

# Phytochemische Untersuchung fermentierter pflanzlicher Extrakte



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Agnès Millet  
aus Conflans-S<sup>te</sup>-Honorine, Frankreich

Mai 2010



Dekan: Prof. Dr. H. Hillebrecht  
Leiterin der Arbeit: Prof. Dr. I. Merfort  
Referentin: Prof. Dr. I. Merfort  
Korreferent: Prof. Dr. F. Stintzing  
Drittprüfer: Prof. Dr. A. Bechthold

Tag der Promotion: 7. Juli 2010

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen und Posterpräsentationen veröffentlicht:

#### PUBLIKATIONEN

Millet A., Stintzing F., Merfort I., Validation of a GC-FID method for rapid quantification of nicotine in fermented extracts prepared from *Nicotiana tabacum* fresh leaves and studies of nicotine metabolites, J. Pharm. Biomed. Anal. 49 (2009) 1166-1171.

Millet A., Stintzing F., Merfort I., Flavonol quantification and stability of phenolics in fermented extracts from fresh *Betula pendula* leaves, J. Pharm. Biomed. Anal. (in press; DOI: 10.1016/j.jpba.2010.02.001)

Millet A., Lamy E., Jonas D., Stintzing F., Merfort I., Biological activity of fermented extracts from fresh *Allium cepa* bulbs (Manuskript in Vorbereitung)

#### KURZVORTRÄGE

Millet A., Phytochemische Analyse fermentierter pflanzlicher Extrakte anhand ausgewählter Beispiele, Info-Veranstaltung der Umweltmedizin, Uniklinik Freiburg, Freiburg, Juli 2009

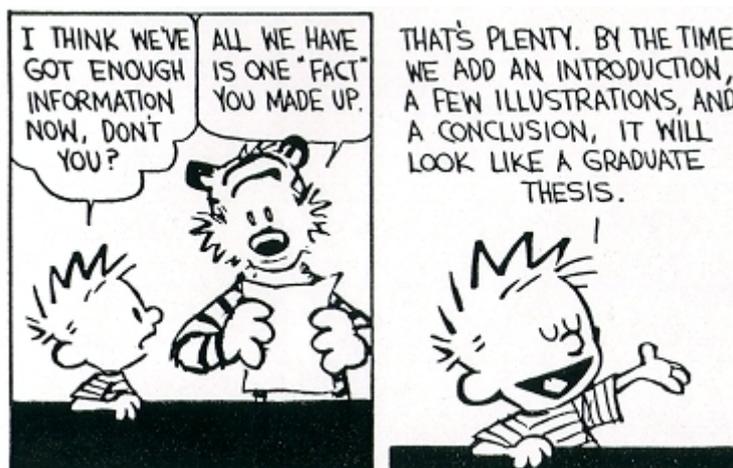
Millet A., Phytochemical analyses of fermented plant extracts, Promovierendenseminar der Pharmazie, Freiburg, Januar 2010

#### POSTERPRÄSENTATION

Millet A., Leger M., Bertrams J., Stintzing F., Merfort I., Quantification and studies on metabolism of flavonol glycosides in fermented extracts from fresh *Betula pendula* leaves. RDPA Congress, 13<sup>th</sup> International Meeting, Mailand, Italien, September 2009

J'ai décidé d'être heureux parce que c'est bon pour la santé.

Voltaire



Bill Watterson



---

<b>A</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b>B</b>	<b><u>ALLGEMEINER TEIL</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b>1.</b>	<b>FERMENTIERTE PFLANZLICHE EXTRAKTE</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>SEKUNDÄRE PFLANZENINHALTSSTOFFE</b>	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>QUALITÄTSPRÜFUNG PFLANZLICHER EXTRAKTE</b>	<b>4</b>
3.1.	ALLGEMEINE ASPEKTE	4
3.2.	QUALITÄTSPRÜFUNG HOMÖOPATHISCHER ZÜBEREITUNGEN	5
3.3.	VALIDIERUNG ANALYTISCHER METHODEN	6
<b>4.</b>	<b>VORSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN ARZNEIPFLANZEN</b>	<b>7</b>
4.1.	ALLIUM CEPA	7
4.1.1.	Inhaltsstoffe	7
4.1.2.	Verwendung	10
4.1.3.	Antibakterielle Aktivität	10
4.1.4.	Analytik	11
4.1.5.	Stabilität der Inhaltsstoffe	11
4.1.6.	Metabolismus der Flavonole	12
4.2.	ARNICA MONTANA	13
4.2.1.	Inhaltsstoffe	13
4.2.2.	Wirkung und Anwendung	14
4.2.3.	Analytik	17
4.2.4.	Stabilität	17
4.3.	BETULA PENDULA	18
4.3.1.	Inhaltsstoffe	18
4.3.2.	Anwendung und Wirkung	19
4.3.3.	Analytik	20
4.3.4.	Stabilität der Flavonole	20
4.3.5.	Metabolismus der Flavonole und der Phenolsäuren	21
4.4.	GENTIANA LUTEA	24
4.4.1.	Inhaltsstoffe	24
4.4.2.	Anwendung und Wirkung	25
4.4.3.	Analytik	26
4.4.4.	Gentiopikrosid Metabolismus	26
4.5.	HYPERICUM PERFORATUM	28
4.5.1.	Inhaltsstoffe	28
4.5.2.	Anwendung und Wirkung	29
4.5.3.	Analytik	29
4.5.4.	Stabilität der Inhaltsstoffe	29
4.5.5.	Metabolismus	30
4.6.	NICOTIANA TABACUM	32
4.6.1.	Inhaltsstoffe	32
4.6.2.	Anwendung und Wirkung	33
4.6.3.	Analytik	33
4.6.4.	Metabolismus von Nikotin	34

<b>C</b>	<b>ZIELSETZUNG.....</b>	<b>35</b>
<b>D</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>37</b>
<b>1.</b>	<b>ALLIUM CEPA</b>	<b>37</b>
1.1.	PHYTOCHEMISCHE ANALYSE .....	37
1.1.1.	HPLC–Methodenentwicklung und Peakzuordnung .....	37
1.1.2.	Vergleich einer fertigen Urtinktur mit zwei selbst hergestellten Extrakten.....	38
1.1.3.	Entstehung von Pyruvat und Methylpyruvat in diesen drei Extrakten.....	39
1.1.4.	Vergleich der fermentierten Extrakte.....	40
1.2.	BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	44
1.2.1.	Mikrobiologische Untersuchungen der fermentierten Extrakte .....	44
1.2.2.	Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität von Zwiebelextrakten .....	45
<b>2.</b>	<b>ARNICA MONTANA</b>	<b>49</b>
2.1.	PHYTOCHEMISCHE ANALYSE .....	49
2.1.1.	GC–MS-Methode .....	49
2.1.2.	Vergleich der fermentierten Extrakte.....	50
2.1.3.	Vergleich mit selbsthergestellten Extrakten.....	52
2.2.	BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	53
2.2.1.	Mikrobiologische Untersuchungen der fermentierten Extrakte .....	53
2.2.2.	Untersuchung auf entzündungshemmende Aktivität .....	53
2.2.3.	Matrix.....	56
<b>3.</b>	<b>BETULA PENDULA</b>	<b>57</b>
3.1.	ENTWICKLUNG EINER HPLC–METHODEN .....	57
3.2.	VALIDIERUNG.....	57
3.2.1.	Spezifität .....	57
3.2.2.	Hyperosid.....	58
3.2.3.	Quercetin .....	62
3.2.4.	Robustheit.....	64
3.2.5.	Systemeignungstests .....	65
3.3.	PHYTOCHEMISCHE ANALYSE .....	66
3.3.1.	Gehaltsbestimmung nach Ph.Eur. und Vergleich mit der HPLC–Methode .....	66
3.3.2.	Erschöpfende Extraktion.....	67
3.3.3.	Gehaltsbestimmung von Flavonoiden in fermentierten Extrakten aus Birkenblätter .....	69
3.3.4.	Vergleich von selbsthergestellten Extrakten nach HAB und Varianten.....	73
3.3.5.	Veränderung der phenolischen Verbindungen in den fermentierten Extrakten .....	74
3.4.	BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	80
3.4.1.	Mikrobiologische Untersuchungen der fermentierten Extrakte .....	80
3.4.2.	Proteinbestimmung .....	81
<b>4.</b>	<b>GENTIANA LUTEA</b>	<b>82</b>
4.1.	ENTWICKLUNG DER HPLC–METHODE .....	82
4.2.	VALIDIERUNG.....	82
4.2.1.	Spezifität .....	82
4.2.2.	Linearität.....	83
4.2.3.	Präzision und Genauigkeit .....	86
4.2.4.	Systemeignungstests .....	87
4.3.	PHYTOCHEMISCHE ANALYSEN .....	88
4.3.1.	Erschöpfende Extraktion.....	88
4.3.2.	Gehaltbestimmung in fermentierten Extrakten .....	89

---

4.3.3.	Umbauprozesse in den fermentierten Extrakten .....	94
4.3.4.	Vergleich der fermentierten Extrakte nach HAB mit selbsthergestellten Extrakten.....	98
4.3.5.	Ermittlung von Folgeprodukten aus Gentiopikrosid im Laufe der Fermentation .....	103
4.3.6.	Bitterwertbestimmung .....	104
4.4.	MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER FERMENTIERTEN EXTRAKTE .....	105
<b>5.</b>	<b>HYPERICUM PERFORATUM</b> .....	<b>107</b>
5.1.	METHODENENTWICKLUNG UND PEAKZUORDNUNG .....	107
5.2.	VERGLEICH DER FERMENTIERTEN EXTRAKTE .....	108
5.3.	MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER FERMENTIERTEN EXTRAKTE .....	110
<b>6.</b>	<b>NICOTIANA TABACUM</b> .....	<b>111</b>
6.1.	METHODENENTWICKLUNG .....	111
6.1.1.	HPLC–DAD .....	111
6.1.2.	GC–MS.....	113
6.1.3.	GC–FID .....	116
6.2.	VALIDIERUNG DER GC–FID-METHODE .....	116
6.2.1.	Spezifität .....	116
6.2.2.	Linearität .....	117
6.2.3.	Bestimmungsgrenze (LLOQ, lower limit of quantification).....	118
6.2.4.	Präzision .....	119
6.2.5.	Genauigkeit .....	120
6.2.6.	Robustheit.....	121
6.3.	PHYTOCHEMISCHE ANALYSEN .....	121
6.3.1.	Erschöpfende Extraktion.....	121
6.3.2.	Gehaltsbestimmung von Nikotin in fermentierten Extrakten .....	124
6.3.3.	Umsetzung von Nikotin in den fermentierten Extrakten .....	125
6.4.	MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER FERMENTIERTEN EXTRAKTE .....	127
<b>E</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....</u></b>	<b><u>129</u></b>
<b>F</b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>135</u></b>
<b>1.</b>	<b>ALLGEMEIN</b> .....	<b>135</b>
<b>2.</b>	<b>ALLIUM CEPA</b> .....	<b>136</b>
<b>3.</b>	<b>ARNICA MONTANA</b> .....	<b>139</b>
<b>4.</b>	<b>BETULA PENDULA</b> .....	<b>140</b>
<b>5.</b>	<b>GENTIANA LUTEA</b> .....	<b>143</b>
<b>6.</b>	<b>HYPERICUM PERFORATUM</b> .....	<b>145</b>
<b>7.</b>	<b>NICOTIANA TABACUM</b> .....	<b>146</b>
<b>G</b>	<b><u>EXPERIMENTELLER TEIL.....</u></b>	<b><u>149</u></b>
<b>1.</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>149</b>
1.1.	HERKUNFT DES UNTERSUCHTEN PFLANZENMATERIALS .....	149
1.2.	FERMENTIERTE WÄSSRIGE EXTRAKTE.....	149
1.3.	CHEMIKALIEN.....	151
1.4.	REFERENZSUBSTANZEN .....	152

1.5.	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	153
1.6.	GERÄTE .....	153
1.7.	COMPUTERPROGRAMME .....	154
<b>2.</b>	<b>PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN</b> .....	<b>155</b>
2.1.	INSTRUMENTELLE ANALYTIK .....	155
2.1.1.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	155
2.1.2.	Gaschromatographie .....	157
2.2.	ANDERE CHROMATOGRAPHISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE VERFAHREN .....	158
2.2.1.	Säulenchromatographie .....	158
2.2.2.	Niederdruckflüssigkeitschromatographie (Lobar) .....	158
2.2.3.	Fraktionierung .....	159
2.2.4.	Dünnschichtchromatographie (DC) .....	159
2.2.5.	NMR-Spektroskopie .....	160
2.2.6.	Massenspektrometrie .....	160
2.2.7.	UV-Spektroskopie .....	161
2.3.	METHODENVALIDIERUNG .....	161
2.3.1.	Linearität .....	161
2.3.2.	Detektionsgrenze (LOD, limit of detection) .....	161
2.3.3.	Bestimmungsgrenze (LLOQ, lower limit of quantification) .....	161
2.3.4.	Präzision .....	161
2.3.5.	Richtigkeit .....	162
2.4.	<i>ALLIUM CEPA</i> L. ....	162
2.4.1.	Extrakte .....	162
2.4.2.	Probenaufarbeitung zur GC–MS-Analyse .....	163
2.4.3.	Pyruvatbestimmung .....	163
2.5.	<i>ARNICA MONTANA</i> .....	164
2.5.1.	Extrakte .....	164
2.5.2.	Aufarbeitung der Extrakte nach Willuhn und Leven .....	164
2.5.3.	Ermittlung des Gehalts an Sesquiterpenlactonen .....	165
2.6.	<i>BETULA PENDULA</i> .....	165
2.6.1.	Extrakte .....	165
2.6.2.	Aufarbeitung der fermentierten Extrakte zur GC–MS Analyse .....	167
2.6.3.	Gehaltsbestimmung von Flavonoiden nach Ph.Eur. ....	168
2.6.4.	Isolierung von 3,4'-Dihydroxypropiofenon aus einem fermentierten Extrakt .....	168
2.6.5.	Entwicklung und Validierung einer HPLC–Methode .....	169
2.6.6.	Analytische Daten zu den Abbauprodukten in den fermentierten Extrakten .....	170
2.7.	<i>GENTIANA LUTEA</i> .....	171
2.7.1.	Extrakte .....	171
2.7.2.	Bitterwertbestimmung .....	173
2.7.3.	Isolierung von Gentisin .....	174
2.7.4.	Isolierung von Gentiopikrosid .....	179
2.7.5.	Isolierung des Peaks P3 durch Fraktionierung einer Urtinktur mittels RP-18 Lobar- Chromatographie .....	183
2.7.6.	Versuch zur Methylierung von E2 aus P3 .....	184
2.7.7.	Entwicklung und Validierung einer HPLC–Methode .....	184
2.8.	<i>HYPERICUM PERFORATUM</i> .....	185
2.8.1.	Extrakte .....	185
2.8.2.	Aufarbeitung der fermentierten Extrakte zur Anreicherung von Naphthodianthronen und Phloroglucinolen .....	185
2.9.	<i>NICOTIANA TABACUM</i> .....	185

---

2.9.1. Extrakte .....	185
2.9.2. Probenaufarbeitung zur Analyse von Minorverbindungen mittels GC–MS .....	187
2.9.3. Entwicklung und Validierung einer GC–FID Methode .....	187
<b>3. BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN</b> .....	<b>189</b>
3.1. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER FERMENTIERTEN EXTRAKTE .....	189
3.2. BESTIMMUNG DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON ZWIEBELEXTRAKTEN .....	189
3.2.1. Agardiffusionstest .....	190
3.2.2. Bakterienwachstumskinetik .....	190
3.3. BESTIMMUNG DER WIRKUNG DER ARNIKAEXTRAKTE AUF DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR NF- $\kappa$ B .....	190
3.3.1. Material .....	190
3.3.2. Prinzip .....	191
3.3.3. Zellkultur .....	192
3.3.4. Herstellung der Testlösungen .....	193
3.3.5. Proteinextrakte .....	193
3.3.6. Herstellung der DNA-Sonden .....	193
3.3.7. Durchführung des EMSA .....	194
3.4. BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION .....	195
<b><u>H LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>197</u></b>
<b><u>I ANHANG .....</u></b>	<b><u>211</u></b>
1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	211
2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	212
3. TABELLENVERZEICHNIS .....	217
4. ZUSÄTZLICHE DATEN .....	220
<b><u>J ABSTRACT IN ENGLISH .....</u></b>	<b><u>223</u></b>
<b><u>K RESUME EN FRANÇAIS .....</u></b>	<b><u>229</u></b>
<b><u>L DANKSAGUNG – ACKNOWLEDGMENT – REMERCIEMENTS .....</u></b>	<b><u>235</u></b>
<b><u>M LEBENSLAUF .....</u></b>	<b><u>239</u></b>



## A Einleitung

Aufgrund ihrer therapeutischen oder prophylaktischen Wirkungen sind Pflanzenextrakte wesentliche Bestandteile einer großen Zahl von Arzneimitteln. Viele Pflanzen sind seit Jahrhunderten oder sogar Jahrtausenden in der Volksmedizin gebräuchlich. Allerdings ist nur für wenige Pflanzenextrakte deren Wirksamkeit durch klinische Studien belegt. Nach wie vor besitzen aber pflanzliche Arzneimittel einen hohen Stellenwert in der Bevölkerung.

Arzneipräparate auf pflanzlicher Basis bestehen aus einer oder mehreren pflanzlichen Zubereitungen. Sie sind in verschiedenen Formulierungen verfügbar, z. B. als Tee, Kapseln oder Tabletten. Während die Art der Formulierung in der Regel zur Stabilität des Arzneimittels beiträgt, basiert die Wirkung des Produktes auf der in der Heilpflanze enthaltenen Substanzmischung. Dabei ist der gesamte Pflanzenextrakt der sogenannte Wirkstoff. Das bedeutet, dass nicht eine bestimmte Substanz, sondern mehrere Inhaltsstoffe für die Wirksamkeit verantwortlich sind.

Die phytochemische Zusammensetzung eines Extraktes kann je nach Herkunft, Anbaubedingungen, Erntezeit, Pflanzenteil, aber auch Lagerungs- (Dauer, Temperatur) und Extraktionsbedingungen (Methode, Lösungsmittel, Temperatur, Dauer) hoch variabel sein. Die Stabilität des Extraktes hängt sowohl von dessen mikrobiologischen Status als auch von dessen Inhaltsstoffzusammensetzung ab. Beide sind wiederum vom pflanzlichen Anfangsmaterial und vom Herstellungsprozess abhängig.

Überwiegend werden Phytopharmaka aus getrockneten Pflanzenteilen hergestellt, in der Homöopathie sowie der anthroposophischen Medizin hingegen in der Regel aus frischem Pflanzenmaterial, das zum Teil einem Fermentationsprozess nach dem Homöopathischen Arzneibuch<sup>1</sup> unterzogen wird. Vergleichbare Fermentationsprozesse werden in vielen Bereichen der Lebensmittelverarbeitung und Biotechnologie angewandt, um eine Haltbarkeitsverbesserung bzw. Stoffumwandlungen herbeizuführen.

---

<sup>1</sup> HAB (2009b)



## B Allgemeiner Teil

### 1. Fermentierte pflanzliche Extrakte

Die in dieser Arbeit untersuchten fermentierten pflanzlichen Extrakte werden nach speziellen Verfahren hergestellt, die den Anforderungen des Homöopathischen Arzneibuches (HAB) entsprechen.<sup>2</sup> Bei den Verfahren 33 und 34 des HAB werden Pflanzen zerrieben, mit Wasser und Molke (bzw. Laktose und Honig) versetzt und schließlich in einem Wechsel zwischen Wärme und Kälte, Licht und Dunkelheit sowie Ruhe und Bewegung, einer Fermentation unterzogen. Das Pflanzenmaterial wird abgepresst und anschließend einer Nachreifung unterzogen (s. Absatz G1.2). Das Ergebnis ist ein ohne zusätzliche Konservierungsmittel haltbarer, wässriger Auszug aus dem Pflanzenmaterial – die sog. Urtinktur, die zu verschiedenen Arzneimitteln weiterverarbeitet wird.<sup>3</sup> Der Einfluss der Fermentation auf das Inhaltsstoffmuster der eingesetzten Pflanzen ist allerdings bisher kaum untersucht worden.

Diese Wechsel im Laufe der Fermentation sind wesentlicher Bestandteil der Herstellung fermentierter Extrakte nach HAB. Dieses Prinzip wurde erstmals von Dr. Hauschka mit frisch gepflückten Rosenblüten im Mai 1929 getestet. Dabei beobachtete er, dass die Blütenblätter langsam lösten und ihre Farbe und ihren Duft an den Extrakt abgaben, während die Kontrolle ohne Wechsel von Temperatur, Licht und ohne Umrühren nach drei Tagen verschimmelte. Dieser erste Rosenextrakt hielt sich fast 30 Jahre lang.<sup>4</sup>

Einige fermentierte Extrakte (wie z. B. Birkenblätter- und Zwiebelextrakte) werden mit Molke<sup>5</sup> nach der HAB Vorschrift 34<sup>6</sup> hergestellt. Molke ist sehr reich an Milchsäurebakterien, wodurch das Wachstum der Wildflora als auch pathogener Keime in den wässrigen Extrakten verhindert wird. Schließlich entstehen mikrobiologisch stabile Extrakte, mit einem pH-Wert unter 4.5.<sup>7</sup>

---

<sup>2</sup> HAB (2009b)

<sup>3</sup> WALA (2009)

<sup>4</sup> Hauschka (2004)

<sup>5</sup> HAB (2009a)

<sup>6</sup> HAB 34 (2003)

<sup>7</sup> Settanni & Corsetti (2008)

## 2. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Sekundäre Pflanzenstoffe gehen nicht aus dem Grundstoffwechsel der Pflanze hervor. Während letzterer für jede Lebensform essentiell ist, drücken sich im Sekundärstoffwechsel Unterschiede zwischen den Spezies als auch Standortanpassungen aus. Die chemischen Strukturen sind dabei vielfältig und die Bildung u. a. auch abhängig vom Stadium der Pflanzenentwicklung. Demzufolge sind es sekundäre Inhaltsstoffe, die den Pflanzen ihre jeweiligen Identitätsmerkmale verleihen.<sup>8</sup> Viele Komponenten dienen als chemische Abwehr gegenüber Fraßfeinden, wie die bitter schmeckenden Secoiridoide des Enzians, die schwerverdaulichen Gerbstoffe von Bäumen<sup>9</sup> oder die insektiziden Alkaloide der Tabakpflanze<sup>8</sup>. Andere werden vermehrt unter Stressbedingungen produziert, z. B. nach Schädlingsbefall<sup>9</sup> oder UV-Bestrahlung<sup>10</sup>. Sekundäre Pflanzenstoffe weisen vielfältige biologische Wirkungen auf, weshalb zahlreiche Pflanzen als Grundlage für Arzneimittel sowie die Phytotherapie verwendet werden. Es sind auch die sekundären Metaboliten, die entweder als aktive Substanzen oder generell als Leitsubstanzen für die Qualitätssicherung von Pflanzenextrakten verwendet werden.

## 3. Qualitätsprüfung pflanzlicher Extrakte

### 3.1. Allgemeine Aspekte

Leitsubstanzen oder Marker sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die stellvertretend für die Qualitätsbewertung eines komplexen Inhaltsstoffprofils geprüft werden. Vorzugsweise werden hierzu Komponenten gewählt, die analytisch einfach nachzuweisen sind, die wirksamkeitsbestimmend sind und die für die Identitäts-, Reinheits- und Gehaltsbestimmungen relevant sind.

Identitätsprüfungen werden vor allem mittels Dünnschichtchromatographie (DC) durchgeführt, da es sich um eine schnelle und wenig aufwändige Methode handelt, aber auch mittels Hochleistungsflüssigkeits- (HPLC) und Gaschromatographie (GC). Als Vergleich

---

<sup>8</sup> Hänsel & Sticher (2004)

<sup>9</sup> Harborne & Williams (2000)

<sup>10</sup> Julkunen-Tiitto et al. (2005); Keski-Saari et al. (2005); Peltonen et al. (2005)

dienen entweder offiziell anerkannte Monographien oder eine authentische Probe. Dabei liegt allen Methoden das gleiche Prinzip zugrunde: Das erhaltene Chromatogramm stellt einen für den jeweiligen Extrakt spezifischen Fingerprint dar.

Für die Reinheitsbestimmungen können die gleichen Methoden wie für die Identitätsprüfung verwendet werden, sofern sie geeignet sind, Verunreinigungen zu detektieren.

Zusätzlich müssen die Gehalte an toxischen Schwermetallen (wie beispielsweise Blei, Cadmium und Quecksilber) geprüft werden. Hierfür werden im Europäischen Arzneibuch (Ph.Eur.) verschiedene Methoden zur Grenzprüfung angegeben. Außerdem müssen Pestizidrückstände wegen ihrer möglichen Toxizität quantifiziert werden. Diese Prüfungen werden bereits an der Droge durchgeführt, bevor diese zur weiteren Verarbeitung gelangt.

Weiterhin sind mikrobiologische Prüfungen vorgeschrieben, um sicherzustellen, dass keine Krankheitserreger enthalten und die Extrakte mikrobiologisch stabil sind. Dafür wird die Gesamtkeimzahl erfaßt und mögliche pathogene Keime spezifisch nachgewiesen. Zur Keimartbestimmung werden spezielle Nährböden verwendet, um die fraglichen Keime anzureichen.

Zur Gehaltsbestimmung der für den jeweiligen Extrakt spezifischen Leitsubstanzen werden wiederum die gleichen Methoden wie für die Identitäts- und Reinheitsprüfungen verwendet. Hierfür muss die gewählte Methode spezifisch genug sein, um die gewünschte Substanz mit hinreichender Genauigkeit und Empfindlichkeit quantifizieren zu können.

Schließlich müssen die Haltbarkeit sowie die Stabilität während der Lagerung geprüft werden. Die möglichen Änderungen können organoleptisch, physikalisch, chemisch und mikrobiologisch festgestellt werden.<sup>11</sup>

### **3.2. Qualitätsprüfung homöopathischer Zubereitungen**

Die Qualität homöopathischer Urtinkturen ist traditionell durch die Definition der Abgangsdroge und die Erläuterung der individuellen Herstellungsverfahren gewährleistet.<sup>12</sup>

Das Hauptmerkmal homöopathischer Urtinkturen ist, dass sie in der Regel aus frischem

---

<sup>11</sup> Hänsel & Sticher (2004)

<sup>12</sup> Biber et al. (2009)

Pflanzenmaterial hergestellt werden. Zur gewöhnlichen Qualitätsprüfung gehören Aussehen, Geruch und DC-Analyse für die Identitätsprüfung sowie Dichte, Trockengewicht und pH-Wert für die Reinheitsprüfung.<sup>13</sup> Das Trockengewicht wird als Basis gesehen, um eine Abschätzung des „gesamten aktiven Wirkprinzips“ zu haben.<sup>12</sup> Identitätsprüfungen werden generell mittels DC durchgeführt. Die DC-Fingerprints verschiedener Urtinkturchargen können signifikante Unterschiede aufweisen, die auf natürliche Inhaltsstoffschwankungen zurückgeführt werden können, die ihrerseits jahrgangs- oder herkunftsbedingt sind. Es ist daher erstrebenswert, zusätzlich quantitative Angaben von Leitsubstanzen zu haben, wie es üblicherweise für pflanzliche Arzneimittel der Fall ist. Allerdings sind solche Leitsubstanzen für Extrakte definiert worden, die aus getrockneter Droge stammen. Diese sind nicht ohne weiteres auf wässrige fermentierte Extrakte anwendbar, da sowohl die selektive Extraktion als auch die Fermentation hierbei unberücksichtigt sind.

### 3.3. Validierung analytischer Methoden

Analytische Methoden zur Gehaltsbestimmung aktiver Substanzen bzw. Leitsubstanzen müssen spezifisch und gleichzeitig robust sein, um jederzeit unabhängig von der durchführenden Person und Ort reproduzierbare Ergebnissen zu erhalten. Um in der Qualitätskontrolle und im Zuge von Stabilitätsprüfungen eingesetzt werden zu können, werden Methoden daher validiert. Früher war der Ablauf einer Methodvalidierung eine Frage der eigenen Sorgfalt. Die ersten Richtlinien für die Validierung chromatographischer Methoden wurden 1993 von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) publiziert.<sup>14</sup> Später wurden die ländereigenen Richtlinien durch Experten aus der EU, der USA und Japan, durch die Gründung der *International Conference on Harmonization* (ICH) of *technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use* (ICH Q2A und Q2B) harmonisiert.<sup>15</sup> Die daraus hervorgegangenen Richtlinien sind heute Teil der Richtlinien der Guten Herstellungspraxis (GMP, *Good Manufacturing Practice*).<sup>16</sup>

---

<sup>13</sup> Europäisches Arzneibuch (2008d); HAB (2009b)

<sup>14</sup> US FDA (1994)

<sup>15</sup> ICH-Q2A (1995); ICH-Q2B (1996)

<sup>16</sup> Adam & Becker (2000); Chandran & Singh (2007)

## 4. Vorstellung der untersuchten Arzneipflanzen

### 4.1. *Allium cepa*



**Abb. B-1** Gelbe Zwiebel (*Allium cepa* L.)

Die Zwiebel wird heutzutage in vielen Regionen der Welt angebaut. Sie stammt wahrscheinlich aus Mittelasien, allerdings ist keine Wildform von *Allium cepa* bekannt. Zwiebeln können vielfältige Formen, Farben, Trockengewicht sowie Schärfe und Süße zeigen, je nach Anbaugebiet und Varietät.<sup>17</sup> Der Schwerpunkt liegt im Folgenden auf der gelben Küchenzwiebel.

#### 4.1.1. Inhaltsstoffe

Die am besten untersuchten Inhaltsstoffe der Zwiebel (*Allium cepa* L.) sind die Flavonoide und die organischen Schwefelverbindungen. Darauf soll in den nächsten Absätzen weiter eingegangen werden. Zwiebeln enthalten zusätzlich Phenolsäuren (Chlorogen-, Ferula-, Gallus- und Protocatechusäure), organische Säuren (0.5 % Frischgewicht<sup>18</sup>), Fettsäuren (0.15 % Trockengewicht, davon vor allem Linol-, Palm-, Öl- und  $\alpha$ -Linolensäure; insgesamt wurden 43 verschiedene Fettsäuren detektiert)<sup>19</sup>, Kohlenhydrate (3–5 % Frischgewicht, davon vor allem Fruktan, sonst Glucose, Fructose und Saccharose)<sup>20</sup> sowie freie Aminosäuren (vor allem Glutamin und Arginin)<sup>21</sup>. Es wurden ebenfalls verschiedene Saponine aus Zwiebeln isoliert.<sup>22</sup>

---

<sup>17</sup> Griffiths et al. (2002)

<sup>18</sup> Rodriguez Galdon et al. (2008)

<sup>19</sup> Tsiaganis et al. (2009)

<sup>20</sup> Rodriguez Galdon et al. (2009)

<sup>21</sup> Lee et al. (2009)

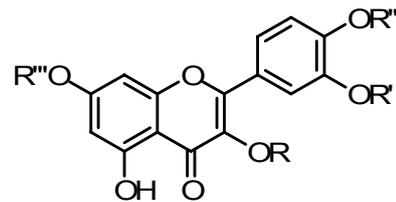
<sup>22</sup> Corea et al. (2005); Smoczkiewicz et al. (1982)

## a) Flavonoide

Zwiebelknollen sind eine der reichsten Nahrungsquellen an Flavonoiden.<sup>23</sup> Je nach Sorte und Farbe sind die Flavonoid-Mengen und der Flavonoidtyp unterschiedlich. Pigmente der roten Zwiebeln sind Anthocyane, die der gelben Zwiebeln Flavonole. Frische gelbe Zwiebeln enthalten 270–1187 mg/kg Flavonole. Dabei sind die Hauptflavonole Quercetin und dessen Glucoside (Tab. B-1), vor allem Quercetin 4'- $\beta$ -glucosid (50–1300 mg/kg), Quercetin 3,4'- $\beta$ -glucosid (36–394 mg/kg Frischgewicht) und Quercetin 3- $\beta$ -glucosid (>1% des Flavonolgehaltes).<sup>24</sup> In geringer Menge kommen auch Quercetin 3,7,4'-triglucosid, Isorhamnetin 4'-glucosid und Isorhamnetin 3,4'-diglucosid vor (Tab. B-1).<sup>25</sup>

**Tab. B-1** Flavonolglykoside der Zwiebel (Glc: Glucosid)

Flavonol \ Substitution	R	R'	R''	R'''
Quercetin	H	H	H	H
Quercetin 3-glucosid	Glc	H	H	H
Quercetin 4'-glucosid	H	Glc	H	H
Quercetin 7,4'-diglucosid	H	Glc	H	Glc
Quercetin 3,4'-diglucosid	Glc	Glc	H	H
Quercetin 3,7,4'-triglucosid	Glc	Glc	H	Glc
Isorhamnetin 4'-glucosid	H	Glc	Me	H
Isorhamnetin 3,4'-diglucosid	Glc	Glc	Me	H



## b) Schwefelverbindungen

Getrocknete Zwiebeln enthalten 1–5 % nicht proteinogene schwefelhaltige Aminosäuren.<sup>26</sup> Die zwei wichtigsten in *Allium cepa* sind Methiin (*S*-Methylcystein *S*-oxid) und Isoalliin ((*E*)-*S*-Propenyl)-cystein *S*-oxid), mit Konzentrationen von 0.1 bzw. 0.4 mg/g bezogen auf das Frischgewicht. Spuren von Propiin und Ethiin (*S*-Propylcystein- bzw. *S*-Ethylcystein *S*-oxid) wurden ebenfalls nachgewiesen.<sup>27</sup> Wenn Zwiebeln geschnitten oder beschädigt werden, wird die Zellstruktur zerstört und die *S*-Cysteinderivate kommen in Kontakt mit dem Enzym

<sup>23</sup> Nemeth & Piskula (2007)

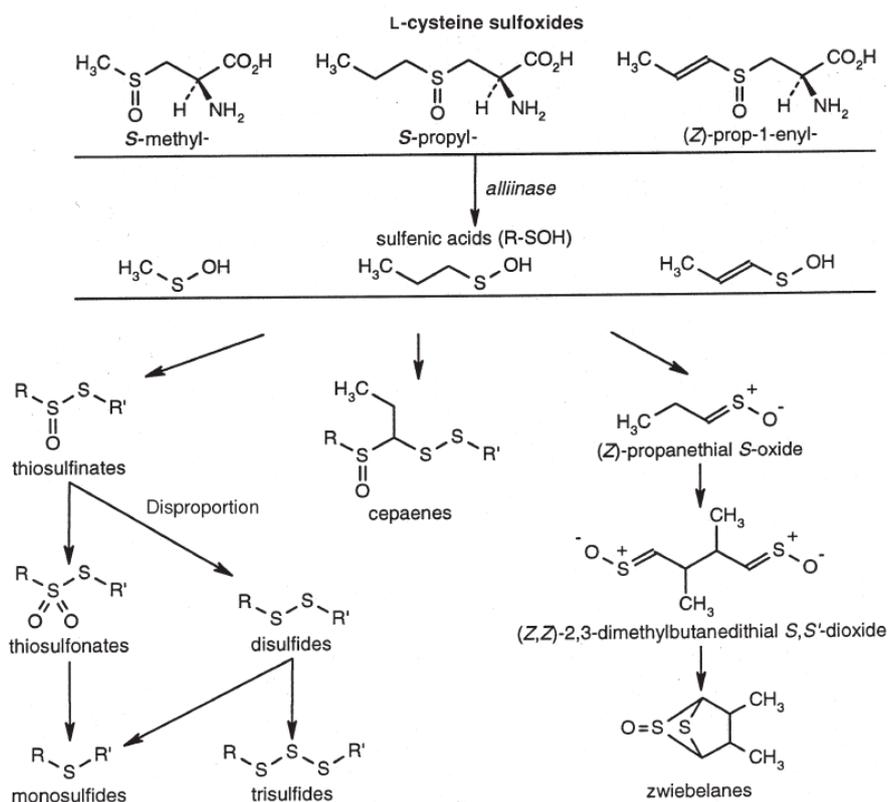
<sup>24</sup> Slimestad et al. (2007)

<sup>25</sup> Bonaccorsi et al. (2005)

<sup>26</sup> Block (1992c)

<sup>27</sup> Kubec & Dadakova (2009)

Alliinase. Dabei entstehen Sulfensäuren und Dehydroalanin.<sup>28</sup> Beide Moleküle sind äußerst instabil. Letzteres reagiert weiter zu Pyruvat und Ammoniak, während die Sulfensäuren sich in über 50 sehr unterschiedliche Schwefelderivate zersetzt (Abb. B-2). Diese Derivate sind meist sehr flüchtig und geben der Zwiebeln ihren charakteristischen Geruch. Das Thiopropanal S-oxid (=Z)-Propanethial S-oxid) ist auch als „tränenreizender Faktor“ bekannt.<sup>29</sup> Es wird durch eine „Tränenfaktor-Synthase“ aus dem 1-Propenylsulfensäure (Abb. B-2, zweite Linie, rechts) gebildet.<sup>30</sup> Die Schärfe der Zwiebeln kommt aus den schwefelhaltigen Verbindungen. Der Pyruvatgehalt, der mit der ursprünglichen Menge an S-Cysteinderivaten in Beziehung steht, korreliert dabei auch mit der gesamten Menge an organischen Schwefelverbindungen und somit mit der Zwiebelschärfe. Demzufolge kann die Schärfe durch den Pyruvatgehalt bestimmt werden.<sup>28</sup>



**Abb. B-2** Genuine Cysteinsulfoxide der Zwiebel und deren Abbauprodukte<sup>31</sup>

<sup>28</sup> Schwimmer & Weston (1961)

<sup>29</sup> Block (1992c)

<sup>30</sup> Imai et al. (2002)

<sup>31</sup> entnommen aus WHO (1999)

#### 4.1.2. Verwendung

Die Zwiebel ist weltweit einer der wichtigsten Kochzutaten.<sup>32</sup> Sie wird aber auch in der Volksmedizin seit mindestens dreitausend Jahren verwendet<sup>33</sup>, um verschiedene Beschwerden wie Verdauungsprobleme<sup>34</sup>, Asthma oder epidemische Krankheiten<sup>33</sup> zu behandeln. Übersichtsarbeiten berichten über antioxidative und antikarzinogene Wirkung, aber auch über den positiven Effekt auf das Herzkreislauf- und Atmungssystem.<sup>35</sup> So zeigte ein Chloroformextrakt eines Zwiebelsafts sowie die daraus isolierten ungesättigten Thiosulfinate eine antiasthmatische Wirkung *in vivo*.<sup>36</sup> Antibakterielle Wirkungen wurden ebenfalls beobachtet. Auf Letztere soll im nächsten Absatz eingegangen werden. Die meisten biologischen Aktivitäten der Zwiebeln sind auf die Metaboliten der S-Cystein-Sulfoxide<sup>37</sup> und die Flavonoide<sup>38</sup> zurückzuführen.

#### 4.1.3. Antibakterielle Aktivität

Die antibakterielle Wirkung der *Allium cepa* ist vor allem durch die organischen Sulfoxide bedingt<sup>38</sup>, obwohl auch einige Oxidationsprodukte von Quercetin eine solche Aktivität zeigen.<sup>39</sup> Frühere Berichte über antibiotische Eigenschaften frischer Zwiebelrohextrakte weisen generell auf eine mäßige Aktivität gegenüber gramnegativen sowie -positiven Bakterien hin.<sup>40</sup> Indu et al. konnten hingegen überhaupt keine Hemmung der getesteten Stämme (gramnegative und -positive) finden.<sup>41</sup> Elnima et al. beobachteten mit einem wässrigen Extrakt aus frischen Zwiebeln bei grampositiven Stämmen eine höhere Aktivität als bei gramnegativen Bakterien.<sup>42</sup> Ein ähnliches Ergebnis berichten Santas et al. nach destillativer Entfernung des Methanols von einem mit 75 %–Methanol erhaltenen Extrakt aus gefriergetrockneten Zwiebeln. Die Autoren stellten ähnliche Effekte mit reinem Quercetin fest.<sup>43</sup> Andere Autoren berichten über eine stärkere Wirkung der Zwiebeln, z. B.

---

<sup>32</sup> Griffiths et al. (2002)

<sup>33</sup> Lanzotti (2006)

<sup>34</sup> Platel & Srinivasan (2001)

<sup>35</sup> Corzo-Martinez et al. (2007); Griffiths et al. (2002); Lanzotti (2006); Rose et al. (2005)

<sup>36</sup> Bayer et al. (1988)

<sup>37</sup> Rose et al. (2005)

<sup>38</sup> Griffiths et al. (2002)

<sup>39</sup> Ramos et al. (2006)

<sup>40</sup> Abdou et al. (1972); Hughes & Lawson (1991); Srinivasan et al. (2001)

<sup>41</sup> Indu et al. (2006)

<sup>42</sup> Elnima et al. (1983)

<sup>43</sup> Santas et al. (2010)

durch eine vollständige Hemmung von Staphylokokken durch einen 4 %igen wässrigen Zwiebelextrakt<sup>44</sup> oder eine bakterizide Wirkung von Zwiebeln gegen Streptokokken (hierbei keine Angaben zur Extraktionsart).<sup>45</sup>

#### 4.1.4. Analytik

Die Flavonoide werden vorwiegend mittels HPLC analysiert. Hierzu werden RP-Säulen (v. a. C18) mit Gradienten aus Wasser und Methanol oder Acetonitril verwendet.<sup>46</sup> In den letzten 15 Jahren wurden 70 % der jetzt bekannten Strukturen identifiziert, vor allem mittels MS und NMR.<sup>47</sup>

Die S-Cysteinsulfoxide sind zu instabil, um ohne spezielle Aufarbeitung chromatographisch erfaßt werden zu können. Die aktuellsten Methoden verwenden vor allem HPLC, aber auch GC oder Kapillarelektrophorese (CE), mit vorheriger Derivatisierung der fraglichen Moleküle. Typischerweise werden Extrakte mit Dansylchlorid oder Phenylisothiocyanat derivatisiert.<sup>48</sup> Thiosulfinsäuren, die wesentlichen organischen Schwefelverbindungen in Zwiebelextrakten, werden mittels HPLC und GC analysiert, letztere allerdings unter Kryo-Bedingungen (Injektion bei 0°C), weil diese Substanzen bei höheren Temperaturen stark labil sind. Die besten Ergebnisse wurden jedoch mittels HPLC erzielt. Die detektierten Thiosulfinsäuren wurden mittels UV- und MS-Detektion identifiziert.<sup>49</sup> Flüchtige Verbindungen, wie der tränentreibende Faktor, konnten nach Festphasen-Mikroextraktion mittels GC-MS erfaßt werden.<sup>50</sup>

#### 4.1.5. Stabilität der Inhaltsstoffe

Die Stabilität der Zwiebelinhaltsstoffe wurde vorwiegend unter Hitzeeinfluß untersucht, wie z.B. durch Kochen oder Braten. Dagegen existieren wenige Angaben über deren Stabilität in wässrigen Extrakten. Bekannt ist dennoch, dass S-Cysteinderivate und Thiosulfinate in reinem Wasser schlechter extrahiert werden und instabiler sind. Deswegen werden sie mit

---

<sup>44</sup> Al Delaimy & Ali (1970)

<sup>45</sup> Kim et al., zitiert von Griffiths et al. (2002); Rose et al. (2005)

<sup>46</sup> Bonaccorsi et al. (2008); Vagen & Slimestad (2008)

<sup>47</sup> Bonaccorsi et al. (2008); Slimestad et al. (2007)

<sup>48</sup> Kubec & Dadakova (2009)

<sup>49</sup> Block (1992b); Block (1992a)

<sup>50</sup> Mondy et al. (2001); Mondy et al. (2002)

wässrigem Ethanol oder Methanol (70–90 %) gewonnen.<sup>51</sup> Ein hoher Anteil an Alkohol dient zusätzlich der Hemmung des Enzyms Alliinase.

Beim Kochen von Zwiebeln bei verschiedenen pH-Werten zeigt sich eine strukturabhängige Stabilität der Flavonole. Alle Flavonole sind bei tieferen pH-Werten stabiler, wobei die Quercetin Diglucoside am stabilsten sind, gefolgt von den Monoglucoside und dem Aglykon.<sup>52</sup> Interessanterweise reagieren die Flavonole anders bei einer 24 h Autolyse der klein geschnittenen Zwiebeln: Die Majorkomponente, das Quercetin 2,4'-Diglucosid, wird abgebaut, während das Aglykon und das Monoglykosid entstehen. Ab einer etwa 10 h Autolyse wird das gebildete Aglykon selbst abgebaut.<sup>53</sup>

#### **4.1.6. Metabolismus der Flavonole**

(Siehe B4.3.5)

---

<sup>51</sup> Fujisawa et al. (2008); Kubec & Dadakova (2009)

<sup>52</sup> Buchner (2008)

<sup>53</sup> Price & Rhodes (1997)

## 4.2. *Arnica montana*



Abb. B-3 *Arnica montana* L.

*Arnica montana* L. ist auf den Wiesen Europas weit verbreitet. Inzwischen ist eine Kultivierung der Pflanze möglich.<sup>54</sup>

### 4.2.1. Inhaltsstoffe

*Arnica montana* L. enthält als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe Sesquiterpenlactone (s. B4.2.1.a), daneben Flavonoide und Phenolsäuren (s. b) ätherisches Öl (ca. 0.3 % bis 0.5 % im Kraut), Cumarinderivate sowie Spuren von nicht toxischen Pyrrolizidinalkaloiden (Tussilagin- und Isotussilaginsäure<sup>55</sup>).<sup>56</sup> Das ätherische Öl in den Blüten enthält 45% Fettsäuren, 9 % *n*-Alkane sowie ca. 20 % Thymolderivate und andere Terpene.<sup>57</sup> Während vor allem die getrockneten Blüten untersucht wurden, liegen weit weniger Daten zur Frischpflanze vor.

#### a) Sesquiterpenlactone

Die Sesquiterpenlactone der Arnika sind vom Pseudoguaianolidtyp. Hierbei handelt es sich um Ester von Helenalin und Dihydrohelenalin (Abb. B-4). Es sind zwei Chemotypen der Arnika bekannt, einer aus Mitteleuropa, in dem die Blüten vorwiegend Helenalinester enthalten (H-Isobutyrat, -Methacrylat und 2-Methylbutyrat) und ein weiterer aus Spanien, in

---

<sup>54</sup> HagerROM (2006)

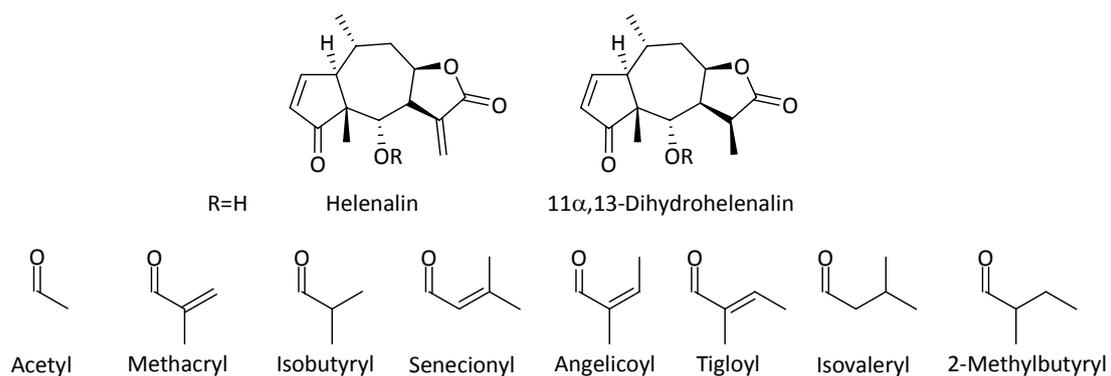
<sup>55</sup> Passreiter (1992)

<sup>56</sup> Hänsel & Sticher (2004); Hiller & Melzig (2005)

<sup>57</sup> Willuhn (1972)

dem fast ausschließlich Dihydrohelenalinderivat vorkommen (DH-Acetat und -Methacrylat). Dennoch wurde vor kurzem auch *Arnica montana* vom mitteleuropäischen Typ in den Heidelandschaften Spaniens gefunden.<sup>58</sup>

Die Frischpflanze enthält überwiegend Dihydrohelenalinderivate. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass junge Arnikapflanzen Helenalinderivate anreichern, deren Gehalt aber ab dem Zeitpunkt der Blätterbildung zugunsten von Dihydrohelenalinderivaten sinkt.<sup>59</sup>



**Abb. B-4** Struktur der Sesquiterpenlactone von *Arnica montana* und deren Esterresten

#### b) Flavonoide und Phenolsäuren

Aus den Blüten wurden über 15 verschiedene Flavonoide isoliert und identifiziert.<sup>60</sup> Hierbei handelt es sich vor allem um Flavonol 3-*O*-β-glucoside<sup>61</sup> sowie 6-methoxylierte Flavone und Flavonole, im Kraut um das Flavon Pectolarigenin.<sup>62</sup> Die überwiegend vorkommenden Phenolsäuren sind Caffeoylchinasäuren, wie Chlorogensäure, 1,5-Di-*O*-Caffeoylchinasäure oder 1,4,5-Tri-*O*-Caffeoylchinasäure.<sup>63</sup>

### 4.2.2. Wirkung und Anwendung

#### a) Wirkung

Es wurden vielfältige pharmakologische Aktivitäten wie antimikrobielle, antiphlogistische, anti-tumorale und analgetische Wirkungen der Arnikablüten nachgewiesen. Die

<sup>58</sup> Perry et al. (2009)

<sup>59</sup> Schmidt et al. (1998)

<sup>60</sup> Merfort & Wendisch (1987); Merfort & Wendisch (1988); Merfort & Wendisch (1992)

<sup>61</sup> Spitaler et al. (2008)

<sup>62</sup> Hiller & Melzig (2005)

<sup>63</sup> Albert et al. (2009); Merfort (1992)

antiseptische Wirkung ist auf die zytotoxische Wirkung der SLs zurückzuführen.<sup>64</sup> Helenalinderivate zeigen eine hohe Reaktivität durch ihre  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigten Carbonylstrukturen im  $\alpha$ -Methylen- $\gamma$ -butyrolactonring sowie im Cyclopentenonring, die einen nukleophilen Angriff durch Michael-Addition ermöglichen.<sup>65</sup> Die entzündungshemmende Wirkung der Arnika sowie deren Sesquiterpenlactone wird nach wie vor vielfach untersucht. Die Sesquiterpenlactone können die DNA–NF- $\kappa$ B–Bindung und somit die Aktivität von NF- $\kappa$ B inhibieren. Der Eingriff der SLs in die NF- $\kappa$ B Kaskade ist in Abb. B-5 vereinfacht dargestellt. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der an vielen biologischen Prozessen beteiligt ist und unter anderem im Entzündungsgeschehen eine sehr wichtige Rolle spielt.<sup>66</sup> NF- $\kappa$ B ist ein dimeres Protein, das in unstimulierten Zellen normalerweise in einer inaktiven Form im Cytosol der Zellen vorliegt. Die Inaktivierung von NF- $\kappa$ B wird durch Bindung an ein Protein, I $\kappa$ B (Inhibitor of  $\kappa$ B), erreicht. Werden die Zellen aktiviert, z. B. durch Cytokine, wird I $\kappa$ B abgebaut (eingeleitet durch Phosphorylierung über den IKK – I $\kappa$ B Kinase-Komplex) und NF- $\kappa$ B kann somit in den Zellkern wandern. Im Zellkern wird NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor aktiv und kann die Expression verschiedener Gene einleiten, z. B. von Genen, die Entzündungsreaktionen auslösen oder daran beteiligt sind (wie z. B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und COX-2<sup>67</sup>). Die SLs aus *Arnica montana* inhibieren die Anlagerung von NF- $\kappa$ B an die DNA (durch Reaktion mit einem Cysteinrest in der DNA-Bindedomäne)<sup>68</sup> und verhindern dadurch die Auslösung der Genexpression, was zur Entzündungshemmung führt.

---

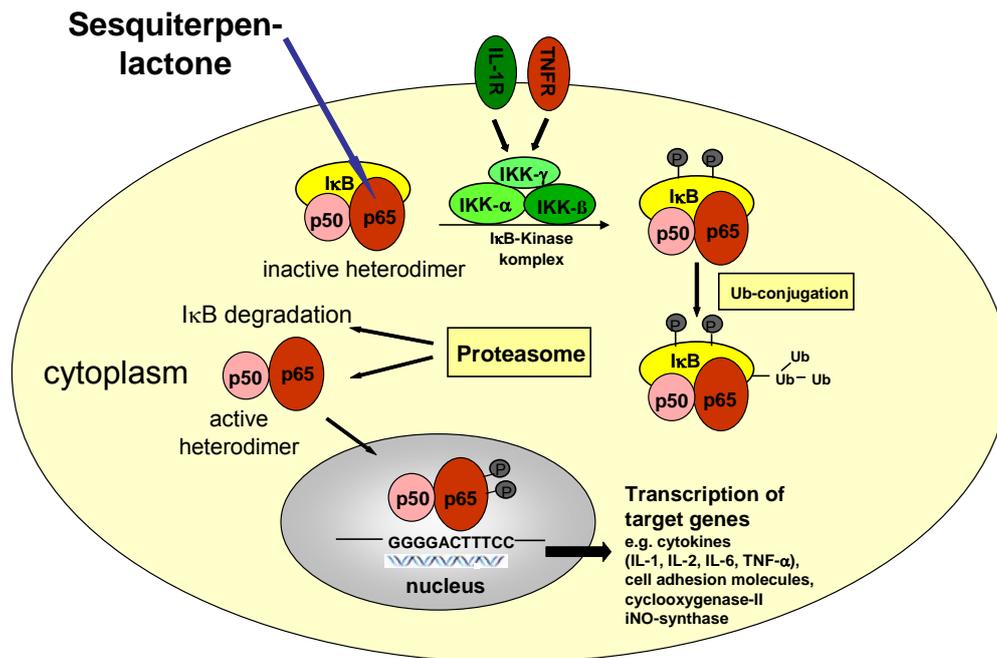
<sup>64</sup> Willuhn (1991)

<sup>65</sup> Willuhn (1987)

<sup>66</sup> Merfort (2003)

<sup>67</sup> Pahl (1999)

<sup>68</sup> Garcia-Pineros et al. (2001); Lyss et al. (1998)



**Abb. B-5** Eingriff von Sesquiterpenlactonen in die NF- $\kappa$ B Kaskade<sup>66</sup> (IL: Interleukin; p: Protein; P: Phosphat; R: Receptor; TNF: Tumornekrosefaktor; Ub: Ubiquinon)

Zusätzlich wurde gezeigt, dass Arnikablütenextrakte besser die Haut penetrieren als reine Helenalinderivate und weniger zytotoxisch sind.<sup>69</sup> Weiterhin wurde kürzlich nachgewiesen, dass Arnikazubereitungen und die darin enthaltenen Sesquiterpenlactone nur schwache Kontaktallergene sind, was ihre gute Verträglichkeit bestätigt. Bisher wurden sie als starke Kontaktallergene klassifiziert.<sup>70</sup>

## b) Anwendung

Zubereitungen aus Arnikablüten werden äußerlich bei verschiedenen Verletzungen und Entzündungen, wie z. B. bei Blutergüssen, Zerrungen, Prellungen, Quetschungen, Frakturödemen, rheumatischen Muskel- und Gelenksbeschwerden sowie nach Insektenstichen verwendet.<sup>71</sup> In diesen Anwendungsgebieten haben Arnikazubereitungen eine positive Beurteilung von der Kommission E (BfArM) und der ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) erhalten. Von der innerlichen Anwendung der Blüten wird wegen ihrer Toxizität abgeraten.<sup>72</sup> Das Kraut dient traditionell als Wundheilmittel und wurde

<sup>69</sup> Wagner et al. (2004)

<sup>70</sup> Lass et al. (2008)

<sup>71</sup> BfArM (1999)

<sup>72</sup> Willuhn & Leven (1981)

früher in der Fieberbehandlung eingesetzt. In der anthroposophischen Therapierichtung wird häufig die gesamte frische Arnikapflanze mit Blüten verwendet.<sup>73</sup>

#### 4.2.3. Analytik

Die Sesquiterpenlactone (SLs) aus Arnika werden generell mit HPLC oder GC analysiert.<sup>74</sup> Vergleichende Gehaltsbestimmungen mit HPLC, GC sowie Spektrophotometrie ergaben ähnliche Ergebnisse.<sup>75</sup> Für die HPLC kommen vorwiegend RP-18 Säulen sowie DAD-Detektoren zum Einsatz.<sup>76</sup> Die Validierung einer solchen Methode wurde publiziert und ermöglicht sogar die gleichzeitige Quantifizierung der Flavonoide und Phenolsäuren; allerdings in der brasilianischen Arnika *Lychnophora ericoides*.<sup>77</sup> Weiterhin werden immer häufiger kombinierte DAD-MS Detektoren eingesetzt.<sup>78</sup> Obwohl GC-Methoden seltener publiziert wurden, liegt eine validierte GC-MS Methode zur Gehaltsbestimmung der SLs vor.<sup>79</sup> Außerdem wurden Trennmethode mittels Mizellar-elektrokinetischer Kapillarchromatographie (MEKC) zur Quantifizierung der Sesquiterpenlactone<sup>80</sup> oder Flavonoide<sup>81</sup> entwickelt. Die Flavonoide der Arnika werden sonst vorwiegend mittels RP-HPLC untersucht, auch hier zum Teil mit zusätzlicher MS-Detektion.<sup>82</sup>

#### 4.2.4. Stabilität

Die Stabilität der SLs in Arnikazubereitungen wurde bisher lediglich in ethanolischen Tinkturen untersucht.<sup>83</sup> Bei der Lagerung der Tinkturen bei verschiedenen Temperaturen korreliert das Ausmaß der Temperaturerhöhung mit dem SL-Abbau und der Bildung von Ethanoladdukten.<sup>84</sup>

---

<sup>73</sup> Hänsel & Sticher (2004); Hiller & Melzig (2005)

<sup>74</sup> Merfort (2002)

<sup>75</sup> Willuhn & Leven (1991)

<sup>76</sup> Douglas et al. (2004)

<sup>77</sup> Gobbo-Neto & Lopes (2008)

<sup>78</sup> Bergonzi et al. (2005); Gobbo-Neto & Lopes (2008)

<sup>79</sup> Wagner & Merfort (2007)

<sup>80</sup> Merfort et al. (1997)

<sup>81</sup> Ganzera et al. (2008)

<sup>82</sup> Albert et al. (2009); Spitaler et al. (2008); Schroder & Merfort (1991)

<sup>83</sup> Kos (2005); Schmidt et al. (2000)

<sup>84</sup> Schmidt et al. (2000)

### 4.3. *Betula pendula*



**Abb. B-6** Blätter der *Betula pendula* Roth.

*Betula pendula* Roth. ist in ganz Europa sowie im gemäßigten Asien verbreitet.<sup>85</sup> In Skandinavien wird sie zudem im Rahmen von Aufforstungsmaßnahmen gepflanzt. Von Bedeutung sind vor allem die Birkenblätter aufgrund ihrer phenolischen Verbindungen sowie die Birkenrinde als Triterpenquelle. In dieser Arbeit wurden lediglich die Birkenblätter untersucht.

#### 4.3.1. Inhaltsstoffe

Die Blätter von *Betula pendula* Roth. enthalten vor allem Flavonoide (2–3 %, auf das Trockengewicht bezogen), besonders Hyperosid und Quercitrin sowie andere Flavonolglykoside (s. Tab. B-2), aber auch die Flavone Apigenin, Acacetin und Luteolin in geringer Menge. Weitere wesentliche phenolische Verbindungen sind Proanthocyanidine (103 mg/g, bezogen auf das Trockengewicht)<sup>86</sup>, 3,4'-Dihydroxypropiofenon 3- $\beta$ -glucosid<sup>87</sup> und Chlorogensäure. Zusätzlich kommen Triterpene vom Dammarantyp<sup>88</sup>, Monoterpenglucoside, wenig ätherisches Öl sowie Salze von Fruchtsäuren (u. a. Kaliumtartrat) und Ascorbinsäure (bis 0.5 %) vor.<sup>89</sup>

---

<sup>85</sup> HagerROM (2006)

<sup>86</sup> Ossipova et al. (2001)

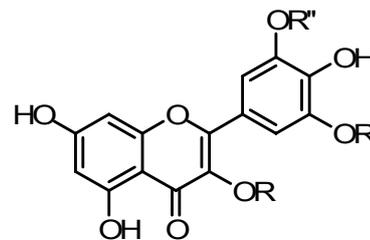
<sup>87</sup> Ossipov et al. (1996)

<sup>88</sup> Hilpisch et al. (1997); Rickling & Glombitza (1993)

<sup>89</sup> Hänsel & Sticher (2004); Hiller & Melzig (2005)

**Tab. B-2** Flavonolglykoside der Birkenblätter (in ihrer üblichen Elutionsreihenfolge bei HPLC-Analysen; Ara(f): Arabinofuranosid, Ara(p): Arabinopyranosid, Gal: Galaktosid, Glc: Glucosid, Glucu: Glucuronid, Glyk: Glykosid, Rha: Rhamnose)

Flavonol \ Substitution	R	R'	R''
Myricetin 3-O-β-galactosid	Gal	OH	OH
Myricetin 3-O-β-glucosid	Glc	OH	OH
Myricetin 3-O-β-glucuronid	Glucu	OH	OH
Rutin	6-O-Rha-Glc	OH	H
Hyperosid	Gal	OH	H
Isoquercitrin	Glc	OH	H
Miquelianin	Glucu	OH	H
Quercetin 3-O-arabinopyranosid*	Ara(p)	OH	H
Kämpferol 3-O-glykosid	Glyk	H	H
Quercetin 3-O-arabinofuranosid*	Ara(f)	OH	H
Quercitrin	Rha	OH	H
Quercetin	H	OH	H



\* α oder β Konfiguration nicht eindeutig, die Literaturstellen mit NMR-Identifizierungen sind widersprüchlich.<sup>90</sup>

#### 4.3.2. Anwendung und Wirkung

Die Birkenblätter werden als Tee zur Durchspülungstherapie bei bakteriellen und entzündlichen Infektionen der ableitenden Harnwege und bei Nierengrieß eingesetzt. Sie werden auch traditionell bei rheumatischen Beschwerden und Gicht angewendet.<sup>91</sup> Allerdings ist unbekannt, ob die Flavonoide oder die Triterpene für die harntreibende Wirkung der Birkenblätter verantwortlich sind.<sup>92</sup>

Quercetin und dessen Glykoside weisen eine Vielfalt an biologischen Wirkungen<sup>93</sup> auf, wie beispielsweise antioxidativ<sup>94</sup>, entzündungshemmend<sup>95</sup> oder tumorhemmend<sup>96</sup>. Die Anwesenheit eines Catecholrestes sowie einer 3-Hydroxygruppe an einer C2-C3 Doppelbindung (wie es bei Flavonolen der Fall ist) erhöhen die Effizienz von Flavonoiden als

<sup>90</sup> Dallenbach-Tölke (1986); Schieber et al. (2002)

<sup>91</sup> Hänsel & Sticher (2004); Hiller & Melzig (2005)

<sup>92</sup> Hänsel & Sticher (2004)

<sup>93</sup> Havsteen (1983)

<sup>94</sup> Pietta (2000)

<sup>95</sup> Garcia-Lafuente et al. (2009)

<sup>96</sup> Aalinkeel et al. (2008); Cui et al. (2008); Seelinger et al. (2008)

Antioxidantien.<sup>97</sup> In den Pflanzen dienen sie auch als UV-Schutz, indem sie Wellenlängen im UV-B Bereich absorbieren (280–315 nm).<sup>98</sup> Daher wurde in einer aktuellen Untersuchung geprüft, inwieweit sich diese als Sonnenschutz eignen. Sowohl Quercetin als auch Rutin zeigten befriedigende Ergebnisse; mit 10 % w/w erlangten sie Platz 9 von 18 im Vergleich zu den zugelassenen UV-Filtern in der EU.<sup>99</sup> Flavonole zeigen auch eine antimikrobielle Wirkung, wie beispielsweise gegen den Tomato ringspot Virus bei *Chenopodium quinoa* mit einer 70 %igen Hemmung der Virusreplikation.<sup>98</sup>

#### 4.3.3. Analytik

Die Flavonole und andere phenolische Verbindungen der Birkenblätter wurden umfassend untersucht, aber vielmehr aus ökologischen als aus pharmakologischen Gründen. Die am häufigsten verwendeten analytischen Methoden sind Gesamtgehaltsbestimmungen wie z. B. Phenolbestimmungen mittels Ciocalteu-Reagenz. Es wird von verschiedenen RP–HPLC Trennmethoden berichtet: von der Trennung mit Gradienten aus Wasser, Tetrahydrofuran, Methanol und *o*-Phosphorsäure<sup>100</sup>; mit Wasser, Ameisensäure und Acetonitril<sup>101</sup> oder isokratisch mit einem Gemisch aus Wasser, Tetrahydrofuran, Acetonitril, Methanol und Essigsäure<sup>102</sup>.

Proanthocyanidine werden vorwiegend mit NP (Normalphase)-Säulen analysiert, da sie eine Trennung je nach Polymerisierungsgrad ermöglichen (z. B. mit einem Gradienten aus Dichlormethan, Methanol, Wasser und Essigsäure)<sup>103</sup>, aber auch mittels RP–HPLC mit Gradienten aus Wasser, Acetonitril und Ameisensäure<sup>104</sup>.

#### 4.3.4. Stabilität der Flavonole

Langzeitstabilitätstests der Flavonole in der Birkenblätterdroge zeigen einen Abbau der Flavonolglykoside lediglich unter Stressbedingungen (40°C, 75 % relative Luftfeuchtigkeit; im Vergleich zu normalen Lagerungsbedingungen bei 25°C, 60 % relative Luftfeuchtigkeit).

---

<sup>97</sup> Tournaire et al. (1993)

<sup>98</sup> Harborne & Williams (2000)

<sup>99</sup> Choquenot et al. (2008)

<sup>100</sup> Keinänen (1993); Laitinen et al. (2000)

<sup>101</sup> Ossipov et al. (1996)

<sup>102</sup> Dallenbach-Tölke et al. (1987)

<sup>103</sup> Karonen et al. (2006)

<sup>104</sup> Karonen et al. (2006); Salminen (2003)

Dabei wurde das Aglykon Quercetin gebildet. Weitere Abbauprodukte wurden nicht detektiert. Der Autor nimmt an, dass der Abbau durch aktivierte Enzyme bei 40°C ausgelöst sein könnte.<sup>105</sup> Diese Annahme wird durch den Vergleich der Mazeration von Salatblättern im kalten bzw. kochenden Wasser bestätigt: Bei Raumtemperatur wurden alle Flavonoide abgebaut, mit nachfolgender Anreicherung an Kaffeesäurederivaten und Auftreten einer braunen Färbung, während die Flavonoide in kochendem Wasser stabil waren. In diesem Fall wurden die endogenen Enzyme sicherlich das Kochen desaktiviert.<sup>106</sup>

#### 4.3.5. Metabolismus der Flavonole und der Phenolsäuren

Der Metabolismus der Flavonoide und der Phenolverbindungen wurde vielfach untersucht. Vor allem aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften wurde erforscht, inwiefern sie im Körper metabolisiert werden und in welcher Form sie ausgeschieden werden. Zusätzlich wurde am Beispiel der Flavonole der Zwiebeln untersucht, inwieweit thermische Behandlungen und Oxidation strukturelle Veränderungen hervorrufen. Über die Abbauprodukte von Quercetin und dessen Glykoside soll daher in den nächsten Absätzen kurz eingegangen werden.

##### a) Enzymatischer und mikrobiologischer Metabolismus

Die Hauptmetaboliten von Quercetin und Rutin, die *in vivo* nachgewiesen wurden, sind in Abb. B-7 zusammengefasst. Zahlreiche Metabolite wurden zusätzlich mit Hilfe von *in vitro* Experimenten bestätigt, wie zum Beispiel durch Versetzen von Quercetin und einiger Glykoside mit Fäkalflora (Abb. B-8). Die Hauptmetaboliten sind v. a. kleinere Phenolsäuren, wie z. B. (Di)-Hydroxybenzoesäure oder Hydroxyphenylpropionsäure.

---

<sup>105</sup> Heigl & Franz (2003)

<sup>106</sup> Dupont et al. (2000)

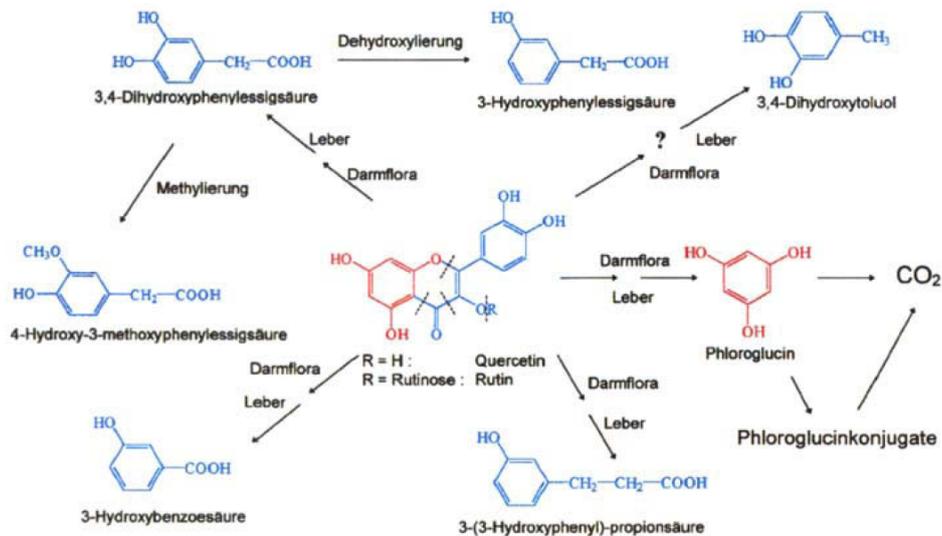


Abb. B-7 Metabolismus von Quercetin und Rutin bei in-vivo Untersuchungen im Menschen und Tier<sup>107</sup>

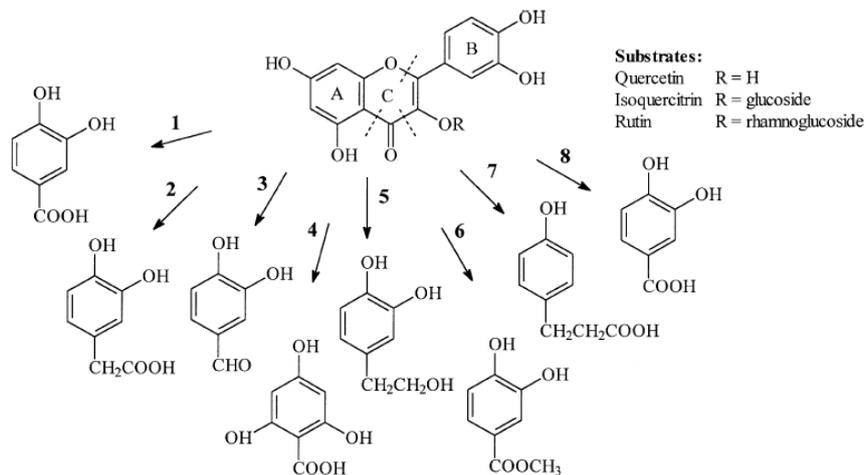


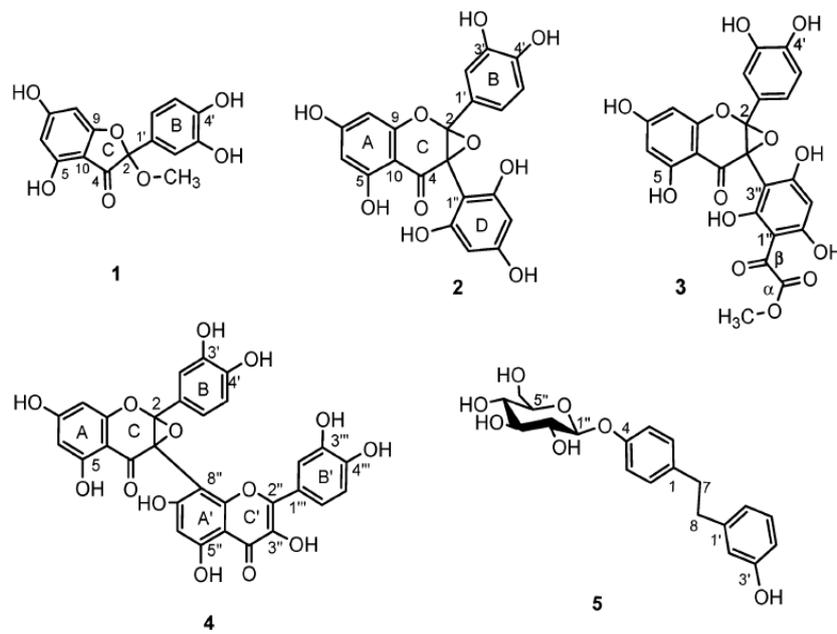
Abb. B-8 Abbauprodukte der in-vitro Umsetzung durch Fäkalflora von Quercetin, Isoquercitrin und Rutin<sup>108</sup>

## b) Oxidativer Abbau

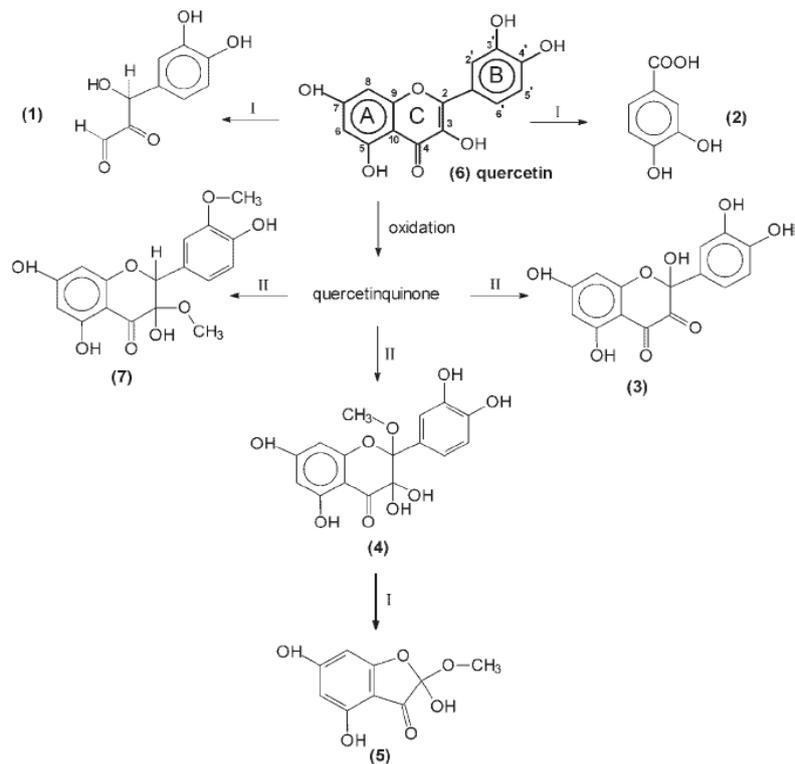
Durch die thermische Behandlung von Zwiebeln (Abb. B-9) oder bestimmte Referenzsubstanzen, wie Quercetin und dessen Glykoside (Abb. B-10), wurden ebenso zahlreiche Abbauprodukte identifiziert. Alle diese Verbindungen zeigen antioxidative Eigenschaften, die häufig sogar stärker als die von Quercetin ausfallen.<sup>108,109</sup>

<sup>107</sup> entnommen aus Heilmann & Merfort (1998)

<sup>108</sup> entnommen aus Justesen & Arrigoni (2001)



**Abb. B-9** Oxidationsprodukte aus Quercetin, erhalten nach Heißextraktion der getrockneten Haut von gelben Zwiebeln (Ausschnitt aus<sup>109</sup>)



**Abb. B-10** Reaktionswege für die Oxidation von Quercetin durch thermische Behandlung. I: Spaltung, II: Nucleophiladdition<sup>110</sup>

<sup>109</sup> Ramos et al. (2006)

<sup>110</sup> entnommen aus Buchner et al. (2006)

#### 4.4. *Gentiana lutea*



Abb. B-11 Blüte von *Gentiana lutea* L.



Abb. B-12 Gelber Enzian mit Wurzeln<sup>111</sup>

Der gelbe Enzian, *Gentiana lutea* L., kommt auf den Wiesen der mittel- und südeuropäischen Gebirge vor.<sup>112</sup> Die Droge besteht aus den im Frühjahr geernteten und getrockneten Wurzeln und Rhizomen der Pflanze.<sup>113</sup> Die Pflanze kann bis 1.4 m und die Wurzel bis zu 1 m Länge erreichen. Dabei kann das Frischgewicht der Wurzel bis zu 7 kg wiegen.<sup>112</sup> Die Pflanze steht z. T. unter Artenschutz und wird in einigen Ländern seit über 30 Jahren angebaut.<sup>114</sup>

##### 4.4.1. Inhaltsstoffe

In Enzianwurzeln kommen als Bitterstoffe die Secoiridoide mit 2-4 % bezogen auf das Trockengewicht vor, darunter mit ca. 2.5 % Gentiopikrosid (Bitterwert 12 000) und 0.03 % Amarogentin (Bitterwert 58 000 000). Weiterhin sind Loganinsäure, Kohlenhydrate (30-55 % bezogen auf das Trockengewicht, v. a. Fructose, Glucose, Saccharose, Gentianose und die beim Trocknen gebildete Gentiobiose, Bitterwert 120), Xanthonderivate (ca. 0.25 %, v. a. Gentsin, aber auch Isogentsin und das Primeverosid Gentsiosid) sowie wenig ätherisches Öl (ca. 0.001 %, davon 35 % Limonen)<sup>115</sup> Bestandteil der gelben Enzianwurzel. Zudem wurden

<sup>111</sup> Culbreth (1917)

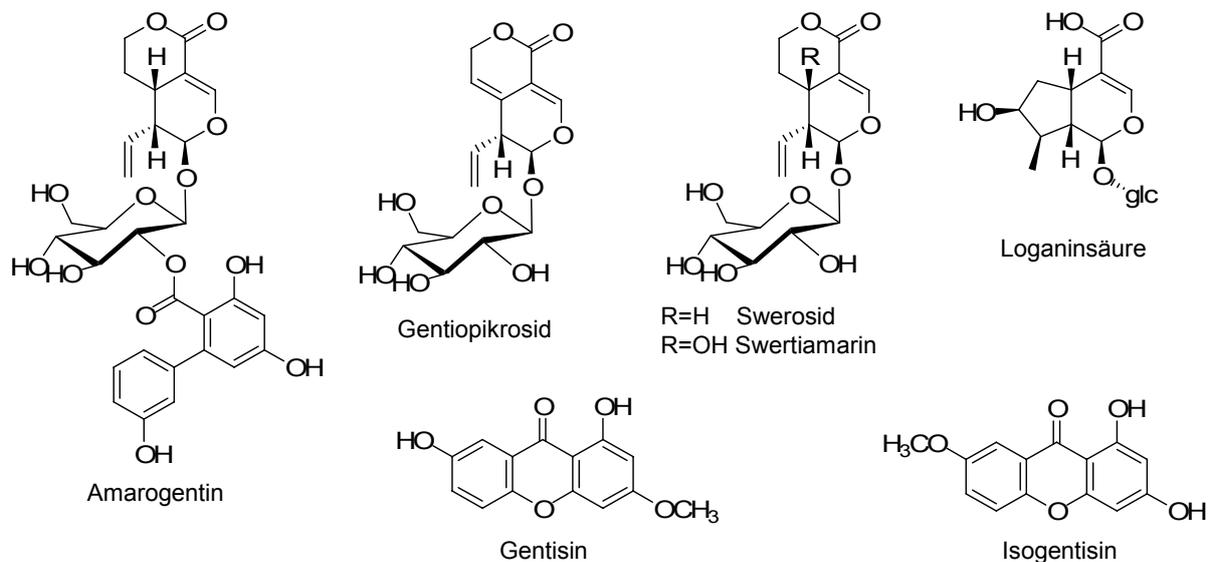
<sup>112</sup> HagerROM (2006)

<sup>113</sup> Teuscher et al. (1997)

<sup>114</sup> Franz & Fritz (1975)

<sup>115</sup> Chialva et al. (1986)

verschiedene Triterpenoide isoliert.<sup>116</sup> Die Strukturen der Hauptinhaltsstoffe sind in Abb. B-13 dargestellt. Die meisten Analysen der Enzianwurzeln basieren auf der getrockneten Droge und lediglich zwei Quellen befassen sich mit der Isolierung von Inhaltsstoffen aus frischen Wurzeln. In einem Fall eines in Japan kultivierten gelben Enzians wurde Swertiamarin als Hauptsecoiridoid und kein Gentiopikrosid gewonnen. Zusätzlich wurden Chromencarbonsäuren isoliert.<sup>117</sup> Frische Wurzeln enthalten in der Regel mehr Iridoide als getrocknete Wurzeln.<sup>118</sup>



**Abb. B-13** Hauptinhaltsstoffe der Wurzel des gelben Enzians

#### 4.4.2. Anwendung und Wirkung

Die Bitterstoffdroge Enzianwurzel, deren Bitterwert zwischen 10 000 und 30 000 beträgt,<sup>119</sup> unterstützt die Speichel- und Magensaftsekretion und wird bei vielen Verdauungsbeschwerden, wie Appetitlosigkeit, Völlegefühl oder Blähungen angewendet.<sup>120</sup> Zusätzlich zeigen Enzianwurzelextrakte antimikrobielle<sup>121</sup> sowie wundheilende

<sup>116</sup> Kakuda et al. (2003); Toriumi et al. (2003)

<sup>117</sup> Ando et al. (2007)

<sup>118</sup> Carnat et al. (2005)

<sup>119</sup> Adam & Becker (2000); Hänsel & Sticher (2004)

<sup>120</sup> BfArM (1999)

<sup>121</sup> Savikin et al. (2009)

Eigenschaften<sup>122</sup>, letztere durch ihren zytoprotektiven Effekt sowie durch eine Stimulierung der Kollagenproduktion und der mitotischen Aktivität. Gentiopikrosid und Swerosid zeigen zudem eine hepatoprotektive Wirkung.<sup>123</sup>

#### 4.4.3. Analytik

Die am häufigsten verwendete chromatographische Methode für die Analyse der Iridoide in den Gentianaceae ist die HPLC.<sup>124</sup> Als Referenz<sup>119</sup> dient bis heute eine isokratische Methode, die lediglich die Trennung der Secoiridoide ermöglicht (C18-Säule, 50 % MeOH als Laufmittel und Detektion bei 233 nm).<sup>125</sup> Erst kürzlich wurden zwei verschiedene HPLC-Methoden zur simultanen Trennung der Iridoide und Xanthonderivate publiziert, wobei letztere validiert wurde.<sup>126</sup> An anderer Stelle wird von einer kapillarelektrophoresen Methode berichtet.<sup>127</sup>

#### 4.4.4. Gentiopikrosid Metabolismus

Verschiedene Experimente zur Fermentierung von Gentiopikrosid oder Swertiamarin liegen vor. Durch die Umsetzung mit  $\beta$ -Glucosidase ergibt das Gentiopikrosid zuerst das Aglykon, das schnell zu Gentiogenal reagiert (Abb. B-14).<sup>128</sup> Die Fermentation von Gentiopikrosid mit verschiedenen Darmbakterien führt zur Bildung von fünf weiteren Metaboliten (Abb. B-15).<sup>129</sup> Bei der Fermentation von Swertiamarin unter den gleichen Bedingungen wird Erythrocentaurin ( $G_1$ , Abb. B-15), ein Alkohol ( $G_4$ , Abb. B-15, Reduktionsprodukt von Erythrocentaurin) und Gentianin (ein Alkaloid) erhalten.<sup>130</sup>

---

<sup>122</sup> Öztürk et al. (2006)

<sup>123</sup> Jensen & Schripsema (2001)

<sup>124</sup> Rodriguez et al. (1998)

<sup>125</sup> Sticher & Meier (1980)

<sup>126</sup> Aberham et al. (2007); Carnat et al. (2005)

<sup>127</sup> Citova et al. (2008)

<sup>128</sup> van der Nat et al. (1982)

<sup>129</sup> El Sedawy et al. (1989a)

<sup>130</sup> El Sedawy et al. (1989b)

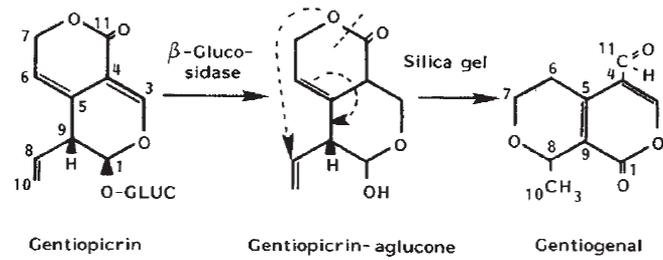


Abb. B-14 Umsetzung von Gentiopicrosin (= Gentiopicrosin) mit  $\beta$ -Glucosidase und Bildung von Gentiogenol<sup>128</sup>

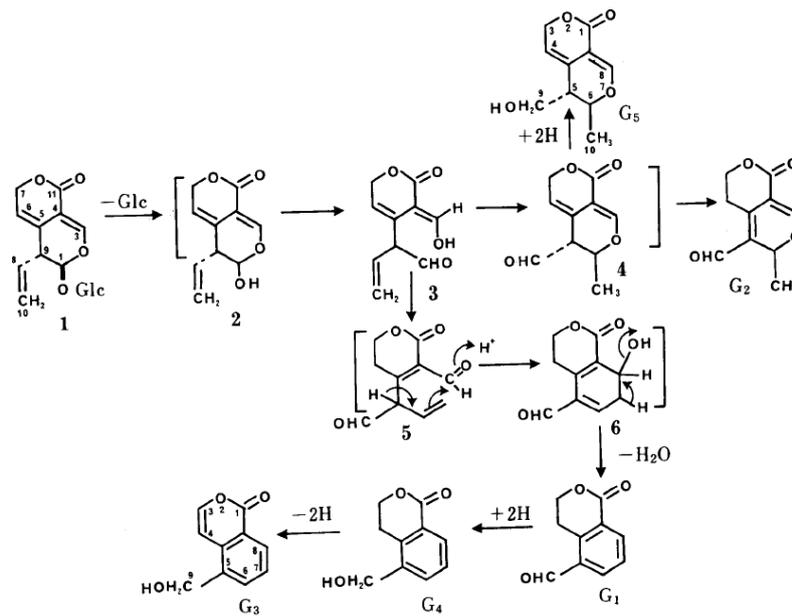


Abb. B-15 Mögliche Bildung von Gentiopicrosinmetaboliten nach der Fermentation mit Darmbakterien. G1: Erythrocentaurin; G2: Gentiopicrosin<sup>129</sup>

## 4.5. *Hypericum perforatum*



Abb. B-16 Johanniskrautpflanze (*Hypericum perforatum* L.)

Das echte Johanniskraut, *Hypericum perforatum* L., gehört der Familie der Hypericaceae an. Es ist weit verbreitet und in ganz Europa, Westasien sowie Nordafrika heimisch. Es wird v. a. wild gepflückt, inzwischen aber auch häufiger in Kultur genommen.<sup>131</sup>

### 4.5.1. Inhaltsstoffe

Das Johanniskraut enthält in seinen oberirdischen Teilen Naphthodianthrone (v. a. Hypericin und Pseudohypericin, ca. 0.1 %), Phloroglucinderivate (v. a. Hyperforin, ca. 0.2 %), Flavonoide (2–4 %, v. a. Quercetinglykoside wie Hyperosid, aber auch die Biflavone 13,118-Biapigenin und Amentoflavon), Procyanidine, Catechingerbstoffe (ca. 10 %), Xanthone, ätherisches Öl (0.25 %) und Phenolcarbonsäuren.<sup>131</sup>

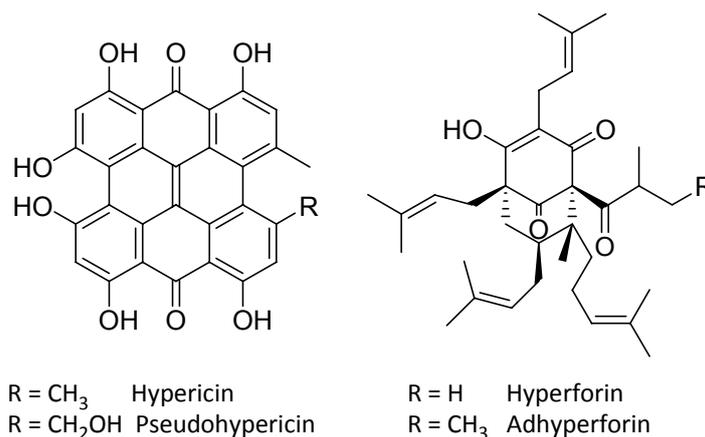


Abb. B-17 Naphthodianthrone (links) und Phloroglucinderivate (rechts) in Johanniskraut

<sup>131</sup> Hänsel & Sticher (2004); Hiller & Melzig (2005)

#### 4.5.2. Anwendung und Wirkung

Hypericumextrakte, v. a. ethanolische Extrakte der getrockneten überirdischen Teile, werden öfters zu Fertigarzneimitteln weiterverarbeitet. Die Extrakte zeigen antibakterielle, antivirale und antidepressive Wirkungen. Wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe für die antidepressive Wirkung sind die Hyperforinderivate, wobei für die anderen Inhaltsstoffe synergistische Wirkungen nachgewiesen wurden. Insgesamt gilt für Johanniskrautzubereitungen, die zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depression Einsatz finden,<sup>132</sup> dass der Gesamtextrakt der Wirkstoff ist.<sup>133</sup>

#### 4.5.3. Analytik

Die Droge wurde bereits intensiv untersucht. Neben der zur Qualitätsprüfung verwendeten spektrophotometrischen Methoden zur Gesamtgehaltsbestimmung der Hypericinderivate oder der Phenole (Ph.Eur.<sup>134</sup>) werden besonders RP-HPLC-Methoden angewandt. Einige Methoden wurden lediglich zur Trennung einer einzigen Stoffgruppe entwickelt: entweder für die Phloroglucinole (Gradient aus angesäuertem Wasser mit Trifluoressigsäure oder Phosphorsäure und Acetonitril, Detektion bei 270 nm)<sup>135</sup>, für die Naphthodianthrone (meistens mit einem pH-Wert des Laufmittels bei 2.5 mittels Phosphatpuffer, Detektion bei 590 nm)<sup>136</sup> oder der Flavonoide (mit einem Gradient aus Wasser, Ameisensäure und Acetonitril, Detektion 260–550 nm)<sup>137</sup>. Andere ermöglichen die Erfassung des gesamten Fingerprints des Pflanzenextraktes (Gradienten aus Wasser, Säure und entweder Methanol, Acetonitril, oder von beiden, Detektion bei 270 und 590 nm).<sup>138</sup>

#### 4.5.4. Stabilität der Inhaltsstoffe

Phloroglucinderivate und Naphthodianthrone sind sehr instabil in wässrigen Lösungen. Zudem sind sie in Wasser schlecht löslich. Zusätzlich fördern verschiedene Parameter deren Abbau: In wässrigen Lösungen werden sie bei tieferen pH-Werten besonders rasch

---

<sup>132</sup> BfArM (1999)

<sup>133</sup> Butterweck & Schmidt (2007)

<sup>134</sup> Europäisches Arzneibuch (2008a)

<sup>135</sup> Fourneron & Nait-Si (2006); Fuzzati et al. (2001)

<sup>136</sup> Pages et al. (2006); Puri et al. (2006)

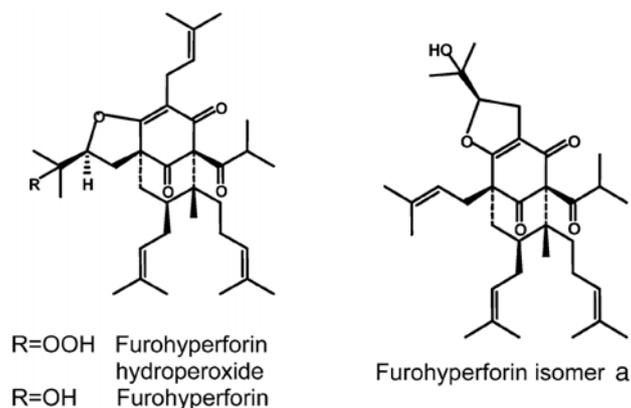
<sup>137</sup> Schmidt et al. (2008)

<sup>138</sup> Avato & Guglielmi (2004); Bilia et al. (2002); Brolis et al. (1998); Ganzera et al. (2002); Jürgenliemk & Nahrstedt (2002)

abgebaut. Phloroglucinole sind besonders bei Lichtexposition labil und werden dabei rasch und vollständig in wenigen Stunden abgebaut.<sup>139</sup> Hyperforin ist stabil in protischen und instabil in apolaren Lösungsmitteln (wie *n*-Hexan).<sup>140</sup> In Fertigarzneimitteln, die bei 25°C unter Lichtschutz aufbewahrt werden, liegen die Konzentrationen für Hyperforin- nach 3 Monaten und für Hypericinderivate nach einigen Wochen unter 90 % des Anfangswertes. Beide Inhaltstoffgruppen sind sehr lichtsensibel.<sup>141</sup> Die Flavonole sind in den Fertigarzneimitteln über 3 Monaten und in alkoholischen Tinkturen 1–3 Monate stabil. Allerdings sind sie gegenüber höheren Wasseranteilen labiler.<sup>142</sup>

#### 4.5.5. Metabolismus

In sauren wässrigen Lösungen wurden verschiedene Abbauprodukte von Hyperforin detektiert. Diese wurden als Furohyperforin sowie als dessen Hydroperoxide und als ‚Isomer a‘ identifiziert (Abb. B-18).<sup>143</sup> In *n*-Hexan baut Hyperforin ebenso zu diesen zwei ersten Abbauprodukten ab.<sup>140</sup> Unter oxidativen Bedingungen, z. B. mit Hydroperoxid, wird Hyperforin zu drei weiteren Moleküle umgesetzt (Abb. B-19).<sup>144</sup>



**Abb. B-18** Abbauprodukte von Hyperforin in Hexanextrakten<sup>145</sup>

<sup>139</sup> Ang et al. (2004)

<sup>140</sup> Fuzzati et al. (2001)

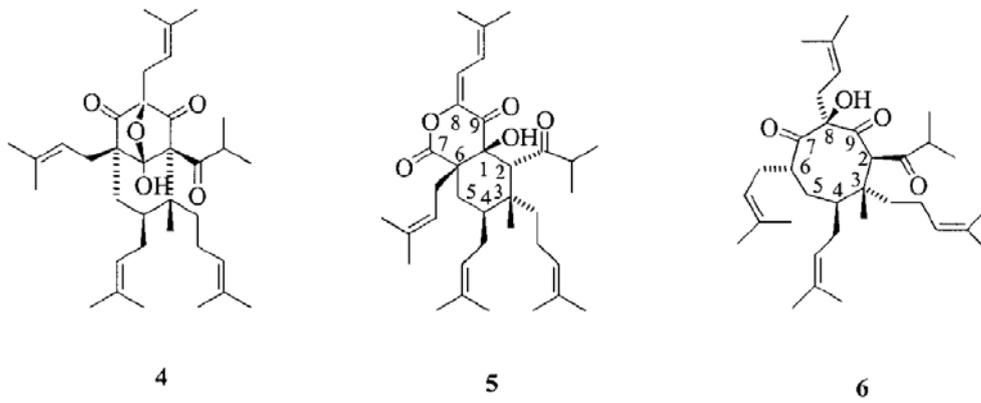
<sup>141</sup> Bilia et al. (2001)

<sup>142</sup> Bilia et al. (2002)

<sup>143</sup> Ang et al. (2004)

<sup>144</sup> Verotta et al. (2004)

<sup>145</sup> Ausschnitt aus Ang et al. (2004)



**Abb. B-19** Produkte nach oxidativen Umsatz von Hyperforin<sup>146</sup>

---

<sup>146</sup> Ausschnitt aus Verotta et al. (2004)

#### 4.6. *Nicotiana tabacum*



Abb. B-20 Blätter und Blüte von *Nicotiana tabacum* L.

*Nicotiana tabacum* L. existiert nicht als Wildpflanze und wird heutzutage auf der ganzen Welt angebaut. Sie ist ein Bastard aus zwei in Peru heimischen Arten, *Nicotiana sylvestris* und *Nicotiana tomentosiformis*.<sup>147</sup> *Nicotiana tabacum* kann bis zu 3 m Höhe reichen.

##### 4.6.1. Inhaltsstoffe

Die wichtigsten Inhaltsstoffe der Tabakblätter sind die Pyridinalkaloide. Dabei ist Nikotin der Hauptvertreter dieser Stofffamilie (0,08–9 %). Die anderen Hauptalkaloide sind Nornikotin, Anatabin und Anabasin (Abb. B-21). Dazu kommen 40 weitere Nebenalkaloide.<sup>148</sup> Die Blätter enthalten auch Chlorogensäure, Cumarinderivate (Scopoletin, Esculetin), Flavonole (Rutin, Quercitrin, Kämpferol),<sup>149</sup> Fettsäuren (2,1–4,4 %, davon 40–63 % Linolenat)<sup>150</sup> und Nitrate (bis 10 %).

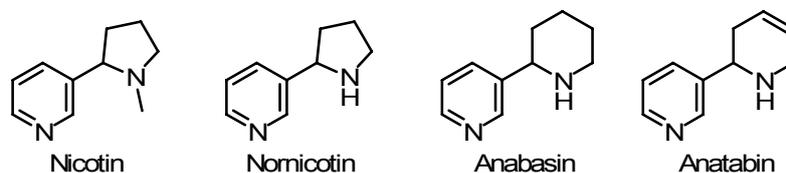


Abb. B-21 Hauptalkaloide der Tabakblätter

<sup>147</sup> Hänsel & Sticher (2004)

<sup>148</sup> Saitoh et al. (1985)

<sup>149</sup> Gu et al. (2005); Nisseron et al. (1984)

<sup>150</sup> Koiwai et al. (1983)

#### 4.6.2. Anwendung und Wirkung

Die Pflanze wird hauptsächlich zur Herstellung von Rauchtobak angebaut. Tabak ist dabei eher wegen seiner Verwendung in Zigaretten als für seine therapeutischen Anwendungen bekannt. Früher wurde Tabak traditionell bei Verstopfungen, Koliken oder Wurmerkrankungen angewendet, was heutzutage obsolet ist.<sup>151</sup> Pharmakologisch dient Nikotin praktisch nur noch der Tabakentwöhnung. Dennoch werden *Nicotiana tabacum*-Zubereitungen allein oder mit anderen Komponenten in der homöopathischen und anthroposophischen Medizin verwendet, um Beschwerden wie Spasmen, Krämpfe und Asthma zu behandeln.<sup>152</sup>

Die Wirkung von Nikotin ist stark dosisabhängig. Geringe Dosen Nikotin wirken auf sympathische Ganglien stimulierend und regen die Magensaftsekretion sowie die Peristaltik an. Die zentralnervösen Effekte von kleinen Nikotindosen machen Tabak als Genussmittel attraktiv. Nikotin steigert die psychomotorische Leistungsfähigkeit sowie die Aufmerksamkeit und die Gedächtnisleistung. Diese Effekte sind jedoch nur von kurzer Dauer und häufiger Konsum verkürzt die Wirkung. In höheren Mengen zeigt Nikotin einen hemmenden Effekt auf vegetative Ganglien, was zu Krämpfen und Atemlähmung führen kann.<sup>147</sup>

#### 4.6.3. Analytik

Verschiedene chromatographische Methoden wurden bereits zur Quantifizierung der Tabakalkaloide entwickelt. Diese sind aber meist aufwändig oder setzen eine teure Ausrüstung voraus. So haben RP-HPLC-Methoden eingeschränkte Anwendungsmöglichkeiten, weil die basischen Eigenschaften der Alkaloide pH-Bereiche erfordern, die die meisten RP-Säulen nicht erfüllen können. Zusätzlich muss das Fließmittel sehr exakt eingestellt werden, um Peaktailing zu vermeiden.<sup>153</sup> Infolgedessen basieren die meisten Quantifizierungsmethoden, die in der Literatur beschrieben sind, auf Gaschromatographie mit massenspektrometrischer oder Stickstoff-Phosphor-Detektion bezogen.

---

<sup>151</sup> Hiller & Melzig (2005)

<sup>152</sup> Vademecum Anthroposophische Arzneimittel (2008); WALA (2009)

<sup>153</sup> Ciolino et al. (1999)

Nikotin wurde bislang vor allem in Zigaretten<sup>154</sup>, Urin<sup>155</sup>, humanen Körperflüssigkeiten<sup>156</sup>, Plasma<sup>157</sup> oder Haaren<sup>158</sup> analysiert und es stehen nur wenige Berichte zur Nikotinquantifizierung in Tabakblättern zur Verfügung<sup>159</sup>. Für die gaschromatographische Erfassung von Nikotin werden verschiedene Säulen verwendet. Hierbei handelt es sich um mit unterschiedlichen Methylpolysiloxanarten beschichteten Kieselglassäulen<sup>160</sup>, eine 14 %-Cyanopropyl-phenyl-methylpolysiloxan-Säule<sup>161</sup> oder eine Megabore-Kapillarsäule<sup>162</sup>. Ein einziges Mal wurde die Verwendung einer Amin-desaktivierten Kapillarsäule beschrieben.<sup>163</sup>

#### 4.6.4. Metabolismus von Nikotin

Zahlreiche Studien sind zum Metabolismus und zum Abbau von Nikotin, v. a. in Zusammenhang mit dem Metabolismus in der Leber und dem Abbau während der Tabakherstellung, publiziert worden. Der häufigste Metabolit im Menschen ist das durch C-Oxidierung gebildete Cotinin. Dieses kann weiter zu 3-Pyridylelessigsäure metabolisiert werden. Nornikotin und Demethylkotinin können ebenfalls entstehen sowie weitere Produkte aus N-Oxidierungen, N-Methylierungen sowie N- und O-Glucuronidierungen von Nikotin.<sup>164</sup> Zudem wurde die Bildung der karzinogenen Nitrosamine im Tabakrauch nachgewiesen.<sup>165</sup> Um die Umsetzung von Nikotin während der Tabakherstellung zu verstehen, wurde reines Nikotin durch Luftzufuhr und Belichtung oxidiert. Hierbei wurde Nikotinsäure, Oxynikotin, Nikotyrin, Cotinin und Myosmin<sup>166</sup> sowie zusätzlich Methylamin und Ammoniak identifiziert.<sup>167</sup>

---

<sup>154</sup> Cai et al. (2003); Wu et al. (2002)

<sup>155</sup> Man et al. (2006)

<sup>156</sup> Kim et al. (2005)

<sup>157</sup> Davis (1986)

<sup>158</sup> Zahlsen & Nilsen (1994)

<sup>159</sup> Cai et al. (2003); Saitoh et al. (1985); Yang et al. (2002)

<sup>160</sup> Cai et al. (2003); Kim et al. (2005); Man et al. (2006); Saitoh et al. (1985); Zahlsen & Nilsen (1994)

<sup>161</sup> Wu et al. (2002); Yang et al. (2002)

<sup>162</sup> Cai et al. (2003)

<sup>163</sup> Davis (1986)

<sup>164</sup> Yildiz (2004)

<sup>165</sup> Brunnemann et al. (1996)

<sup>166</sup> Wada et al. (1959)

<sup>167</sup> Kisasi et al. (1978)

## C Zielsetzung

Um ein umfassendes Bild verschiedener Stoffgruppen unter fermentativen Bedingungen zu erhalten, soll das Extraktionsverhalten und die chemische Umwandlung von typischen Pflanzeninhaltsstoffen im Laufe der Herstellung fermentierter Urtinkturen untersucht sowie deren Ursachen charakterisiert werden. Die Arbeit umfasst die wichtigsten, pharmakologisch relevanten Pflanzenstoffgruppen. Zu jeder Stoffgruppe wurde eine Beispieelpflanze gewählt, die analytisch möglichst gut charakterisiert ist. Die zu untersuchenden Stoffgruppen und Pflanzen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tab. C-1** Inhaltstoffgruppen und Pflanzen, die in dieser Arbeit untersucht wurden

Pharmakologisch aktive Stoffgruppe	Nachweisbar in folgenden Pflanzenteile ( <i>Pflanze</i> )
Alkaloide	Tabakblätter ( <i>Nicotiana tabacum</i> )
Flavonoide	v. a. Birkenblätter ( <i>Betula pendula</i> ), gelbe Zwiebeln ( <i>Allium cepa</i> ) und Johanniskraut ( <i>Hypericum perforatum</i> )
Organische Sulfoxide	Gelbe Zwiebeln ( <i>Allium cepa</i> )
Secoiridoide	Wurzeln des Gelben Enzians ( <i>Gentiana lutea</i> )
Sesquiterpenlactone	Arnika ( <i>Arnica montana</i> )
Phloroglucinole/Naphthodianthrone	Johanniskraut ( <i>Hypericum perforatum</i> )

Schwerpunkte des Projektes sind dabei:

1. Entwicklung robuster chromatographischer Trennmethoden für ausgewählte Pflanzeninhaltsstoffe.
2. Validierung dieser Methoden, um diese für die Quantifizierung bestimmter Verbindungen zu verwenden.
3. Bestimmung der Konzentration ausgewählter typischer Verbindungen im Ausgangsmaterial.
4. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf des Gehaltes dieser Verbindungen im fermentierenden Ansatz.
5. Charakterisierung der dabei entstehenden Folgeprodukte.
6. Untersuchungen der Auswirkung von Änderungen des Herstellungsprozesses nach HAB auf die Extrakte.

7. Unterwerfen von Referenzsubstanzen den Bedingungen des Temperaturwechsels nach HAB zur Untersuchung entstehender Abbauprodukte.
8. Untersuchungen zu den chemischen sowie mikrobiologischen Eigenschaften der Ansätze.
9. Vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit der Urtinkturen mit Extrakten aus anderen Auszugsverfahren mit Hilfe biologischer Modelle.

## D Ergebnisse

### 1. *Allium cepa*

#### 1.1. Phytochemische Analyse

##### 1.1.1. HPLC–Methodenentwicklung und Peakzuordnung

Da die publizierten Methoden<sup>168</sup> für die vollständige Trennung der phenolischen Inhaltsstoffe ungeeignet erschienen, wurde eine HPLC–Methode entwickelt. Die Peaks konnten unter Hinzuziehung von Literaturangaben<sup>169</sup>, mit Hilfe spezifischer UV-Spektren sowie Aufstockanalysen den jeweiligen Flavonoiden zugeordnet werden. Die Peakzuordnung ist in Abb. D-1a) anhand von HPLC–Chromatogrammen bzw. in Abb. D-1b) von GC–MS–Chromatogrammen dreier Extrakte wiedergegeben (ein fermentierter, ein methanolischer und ein wässriger Extrakt). Der Peak 1 (15.7 min, Abb. D-1 a) war einer von den wenigen Peaks, der bei allen drei Extrakten detektiert wurde. Anhand der UV- und LC–MS-Daten konnte diese Verbindung als Tryptophan identifiziert werden, mit zwei UV-Maxima bei 218 und 278 nm<sup>170</sup> und einer Molmasse von 204 g/mol. Diese Aminosäure, durch eine Aufstockanalyse mit reinem *L*-Tryptophan als Peak 1 bestätigt, wurde bereits in einer früheren Arbeit im Extrakt aus frischen Zwiebeln gefunden.<sup>171</sup>

Mittels GC–MS und mit Hilfe der NIST–Datenbank konnte eine Zuordnung weiterer Verbindungen vorgeschlagen werden (Abb. D-1b). 5-Hydroxymethylfurfural<sup>172</sup> (Peak VI) und Palmitinsäure<sup>173</sup> (Peak VII) wurden bereits aus *A. cepa* isoliert. 5-Hydroxymethylfurfural ist als Produkt der säurekatalysierte Degradierung von Hexosen (v. a. Fruktose) berichtet worden<sup>174</sup>, Bedingungen, die in den fermentierten Extrakten zutreffen. 5-Hydroxymethylfurfural und Pyranon (Peak IV) sind als Abbauprodukte von Glukose nach

---

<sup>168</sup> Bonaccorsi et al. (2005); Marotti & Piccaglia (2002); Mogren et al. (2006)

<sup>169</sup> Bonaccorsi et al. (2005)

<sup>170</sup> Edwards (1949)

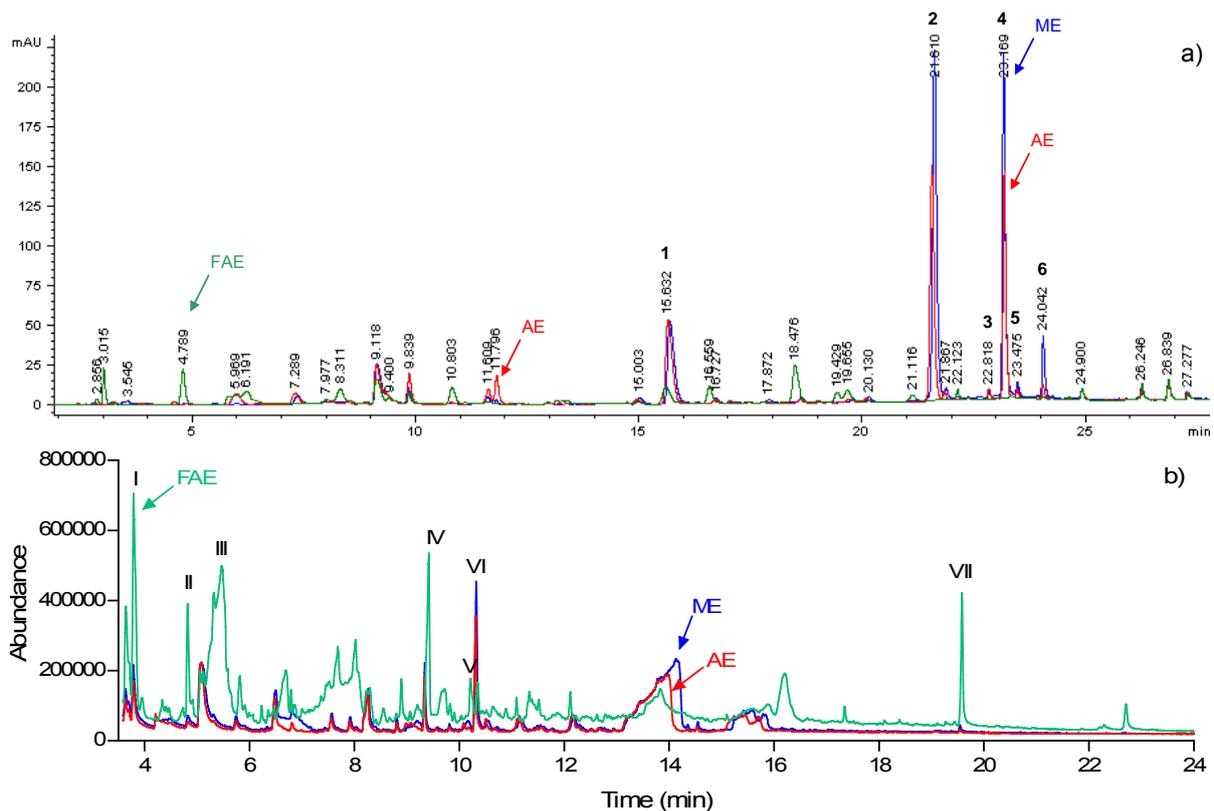
<sup>171</sup> Lee et al. (2008)

<sup>172</sup> Xiao & Parkin (2007)

<sup>173</sup> Tsiaganis et al. (2009)

<sup>174</sup> Noller (1965), zitiert in Risner et al. (2006)

thermischer Behandlung bekannt,<sup>175</sup> allerdings wurde Pyranon als endogene Verbindungen der zuckerreichen Zwiebeln<sup>176</sup> bisher nicht beschrieben. Catechol (Peak V) wurde auch in fermentierten Extrakten von *B. pendula* detektiert (s. Sektion D3.3.5) und könnte aus Quercetin entstanden sein.<sup>177</sup>



**Abb. D-1** HPLC–UV (a) und GC–MS (b) Chromatogramme (280 nm): blau, methanolischer Extrakt (ME); rot, wässriger Extrakt (AE); grün, fermentierter wässriger Extrakt (FAE, jeweils 1:2 (v/v) mit Wasser verdünnt). 1) Tryptophan; 2) Quercetin 3,4'-di-*O*- $\beta$ -glucosid; 3) Quercetin 3-*O*- $\beta$ -glucosid ; 4) Quercetin 4'-*O*- $\beta$ -glucosid; 5) Isorhamnetin 4'-*O*- $\beta$ -glucosid; 6) Quercetin; I) Methylpyruvat ; II) 3-Hydroxymethylfuran; III) Propylenglycol; IV) Pyranon; V) Catechol; VI) 5-Hydroxymethylfurfural; VII) Palmitinsäure.

### 1.1.2. Vergleich einer fertigen Urtinktur mit zwei selbst hergestellten Extrakten

Der methanolische und der wässrige Extrakt aus frischen Zwiebeln waren sich ähnlich, mit Ausnahme von etwas kleineren Flavonoidpeaks (Peaks 2–6, Abb. D-1 a) im Falle des

<sup>175</sup> Ames et al. (1999)

<sup>176</sup> Rodriguez Galdon et al. (2009)

<sup>177</sup> Selma et al. (2009)

wässrigen Extrakts. Der fermentierte Extrakt (2006–M12) hingegen zeigte ein völlig anderes chromatographisches Profil: Es konnten keine Flavonolglykoside detektiert werden und das Aglykon Quercetin (Peak 6, Abb. D-1 a) nur in Spuren.

### 1.1.3. Entstehung von Pyruvat und Methylpyruvat in diesen drei Extrakten

Einschlägige Literaturangaben<sup>178</sup> bzw. publizierte UV-Spektren waren nicht ausreichend, um die organischen Schwefelverbindungen in den Extrakten nachzuweisen bzw. zuzuordnen. *Allium*-Extrakte sind dafür bekannt, Abbauprodukte der genuinen Alk(en)ylcysteinsulfoxide (ACSO) zu enthalten. Letzere sind stark flüchtig und konnten mit den verwendeten Messmethoden nicht nachgewiesen werden. Pyruvat wird beim Zwiebelschneiden enzymatisch aus den ACSOs erzeugt. Deswegen ist Pyruvat ein geeigneter Indikator für das Vorliegen der Abbauprodukte und damit auch der dadurch bedingten Schärfe der Zwiebel.<sup>179</sup>

#### a) Detektion von Methylpyruvat mittels GC–MS

In den drei gezeigten Proben konnte Pyruvat, das nicht GC-gängig ist, nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde Methylpyruvat mittels GC–MS detektiert ( $m/z$  102 [M], 43, 31, Charakterisierung mittels Vergleich mit der NIST-Datenbank). Dieses könnte aus Pyruvat in den in Methanol aufgenommenen gefriergetrockneten Zwiebelextrakten gebildet worden sein. Interessanterweise wurde in dem fermentierten Extrakt mehr Methylpyruvat gefunden, als im wässrigen bzw. methanolischen Extrakt (Tab. D-1).

#### b) Photometrische Pyruvatbestimmung

Der Gehalt an Pyruvat wurde durch photometrische Bestimmung ermittelt (G2.4.3). Während im Falle der unfermentierten Extrakten höhere Pyruvatgehalte mit höheren Methylpyruvatmengen korrelierten (Tab. D-1), traf dies für die Urtinktur nicht zu; es wurde nur eine sehr geringe Menge an Pyruvat detektiert, obwohl der größte Methylpyruvat–Peak beobachtet wurde.

---

<sup>178</sup> Block (1992b); Block (1992a)

<sup>179</sup> Resemann et al. (2004); Schwimmer & Weston (1961)

**Tab. D-1** Photometrische Pyruvatgehaltsbestimmung in den drei Extrakten sowie in den verwendeten Zwiebeln und Vergleich mit der mittels GC–MS ermittelten Methylpyruvat–Peakfläche

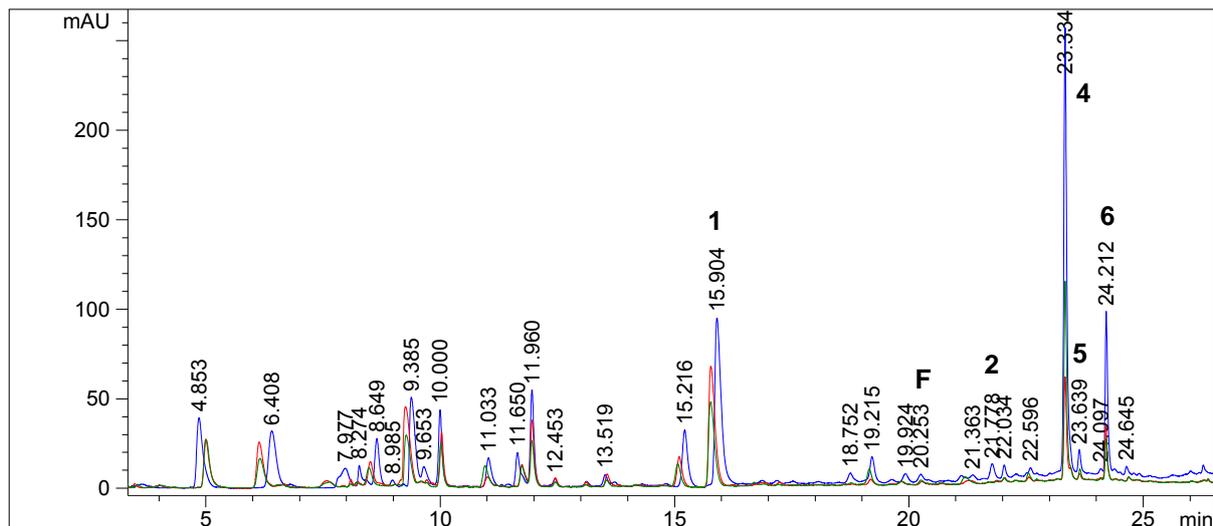
Extrakt	Pyruvat		Methylpyruvat (Peakfläche, <i>m/z</i> 102)
	( $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht)	RSD %	
MeOH	6.02	9.90	396363
Wasser	4.58	0.28	258150
2006-M12	0.56	5.74	1150244
Zwiebeln	3.80	5.56	–

#### 1.1.4. Vergleich der fermentierten Extrakte

Alle vorhandenen WALA-Proben (Jahrgänge 2006–2008) wurden mittels HPLC analysiert und die Chromatogramme verglichen. Die Extrakte der drei Jahrgänge zeigten zum gleichen Probenzeitpunkt sehr ähnliche Zusammensetzungen. Die einzigen Unterschiede waren, dass die Charge von 2006 insgesamt eine höhere Konzentration an Verbindungen zeigte als die zwei anderen (bes. Flavonoide, s. Abb. D-2) und dass die Flavonoide bei der Charge aus 2008 erst zu einem späteren Zeitpunkt abgebaut wurden. In diesem Fall war ein großer Quercetinpeak bis zum 7. Extraktionstag vorhanden, der sonst schon am 3. Tag nur noch in Spuren zu detektieren war (Chromatogramm nicht gezeigt). Die gemessenen pH–Werte (Tab. D-2) waren für die zwei aufgeführten Chargen aus 2006 und 2007 gleich.

**Tab. D-2** Vergleich der pH–Werte von Proben aus zwei fermentierten Zwiebelextrakten (2006 und 2007)

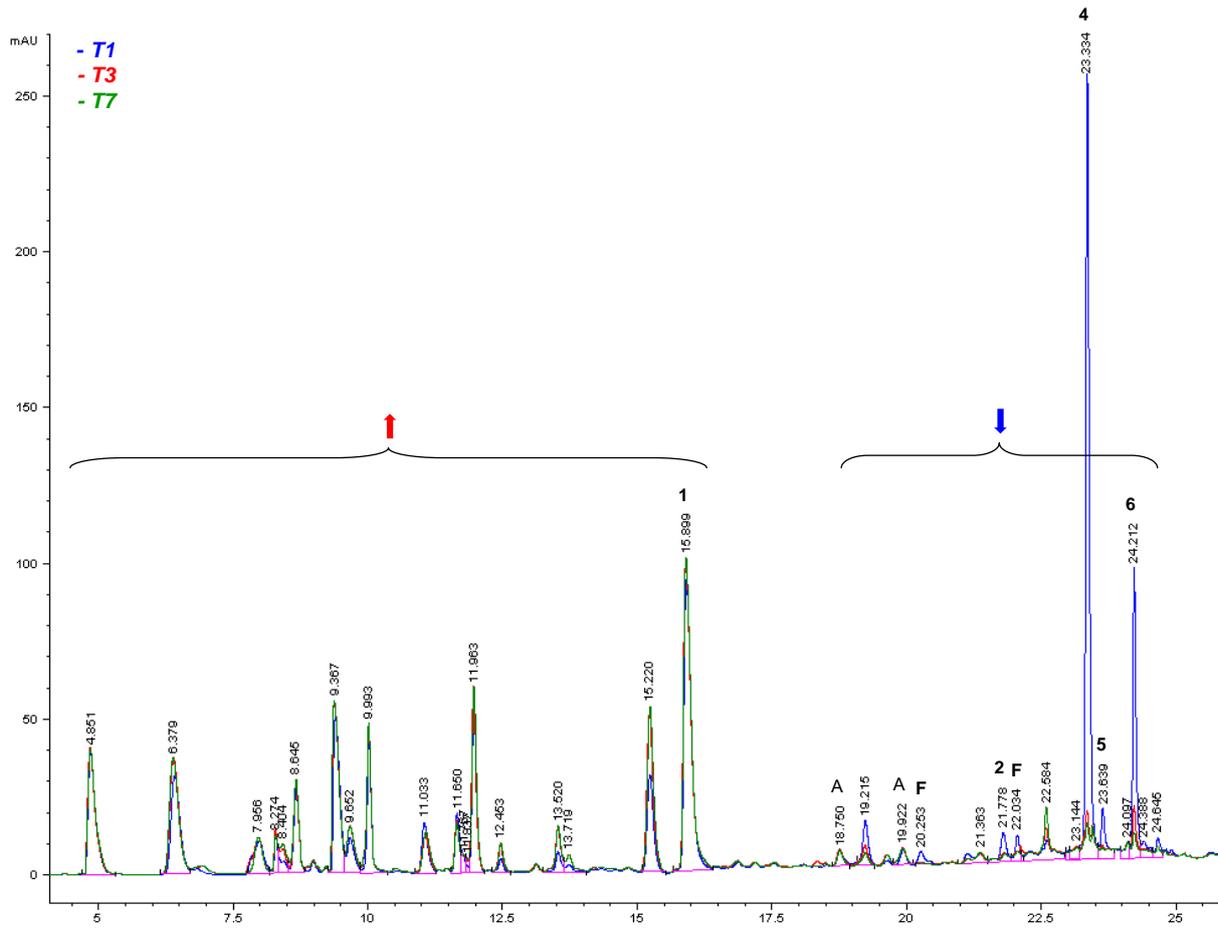
Jahr	T1	T3	T7	M12
2006	4.1	4	4.1	3.9
2007	4.2	4	4	–



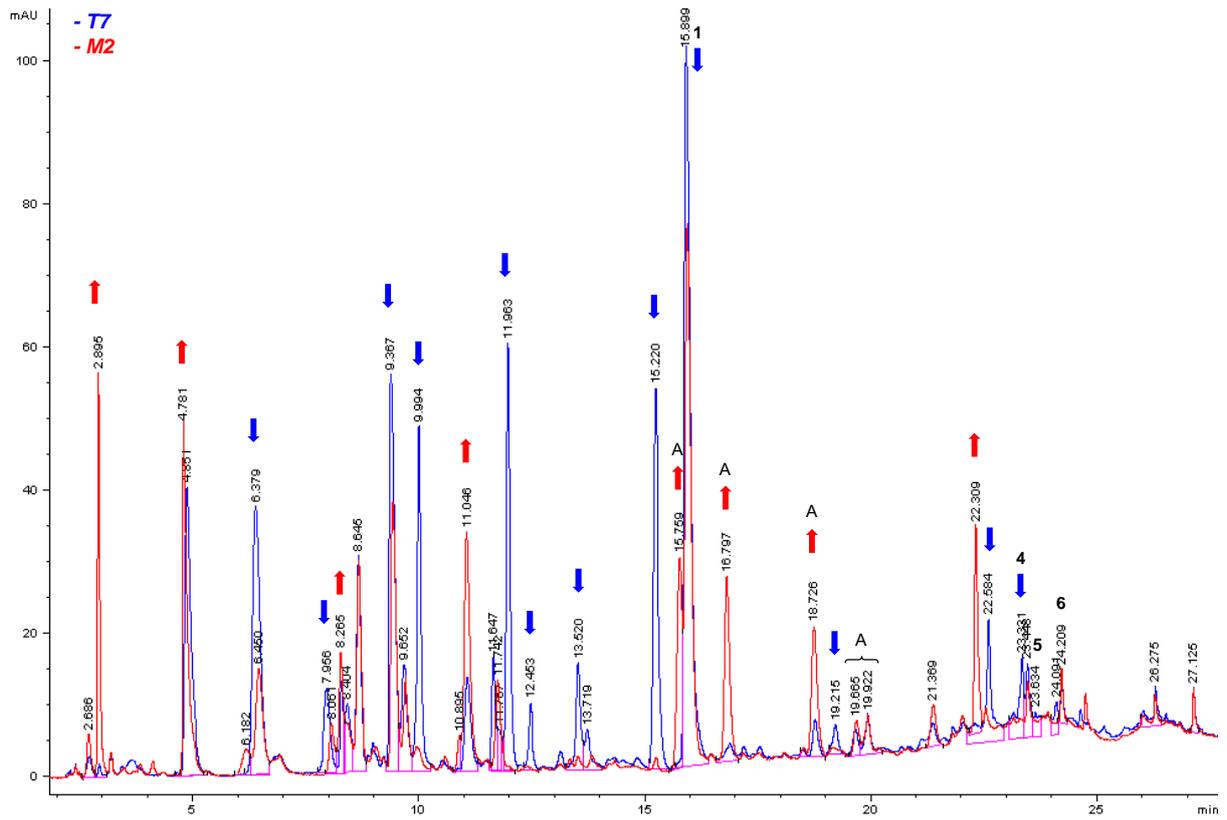
**Abb. D-2** HPLC-Chromatogramme der fermentierten Extrakte 2006–2008 nach 24 h. Blau: 2006, rot: 2007, grün: 2008. Peakzuordnung: s. Abb. D-1 (F = Flavonoid)

Der Vergleich der Stufenkontrollen, die während des Herstellungsprozesses entnommen wurden, wird hier beispielhaft für den Jahrgang 2006 aufgezeigt (Abb. D-3 bis Abb. D-5). Da der Fingerprint der fermentierten Extrakte sehr stark vom Zeitpunkt der Probenahme abhängig war und weitaus viel mehr Peaks als ein übliches Zwiebelextrakt-Chromatogramm zeigte (Vergleich mit den Extrakten ME oder AE in Abb. D-1), gelang die Peakzuordnung trotz LC–MS Untersuchungen nur unvollständig. Einige Peaks zeigten ähnliche UV-Spektren wie Tryptophan (mit UV-Maxima bei ca. 220 und 278 nm) und wurden in den Chromatogramme als Aminosäuren (A) bezeichnet.

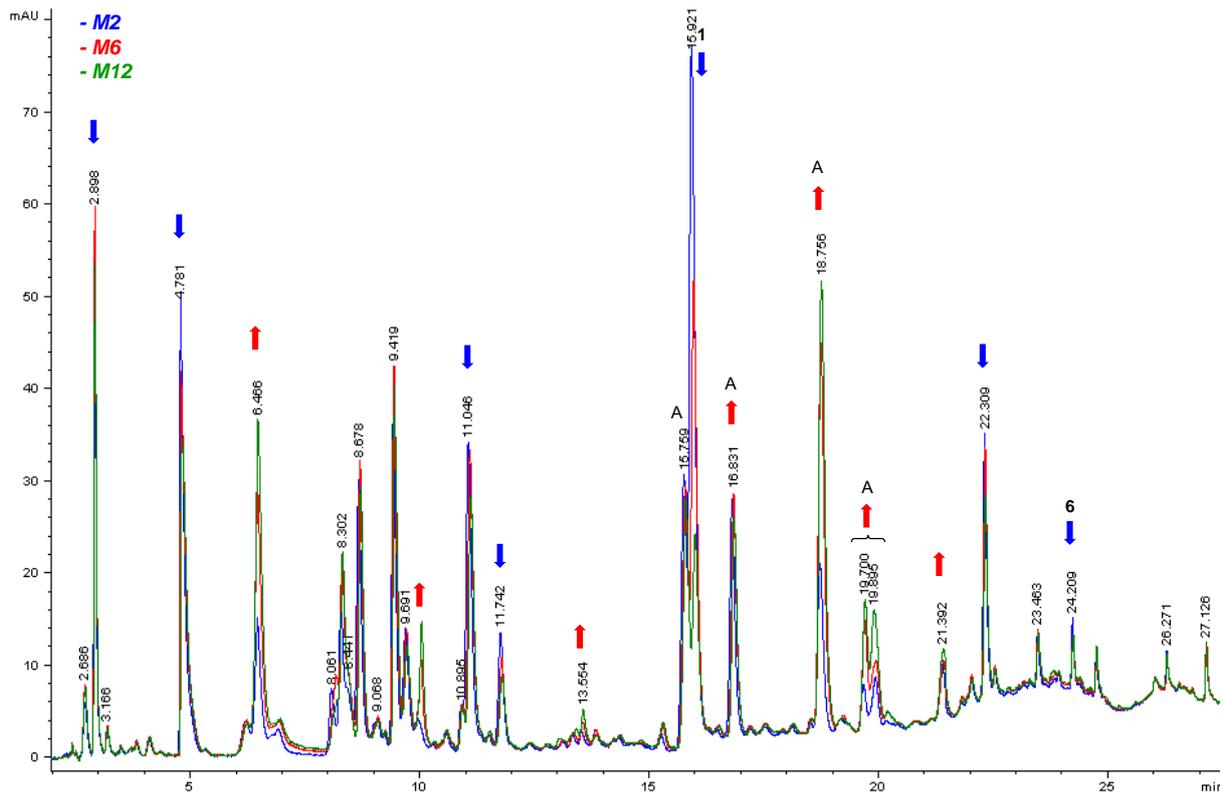
In der ersten Probe, 2006–T1, waren sowohl Flavonole mit Retentionszeiten zwischen 19 und 25 min als auch unbekannte Peaks zwischen 4 und 17 min zu sehen (Abb. D-3). Im Anschluß wurde bis zum 7. Extraktionstag ein Abbau aller Flavonole beobachtet (v. a. Peak 32, Quercetin 4'-O- $\beta$ -glucosid). Gleichzeitig nahmen alle Peaks im vorderen Retentionszeitbereich zu, als auch ein kleiner Peak bei 22.6 min. Nach 2 Monaten Lagerung bei 15°C war die Hälfte der Peaks, die nach 7 Tagen beobachtet wurden, entweder gänzlich verschwunden bzw. viel kleiner geworden (Abb. D-4, blau). Zeitgleich entstand eine ungefähr gleich große Menge an Peaks (Abb. D-4, rot). Im Zeitraum zwischen 2 und 12 Monaten veränderte sich der Zwiebelextrakt erneut sehr stark. Die Hälfte der Peaks wurde kleiner, andere Verbindungen größer (Abb. D-5). Eine ähnlich rapide Abnahme der Flavonole wurde bei den *B. pendula*-Blättern beobachtet (Sektion D3.3.3).



**Abb. D-3** HPLC-Chromatogramme der fermentierten Extrakte 2006-T1, -T3 und -T7. Pfeile (↑) zeigen Peaks an, die größer geworden sind, (↓) zeigen Komponenten an, die abgebaut wurden. Zuordnung der charakterisierten und identifizierten Peaks: s. Abb. D-1 (F: Flavonoid, A: Aminosäure ähnlich).



**Abb. D-4** HPLC-Chromatogramme der Stufenkontrollen 2006–T7 und –M2. Pfeile (↑) zeigen Peaks an, die größer geworden sind, (↓) zeigen Komponenten an, die abgebaut wurden. Zuordnung der charakterisierten und identifizierten Peaks: s. Abb. D-1 (A: Aminosäure ähnlich).



**Abb. D-5** HPLC-Chromatogramme der Stufenkontrollen 2006–M2, M6 und M12. Pfeile (↑) zeigen Peaks an, die größer geworden sind, (↓) zeigen Komponenten an, die abgebaut wurden. Zuordnung der charakterisierten und identifizierten Peaks: s. Abb. D-1 (A: Aminosäure ähnlich).

## 1.2. Biologische Untersuchungen

### 1.2.1. Mikrobiologische Untersuchungen der fermentierten Extrakte

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung sind in Tab. D-3 zusammengefasst. Es waren vor allem bei den Chargen aus 2006 und 2007 Milchsäurebakterien zu finden. Da die Extrakte mit Molke hergestellt wurden (s. Tab. G-2), ist dies nicht weiter erstaunlich. Interessant war jedoch, dass keine Milchsäurebakterien mehr im Extrakt von 2008 ab 2 Monaten Lagerung vorhanden waren.

**Tab. D-3** Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Zwiebelextrakte

Tage	1	3	7	60	120	180	270	360
2006		+	+	+	+	+		-
2007	-		+	+	+	+	+	+
2008	-	+	+	-	-	-		

\* -: negativer Test; +: positiver Test.

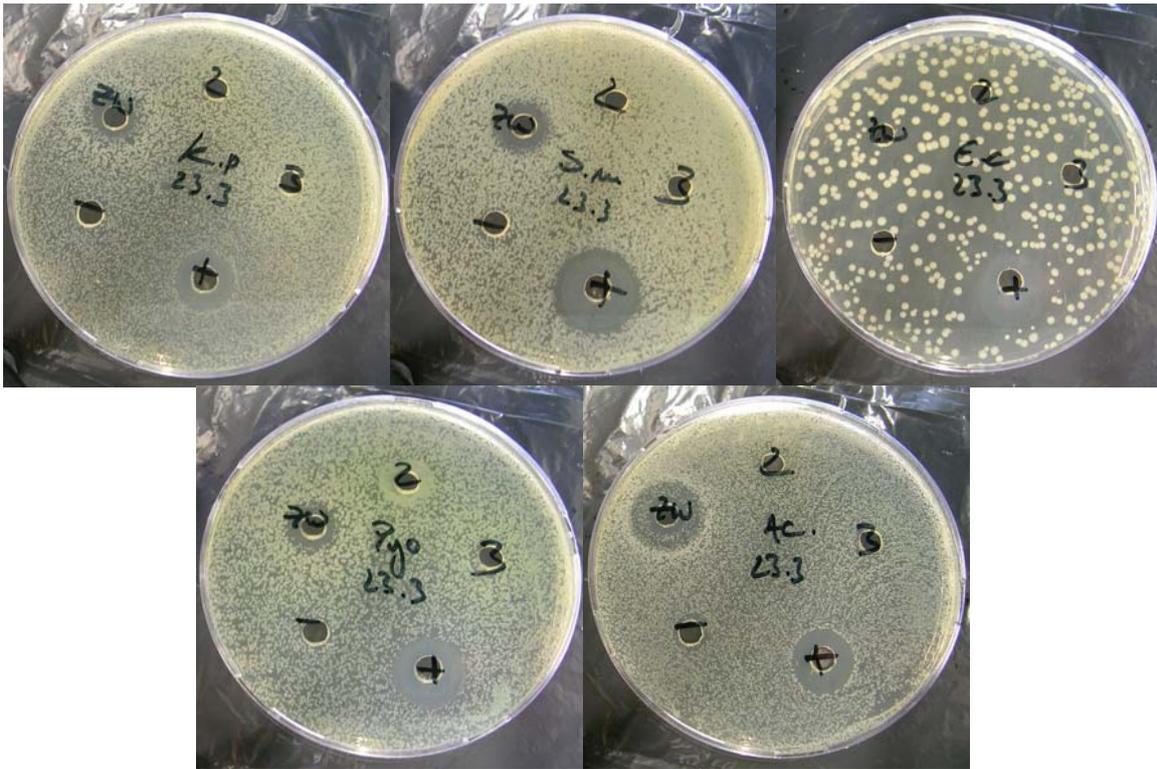
### 1.2.2. Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität von Zwiebelextrakten

Die antibakterielle Aktivität eines fermentierten, eines methanolischen und eines wässrigen Extraktes wurde mittels eines Agardiffusionstests und einer Bakterienwachstumskinetik untersucht.

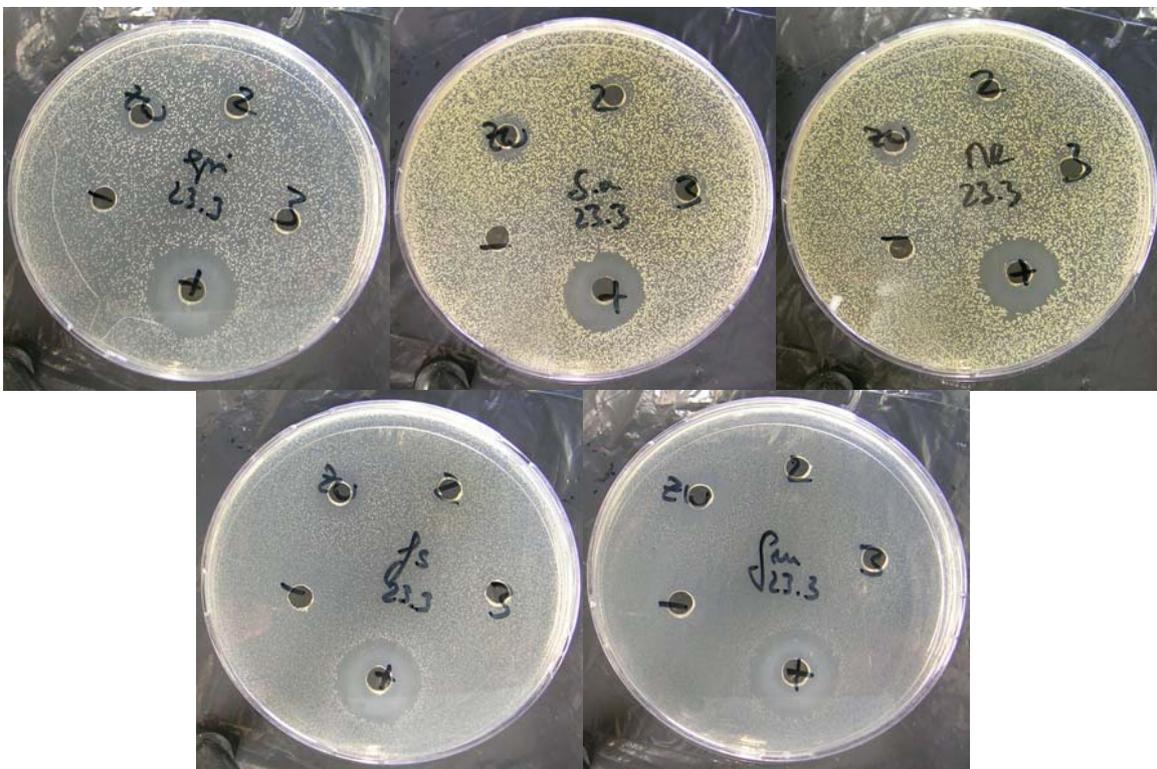
#### a) Agardiffusionstest

Der fermentierte Extrakt (2006–M12) zeigte bei allen gramnegativen Bakterienstämmen eine Wachstumshemmung mit klarem Hemmhof (ZW, Abb. D-6) und bei den grampositiven Stämmen eine Wachstumsreduktion mit einzelnen Kolonien innerhalb des Hemmhofes (Abb. D-7, zu den Bakterienstämmen siehe Abb. B-8). In allen Fällen wurde der Hemmhof gemessen und ist in Abb. D-8 für die fermentierte Urtinktur, verglichen mit der Positivkontrolle (Octenisept), graphisch dargestellt. Der größte Hemmhof wurde bei dem gramnegativen Bakterienstamm *A. baumannii* beobachtet, wobei es sich um einen „Doppelhof“ handelte. Dieser Hof maß insgesamt 16.5 mm, mit einem Ring von Bakterienkolonien in der Mitte.

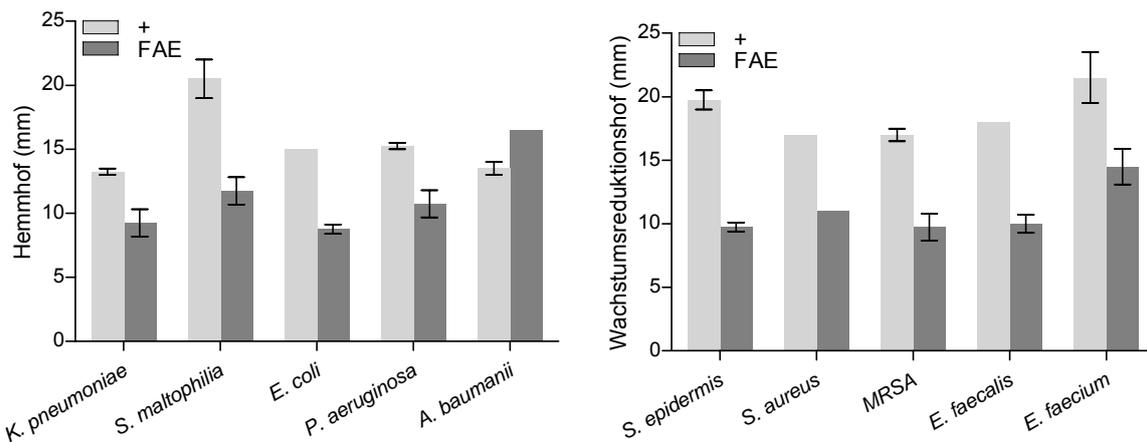
Der methanolische Extrakt zeigte eine Wachstumsreduktion bei zwei gramnegativen Bakterien (*S. maltophilia* und *A. baumannii*, mit einem Hof von 11–12 mm, Abb. D-6) und den drei verschiedenen Staphylokokken (Hof-Durchmesser: 9–10 mm, Abb. D-7). Der wässrige Extrakt zeigte keine antimikrobielle Aktivität. Die zwei selbsthergestellten Extrakte bewirkten sogar ein stärkeres Wachstum bei *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* (Abb. D-6: sehr gut zu sehen für den methanolischen Extrakt mit *P. aeruginosa* = Pyo).



**Abb. D-6** Agarplatten von ausgewählten gramnegativen Bakterienstämmen. Von links nach rechts: *K. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *A. baumannii*. ZW = WALA-Urtinktur; 2 = methanolischer Extrakt; 3 = wässriger Extrakt; + = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle.



**Abb. D-7** Agarplatten von ausgewählten grampositiven Bakterienstämmen. Von links nach rechts: *S. epidermis*, *S. aureus*, MRSA, *E. faecalis* und *E. faecium*. ZW = WALA-Urtinktur; 2 = methanolischer Extrakt; 3 = wässriger Extrakt; + = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle.



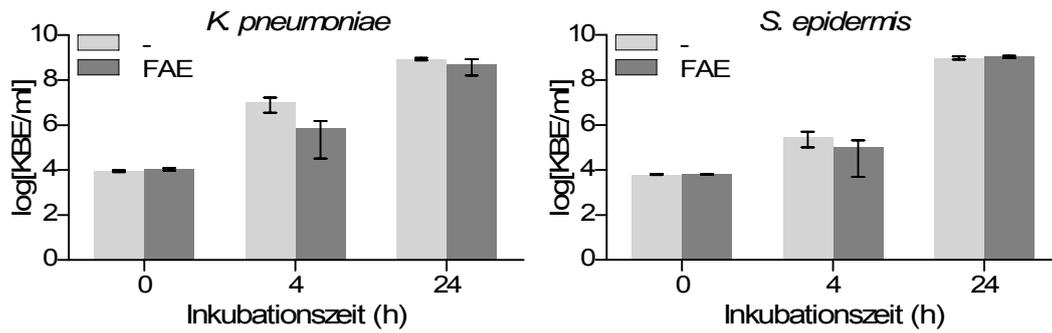
**Abb. D-8** Hemmhofdurchmesser für den fermentierten Extrakt (FAE) und die Positivkontrolle (Octenisept) bei den gramnegativen Stämmen (links) und den grampositiven Stämmen (rechts).

#### b) Bakterienwachstumskinetik

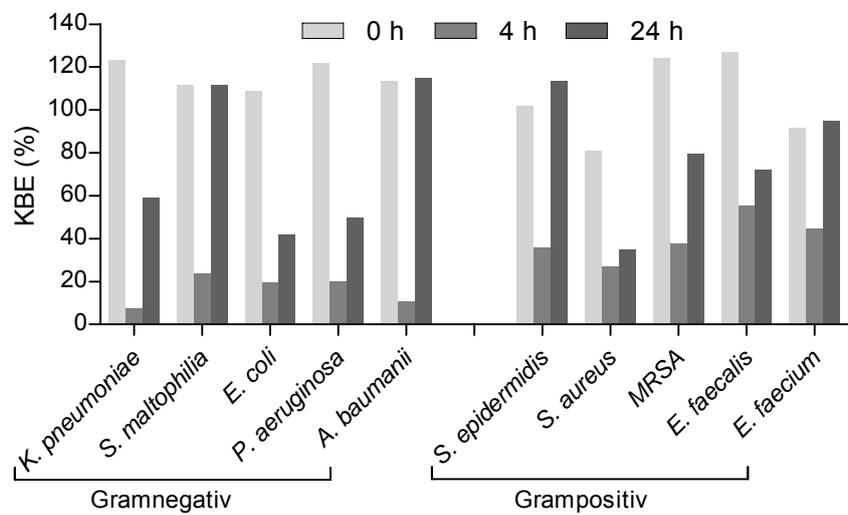
Um die Wirkung der Zwiebelextrakte in einer Bakteriensuspension zu beobachten, wurde eine Bakterienwachstumskinetik aufgenommen. Bei Vorversuchen zeigten die methanolischen und wässrigen Extrakte keine Aktivität, deswegen wurde für die folgenden Versuche lediglich mit der fermentierten Urtinktur gearbeitet. Die Positivkontrolle, Octenisept, wurde nur ein Mal getestet (auf *S. maltophilia*), und zeigte dabei eine stark bakterizide Wirkung: Es konnten auf keiner Platte Kolonien detektiert werden. Die fermentierte Urtinktur zeigte in allen zehn getesteten Bakterienstämmen eine leichte wachstumshemmende Aktivität nach 4 h, die nach 24 h Inkubation allerdings abfiel (Abb. D-9).

Um die Wachstumsreduktion der Bakterien nach Behandlung mit der WALA-Tinktur gegenüber Wasser besser nachzuvollziehen, wurde das folgende Verhältnis berechnet und graphisch dargestellt (Abb. D-10):  $\frac{\text{KBE (ZW)}}{\text{KBE (H}_2\text{O)}} \times 100$  (KBE = Kolonienbildende Einheiten).

Damit konnte bei den gramnegativen Bakterien nach Behandlung mit dem fermentierten Extrakt beobachtet werden, dass die Kolonienzahl nach 4 h bei 10–20 % der Negativkontrolle lag, also eine Wachstumsreduktion von 80 % aufwies. Bei den grampositiven Bakterien fiel die Wirkung nach 4 h mit 25–55 % der KBE/ml im Vergleich zur Negativkontrolle geringer aus.



**Abb. D-9** Wachstumskinetik von zwei ausgewählten Bakterienstämmen in Anwesenheit eines fermentierten Extraktes (FAE) bzw. Wasser (Negativkontrolle)



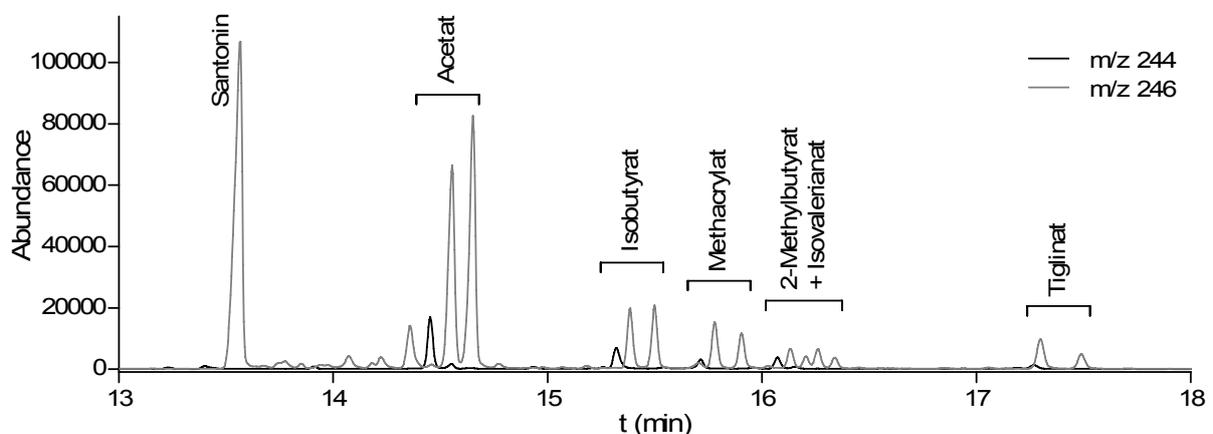
**Abb. D-10** Darstellung der Kolonienzahl (= KBE) (%) beim fermentierten Extrakt (2006–M12, bezogen auf die Ergebnisse mit Wasser)

## 2. Arnica montana

### 2.1. Phytochemische Analyse

#### 2.1.1. GC–MS-Methode

Die verwendete GC–MS–Methode zur Auftrennung und Gehaltsbestimmung der Sesquiterpenlactone (SL; s. Absatz G2.1.2.a), Gradient I), wurde von S. Wagner aus dem Arbeitskreis Merfort entwickelt und validiert.<sup>180</sup> Es wurde im SIM–Modus bei  $m/z$  244 und 246, den spezifischen Massen für die Helenalin– bzw.  $11\alpha,13$ -Dihydrohelenalinderivate (H– bzw. DH–Derivate), detektiert. In der nächsten Abbildung (Abb. D-11) ist ein typisches GC–MS–Chromatogramm eines fermentierten Arnikaextraktes mit der Zuordnung der jeweiligen Ester dargestellt. Die Zuordnung zu den einzelnen Derivaten erfolgte durch den Vergleich der MS–Spektren mit Spektren aus der arbeitskreisinternen Datenbank.<sup>181</sup> Die zu beobachtende Verdopplung bei den DH–Derivaten ist vermutlich auf Reaktionen im Injektor zurückzuführen, beeinträchtigte die Gehaltsbestimmung jedoch nicht.



**Abb. D-11** GC–MS–Chromatogramm einer Probe eines fermentierten Arnikaextraktes (2006–M12); SIM–Modus.

<sup>180</sup> Wagner (2006); Wagner & Merfort (2007)

<sup>181</sup> Kos (2005)

### 2.1.2. Vergleich der fermentierten Extrakte

Alle vorhandenen Proben der fermentierten Arnikaextrakte (s. Tab. G-4) wurden nach Aufarbeitung (Absatz G2.5.2) mittels GC–MS quantifiziert. Die Aufarbeitung wurde jeweils mindestens zweimal durchgeführt. Der gesamte prozentuale Gehalt an Sesquiterpenlactonen (SL) lag zwischen 0.007 und 0.016 % des fermentierten Extraktes für alle Proben (Chargen 2006–2008, Tab. D-4). Bei den Proben, die während der Lagerung gezogen wurden, schwankte die berechnete Konzentration. Zusätzliche Wiederholungen der Aufarbeitungen bestätigten diese Befunde. Daher wird vermutet, dass die Homogenisierung des Extraktes bei den Probenahmen nicht optimal war, vor allem während der 7-tägigen Extraktion aufgrund der neben der Flüssigkeit vorhandenen Pflanzenteile. Die Tinktur von 2007 hatte die geringste Konzentration an SLs über den ganzen Zeitraum mit ca. 4/5 des gesamten SL–Gehaltes der anderen Chargen. Die relative Standardabweichung zwischen jeweils zwei Aufarbeitungen war <10 % für die gesamten SLs sowie für die DH-Derivate. Bei den Helenalinestern dagegen betrug sie bis zu 50 %. Insgesamt konnte für die drei untersuchten Jahrgänge tendenziell ein leichter Rückgang der Sesquiterpenlactone beobachtet werden. Nach sieben Tagen Extraktion waren noch 70–80 % der Anfangskonzentration an SLs vorhanden (Abb. D-12). Während der Lagerung blieb der Anteil weiterhin bei ca. 70 %. Die Sesquiterpenlactone waren folglich bei den untersuchten Lagerungsbedingungen vergleichsweise stabil. Außerdem wurden Analysen von frühen und späten Proben der drei fermentierten Extrakte (*T3* bzw. *M6* oder *M9*) mittels GC–MS im Total-Ion-Modus durchgeführt und miteinander verglichen. Es konnten keine der aus der Literatur bekannten Addukte in den späten Proben detektiert werden (s. B4.2.4).

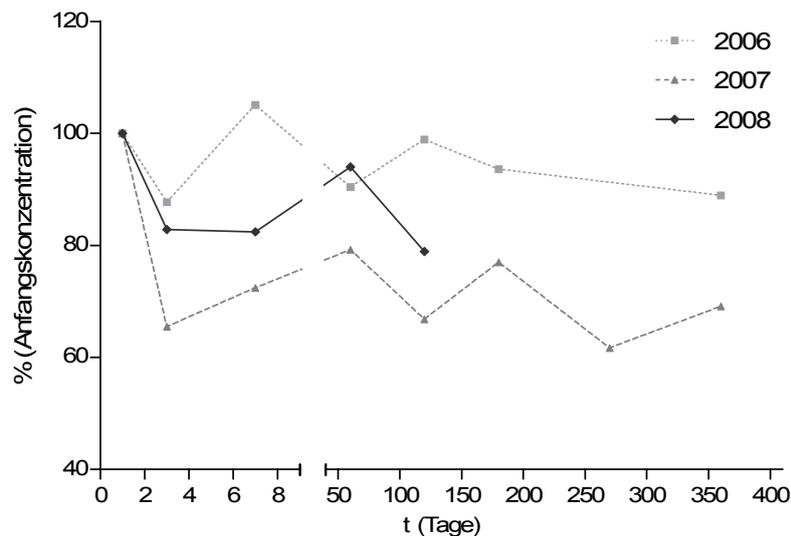
Die gemessenen pH–Werte (Tab. D-5) lagen für die zwei Chargen von 2006 und 2007 bei pH 4, in der Charge von 2007 waren die pH–Werte nach 24 h leicht erhöht.

**Tab. D-4** Gehalt (% w/v) an SL, Helenalin (H)- und Dihydrohelenalin (DH)-Derivaten in fermentierten Arnikaextrakten aus den Jahrgängen 2005 bis 2008

SL-Gesamt	2005		2006		2007		2008	
	C (%)	RSD (%)						
T1			1.48E-02	3.43	1.21E-02	7.32	1.50E-02	0.83
T3			1.30E-02	6.68	7.90E-03	1.16	1.24E-02	1.84
T7			1.56E-02	1.24	8.74E-03	1.92	1.24E-02	9.43
M2			1.34E-02	5.89	9.56E-03	3.36	1.41E-02	7.01
M4			1.47E-02	6.24	8.06E-03	5.29	1.18E-02	5.65
M6			1.39E-02	4.88	9.29E-03	0.88		
M9					7.45E-03	8.78		
M12	1.45E-02	5.54	1.32E-02	1.49	8.34E-03	8.37		

H-D.	2005		2006		2007		2008	
	C (%)	RSD (%)						
T1			1.66E-03	11.24	1.75E-03	14.19	2.61E-03	18.17
T3			1.53E-03	14.39	5.99E-04	14.07	1.08E-03	48.62
T7			2.55E-03	15.89	9.07E-04	29.76	1.43E-03	0.61
M2			1.32E-03	14.01	1.06E-03	18.67	1.96E-03	13.30
M4			1.70E-03	35.63	5.78E-04	5.15	1.09E-03	38.80
M6			1.61E-03	29.81	7.18E-04	23.95		
M9					4.10E-04	31.89		
M12	7.21E-04	28.16	1.34E-03	16.63	6.30E-04	42.91		

DH-D.	2005		2006		2007		2008	
	C (%)	RSD (%)						
T1			1.32E-02	2.44	1.03E-02	6.16	1.24E-02	4.84
T3			1.15E-02	5.66	7.30E-03	0.10	1.13E-02	2.64
T7			1.31E-02	1.62	7.83E-03	1.30	1.09E-02	10.75
M2			1.21E-02	8.07	8.50E-03	1.45	1.21E-02	6.00
M4			1.30E-02	11.71	7.48E-03	6.10	1.07E-02	2.29
M6			1.23E-02	9.43	7.73E-03	14.17		
M9					7.04E-03	7.44		
M12	1.38E-02	4.35	1.19E-02	3.54	7.71E-03	5.55		



**Abb. D-12** Stabilitätsvergleich der gesamten SLs (in % der Anfangskonzentration) in den fermentierten Extrakten von 2006 bis 2008.

**Tab. D-5** Vergleich der pH-Werte von Proben aus zwei fermentierten Arnikaextrakten (2006 und 2007)

Jahr	T1	T3	T7	M12
2006	4.2	3.9	4	3.9
2007	4.9	3.7	3.7	3.7

### 2.1.3. Vergleich mit selbsthergestellten Extrakten

Es wurden drei verschiedene Extrakte aus gemörserter Frischpflanze hergestellt (s. Absätze G2.5.1.b) bis d)), um deren Konzentration an SLs und deren biologische Wirkung mit der der fermentierten Extrakte zu vergleichen. Die Ergebnisse der jeweiligen Gehaltsbestimmungen sind in Tab. D-6 zusammengefasst. Der erste Extrakt („50 % MeOH“) wurde nach einer Vorschrift zur erschöpfenden Extraktion hergestellt.<sup>182</sup> Damit wurden auch die höchsten Mengen an SLs aus der Pflanze extrahiert. Zusätzlich wurde ein Extrakt nach einer anderen Vorschrift des HAB (3c<sup>183</sup>) sowie ein kalter wässriger Extrakt ohne Fermentation hergestellt. Die zwei letzten Extrakte waren sich sehr ähnlich, was die extrahierten Mengen an SLs aus der Pflanze betrifft.

<sup>182</sup> Willuhn & Leven (1991)

<sup>183</sup> HAB 3 (2003)

**Tab. D-6** Sesquiterpenlactongehalt in den selbsthergestellten Frischpflanzenextrakten (in %, auf Extrakt (w/v) bzw. auf frische Droge (w/w) bezogen) und Vergleich mit Proben nach 12 Monaten des fermentierten Extraktes von 2006

C(%)	50 % MeOH		HAB 3c		Wässriger Extrakt		2006-M12
	(w/v)	(w/w)	(w/v)	(w/w)	(w/v)	(w/w)	(w/v)
SL	1.23 <sup>E-01</sup>	1.22 <sup>E-01</sup>	6.25 <sup>E-02</sup>	3.84 <sup>E-02</sup>	3.01 <sup>E-02</sup>	3.77 <sup>E-02</sup>	1.32 <sup>E-02</sup>
H	4.15 <sup>E-02</sup>	4.15 <sup>E-02</sup>	2.54 <sup>E-02</sup>	1.52 <sup>E-02</sup>	1.01 <sup>E-02</sup>	1.26 <sup>E-02</sup>	1.34 <sup>E-03</sup>
DH	8.10 <sup>E-02</sup>	8.10 <sup>E-02</sup>	3.71 <sup>E-02</sup>	2.32 <sup>E-02</sup>	2.01 <sup>E-02</sup>	2.51 <sup>E-02</sup>	1.19 <sup>E-02</sup>

## 2.2. Biologische Untersuchungen

### 2.2.1. Mikrobiologische Untersuchungen der fermentierten Extrakte

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung sind Tab. D-7 zusammengefasst. Milchsäurebakterien waren in allen Proben von 2006 sowie in den Proben von 2007 und 2008, die während der Extraktion entnommen wurden, zu finden. Interessanterweise wurden diese Extrakte anstatt mit Molke, mit Laktose und Honig hergestellt (s. Tab. G-2), die Milchsäurebakterien also über die Pflanze eingebracht.

**Tab. D-7** Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Arnikaextrakte

	Tage	1	3	7	60	120	180	270	360
2006			+	+	+	+	+		+
2007		+	+	+	-	-	-	-	+
2008		+	+	+	-	-	-	-	

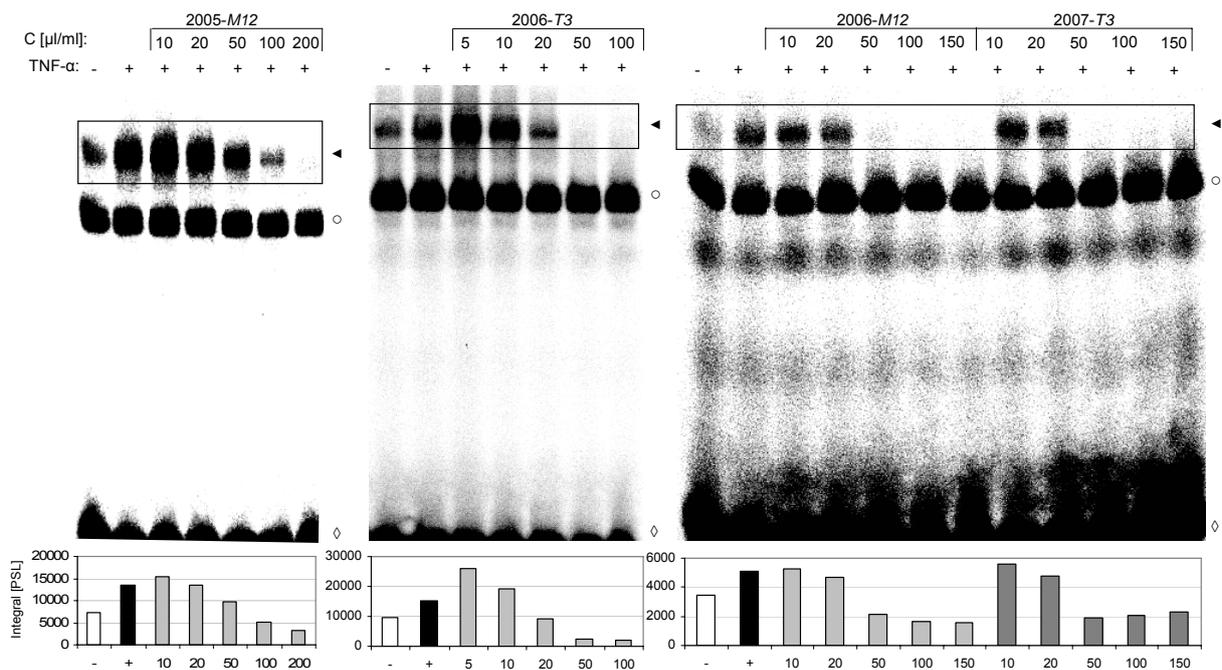
\* -: negativer Test; +: positiver Test.

### 2.2.2. Untersuchung auf entzündungshemmende Aktivität

#### a) Fermentierte Extrakte

Die fermentierten Extrakte 2005-M12, 2006-T3 und -M12 sowie 2007-T3 wurden auf ihre hemmende Aktivität gegenüber dem Transkriptionsfaktor NF-κB getestet (Methode s. G3.3). Die Ergebnisse der EMSAs sind in Abb. D-13 dargestellt. Die Konzentrationen an SLs der verwendeten Proben sind in Tab. D-8 wiedergegeben. Die Proben von 2006 und 2007 zeigten eine ähnliche Aktivität: sie hemmten alle vollständig die NF-κB-Bindung ab einer Konzentration von 50 µl/ml. Für 2005-M12 waren über 100 µl/ml nötig. Obwohl die drei Proben von 2005 und 2006 ähnliche Konzentrationen an SLs hatten, zeigte der Extrakt 2005-

*M12* eine schwächere NF- $\kappa$ B Hemmung. Die fertige Urtinktur enthielt nur halb so viel H-Derivate als die Proben von 2006, und wirkte erst bei der vierfachen Konzentration hemmend (s. Tab. D-8). Obwohl der Gesamtgehalt in der Probe 2007–*T3* geringer als in den vorherigen Jahrgängen war und der Gehalt an Helenalinderivaten vergleichbar mit dem in der Urtinktur von 2005 war, zeigte die Probe 2007–*T3* eine ähnliche Hemmkonzentration wie die Proben von 2006.



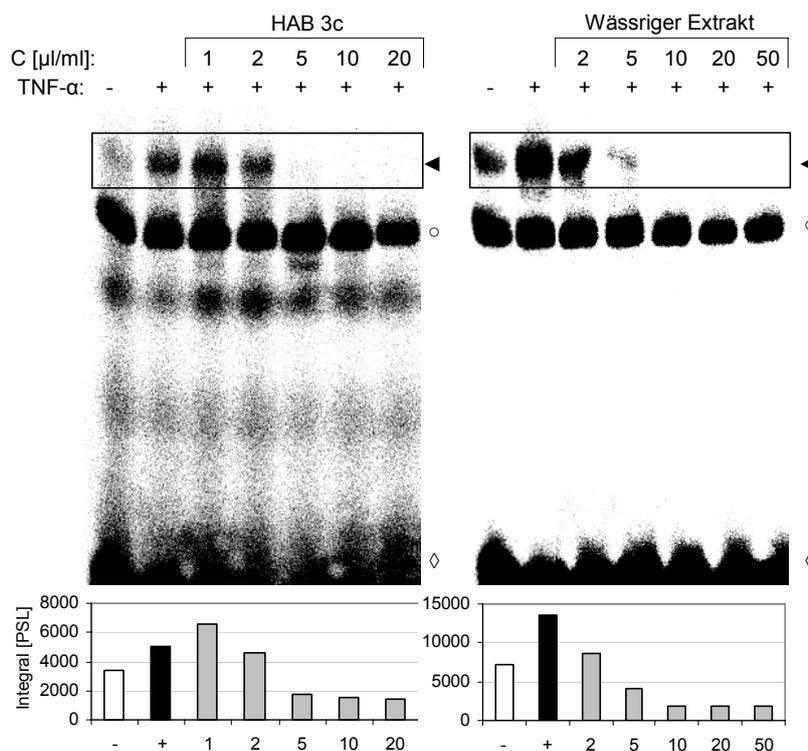
**Abb. D-13** Wirkung von vier fermentierten Arnikaextrakten (Proben 2005-*M12*, 2006-*T3*, -*M12* und 2007-*T3*) auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung in HaCaT-Zellen. Bahn „-“ zeigt unstimulierte Kontrollzellen; Bahn „+“ zeigt Zellen, die lediglich mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden. In den anderen Bahnen wurden die Zellen 1 h mit den angegebenen Mengen an Arnikauszug vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 U/ml TNF- $\alpha$  1 h stimuliert. Ein gefülltes Dreieck zeigt die Stelle des NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes an. Der Ring deutet eine unspezifische Bindung an und die Raute ungebundenes Oligonukleotid.

**Tab. D-8** Sesquiterpenlactongehalt (% w/v) und der zur vollständigen NF- $\kappa$ B-Komplex-Hemmung notwendige Konzentrationsbereich (bezogen auf die Kontrolle) an fermentierten bzw. selbsthergestellten Arnikaextrakten

C (%)	2005- <i>M12</i>	2006- <i>T3</i>	2006- <i>M12</i>	2007- <i>T3</i>	HAB 3c	Wässriger Extrakt
SL	1.45E-02	1.30E-02	1.32E-02	7.90E-03	6.25E-02	3.01E-02
H	7.21E-04	1.53E-03	1.34E-03	5.99E-04	2.54E-02	1.01E-02
DH	1.38E-02	1.15E-02	1.19E-02	7.30E-03	3.71E-02	2.01E-02
NF- $\kappa$ B Hemmung ( $\mu$ /ml)	50–100	20	20–50	20–50	2–5	2–5

## b) Vergleich mit selbsthergestellten Extrakten

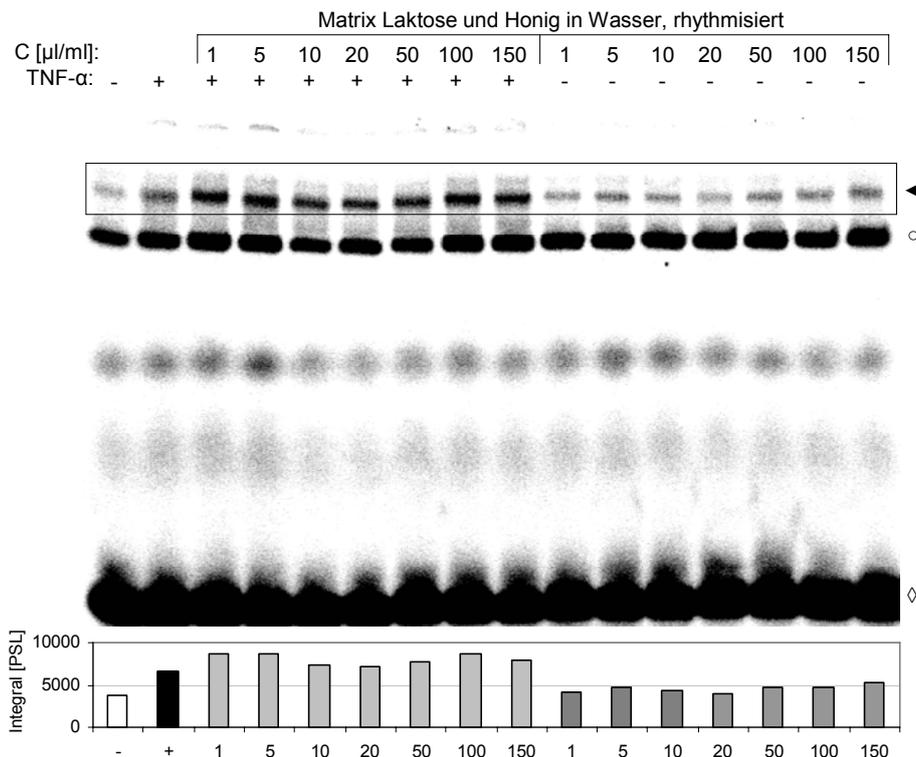
Zum Vergleich mit den fermentierten Extrakten wurde ein Extrakt aus Arnika-Pflanzen nach der Vorschrift 3c des HABs, sowie ein wässriger Extrakt aus frischen Pflanzen hergestellt (s. Absätze G2.5.1.c) bzw. d) und D2.1.3). Die Konzentrationen an SLs sind in Tab. D-8 angegeben. Wie in Abb. D-14 dargestellt, hemmten diese Auszüge die NF- $\kappa$ B-Bindung vollständig ab einer Konzentration von 2–5  $\mu$ l/ml, d. h. sie verhielten sich hinsichtlich der NF- $\kappa$ B-DNA-Hemmung ähnlich. Diese selbsthergestellten Extrakte enthielten 2.5–5 mal höhere Mengen an SLs und 10–20 mal höhere Mengen an H-Derivaten als die fermentierten Extrakte. Sie hemmten die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung entsprechend bei geringeren Konzentrationen.



**Abb. D-14** Wirkung von selbsthergestellten Arnikaextrakten auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung. Bahn „-“ zeigt unstimulierte Kontrollzellen; Bahn „+“ zeigt Zellen, die lediglich mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden. Bei den anderen Bahnen wurden die Zellen 1 h mit der angegebenen Menge an Arnika-Auszügen vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 U/ml TNF- $\alpha$  1 h stimuliert. Ein gefülltes Dreieck zeigt die Stelle des NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes an. Der Ring deutet eine unspezifische Bindung an und die Raute ungebundenes Oligonukleotid.

### 2.2.3. Matrix

Die fermentierten Extrakte zeigten im Vergleich zum selbsthergestellten wässrigen Extrakt eine erheblich schwächere Hemmwirkung, dafür aber eine Stimulierung der TNF- $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei einigen Konzentrationen. Um den Einfluß der Matrix (d. h. der Laktose und des Honigs) zu untersuchen, wurden die Untersuchungen auf Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B weitergeführt. Dazu wurde die Wirkung der Matrix mit und ohne Zusatz des Zytokins TNF- $\alpha$  auf NF- $\kappa$ B untersucht (Abb. D-15). Bei einem Vorversuch konnte für die Matrix mit TNF- $\alpha$ -Stimulierung eine leichte Steigerung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung beobachtet werden. Bei der Wiederholung mit und ohne TNF- $\alpha$  konnte aber kein signifikanter Trend beobachtet werden (Abb. D-15). Die leichte Stimulierung bei einigen Bahnen ohne TNF- $\alpha$  (Bahnen 10–16) deutete auf eine Grundstimulierung in den HaCaT-Zellen hin. Vergleichbare Ansätze ohne Laktose und/oder ohne Honig brachten das gleiche Ergebnis (nicht gezeigt).



**Abb. D-15** Wirkung der WALA-Matrix (Laktose und Honig in dest. Wasser, s. G2.5.1.e)) auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung in HaCaT-Zellen. Bahn „-“ zeigt unstimulierte Kontrollzellen; Bahn „+“ zeigt Zellen, die lediglich mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden. In den anderen Bahnen wurden die Zellen 1 h mit den angegebenen Mengen an WALA-Matrix vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 U/ml TNF- $\alpha$  1 h stimuliert. Ein gefülltes Dreieck zeigt die Stelle des NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes an. Der Ring deutet eine unspezifische Bindung an und die Raute ungebundenes Oligonukleotid.

### 3. **Betula pendula**

#### 3.1. **Entwicklung einer HPLC–Methoden**<sup>184</sup>

Zur Quantifizierung von Hyperosid wurde mit dem HPLC–System I eine geeignete Methode entwickelt (Absatz G2.1.1.a)). Basis dafür war eine isokratische Methode<sup>185</sup> die u. a. durch Anpassung an einen Gradienten mit Methanol optimiert wurde. Die beste Trennung wurde mit der RP18 Symmetry Säule erzielt im Vergleich zu Hypersil ODS, Nova-pak und Sperisorb ODS (s. Tab. G-10). Diese Methode wurde validiert und für die Gehaltsbestimmung der Flavonolglykoside in den ersten Proben fermentierter Extrakte (Charge von 2005) sowie der verschiedenen methanolischen und wässrigen Extrakte benutzt. Die beiden letztgenannten Extrakte wurden hergestellt, um geeignete Bedingungen für eine erschöpfende Extraktion zu ermitteln. Nachdem das System I sich für den Routinebetrieb als ungeeignet erwies, wurde die Trennmethode auf das System II übertragen, das im Laufe der Methodenentwicklung zur Verfügung stand. Für die Spurenanalytik wurde zusätzlich eine GC–MS Methode verwendet (Absatz G2.1.2.a), Gradient II).

#### 3.2. **Validierung**<sup>184</sup>

##### 3.2.1. **Spezifität**

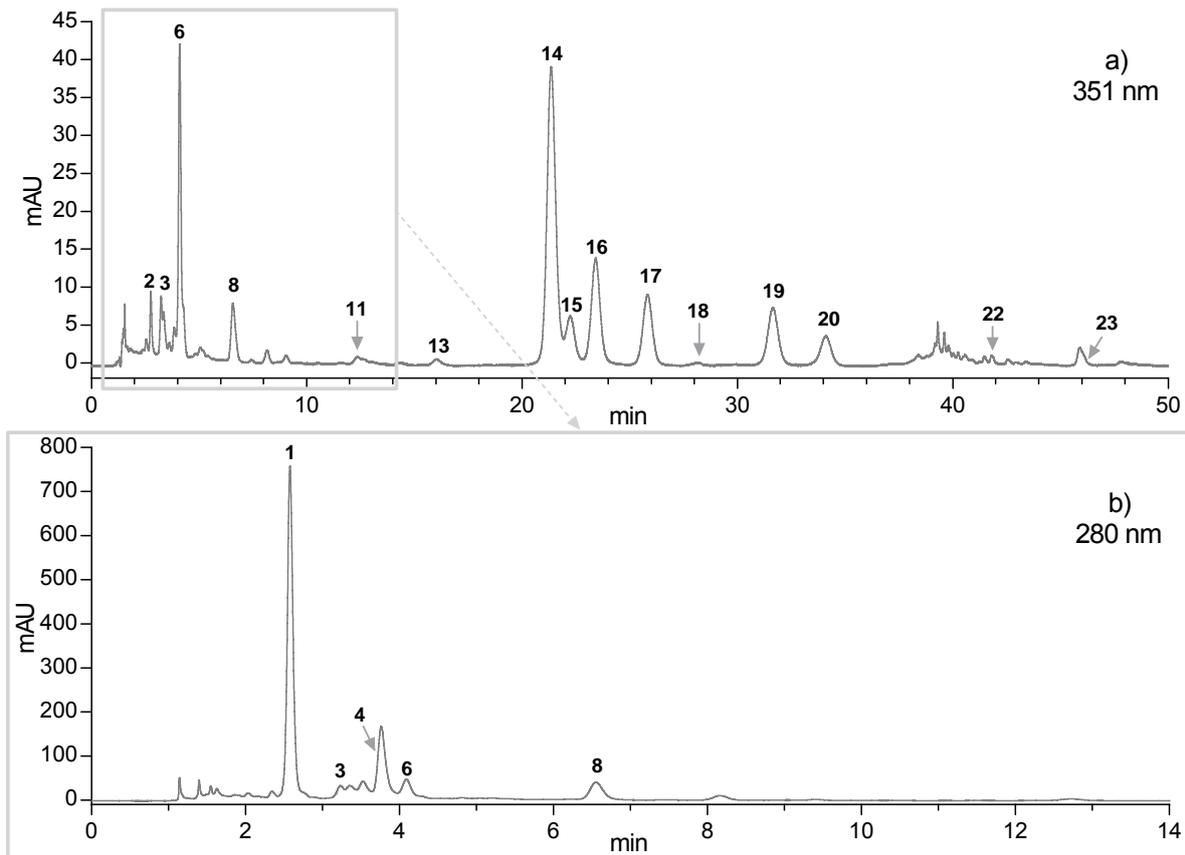
Die Peaks der phenolischen Verbindungen (Zuordnung s. Abb. D-16) wurden anhand der Literatur<sup>186</sup>, der UV-Spektren und LC–MS Daten sowie mittels Aufstockexperimente mit authentischen Referenzsubstanzen zugeordnet. Die Peakreinheit der Flavonole wurde mit dem ChemStation Peakpurity Test geprüft, wodurch auch die Spezifität der Methode bestätigt wurde. Die Validierung wurde für Hyperosid und Quercetin durchgeführt. Alle Flavonolglykoside wurden als Hyperosid Äquivalente quantifiziert. Für alle Validierungsschritte wurde der fermentierte Extrakt 2005–T3 verwendet.

---

<sup>184</sup> Millet et al. (2010)

<sup>185</sup> Dallenbach-Tölke et al. (1987)

<sup>186</sup> Clifford et al. (2003); Keinänen & Julkunen-Tiitto (1998); Ossipov et al. (1996); Schieber et al. (2002)



**Abb. D-16** Chromatogramme der Probe nach einem Tag Extraktion des fermentierten Extraktes aus 2007. a) HPLC–UV bei 351 nm; b) HPLC–UV, früher Retentionszeitbereich bei 280 nm. Peakzuordnung: 1) 3,4'-Dihydroxypropiofenon 3-*O*- $\beta$ -glucopyranosid; 2) Neochlorogensäure; 3) 3-*p*-Cumaroylchinasäure; 4) *p*-Hydroxyphenylethanol; 6) Chlorogensäure; 8) 5-*p*-Cumaroylchinasäure; 11) Myricetin 3-*O*- $\beta$ -galactosid + Myricetin 3-*O*- $\beta$ -glucuronid; 13) Myricetin 3-*O*- $\beta$ -glucosid; 14) Hyperosid; 15) Rutin + Isoquercitrin; 16) Quercetin 3-*O*- $\beta$ -glucuronid; 17) Quercetin 3-*O*-arabinopyranosid<sup>187</sup>; 18) Kaempferol 3-*O*-glykosid; 19) Quercetin 3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranosid; 20) Quercitrin; 22) Apigenin; 23) Acacetin.

### 3.2.2. Hyperosid

Der LLOQ–Wert wurde für Hyperosid auf dem System II als 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bestimmt. Das Signal/Rausch–Verhältnis war dabei 11.3:1 (ICH<sup>188</sup> fordert einen Wert von >10:1), die relative Standardabweichung betrug <4 % (Tab. D-9a) und die kleinste Wiederfindung 81 % (FDA<sup>189</sup> fordert eine Wiederfindung von 100 $\pm$ 20 %). Der LLOQ–Wert wurde als kleinste Konzentration des Kalibrierbereiches gewählt.

<sup>187</sup>  $\alpha$  oder  $\beta$  Konfiguration nicht bestimmt.

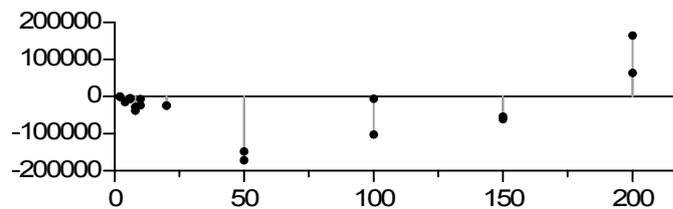
<sup>188</sup> ICH-Q2A (1995); ICH-Q2B (1996)

<sup>189</sup> US FDA (2001)

Die Hyperosid Kalibrierung wurde zuerst auf dem System I mit 10 Konzentrationen an Hyperosid (2–200 µg/ml) durchgeführt. Da die Flavonolglykosid-Konzentrationen zwischen den verschiedenen Proben der fermentierten Extrakte sehr unterschiedlich waren, sollte die Kalibrierkurve einen breiteren Konzentrationsbereich abdecken. Das am Anfang aufgestellte Modell war linear mit folgender Gleichung:

$$C_{H-I}[\mu\text{g/ml}] = \frac{A}{39074}; R^2 = 0.9993$$

Obwohl der Korrelationskoeffizient  $R^2$  sehr gut war, zeigte der später ermittelte Residuenplot durch die nicht zufällige Streuung der Punkte, dass das lineare Modell nicht erlaubt war (Abb. D-17). Diese Gleichung wurde daher nicht weiter verwendet.

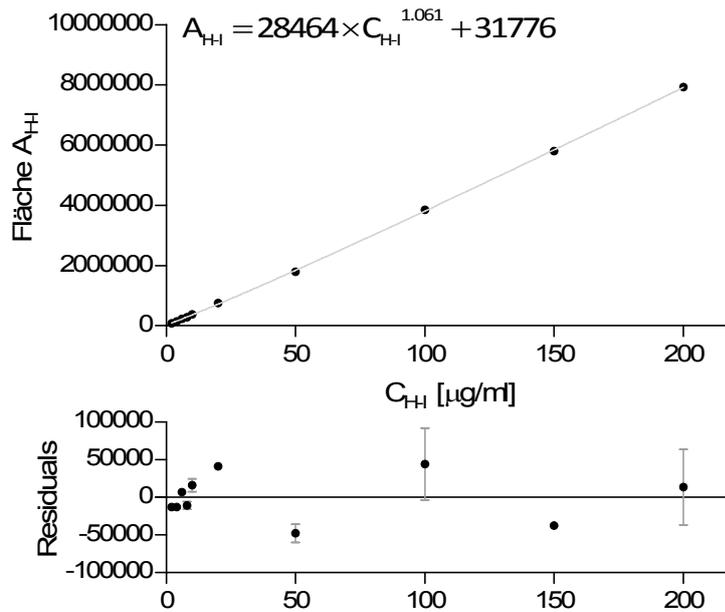


**Abb. D-17** Residuenplot der Hyperosidkalibrierung mit System I unter Zugrundelegung eines lineares Modells

Die beste Korrelation zwischen Konzentration ( $C_{H-I}$ ) und Peakfläche ( $A_{H-I}$ ) wurde später berechnet und war nicht linear (Abb. D-18). Die Kalibrierfunktion und der Korrelationskoeffizient wurden wie folgt berechnet:

$$C_{H-I}[\mu\text{g/ml}] = \left( \frac{A - 31776}{28464} \right)^{\frac{1}{1.061}}; R^2 = 0.9998$$

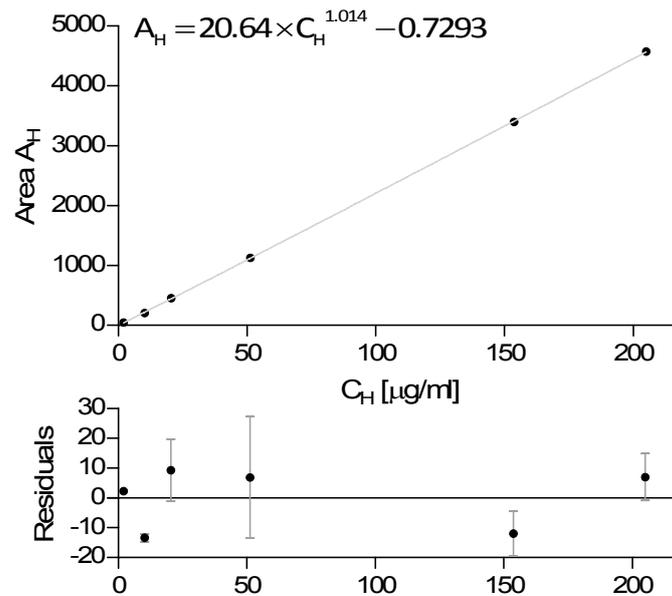
Hier waren die Residuen wie gefordert zufällig gestreut und rechtfertigten das nichtlineare Modell (Abb. D-18). Diese Gleichung wurde für alle Quantifizierungen verwendet, die mit dem System I durchgeführt wurden.



**Abb. D-18** Kalibrierkurve und Residuenplot für 10 Konzentrationen der Hyperosid Referenzlösungen (2–200  $\mu\text{g/ml}$ ) jeweils doppelt injiziert in das System I unter Zugrundelegung eines nichtlinearen Modells

Für die Übertragung der Methoden auf System II wurde die Hyperosidkalibrierung wiederholt: sechs Hyperosidlösungen mit Konzentrationen zwischen 2 und 205  $\mu\text{g/ml}$  wurden hergestellt und in diesem System doppelt injiziert. Hier war die beste Korrelation ebenso nicht linear (Abb. D-19). Kalibriergleichung und Korrelationskoeffizient wurden wie folgt berechnet:

$$C_{H-II}[\mu\text{g/ml}] = \left( \frac{A + 0.7293}{20.64} \right)^{\frac{1}{1.014}}; \text{ mit } R^2 = 0.9999$$



**Abb. D-19** Kalibrierkurve und Residuenplot für 6 Konzentrationen der Hyperosid Referenzlösungen (2–205 µg/ml), doppelt injiziert in das System II unter Zugrundelegung eines nichtlinearen Modells

Eine Standardabweichung von 0.41 % (50 µg/ml Hyperosid, System II) wurde bei den Systempräzisions-Analysen berechnet. Dieser nicht signifikante Wert bestätigte die Injektorstabilität.

Die Wiederhol- und Intermediärpräzisionsuntersuchung wurde zuerst für Hyperosid mit dem System I für drei Konzentrationen (2, 50 und 200 µg/ml) sowie für einen methanolischen Extrakt aus getrockneten Birkenblättern (25 mg/ml w/w; Tab. D-9a) durchgeführt, später für eine 50 µg/ml Hyperosidlösung und einen fermentierten Extrakt aus frischen Blättern (BW05-T3, Tab. D-9b) mit dem System II wiederholt. Alle Standardabweichungen waren <5 % für die Referenzlösungen und <7 % für die Pflanzenextrakte.

Die Genauigkeit wurde aus den Präzisionsuntersuchungen ermittelt (Tab. D-9). Die Wiederfindungsrate für die höchsten Konzentrationen (50 und 200 µg/ml) waren alle im Bereich von 100±5 %. Die kleinste Wiederfindungsrate für die 2 µg/ml Hyperosidlösung lag bei 81 %, ein Wert der schon beim LLOQ-Wert berichtet wurde.

Wiederfindungsexperimente wurden beim Aufstocken eines fermentierten Extraktes (3.18 µg/ml Hyperosid) mit verschiedenen Konzentrationen eines Standards durchgeführt. Das Aufstocken von 45.10 und 153.75 µg/ml Hyperosid zum fermentierten Extrakt (Tab.

D-10) ergab Wiederfindungsraten von 96.13 bzw. 102.90 %. Wiederfindungsraten wurden auch für die gesamten Flavonolglykoside ermittelt (97.23 bzw. 104.91 %).

**Tab. D-9** Wiederhol- und Intermediärpräzision für Hyperosid in Referenzlösungen und Birkenblätterextrakten; a) System I, b) System II.

a)

Probe (Konz. µg/ml)	Hyperosid Konzentration (µg/ml)	RSD (%) der Wiederhol- präzision	RSD (%) der Intermediärpräzision (3 Tage)	Wieder- findungsrate (%)
Hyperosid (2)	1.69	0.50–4.30	3.23	81.00–86.80
Hyperosid (50)	49.13	0.25–2.78	2.45	96.89–100.69
Hyperosid (200)	199.60	0.66–2.14	1.77	98.36–100.61
MeOH Extrakt <sup>a</sup>	196.30	1.97–4.65	1.50	—

b)

Probe (Konz. µg/ml)	Hyperosid Konzentration (µg/ml)	RSD (%) der Wiederholpräzision	RSD (%) der Intermediärpräzision (3 Tage)	Wieder- findungsrate (%)
Hyperosid (50)	51.65	0.22–1.91	1.34	100.26–101.28
Fermentierter Extrakt <sup>b</sup>	3.18	2.71–6.70	1.13	—

<sup>a</sup> Pflanzenkonzentration: 25 mg/ml trockene Droge (s. G2.6.1.d)). <sup>b</sup> Probe 2005-T3, verdünnt 1:3 mit H<sub>2</sub>O.

**Tab. D-10** Genauigkeitstest durch Aufstocken eines fermentierten Extraktes (3.18 µg/ml Hyperosid) mit verschiedenen Hyperosidkonzentrationen.

Substanz aufgestockt (µg/ml)	Hyperosid Konzentration (µg/ml)	RSD (%) der Wiederhol- Präzision (n=3)	Wiederfindungsrate (%)
Hyperosid (45.10)	46.41	0.76	96.13
Hyperosid (153.75)	161.49	0.05	102.90

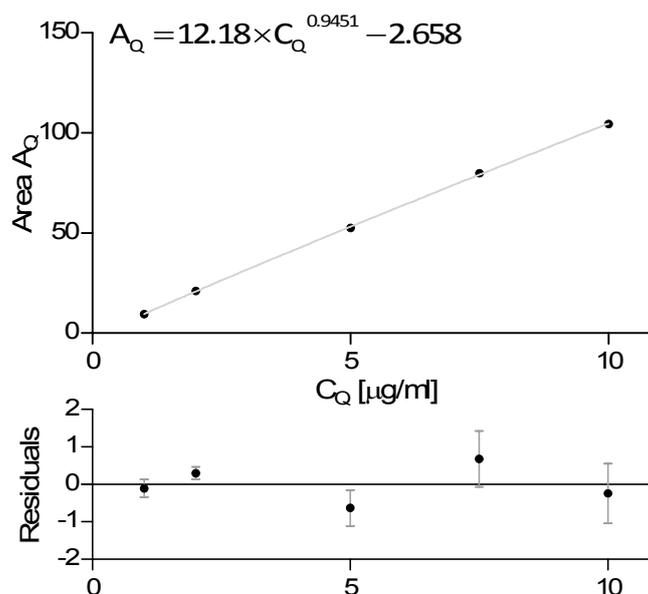
### 3.2.3. Quercetin

Die Validierung der Methode für Quercetin wurde auf System II durchgeführt. Der LLOQ-Wert wurde als 1 µg/ml (System II) bestimmt, mit einer relativen Standardabweichung von <5 % (Tab. D-11) und einer Wiederfindungsrate im Bereich von 100±3 %. Das Signal-Rausch-Verhältnis lag bei 10.6:1. Der LLOQ-Wert wurde als kleinste Konzentration der Kalibrierung gewählt.

Die Quercetin-Kalibrierung wurde mit fünf Quercetinlösungen (1 bis 10 µg/ml) durchgeführt. Es wurde ein nicht-lineares Verhältnis zwischen Peakfläche ( $A_Q$ ) und Konzentration ( $C_Q$ )

beobachtet (Abb. D-20). Die Kalibriergleichung und der Korrelationskoeffizient sind im folgenden angegeben:

$$C_Q [\mu\text{g/ml}] = \left( \frac{A_Q + 2.658}{12.18} \right)^{\frac{1}{0.9451}}; \quad R^2 = 0.9996$$



**Abb. D-20** Kalibrierkurve und Residuenplot für 5 Konzentrationen der Quercetin-Referenzlösungen (1–10  $\mu\text{g/ml}$ ), doppelt injiziert in System II unter Zugrundelegung eines nichtlinearen Modells

Die Residuen, zufällig verstreut, bestätigten die Gültigkeit des nichtlinearen Modells. Die Injektorpräzision (5  $\mu\text{g/ml}$  Quercetin, System II) wurde durch eine niedrige Standardabweichung bestätigt (0.85 %).

Bei der Wiederhol- und Intermediärpräzision (Tab. D-11) betrug die Standardabweichung <5 % für alle Standardlösungskonzentrationen (1, 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$ ) und <8 % für die Pflanzenextrakte (2005–T3).

Die aus den Präzisionsuntersuchungen berechneten Wiederfindungsraten lagen für alle Konzentrationen (1, 5 und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) im Bereich von  $100 \pm 5$  % (Tab. D-11).

Beim Aufstocken einer Probe von fermentiertem Extrakt (6.28  $\mu\text{g/ml}$  Quercetin) mit verschiedenen Konzentrationen an Standards wurden Wiederfindungsexperimente durchgeführt. Durch Aufstocken mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Quercetin konnten 97.06 % des theoretischen Wertes wiedergefunden werden, also im Bereich von  $100 \pm 10$  %. Das Aufstocken mit

höheren Konzentrationen überschritt den Kalibrierbereich und ergab nicht verwertbare Ergebnisse.

**Tab. D-11** Wiederhol- und Intermediärpräzision für Quercetin in Referenzlösungen (3 Konzentrationen) und einem Birkenblätterextrakt (BW05-T3, 1:3 in dest. Wasser verdünnt) auf System II.

Probe (Konz. µg/ml)	Quercetin Konzentration (µg/ml)	RSD (%) der Wiederholpräzision	RSD (%) der Intermediärpräzision (3 Tage)	Wieder- findungsrate (%)
Quercetin (1)	0.98	1.48–4.34	3.51	97.03–100.36
Quercetin (5)	4.79	0.91–1.63	1.36	95.30–96.49
Quercetin (10)	10.00	0.65–1.19	1.09	99.34–101.01
Fermentierter Extrakt <sup>a</sup>	6.28	3.26–7.99	1.23	—

<sup>a</sup> Probe 2005-T3, verdünnt 1:3 mit H<sub>2</sub>O.

**Tab. D-12** Genauigkeitstest durch Aufstocken einer Probe fermentierten Extraktes (6.3 µg/ml Quercetin) mit 1 µg/ml Quercetin.

Konzentration aufgestockt (µg/ml)	Quercetin Konzentration (µg/ml)	RSD (%) der Wiederhol- präzision (n=3)	Wiederfindungsrate (%)
1	6.8	4.87	97.06

### 3.2.4. Robustheit

Die Robustheit wurde getestet mittels eines Stabilitätstests im Autosampler sowie durch Einfrieren und Auftauen der Proben.

#### a) Autosampler

Bei diesem mit drei Quercetinlösungen und einer Probe fermentierten Extraktes durchgeführten Test waren alle Proben instabil (Tab. D-13). Die höchste Instabilität wurde für die kleinsten Konzentrationen erhalten: nach 3 Tagen im Autosampler wurde eine Wiederfindungsrate von 40.12 % für die 1 µg/ml Quercetinlösung (diese Daten lagen unter dem validierten Quantifizierungsbereich) und von 19.79 % für den fermentierten Extrakt ermittelt. In der Probe des fermentierten Extraktes war der Hyperosidpeak ab dem zweiten Tag unterhalb des validierten Quantifizierungsbereichs, mit berechneten Konzentrationen von 3.26/0.92/0.57 µg/ml für die drei Tage. Deswegen sollten Referenzlösungen nur für eine kurze Zeit im Autosampler bleiben – v. a. bei niedriger Konzentration.

**Tab. D-13** Autosampler-Stabilitätstest für drei Konzentrationen an Quercetinlösungen und einem fermentierten Extrakt (BW05-T3, verdünnt 1:3 in dest. Wasser), System II. Konzentrationen und Wiederfindungsrate sind für 1/2/3 Tage im Autosampler angegeben.

Probe (Konz. µg/ml)	Quercetin Konzentration (µg/ml)	RSD (%) der Wiederhol- präzision	RSD (%) der Intermediär- präzision (3 Tage)	Wiederfindungs- rate (%)
Quercetin (1)	0.84/0.66*/0.51*	0.75–7.21*	29.61	80.91/58.87*/40.12*
Quercetin (5)	4.79/4.69/4.33	1.46–3.41	4.96	95.89/93.77/86.68
Quercetin (10)	9.64/9.43/8.06	0.06–1.58	8.03	96.48/94.47/81.11
Fermentierter Extrakt <sup>a</sup> (6.3)	6.30/2.05/1.24	5.39–11.15	87.19	100.42/32.66/19.79

<sup>a</sup> Probe 2005-T3, verdünnt 1:3 mit H<sub>2</sub>O; \* Daten außerhalb des validierten Quantifizierungsbereichs.

#### b) Einfrieren und Auftauen

Beim Gefrier-Tau-Stabilitätstest (Tab. D-14) waren die zwei getesteten Proben – eine Quercetin- und eine Hyperosidlösung – stabil bzw. blieb die Standardabweichung <5 %. Dabei sank aber die Wiederfindungsrate für beide Substanzen um 2 %. Ein- bis zu zweimaliges Einfrieren und Auftauen einer Referenzlösung beeinträchtigt die Analysen nicht, sollte aber nicht überschritten werden.

**Tab. D-14** Gefrier-Tau Stabilitätstest für zwei Referenzlösungen mit dem System II

Probe (Konz. µg/ml)	Konzentration (µg/ml)	RSD (%) der Wiederhol- präzision	RSD (%) der Intermediärpräzision (3 Tage)	Wieder findungsrate (%)
Hyperosid (57)	57.18	0.19–0.94	0.95	101.19/100.29/99.45
Quercetin (5)	4.82	1.61–3.39	2.51	97.57/95.93/95.71

#### 3.2.5. Systemeignungstests

Systemeignungstests wurden mit HPLC-Läufen von Referenzlösungen und Extraktproben durchgeführt. Bei allen Analysen war der Kapazitätsfaktor >40. Die Auflösung betrug >8 für Quercetin und >2 für alle Flavonolglykoside, außer für Hyperosid und Isoquercitrin, die nicht ganz getrennt waren. Die Zahl der theoretischen Böden war >8000. Die Peakform wurde mit dem Tailingfaktor evaluiert, der zwischen 1.0 und 1.8 lag. Wie in den Absätzen D3.2.2 und

D3.2.3 aufgeführt, war der Fehler bei der Injektionspräzision <1 %. All diese Daten entsprachen den FDA-Anforderungen.<sup>190</sup>

### 3.3. Phytochemische Analyse

#### 3.3.1. Gehaltsbestimmung nach Ph.Eur. und Vergleich mit der HPLC-Methode

Der Gehalt einer Betuladroge (getrocknet, Ch. BP04), frischer Blätter (Ch. BP05) und einer fermentierten Urtinktur (2005–M12) wurde nach Ph.Eur.<sup>191</sup> bestimmt (Absatz G2.6.3). Die Ergebnisse sind in Tab. D-15 zusammengefasst und mit den jeweiligen HPLC-Bestimmungen (MeOH-Heißextrakte, s. Absatz G2.6.1.d)) verglichen. Mit der HPLC-Methode konnte ein maximaler Gehalt von 1.69 % in einem methanolischen Extrakt der getrockneten Droge berechnet werden. In der Urtinktur konnten mit beiden Methoden keine Flavonoide detektiert werden. In den frischen Blättern konnten 0.76 % an Flavonoiden mittels HPLC und 1.44 % nach Ph.Eur. berechnet werden. Dass die Heißextrakte zur HPLC-Quantifizierung nicht gleich wie für die Ph.Eur.-Gehaltsbestimmung hergestellt wurden, könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Ausserdem wurden mit der Ph.Eur.-Methode alle phenolische Verbindungen, die mit AlCl<sub>3</sub> einen stabilen Komplex bilden, erfasst, was zusätzlich die höheren Werte erklären könnte.

**Tab. D-15** Gehaltsbestimmungen zweier Chargen Blätter sowie eines fermentierten Extraktes nach Ph.Eur. und mittels HPLC

Gehaltsbestimmung (% w/w)	Getrocknete Blätter	Frische Blätter	2005–M12
Ph.Eur.	1.81	1.44	n.d.*
HPLC	1.69	0.75	n.d.*

\*nicht detektierbar

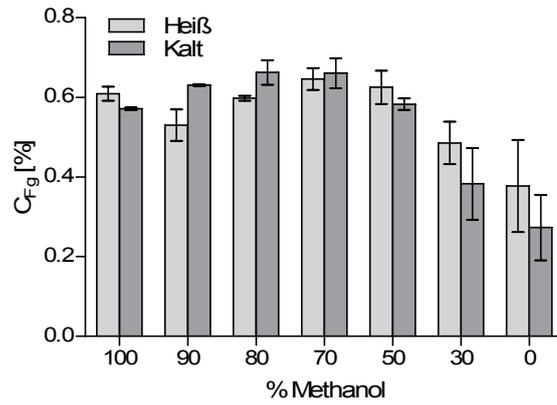
<sup>190</sup> US FDA (1994)

<sup>191</sup> Europäisches Arzneibuch (2008b)

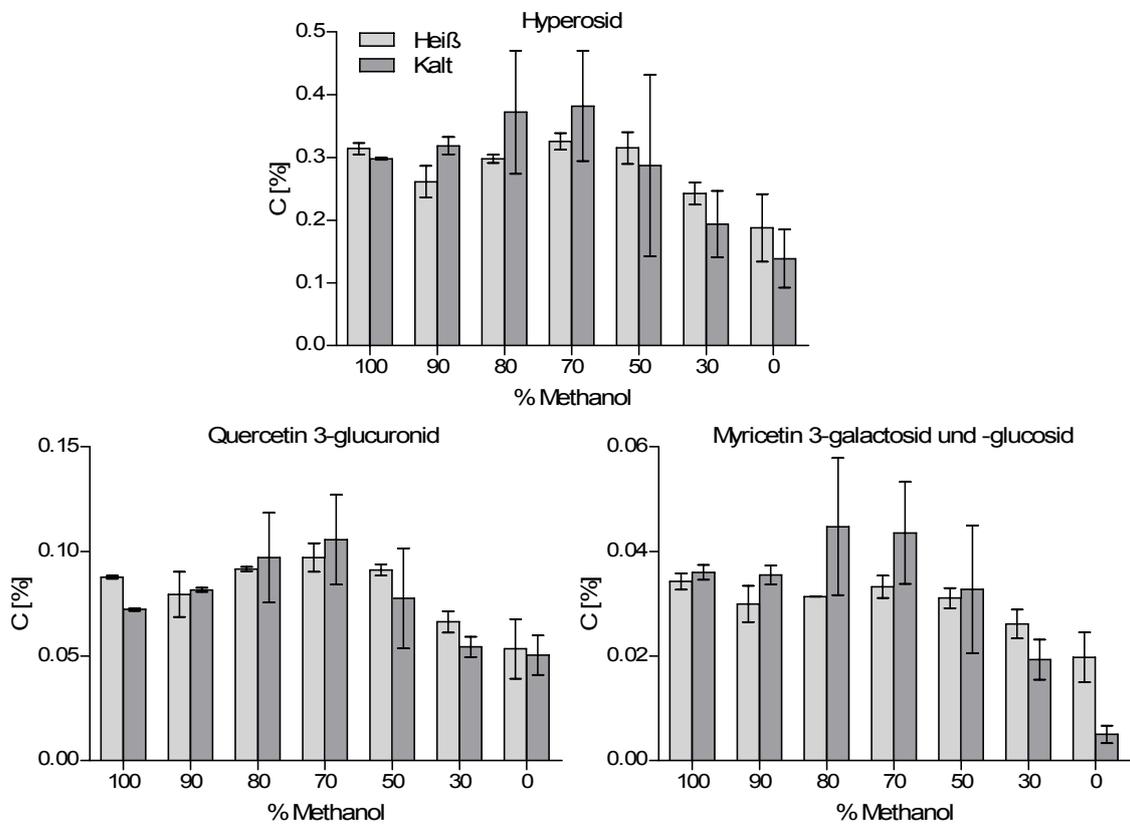
### 3.3.2. Erschöpfende Extraktion

Es wurden zwei Serien von je zwei Extraktionen durchgeführt: Herstellung von heißen und kalten Auszügen (Vorschriften G2.6.1.e) bzw. f)) jeweils mit Methanol, Wasser oder Gemischen aus verschiedenen Anteilen an Wasser und Methanol. Für jede Durchführung wurde die gesamte Menge an frischen Birkenblättern geschnitten und gemahlen und erst dann für die verschiedenen Extraktionen verteilt, um die Konzentrationsvariation zwischen den Proben aufgrund des Pflanzenmaterials zu minimieren. Die Injektionen wurden ursprünglich mit dem HPLC-System I durchgeführt. Die Analysen, bei der die Standardabweichung zwischen den Injektionen derselben Probe zu groß war, wurden mit dem HPLC-System II wiederholt. Es handelte sich um folgende Extrakte: die Heißextrakte bei 100, 80, 70 und 50 % Methanol sowie die Kaltextrakte bei 100, 80, 70 und 0 % Methanol. Quantifiziert wurden alle detektierbaren Flavonolglykoside, bezogen auf Hyperosid. Die Konzentrationen (prozentuale Konzentration, auf die frische Droge bezogen) ist in Abb. D-21 für die gesamten Flavonolglykoside und in Abb. D-22 für Hyperosid, Myricetin-galaktosid und -glukosid (die beide in einem Peak zusammenfallen) sowie für Quercetin-glucuronid graphisch dargestellt.

Die Flavonolglykoside wurden bei der kalten Aufarbeitung insgesamt etwas besser mit 70–80 % Methanol aus den frischen Birkenblättern extrahiert. Insgesamt war die kalte Aufarbeitung etwas effizienter. Die am höchsten erzielte Flavonolglykosid-Konzentration betrug dabei 0.663 %. Bei der warmen Aufarbeitung wurde die beste Extraktion mit 70 % Methanol erreicht. Generell konnte man beobachten, dass mit Hilfe der Methanol-Wasser Gemische die Flavonolglykoside aus den frischen Blättern besser extrahiert werden konnten als mit reinem Wasser. Wenn man die einzelnen Flavonolglykoside betrachtet, wie zum Beispiel Hyperosid, Quercetin 3-glucuronid oder die Myricetin 3-glykoside (Abb. D-22), gab es wenige Unterschiede im gesamten Extraktionsbild.



**Abb. D-21** Vergleich des Gesamtgehaltes an Flavonolglykosiden (% Frischgewicht) von verschiedenen Auszügen.



**Abb. D-22** Graphische Darstellung der Gehaltsbestimmung einzelner Flavonolglykoside in verschiedenen Auszügen.

### 3.3.3. Gehaltsbestimmung von Flavonoiden in fermentierten Extrakten aus Birkenblätter<sup>192</sup>

Alle vorhandenen Proben der fermentierten *Betula* Extrakte (2005–2008) wurden mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen sind in Tab. D-16 zusammengefasst sowie in den Abb. D-23 und Abb. D-24 dargestellt. Die Chromatogramme von zwei Proben sind in Abb. D-27 verglichen. Die nach 24 h extrahierten Flavonolglykoside nahmen sehr schnell während der ersten Woche der Herstellung ab, mit einem Umsatz von 50–80 % nach bereits 3.5 Tagen (Abb. D-24). In den Abb. D-27 und Abb. D-23 ist deutlich zu sehen, wie schnell vor allem das Hyperosid abgebaut wurde. Der extrahierte Gehalt an gesamten Flavonolglykosiden lag bei den Proben nach einem Tag Extraktion zwischen 0.025 und 0.044 % der Tinktur (Tab. D-16). Nach 3.5 Tagen waren nur noch zwischen 24 und 53 % und nach 12 Monaten nur noch 0 bis 9 % der Anfangskonzentration vorhanden (Abb. D-24).

Der Verlauf des Abbaus von Hyperosid folgte genau dem gleichen Schema wie der der gesamten Flavonolglykoside (Abb. D-23). Dies ist nachvollziehbar, da Hyperosid als Hauptflavonoid ungefähr die Hälfte der gesamten Flavonolglykoside darstellt. Hyperosid wurde aber in der ersten Herstellungswoche wesentlich schneller abgebaut als die anderen Glykoside (Abb. D-27): nach 3.5 Tagen waren nur noch 13.6 bis 40.1 % der Anfangskonzentration vorhanden. Der Extrakt aus 2006 zeigte schon nach 4 Monaten kein Hyperosid mehr, die übrigen Flavonolglykoside wurden zu 1.9 % in 2008–M6 und 3.3 % in 2007–M12 der jeweiligen Anfangskonzentrationen bestimmt.

Quercitrin war das stabilste Flavonolglykosid über den ganzen Herstellungsprozess. Nach dem 7. Tag der Extraktion waren mit 67.5 bis 87.8 % der Anfangskonzentration (Tab. D-16, Abb. D-23) wesentlich mehr als bei den anderen Flavonolglykosiden nachweisbar. Im Extrakt aus 2007 blieben sogar nach 12 Monaten noch ca. 60 % des Gehalts nach 24 h erhalten.

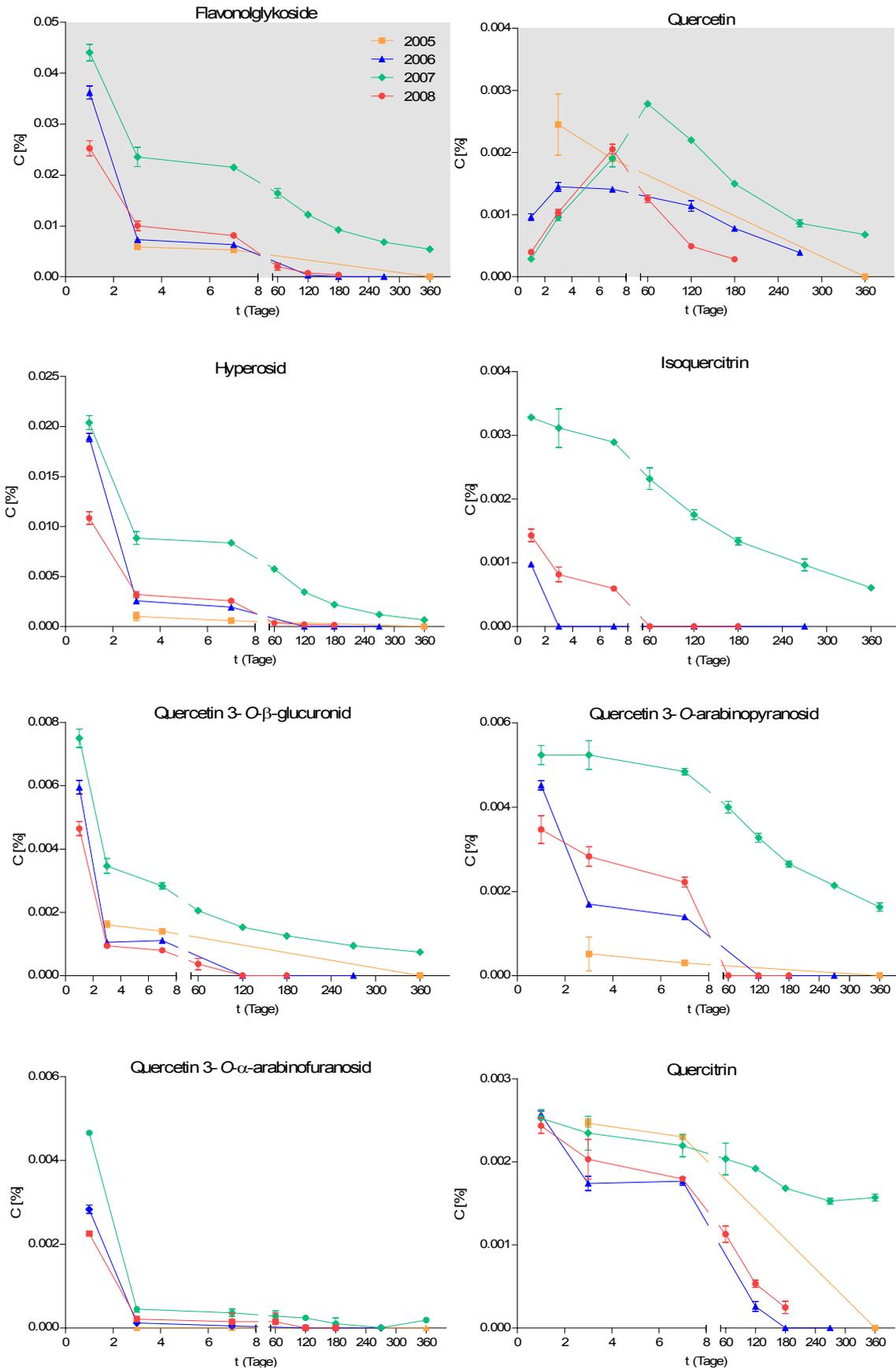
Die Abbaugeschwindigkeit war unterschiedlich für die vier untersuchten Extraktchargen. Der Extrakt aus 2007, mit der höchsten Flavonolglykosid-Konzentration, zeigte die geringsten quantitativen Veränderungen (Abb. D-23, Abb. D-24).

---

<sup>192</sup> z. T. in Millet et al. (2010)

Weiterhin wurde beobachtet, dass das Aglykon Quercetin entstand. Dies war vor allem während der ersten Woche der Herstellung zu beobachten, in der Zeit, in der die Quercetinglykoside am stärksten reduziert wurden (Tab. D-16, Abb. D-23). Um den Quercetin Gehalt ermitteln zu können, wurde mit der schon entwickelten HPLC-Trennmethode (Absatz D3.2.3) eine Kalibrierung durchgeführt. Während der Lagerung bei 15°C wurde Quercetin mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten je nach Extrakt abgebaut. Es gab aber keine direkte Korrelation zwischen der Quercetin-Bildung und der Quercetinglykosid-Abnahme. Interessanterweise bildete sich am meisten Quercetin (mehr als 5fach der Anfangsmenge) in der Charge aus 2007 gebildet. Diese Charge wies die höchste Menge an Flavonolglykoside auf und zeigte auch die höchste Stabilität.

Mit Anfangswerten um pH 4.6 (*T1*) und Endwerten bei 3.7. waren die gemessenen pH-Werte (Tab. D-17) vergleichbar für die vier Urtinkturchargen, d. h. ein Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität kann ausgeschlossen werden.



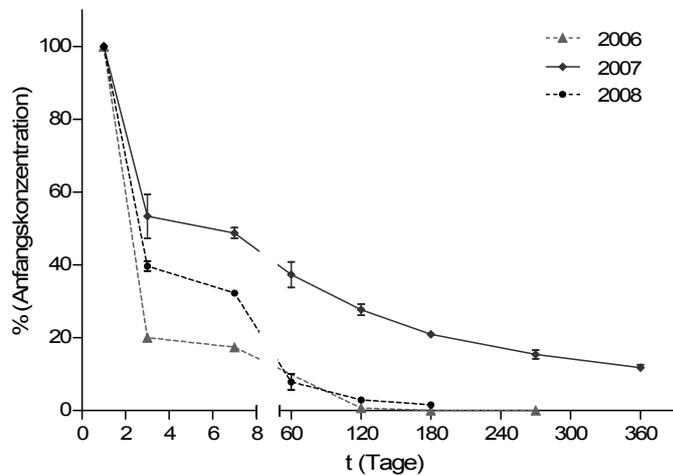
**Abb. D-23** Gehaltsbestimmungen der Flavonole in den fermentierten Extrakten 2005–2008 (% w/v). Für die Strukturformeln, s. B4.3.1.

**Tab. D-16** Gehaltsbestimmung der gesamten Flavonolglykoside und Quercetin in vier fermentierten Extrakten (2005–2008, Konzentration in % Extrakts, w/v)

Flavonolglykoside		2005		2006		2007		2008	
Probe	t (Tage)	C (%)	RSD (%)	C (%)	RSD (%)	C (%)	RSD (%)	C (%)	RSD (%)
T1	1			3.62E-02	3.48	4.40E-02	3.64	2.52E-02	5.87
T3	3.5	5.86E-03	22.51	7.24E-03	3.49	2.34E-02	7.70	1.00E-02	9.21
T7	7	5.18E-03	0.01	6.28E-03	1.09	2.15E-02	0.64	8.14E-03	6.40
M2	60					1.64E-02	5.84	2.01E-03*	33.38
M4	240			2.39E-04*	13.76	1.22E-02	1.88	7.28E-04*	8.73
M6	180			n.d.	–	9.22E-03	3.57	4.05E-04*	35.63
M9	270			n.d.	–	6.77E-03	4.17		
M12	360	n.d.	–			5.20E-03	10.55		

Quercetin		2005		2006		2007		2008	
Probe	t (Tage)	C (%)	RSD (%)	C (%)	RSD (%)	C (%)	RSD (%)	C (%)	RSD (%)
T1	1			9.81E-04	7.99	2.82E-04*	2.51	4.04E-04*	2.78
T3	3.5	2.47E-03	21.23	1.46E-03	5.83	9.85E-04	9.27	1.05E-03	3.36
T7	7	1.86E-03	0.30	1.43E-03	0.90	1.88E-03	5.48	2.04E-03	4.87
M2	60					2.80E-03	1.52	1.24E-03	3.16
M4	240			1.13E-03	6.64	2.19E-03	0.64	4.98E-04*	4.41
M6	180			7.89E-04	5.92	1.51E-03	0.18	2.70E-04*	0.41
M9	270			4.12E-04*	11.75	8.41E-04	3.45		
M12	360	n.d.	–			6.95E-04	7.10		

\* unterhalb des Kalibrierbereichs; n.d.: nicht detektierbar.

**Abb. D-24** Prozentualer Abbau der Flavonolglykoside in fermentierten Extrakten aus 2006–2008**Tab. D-17** Vergleich der pH-Werte in vier untersuchten fermentierten Birkenblätterextrakten (2005–2008)

Jahr	T1	T3	T7	M12
2005	4.4	3.9	3.8	3.5
2006	4.7	3.9	3.8	3.7
2007	4.6	3.8	3.8	3.7
2008	4.7	3.7	3.7	3.8

### 3.3.4. Vergleich von selbsthergestellten Extrakten nach HAB und Varianten

Um den Einfluss unterschiedlicher Parameter auf den Extrakt zu studieren, wurden verschiedene Auszüge nach der Vorschrift HAB 34e mit Ausnahme der Asche Zugabe hergestellt (s. Abb. D-25) Außerdem wurden Varianten (s. Absatz G2.6.1.b) mit der gleichen Pflanzenmenge wie nach HAB 34e angefertigt, allerdings ohne Temperaturwechsel und mit anderen Molke/Wasser-Verhältnissen. Ein Auszug wurde in Wasser gemacht, ein zweiter in Molke/Wasser 1:1 (v/v) und ein dritter in reiner Molke (Auszüge „W-“, „WM-“ und „M-“; Abb. D-25). Zusätzlich wurde ein Ansatz nach HAB 34e vorbereitet, bei dem die Birkenblätter mit der äquivalenten Menge an Hyperosid ersetzt wurden (3.64 mg Hyperosid für 1 g Pflanze; „H3.6+“; Abb. D-25). Alle Ergebnisse der Flavonolglykosid-Gehaltsbestimmungen sind in Tab. D-18 zusammengefasst.

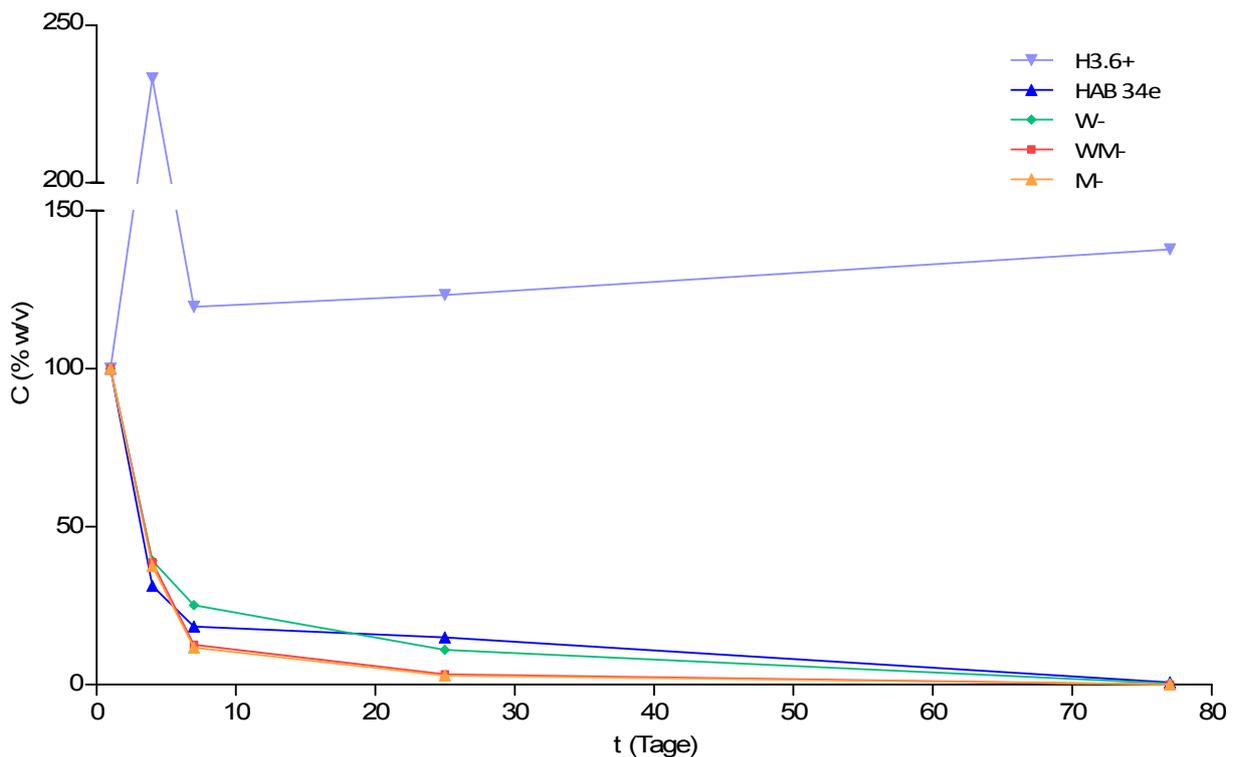
Es konnte festgestellt werden, dass nach 24 h ein höherer Anteil an Flavonoiden mit Molke extrahiert werden konnte als mit Wasser. Die drei Ansätze ohne Temperaturwechsel nach HAB zeigten dazu einen höheren Gehalt an Flavonoiden als die Probe „HAB 34e“ und die Proben des fermentierten Extraktes (s. Tab. D-16 bzw. Tab. D-18). Die Flavonoide wurden während der ersten Woche schnell abgebaut, am 7. Tag glichen sich die Flavonoidmengen in allen Proben ungefähr an. Nach 10 Wochen im Kühlschrank (5°C) konnten keine Flavonoide mehr detektiert werden. Der Vergleich dieser Extrakte zeigte außerdem, dass der Flavonolabbau in den Ansätzen mit Molke schneller ablief.

Hervorzuheben ist, dass Auszüge, die nach der HAB 34e-Vorschrift, aber ohne Temperaturwechsel nach HAB, gewonnen wurden, nach 2 Wochen verschimmelt waren, was bei den Proben, die zeitgleich exakt nach HAB-Vorgaben hergestellt wurden, nie ein Problem war.

Hyperosid löste sich in der Matrix aus Wasser und Molke praktisch nicht. Bis zum 3. Tag löste sich Hyperosid zunehmend, wie aus dem Konzentrationsanstieg bis zum T3 ersichtlich war. Mit dem Abpressen wurde das ungelöste Hyperosid entfernt. Bis zum 7. Tag nahm der Hyperosidgehalt ab, ohne dass daraus entstandene Folgeprodukte detektiert werden konnten.

**Tab. D-18** Gehaltsbestimmungen der Flavonolglykoside in den selbsthergestellten Extrakten

Zeit (Tage)	H3.6+		HAB 34e		W-		WM-		M-	
	C (% w/v)	RSD (%)								
1	3.37 E-03	3.21	2.59 E-02	4.34	2.83 E-02	1.70	3.57 E-02	13.46	4.60 E-02	0.44
3	7.86 E-03	2.26	8.10 E-03	5.53	1.11 E-02	10.35	1.38 E-02	11.53	1.73 E-02	3.88
7	4.03 E-03	2.94	4.77 E-03	1.60	7.14 E-03	6.97	4.51 E-03	5.74	5.42 E-03	1.10
25	4.16 E-03	2.07	3.89 E-03	32.71	3.14 E-03	2.56	1.18 E-03	0.25	1.33 E-03	16.11
77	4.64 E-03	4.87	1.97 E-04	3.41	1.12 E-04	8.39	n.d.	=	n.d.	=

**Abb. D-25** Stabilitätsvergleich der Flavonolglykoside in den Ansätzen H3.6+ (Hyperosid und Matrix), HAB 34e sowie mit Wasser (W-), Molke/Wasser (1:1; WM-) und Molke (M-)

### 3.3.5. Veränderung der phenolischen Verbindungen in den fermentierten Extrakten<sup>193</sup>

Wie schon bei der Gehaltsbestimmung der Flavonole in den WALA-Extrakten gezeigt, wurde Quercetin aus den Quercetinglykosiden gebildet. Quercetin war dabei aber nicht stabil und wurde selbst weiter zu Folgeprodukten umgesetzt (Abb. D-22).

In Proben, die an späterer Stelle des Fermentationsprozesses gezogen wurden (M6, 2007 und 2008), konnten Spuren von Hydroxyphenylpropionsäure – ein Oxidationsprodukt von

<sup>193</sup> Millet et al. (2010)

Quercetin – detektiert werden (Peak 10, Abb. D-27). Der Vergleich der GC–MS Daten mit *m*- und *p*-hydroxylierten Referenzsubstanzen bestätigte eine *para*-Hydroxylierung, was Literaturangaben widersprach. Bisläng wurde vor allem von *meta*-Hydroxylierungen der Quercetin-Metabolite berichtet.<sup>194</sup> Diese wurden mittels GC–MS im Falle von *in-vitro*-Metabolismus-Studien mit Hilfe der Darmflora verifiziert<sup>195</sup>. Lediglich Justesen und Arrigoni beobachteten die Bildung von *p*-Hydroxyphenylpropionsäure durch Fermentation von Quercetin mit menschlicher Fäkalflora, ebenso mittels GC–MS Analysen.<sup>196</sup>

Zusätzlich konnten in der vorliegenden Arbeit Spuren von Catechol gegen Ende des Fermentationsprozesses mittels HPLC und GC–MS detektiert werden (Peak 7, Abb. D-27, Analytikdaten s. G2.6.6.b)). Catechol wurde bereits als möglicher Metabolit von Quercetin und Kaffeesäure durch Fermentation mit menschlicher Darmflora beschrieben.<sup>197</sup>

Interessanterweise wurden keine weiteren Metabolite von Quercetin wie z. B. Protocatechusäure, ein nach Fermentation<sup>198</sup> oder thermischer Behandlung<sup>199</sup> bekanntes Abbauprodukt von Quercetin, detektiert werden.

Chlorogensäure bzw. *p*-Cumaroylchinasäure wurden ebenfalls relativ schnell umgesetzt. Die höchste Menge konnte am *T1*, nach *M6* konnten nur noch Spuren detektiert werden. Beide Verbindungen wurden hydrolysiert und ergaben Kaffee- bzw. *p*-Cumarsäure (Peaks 9 und 10, Abb. D-27), die zu Beginn (*T1*) in Spuren und mit der höchsten Menge in den Proben am Ende der Urtinkturherstellung detektiert wurden (Daten s. G2.6.6.c) bzw. e)). Weiterhin könnte *p*-Cumarsäure als Zwischenprodukt der Degradierung von Quercetin entstanden sein, wie bei dem Metabolismus in *Pseudomonas putida* berichtet wurde.<sup>200</sup>

Am interessantesten war eine weitere Komponente, die als Hauptabbauprodukt detektiert wurde. Diese konnte in allen Proben, vor allem nach 6 Monaten (Peak 5, Abb. D-27), nachgewiesen werden. Die Substanz wurde aus der Probe 2008–*M6* auf einer Sephadex LH-20 Säule isoliert (Absatz G2.6.4) und mittels UV- und Massenspektren sowie 1D <sup>1</sup>H (Abb.

---

<sup>194</sup> Heilmann & Merfort (1998)

<sup>195</sup> Rechner et al. (2004)

<sup>196</sup> Justesen & Arrigoni (2001)

<sup>197</sup> Selma et al. (2009)

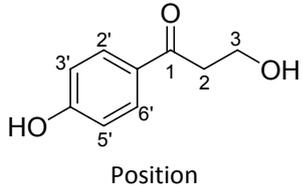
<sup>198</sup> Justesen & Arrigoni (2001); Pillai & Swarup (2002); Rechner et al. (2004)

<sup>199</sup> Buchner et al. (2006)

<sup>200</sup> Pillai & Swarup (2002)

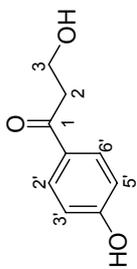
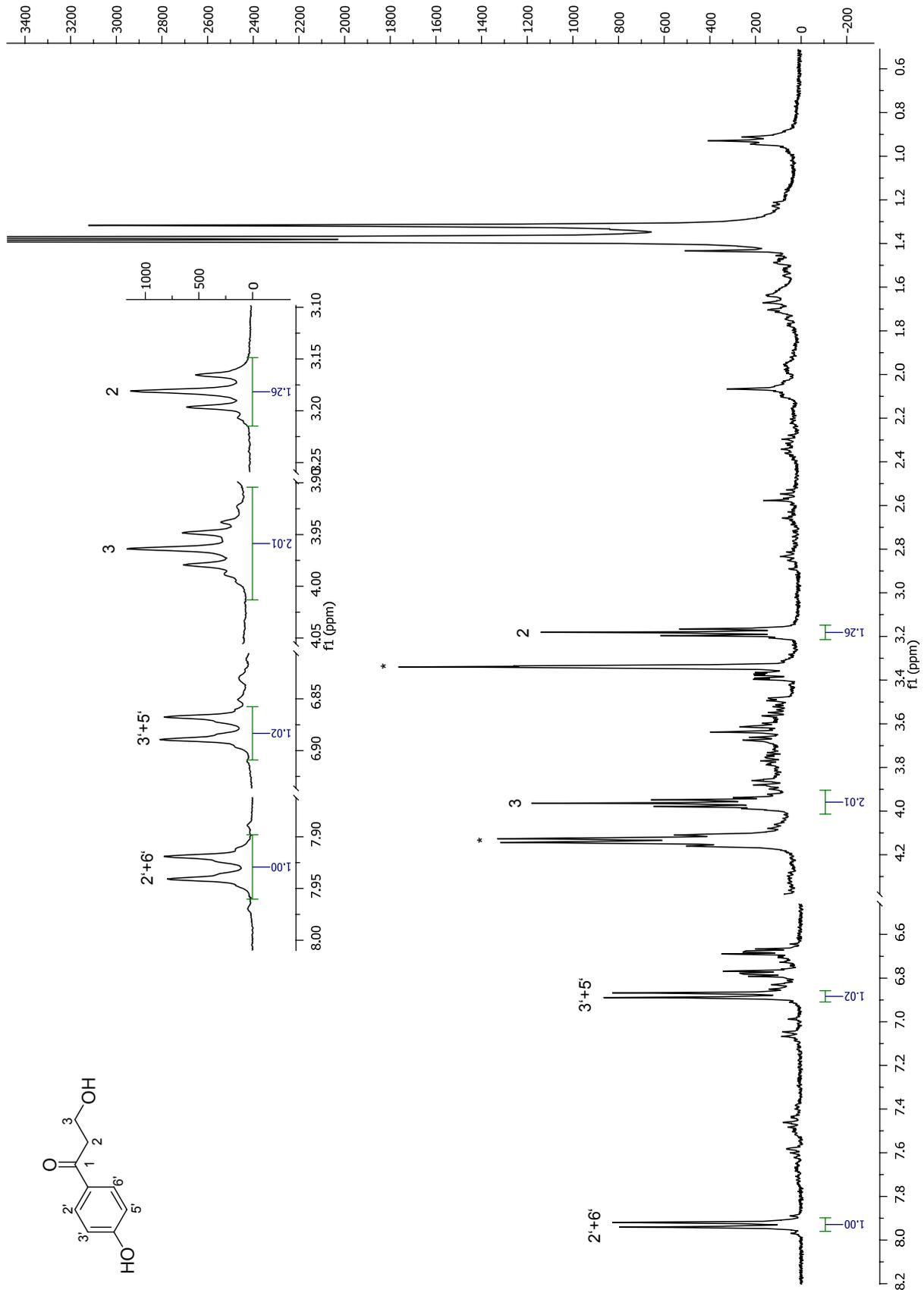
D-26) und 2D HSQC, COSY und HMBC NMR-Analysen als 3,4'-Dihydroxypropiophenon (DHPP) identifiziert (Tab. D-19). Die NMR- und MS-Daten stimmen mit Literaturdaten überein.<sup>201</sup>

**Tab. D-19** NMR-Daten von 3,4'-Dihydroxypropiophenon mit Literaturvergleich<sup>202</sup>. <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz, [D4]-MeOH.

 Position	3,4'-Dihydroxypropiophenon					
	<sup>13</sup> C δ [ppm]	Literatur <sup>13</sup> C δ [ppm]	<sup>1</sup> H δ [ppm] (mult, J [Hz], H)	Literatur <sup>1</sup> H δ [ppm] (mult, J [Hz], H)	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	HMBC ( <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H)
1	198.3	197.4				2, 3, 2', 6'
2	40.1	38.3	3.18 (t, J=6.2, 2H)	3.14 (t, J=6.2, 2H)	3	3
3	57.0	55.5	3.96 (t, J=6.2, 2H)	3.93 (t, J=6.2, 2H)	2	2
1'	128.5	126.9				3', 5'
2', 6'	130.0	128.5	7.93 (d, J=8.8, 2H)	7.89 (m, 2H)	3', 5'	1
3', 5'	114.6	112.9	6.88 (d, J=8.8, 2H)	6.85 (m, 2H)	2', 6'	1
4'	162.5	160.4				1

<sup>201</sup> Achenbach et al. (1983); Lee et al. (1992); Mori et al. (1992)

<sup>202</sup> Mori et al. (1992)



**Abb. D-26** 3,4'-Dihydroxypropiophenon:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, [D<sub>4</sub>]-MeOH). Die Hauptverunreinigung ist Milchsäure (\*).

Es ist durchaus möglich, dass DHPP ein Deglucosylierungsprodukt von 3,4'-Dihydroxypropiophenon 3-*O*- $\beta$ -glucosid ist, welches das Hauptphenolderivat in Birkenblättern darstellt.<sup>203</sup> Daraufhin wurde dieses Glukosid, mit den Fragmentationen bei *m/z* 327 und *m/z* 147 im negativen Ionisierungsmodus<sup>204</sup> auch in hohen Mengen in der frühen Fermentationsphase gefunden (T1–T7; Peak 1; Abb. D-27), es wurde dann aber sehr schnell zu Spuren nach 2 Monaten abgebaut. Obwohl das Aglykon aus *B. platyphylla* isoliert wurde<sup>205</sup>, existieren bisher keine Berichte über dessen Vorkommen in *B. pendula* Extrakten.

Weitere Produkte wie *p*-Hydroxyacetophenon und *p*-Hydroxyphenylethanol konnten in Spuren in späteren Proben mittels GC–MS detektiert werden (Peak X und 4; Abb. D-27). *p*-Hydroxyacetophenon wurde noch nicht als Flavonolmetabolit beschrieben und könnte auch ein Abbauprodukt anderer Phenolderivate sein, wie z. B. des gebildeten DHPP. Es kann angenommen werden, dass *p*-Hydroxyphenylethanol aus der Deglucosylierung von Salidroside (*p*-Hydroxyphenylethanol 3- $\beta$ -glucosid) gebildet wurde. Letztere wurde aus Blättern<sup>206</sup> und im Winter gesammelten Zweigen<sup>207</sup> von *B. pendula* isoliert.

Abb. D-28 fasst alle Abbaupfade zusammen, die während der wässrigen Fermentation von frischen Birkenblättern in dieser Arbeit nachgewiesen wurden.

---

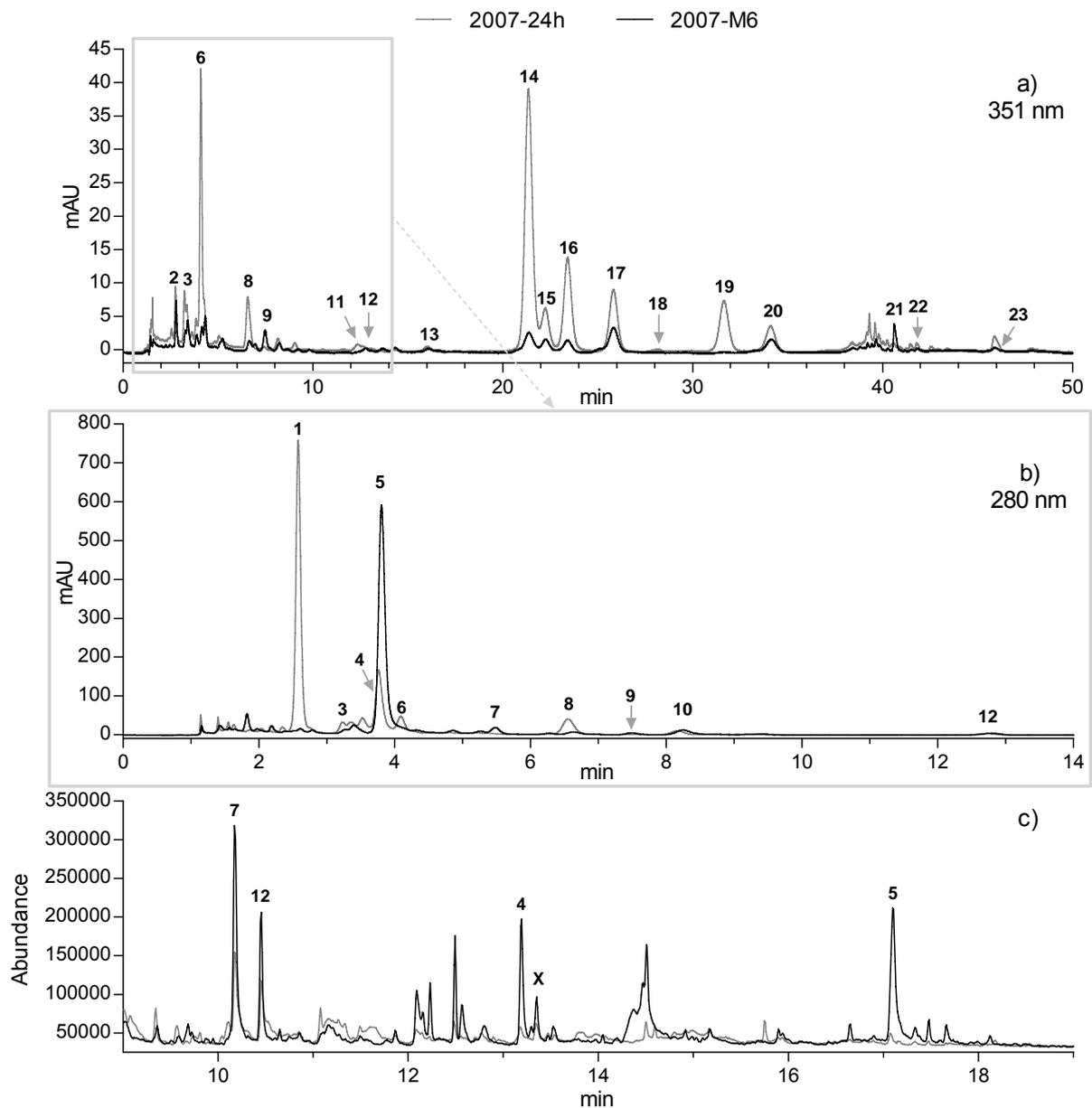
<sup>203</sup> Keinänen & Julkunen-Tiitto (1998); Ossipov et al. (1996)

<sup>204</sup> Ossipov et al. (1996)

<sup>205</sup> Lee et al. (1992)

<sup>206</sup> Kuokkanen et al. (2003)

<sup>207</sup> Vainiotalo et al. (1991)



**Abb. D-27** Chromatogramme von zwei Proben des fermentierten Extraktes aus 2007. Grau: Probe 2007-T1; schwarz: Probe 2007-M6. a) HPLC-UV bei 351 nm; b) HPLC-UV, früher Retentionszeitbereich bei 280 nm; c) GC-MS. Peakzuordnung: 1) 3,4'-Dihydroxypropiofenon 3-O- $\beta$ -glucopyranosid; 2) Neochlorogensäure; 3) 3-*p*-Cumaroylchinasäure; 4) *p*-Hydroxyphenylethanol; 5) 3,4'-Dihydroxypropiofenon; 6) Chlorogensäure; 7) Catechol; 8) 5-*p*-Cumaroylchinasäure; 9) Kaffeesäure; 10) *p*-Hydroxyphenylpropionsäure; 11) Myricetin 3-O- $\beta$ -galactosid + Myricetin 3-O- $\beta$ -glucuronid; 12) *p*-Cumarsäure; 13) Myricetin 3-O- $\beta$ -glucosid; 14) Hyperosid; 15) Rutin + Isoquercitrin; 16) Quercetin 3-O- $\beta$ -glucuronid; 17) Quercetin 3-arabinopyranosid<sup>208</sup>; 18) Kaempferol 3-glykosid; 19) Quercetin 3- $\alpha$ -arabinofuranosid; 20) Quercitrin; 21) Quercetin; 22) Apigenin; 23) Acacetin; X) *p*-Hydroxyacetophenon.

<sup>208</sup>  $\alpha$  oder  $\beta$  Konfiguration nicht bestimmt.



**Tab. D-20** Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Birkenblätterextrakten

Tage	1	3	7	60	120	180	270	360
2006	+		+			+	-	+
2007	+	+	+	+	+	-	+	+
2008	+	+	+	-	-	-	-	-

\* -: negativer Test; +: positiver Test.

### 3.4.2. Proteinbestimmung

Ziel war es, eine Erklärung für die unterschiedlichen Stabilitäten der Extraktchargen zu finden. Der Grund könnte die Konzentration an Glykosidasen sein. Um den Einfluß der Proteinen auf die Stabilität der fermentierten Extrakte zu untersuchen, wurde die Proteinkonzentration für vier Proben des fermentierten Birkenblätterextraktes bestimmt: 2 Proben von 2007 und 2 von 2008. Die Ergebnisse sind in Tab. D-21 zusammengefasst. Die Proben von Tag 1 hatten höhere Konzentrationen an Proteinen im Vergleich zu späteren Proben und diese waren für beide Extraktchargen gleich. Eine Abnahme der Konzentration, von jeweils 0.31 auf 0.13 µg/ml in 2007 bzw. von 0.35 auf 0 µg/ml in 2008, konnte beobachtet werden. Der Unterschied in der Proteinkonzentration war folglich zwischen den zwei Extrakten sehr gering. Die gemessenen Proteine, die entweder aus den Birkenblättern oder aus der Molke stammen, wurden durch den Herstellungsprozess abgebaut.

**Tab. D-21** Ergebnisse der Proteinbestimmung für jeweils 2 Proben der fermentierten Birkenblätterextrakte von 2007 und 2008

Probe	Proteinkonz. (mg/ml)	RSD (%, n=2)
2007-T1	0.309	7.58
2007-M12	0.126	21.49
2008-T1	0.349	9.33
2008-M6	0.000*	-1828.33

\* unterhalb des Kalibrierbereichs

## 4. *Gentiana lutea*

### 4.1. Entwicklung der HPLC–Methode

Die *Gentiana*-Methode wurde auf dem HPLC-System II entwickelt. Hierzu wurden Laufmittel und Gradient ausgehend von Angaben einer Diplomarbeit<sup>209</sup> optimiert. Die beste Trennung sowohl der Iridoide als auch der Xanthonderivate wurde mit der RP18 Zorbax SB Säule erhalten, im Vergleich zu den RP18 Säulen Symmetry C18, Hypersil ODS, Nova-pak und Spherisorb ODS (s. Tab. G-10).

### 4.2. Validierung

Die Methode wurde auf Spezifität, Linearität, Präzision und Genauigkeit geprüft. Ziel war es, die Bitterstoffe und Xanthone in der Wurzel des gelben Enzians zu quantifizieren. Dies wurde für die Secoiridoide Gentiopikrosid, Amarogentin und Swertiamarin als Hauptbitterstoffe bzw. für Gentsin als Hauptxanthon durchgeführt. Zusätzlich wurde der Gehalt des Iridoids Loganinsäure, eine weitere Hauptkomponente der untersuchten Extrakte, bestimmt.

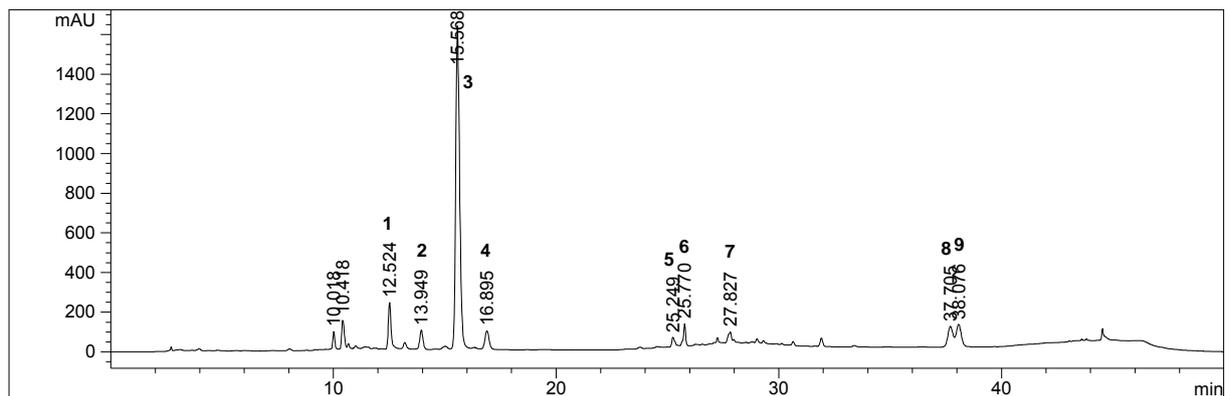
#### 4.2.1. Spezifität

Die Peakzuordnung wurde mit Hilfe der UV-Spektren, anhand von Literaturangaben<sup>210</sup> sowie mittels Aufstockversuchen durchgeführt. Die meisten detektierten Inhaltsstoffe konnten dabei identifiziert werden (Abb. D-30). Die Auflösung wurde für alle Extrakte (fermentierte Extrakte sowie selbsthergestellte Auszüge) geprüft und war immer größer als 1.5. Nach der Peakreinheitsberechnung (Chemstation-Software) waren die Peaks der fünf quantifizierten Stoffe in allen getesteten Extrakten rein. Die Matrix (Abb. D-30, destilliertes Wasser mit Laktose und Honig versetzt, s. G2.7.1.h) wurde injiziert, um das Rauschen der Basislinie zu berechnen und um zu überprüfen, ob diese die Quantifizierung der vier Iridoide nicht beeinträchtigt. Die wenigen dadurch bedingten Peaks, waren zu klein, um die Signale der Zielanalyten zu beeinträchtigen.

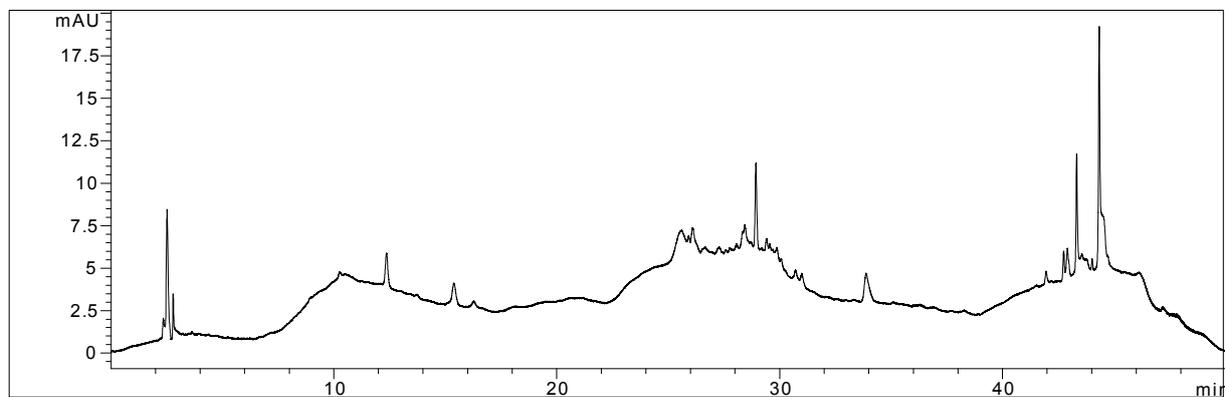
---

<sup>209</sup> Günter (2004)

<sup>210</sup> Brahmachari et al. (2004); Carnat et al. (2005); Hayashi & Yamagishi (1988); Hostettmann & Wagner (1977); Nicolaeva et al. (1983); Szucs et al. (2002)



**Abb. D-29** Chromatogramm eines MeOH-Extraktes (s. G2.7.1.e)) mit Peakzuordnung: 1) Loganinsäure; 2) Swertiamarin; 3) Gentiopikrosid; 4) Swerosid; 5,6) Isoorientinglykoside; 7) Amarogentin; 8) Gentisin; 9) Isogentisin. Der Peak bei 10.4 min zeigte ähnliche UV-Spektren und LC-MS-Daten wie Loganinsäure.



**Abb. D-30** Chromatogramm der Matrix (1:1 mit Wasser verdünnt)

#### 4.2.2. Linearität

Kalibrierungen wurden für Gentiopikrosid, Amarogentin, Swertiamarin, Loganinsäure und Gentisin mittels Referenzsubstanzeinjektionen durchgeführt. Hierfür wurden aus den vier ersten Komponenten 0.1 prozentige Stammlösungen in Methanol hergestellt und mit Wasser auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Für Gentisin wurde eine 0.1 mg/ml Stammlösung in Acetonitril hergestellt und mit einem Wasser/Acetonitril Gemisch (4:1, v/v) zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die Injektionen wurden jeweils zweimal durchgeführt. Eine lineare Korrelation zwischen Fläche und Konzentration wurde für alle vier Komponenten gezeigt. Es wurde die folgende Kalibriergleichung  $C = \frac{A + \beta}{\alpha}$ , mit C als Konzentration, A als Peakfläche und  $\alpha$  und  $\beta$  als Koeffizienten der Geraden verwendet (s. auch Tab. D-22). Ein Residuenplot wurde ebenfalls ermittelt. Dazu wurden die Detektions-

und Bestimmungsgrenzen bestimmt. Diese Konzentrationen sind in Tab. D-22 zusammengefasst. Die LLOQ-Werte wurden jeweils als kleinste Konzentration der Kalibrierung verwendet. Die berechneten Präzisions- und Genauigkeitsdaten nach dreifacher Bestimmung für die LLOQ-Werte sind in Tab. D-23 zusammengefasst.

**Tab. D-22** LOD- und LLOQ-Werte sowie Kalibrierdaten für die fünf untersuchten Referenzsubstanzen

Substanz	LOD (µg/ml)	LLOQ (µg/ml)	Kalibrierbereich (µg/ml)	Gleichung	R <sup>2</sup>
Loganinsäure	0.4	10	10 und 600	$C_L[\mu M] = \frac{A_L + 12.19}{17.79}$	0.9997
Swertiamarin	0.3	20	20 und 150	$C_S[\mu M] = \frac{A_S + 93.76}{17.25}$	0.9983
Gentiopikrosid	0.4	10	10 und 900	$C_G[\mu M] = \frac{A_G + 16.70}{10.93}$	0.9997
Amarogentin	0.5	2	2 und 50	$C_A[\mu M] = \frac{A_A + 11.11}{27.49}$	0.9997
Gentisin	0.1	1	1 und 20	$C_{GX}[\mu M] = \frac{A_{GX} + 2.196}{74.49}$	0.9996

Ein Residuenplot wurde für alle Kalibrierungen berechnet. Die graphische Darstellung der Kalibrierungen und Residuenplots ist in Abb. D-31 gezeigt. Der jeweilige Wert des Korrelationskoeffizienten R<sup>2</sup> (0.9983–0.9997) und die zufällige Streuung der Residuen weisen darauf hin, dass das lineare Modell für alle durchgeführten Kalibrierungen geeignet war.

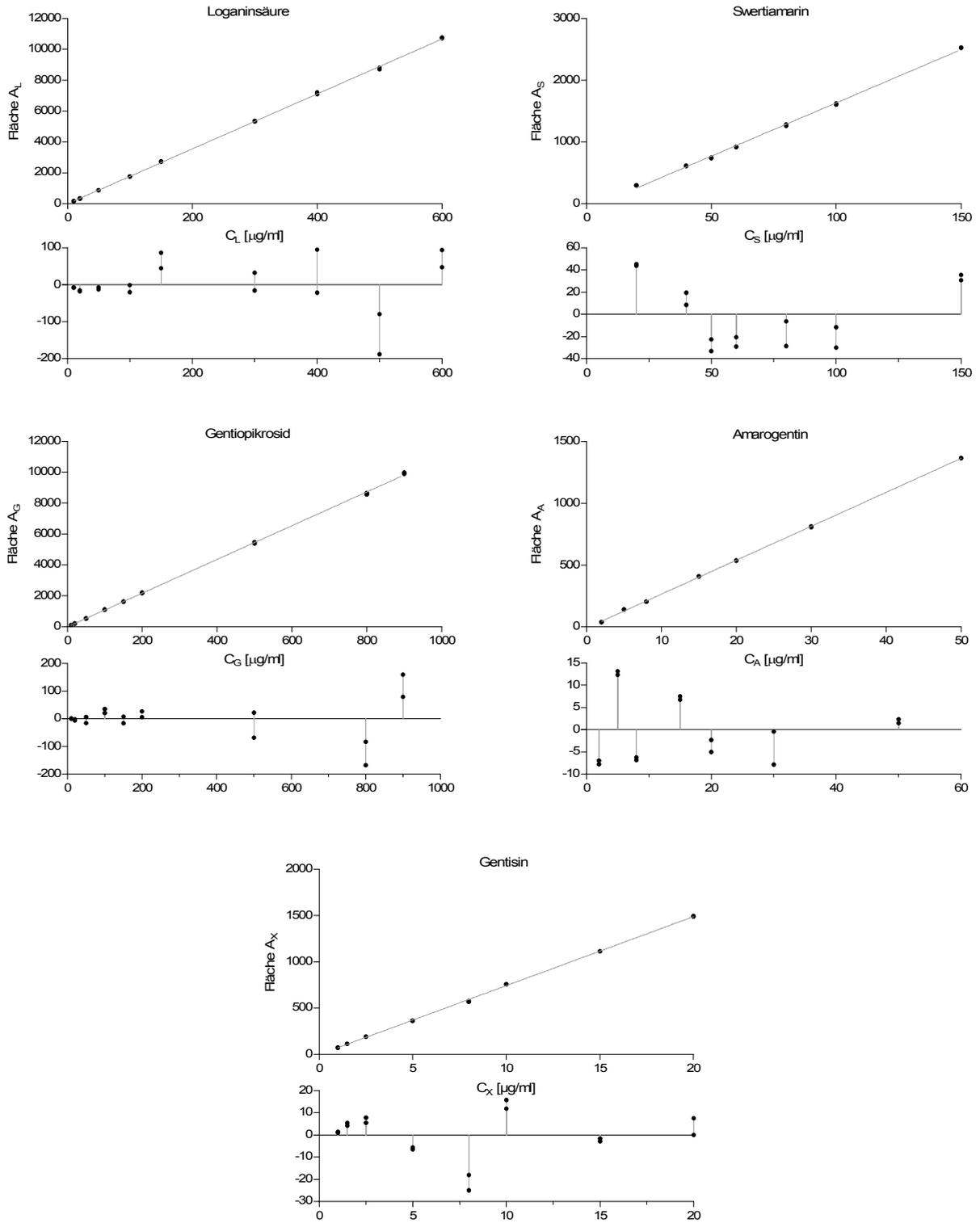


Abb. D-31 Regressionsgerade und Residuenplot für die fünf untersuchten Substanzen

#### 4.2.3. Präzision und Genauigkeit

Die Präzision wurde für jeweils drei Konzentrationen an Referenzsubstanz bestimmt sowie für einen methanolischen und einen fermentierten Extrakt. Die Daten zur Präzision und Genauigkeit sind in Tab. D-23 zusammengefasst.

Die Abweichungen bei der Präzision (Wiederholpräzision und Intermediäre Präzision) waren alle sehr niedrig (<5 %) für die Referenzsubstanzen sowie für die zwei getesteten Extrakte. Die Wiederfindungsrate lag im Bereich von  $100\pm 20$  % für die LLOQ–Werte und von  $100\pm 10$  % für die höheren Konzentrationen. Diese Daten erfüllten alle Anforderungen der FDA<sup>211</sup> und ICH<sup>212</sup>.

---

<sup>211</sup> US FDA (1994); US FDA (2001)

<sup>212</sup> ICH-Q2B (1996)

**Tab. D-23** Präzision und Genauigkeit für fünf charakteristische Komponenten aus Enzianwurzel sowie zwei Extrakte

	Konzentration		Wiederholpräzision (an 1 Tag) [%]	Intermediäre Präzision [%]	Genauigkeit: Wiederfindung [%] <sup>c</sup>
	[µg/ml]	[µM]			
Loganinsäure	10	26.57	0.12–0.85	0.52	103.32–105.09
	150	398.55	0.12–0.42	1.42	97.11–100.69
	600	1594.22	0.13–0.35	2.61	96.42–102.63
	MeOH Extrakt <sup>a</sup> (130.1 µg/ml)		0.012–0.026	0.026	–
	Ferm. Extrakt <sup>b</sup> (275.0 µg/ml)		0.73–1.33	1.59	–
Swertiamarin	20	53.43	0.20–0.46	0.50	117.39–119.34
	60	160.28	0.07–1.13	1.73	102.44–107.18
	150	400.70	0.11–0.33	1.11	98.42–101.22
	MeOH Extrakt <sup>a</sup> (71.9 µg/ml)		0.035–0.046	0.039	–
	Ferm Extrakt <sup>b</sup> (78.7 µg/ml)		0.09–0.30	2.09	–
Gentiopikrosid	10	28.06	0.85–4.69	3.21	105.28–108.83
	200	561.28	0.33–0.82	1.64	92.92–97.57
	900	2525.75	0.16–0.62	0.68	93.85–95.15
	MeOH Extrakt <sup>a</sup> (1824.7 µg/ml)		0.002–0.007	0.021	–
	Ferm. Extrakt <sup>b</sup> (539.4 µg/ml)		0.32–0.81	0.47	–
Amarogentin	2	3.41	0.31–2.72	2.74	113.94–119.96
	20	34.10	0.05–0.28	3.15	93.84–100.79
	50	85.24	0.22–0.61	1.72	95.27–99.82
	MeOH Extrakt <sup>a</sup> (14.5 µg/ml)		0.016–0.044	0.091	–
	Ferm. Extrakt <sup>b</sup> (11.2 µg/ml)		0.078–1.33	1.59	–
Gentisin	1	3.87	0.38–2.36	3.40	94.83–101.44
	5	19.36	0.14–0.65	0.63	96.90–97.99
	20	77.45	0.12–0.96	0.78	100.79–102.09
	Ferm. Extrakt <sup>b,d</sup> (1.7 µg/ml)		0.99–3.76	4.10	–

<sup>a</sup> MeOH-Auszug aus getrockneten Enzianwurzeln (25 mg/ml Trockengewicht, G2.7.1.e) in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:3) aufgenommen; <sup>b</sup> Probe 2006-73, verdünnt 1:4 (v/v) mit Wasser; <sup>c</sup> Absolute Werte; <sup>d</sup> Der MeOH-Extrakt wurde hier nicht berücksichtigt, weil die Daten außerhalb des Kalibrierbereiches waren.

#### 4.2.4. Systemeignungstests

Systemeignungstests wurden für HPLC-Läufe von Referenzlösungen und Extraktproben durchgeführt. Bei allen Analysen war der Kapazitätsfaktor >16. Die Auflösung betrug >5 für alle Iridoide, allerdings nicht für die zwei Xanthone, deren komplette Trennung nicht gelang. Die Zahl der theoretischen Böden betrug >31000. All diese Daten entsprachen den FDA-Anforderungen.<sup>213</sup>

<sup>213</sup> US FDA (1994)

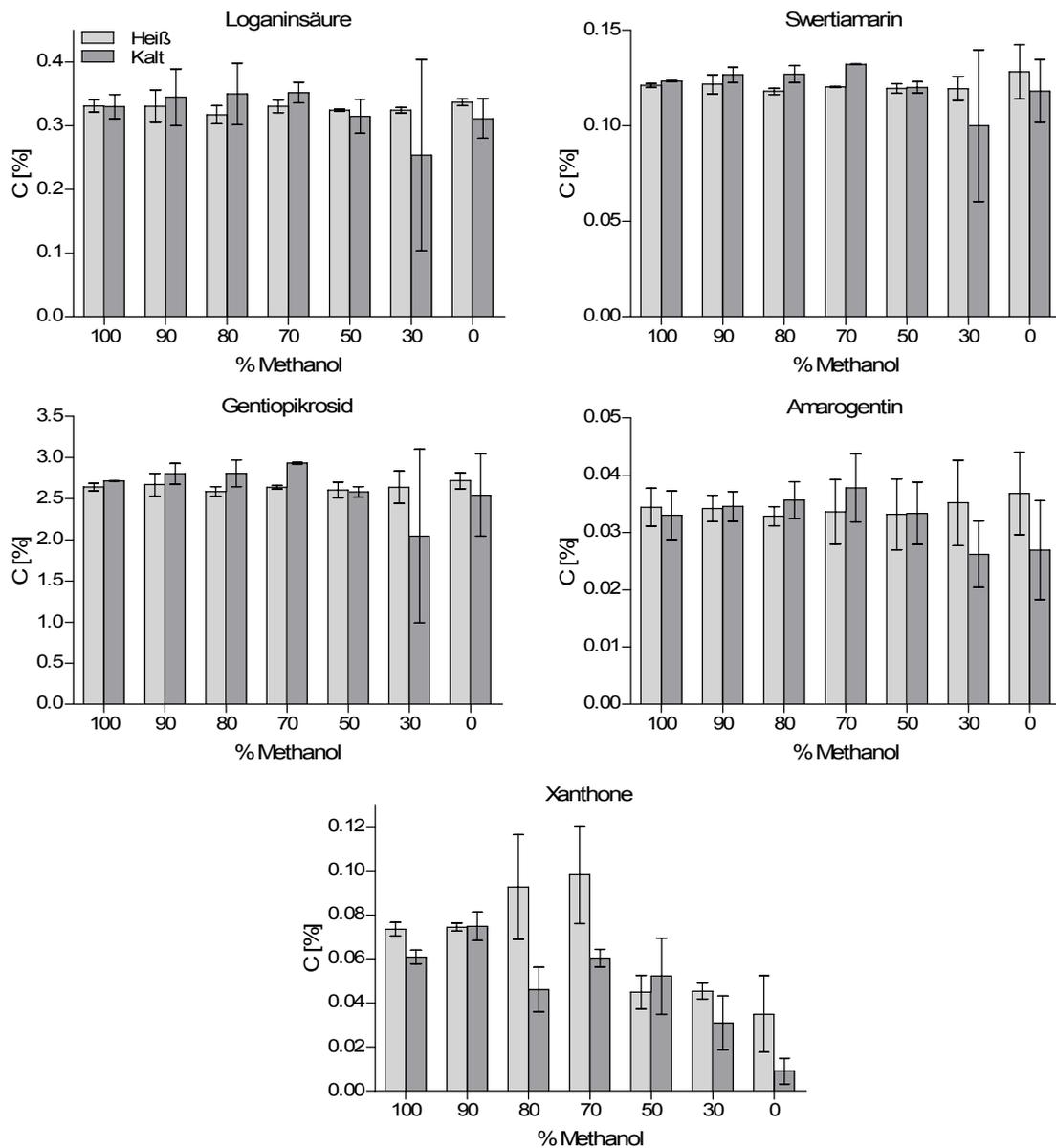
### 4.3. Phytochemische Analysen

#### 4.3.1. Erschöpfende Extraktion

Es wurden zwei Serien von Extraktionen durchgeführt: warme und kalte Auszüge (Vorschriften G2.7.1.f) bzw. g)) jeweils mit Methanol, Wasser bzw. verschiedenen Anteilen an Wasser und Methanol. Quantifiziert wurden Gentiopikrosid, Amarogentin, Loganinsäure, Swertiamarin, Gentsin und Isogentisin. Die zwei letzten Verbindungen werden als Xanthone bezeichnet und wurden zusammen als Gentsin berechnet. Die Ergebnisse (prozentuale Konzentration, auf die frische Droge bezogen) sind in Abb. D-32 graphisch dargestellt. Die Extraktionen wurden jeweils zweimal durchgeführt. Für jede Durchführung wurde die gesamte Menge an frischen Enzianwurzeln aufgetaut, im Mörser zerkleinert, und dann für die verschiedenen Extraktionsansätze aufgeteilt.

Alle Iridoide wiesen sehr ähnliche Konzentrationen bei den verschiedenen Auszügen auf. Keine Extraktionsweise erwies sich als wesentlich effizienter im Vergleich zu den anderen. Lediglich im Falle der Iridoide konnten mit 70 % Methanol bei der kalten Aufarbeitung tendenziell höhere Konzentrationen erreicht werden. Gentsin und Isogentisin verhielten sich anders: die höchste Menge an Xanthonen wurde mit 70 % Methanol bei der warmen Aufarbeitung erzielt und sie wurden wesentlich schwächer mit reinem Wasser extrahiert.

Die maximal extrahierbaren Mengen betragen 2.933 % Gentiopikrosid, 0.352 % Loganinsäure, 0.132 % Swertiamarin, 0.098 % Xanthone und 0.038 % Amarogentin.



**Abb. D-32** Gehaltsbestimmung (% w/w Frischgewicht) von verschiedenen Auszügen mit Standardabweichung (n=2).

#### 4.3.2. Gehaltsbestimmung in fermentierten Extrakten

Für die Gehaltsbestimmung standen Proben von den fermentierten Extrakten aus 2006–2008 zur Verfügung. Die vier Iridoide Loganinsäure, Swertiamarin, Gentiopikrosid, Amarogentin sowie die Xanthonderivate Gentsin und Isogentsin wurden unter Verwendung der oben beschriebenen Kalibriergleichungen (Absatz D4.2.2) quantifiziert. Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen sind in Tab. D-24 zusammengefasst und in Abb. D-33 als prozentualer Anteil der Anfangskonzentration graphisch dargestellt. Insgesamt waren alle Konzentrationen am höchsten im Extrakt von 2006, gefolgt von 2008 und dann 2007.

Loganinsäure zeigte in den drei Extrakten eine unterschiedliche Stabilität. Während sie in den Extrakten von 2006 und 2008 stabil war, wurde sie im Extrakt aus 2007 rasch umgesetzt. Nach 12 Monaten Lagerung waren 88.6 % des Gehalts vom Tag 1 in 2006 vorhanden, in 2007 hingegen nur noch 13.6 %.

Im Falle von Swertiamarin wurde eine langsame Extraktion beobachtet (bis T7). Anschließend nahm die Konzentration während der Lagerung bis zum Ende der Herstellung auf 44 % bis 68 % des Anfangsgehalts ab.

Gentiopikrosid wurde während der ersten 7 Tage auf bis zu ca. 65 % der Anfangskonzentration abgebaut. In der Probe aus 2006 waren nach 12 Monaten noch 43.5 % vorhanden und in 2008 schon nach 6 Monaten Lagerung noch 46.8 % der Anfangskonzentration. Interessanterweise wurde kein Gentiopikrosid in den Proben von 2007 detektiert.

Amarogentin war in den fermentierten Extrakten aus 2006 und 2007 recht stabil, mit einem maximalen Verlust von 15 % nach 12 Monaten Lagerung. Es wurde schneller abgebaut im Extrakt von 2008, mit einem maximalen Umsatz von 30 % nach 6 Monaten.

Die zwei Hauptxanthonderivate Gentisin und Isogentisin wurden zusammen als Gentisin quantifiziert. Sie wurden während der ganzen Herstellung gleichmäßig abgebaut. Nach 7 Tagen Herstellung verblieben noch 63.0–86.3 % der Anfangskonzentration. Nach 12 Monaten Lagerung waren nur noch zwischen 30.7 % und 46.5 % vorhanden (in 2006 bzw. 2007).

Die pH-Werte waren für alle drei Chargen über den gesamten Herstellzeitraum vergleichbar (Tab. D-25).

**Tab. D-24** Gehaltsbestimmung der Iridoide und Xanthone in den fermentierten Extrakten 2006–2008

Loganinsäure Probe	2006		2007		2008	
	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)
T1	1.46E-01	1.41	1.28E-02	0.28	5.68E-02	6.75
T3	1.41E-01	1.58	4.56E-03	3.49	6.24E-02	3.68
T7	1.35E-01	3.75	4.71E-03	7.11	6.37E-02	2.43
M2			4.22E-03	1.21	6.09E-02	5.92
M4	1.29E-01	0.91	3.72E-03	9.00	5.86E-02	0.05
M6	1.30E-01	2.78	3.63E-03	8.10	5.74E-02	0.23
M7	1.33E-01	2.12				
M9	1.31E-01	1.64	2.91E-03	6.02		
M12	1.29E-01	0.81	1.74E-03	14.76		

Swertiamarin Probe	2006		2007		2008	
	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)
T1	3.85E-02	2.89	2.06E-02	9.67	3.10E-02	5.38
T3	3.91E-02	2.57	2.32E-02	7.83	3.56E-02	0.23
T7	3.75E-02	0.70	2.34E-02	7.49	3.63E-02	5.25
M2			2.13E-02	7.49	3.10E-02	8.44
M4	2.64E-02	3.96	1.86E-02	1.23	2.44E-02	7.45
M6	2.39E-02	6.56	1.82E-02	9.66	2.15E-02	8.81
M7	2.45E-02	6.81				
M9	2.18E-02	5.47	1.64E-02	5.27		
M12	1.72E-02	8.18	1.39E-02	6.45		

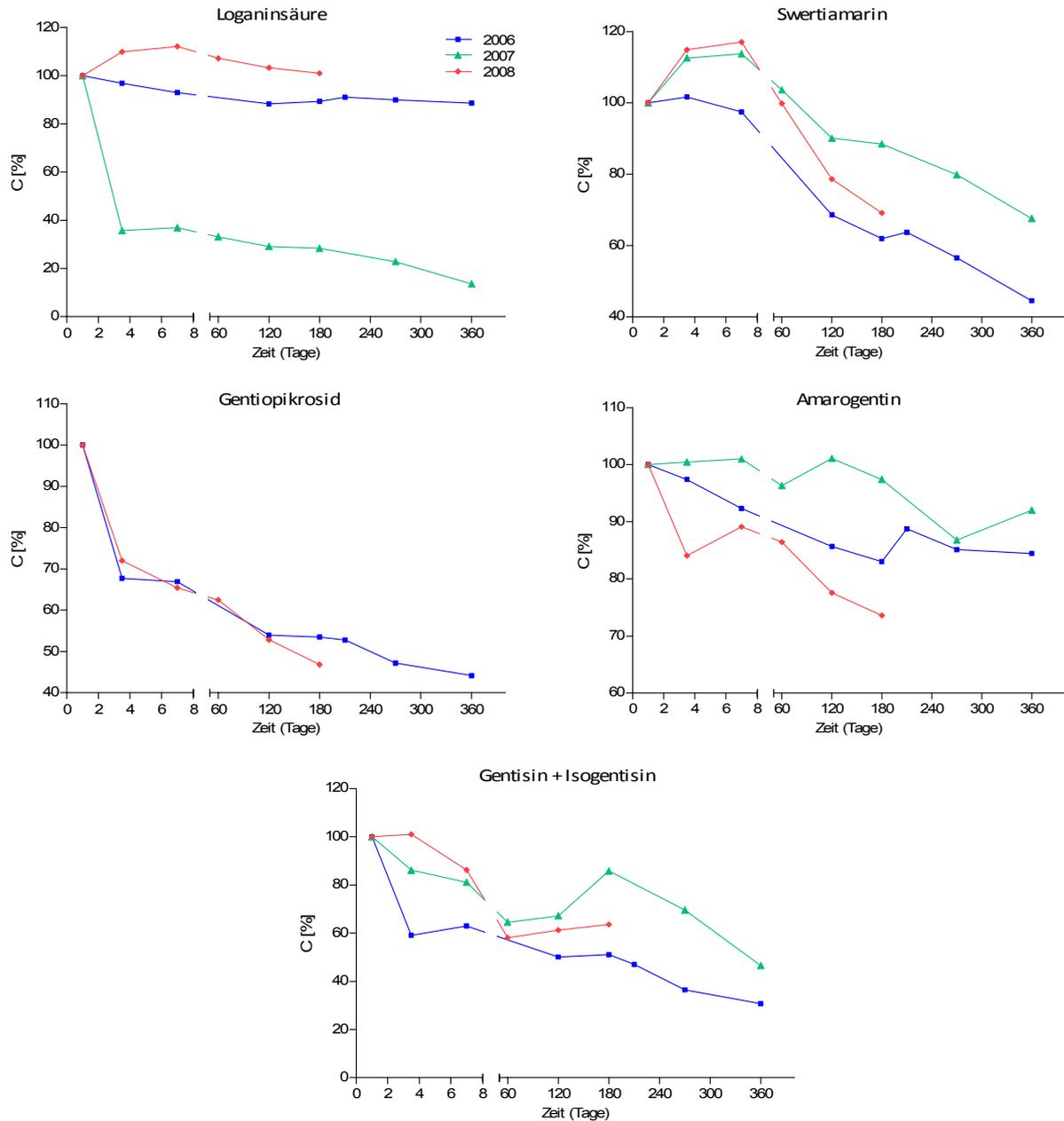
Gentiopikrosid Probe	2006		2007		2008	
	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)
T1	3.95E-01	0.85	n.d.		1.11E-01	5.07
T3	2.67E-01	4.07	n.d.		8.00E-02	1.38
T7	2.64E-01	2.42	n.d.		7.27E-02	3.00
M2			n.d.		6.94E-02	4.00
M4	2.13E-01	0.64	n.d.		5.87E-02	2.19
M6	2.11E-01	2.97	n.d.		5.20E-02	1.95
M7	2.08E-01	0.37				
M9	1.86E-01	0.93	n.d.			
M12	1.74E-01	0.44	n.d.			

Amarogentin Probe	2006		2007		2008	
	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)
T1	5.64E-03	0.75	1.89E-03	7.01	3.60E-03	5.51
T3	5.50E-03	0.58	1.89E-03	4.82	3.03E-03	2.59
T7	5.21E-03	5.47	1.90E-03	5.78	3.21E-03	1.24
M2			1.82E-03	1.53	3.12E-03	1.33
M4	4.84E-03	2.32	1.91E-03	5.00	2.80E-03	4.09
M6	4.68E-03	2.94	1.84E-03	5.38	2.65E-03	4.75
M7	5.01E-03	1.70				
M9	4.80E-03	0.50	1.64E-03	1.73		
M12	4.77E-03	0.86	1.74E-03	1.81		

Xanthone Probe	2006		2007		2008	
	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)	C (% w/v)	RSD (%)
T1	6.44E-04	6.63	2.70E-04*	16.42	4.09E-04*	6.74
T3	3.80E-04*	31.44	2.33E-04*	10.76	4.14E-04*	1.20
T7	4.06E-04*	30.52	2.19E-04*	0.44	3.53E-04*	14.94
M2			1.74E-04*	4.31	2.38E-04*	–
M4	3.23E-04*	7.66	1.81E-04*	17.41	2.51E-04*	–
M6	3.29E-04*	1.29	2.32E-04*	22.82	2.60E-04*	–
M7	3.02E-04*	54.08				
M9	2.35E-04*	16.20	1.88E-04*	18.36		
M12	1.98E-04*	22.20	1.26E-04*	89.97		

n.d.: nicht detektiert; \*: Wert unterhalb des Kalibrierbereichs; –: Bei der Wiederholung eluierte ein Geisterpeak mit den Xanthonen zusammen, deswegen konnte lediglich ein Wert ermittelt werden.



**Abb. D-33** Stabilitätsvergleich der Iridoide und Xanthone im Verlauf der Fermentation von Enzianwurzelnextrakten

**Tab. D-25** Vergleich der pH-Werte von Proben aus den drei studierten fermentierten Enzianwurzelnextrakten (2006–2008)

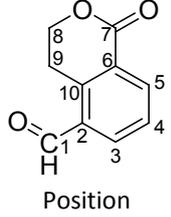
Jahr	T1	T3	T7	M12
2006	3.8	3.7	3.9	
2007	4.4	3.9	3.8	4.4
2008	3.9	3.8	3.8	3.7

### 4.3.3. Umbauprozesse in den fermentierten Extrakten

Drei Peaks tauchten während der Herstellung auf oder nahmen zu: ein Peak bei 2.8min (Peak 10; mit Maxima bei 200 und 280 nm), ein Peak bei 16.2 min (Peak 11; 3 Maxima bei 227, 273 und 355 nm) und ein Peak bei 18.1 min (Peak 12; Maxima bei 228 und 300 nm). Die UV-Daten (Abb. D-37) ließen aber keine Identifizierung zu. Wie im Absatz G2.7.5 berichtet, konnte der dritte Peak (P3) isoliert werden.

Von dem isolierten Peak wurden 1D  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR sowie 2D COSY, HSQC, HMBC und NOESY –Spektren aufgenommen. Die 1D Spektren sind unten abgebildet (Abb. D-34 und Abb. D-35). Es zeigte sich, dass zwei Substanzen vorlagen. Die NMR-Daten einer Verbindung (E1) stimmten mit denen aus der Literatur für Erythrocentaurin überein (Tab. D-26).<sup>214</sup> Entsprechend trat im EI-MS-Spektrum ein Signal bei  $m/z$  176 auf. Auch im direkten positiven und negativen APCI-Modus konnte wiederum die Masse 176 ( $\pm 1$ ) beobachtet werden.

**Tab. D-26** NMR-Daten von Erythrocentaurin mit Literaturvergleich<sup>215</sup>.  $^1\text{H}$ -NMR: 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 100 MHz,  $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$ . Literatur:  $^1\text{H}$ -NMR: 90 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 22.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

 Position	Erythrocentaurin (E1; 1-Oxoisochroman-5-carbaldehyd)						
	$^{13}\text{C}$ $\delta$ [ppm]	Literatur $^{13}\text{C}$ $\delta$ [ppm]	$^1\text{H}$ $\delta$ [ppm] (mult, J [Hz], H)	Literatur $^1\text{H}$ $\delta$ [ppm] (mult, J [Hz], H)	COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )	NOESY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )	HMBC ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ )
1	192.0	191.6	10.27 (s, 1H)	10.03 (s, 1H)		3	4
2	126.4	141.0					9
3	137.4	138.2	8.20 (d, J=7.7, 1H)*	7.89 (d, J=7.7, 1H)	4 (5)	1, 4	1, 5
4	127.5	125.8	7.69 (dd, J=7.8, 7.7, 1H)	7.45 (t, J=7.7, 1H)	3, 5	3, 5	
5	134.7	127.8	8.34 (d, J=7.8, 1H)*	8.22 (d, J=7.8, 1H)	4 (3)	4	3
6	133	132.6					1, 4, 9
7	165.1	164.7					5, 8
8	66.8	66.6	4.60 (t, J=6.0, 2H)	4.39 (t, J=6.0, 2H)	9		9
9	24.0	24.6	3.60 (t, J=6.0, 2H)	3.41 (t, J=6.0, 2H)	8		8
10	141.5	126.9					1, 3, 5, 8, 9

- Keine zweite Aufspaltung konnte beobachtet werden, obwohl eine schwache Kopplung in COSY detektierbar war.

<sup>214</sup> Chapelle (1973); El Sedawy et al. (1989b); Ghosal et al. (1974)

<sup>215</sup> El Sedawy et al. (1989b)

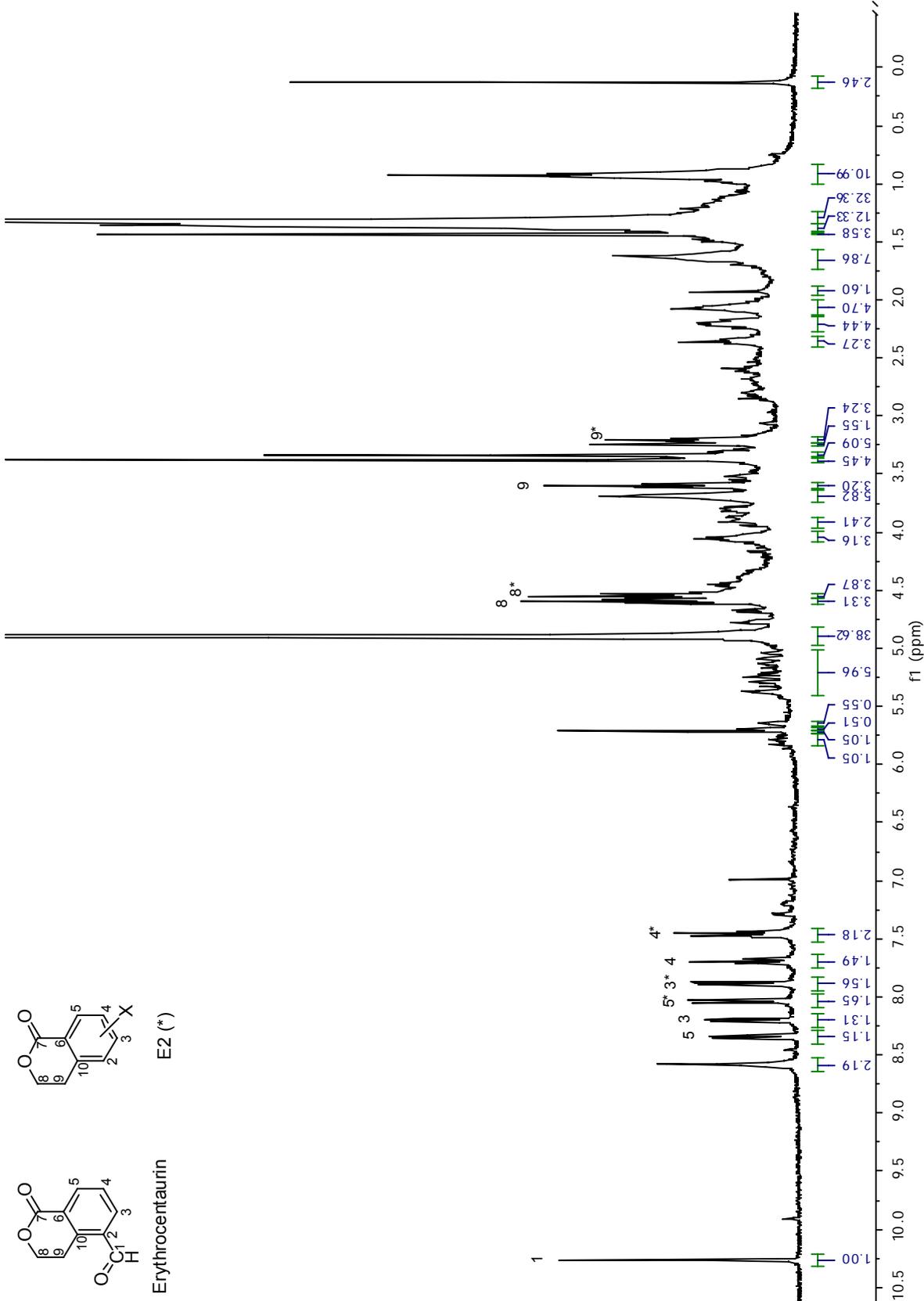


Abb. D-34 P3: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, [D4]-MeOH)

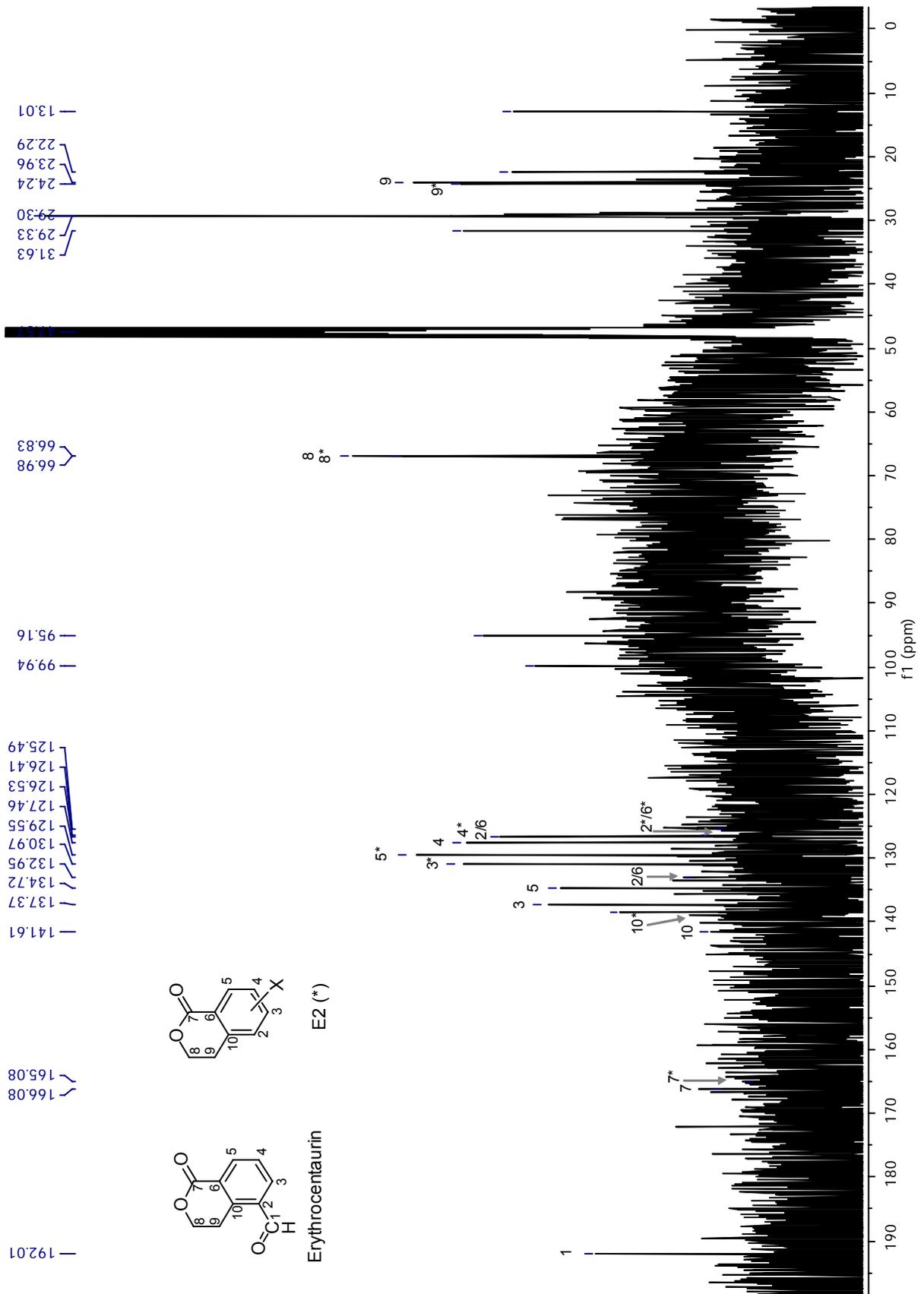


Abb. D-35 P3: <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, [D<sub>4</sub>]-MeOH)

Bei der anderen Verbindung (E2) musste es sich um ein sehr ähnliches Molekül handeln, da dessen Signale gleich, aber leicht verschoben waren im Vergleich zu Erythrocentaurin (Abb. D-34, Tab. D-27), aber kein Signal für die Aldehydgruppe vorhanden war.

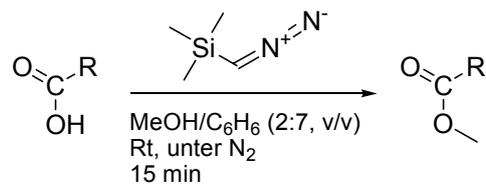
**Tab. D-27** NMR-Daten von E2.  $^1\text{H-NMR}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$ : 100 MHz, [D4]-MeOH.

Position	$^{13}\text{C}$ $\delta$ [ppm]	$^1\text{H}$ $\delta$ [ppm] (mult, J [Hz], H)	COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )	NOESY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )	HMBC ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ )
1					
2	125.5?				4, 9
3	130.9	7.89 (d, J=7.7, 1H)*	4 (5)	4	5
4	126.4	7.45 (dd, J=7.8, 7.7, 1H)	3, 5	3, 5	4
5	129.5	8.04 (d, J=7.8, 1H)*	4 (3)	4	3
6	125.5?				4, 9
7	166.1				5, 8
8	67.0	4.55 (t, J=5.9, 2H)	9		9
9	24.2	3.2 (t, J=5.9, 2H)	8		8
10	138.4				3, 4, 5, 8, 9

\* Keine zweite Aufspaltung konnte beobachtet werden, obwohl eine schwache Kopplung in COSY detektierbar war.

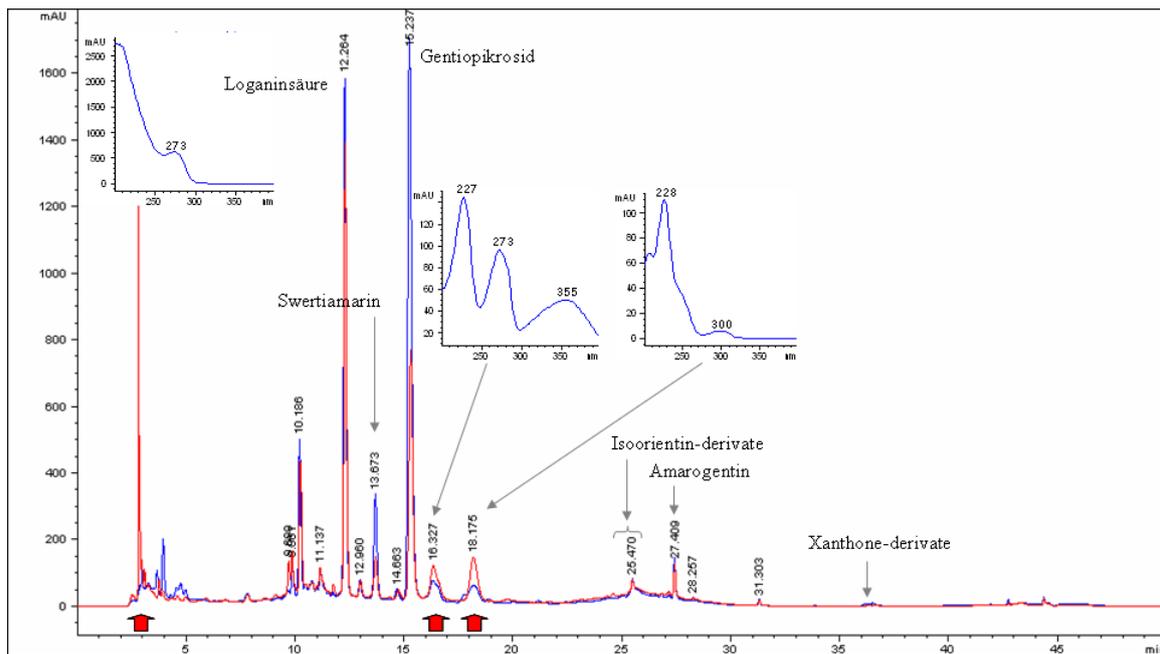
Im  $^1\text{H}$ -Spektrum war ein nicht zuzuordnendes Signal vorhanden: ein breites Singulett bei 8.58 ppm, das aber in den HSQC, COSY und HMBC-Spektren keine einzige Korrelation zu einem C- oder H-Atom zeigte. Da in Methanol gemessen wurde, konnte es sich nicht um ein an Sauerstoff gebundenes H-Atom handeln. Um zu untersuchen, ob es sich um ein Amid handeln könnte, wurde die  $^1\text{H}$ -Messung erneut nach einigen Tagen durchgeführt. Dabei änderte sich die Integration dieses Signals nicht, was dafür sprach, dass kein Amid vorlag. In diesem Fall hätte das Signal mit der Zeit abgenommen, da es in [D4]-Methanol langsam ausgetauscht worden wäre.

Möglich war auch das Vorliegen einer Säurefunktion, da sonst kein anderes Signal bei den NMR-Messungen in MeOH zu sehen war, das eine Korrelation zu den anderen Atomen von E2 zeigte. Um dies zu klären, wurde dem Gemisch TMS-Diazomethan als Methylierungsreagenz zugesetzt (s. G2.7.6). Die theoretische Reaktionsgleichung ist in Abb. D-36 dargestellt.



**Abb. D-36** P3: Methylierung einer organischen Säure mittels TMS-Diazomethan

Als Zeichen, dass die Reaktion abläuft, sollte bei der Methylierung Stickstoff vom Diazomethanrest abgespalten werden, was sich in einer Blasenbildung zeigt. In unserem Fall wurde nichts dergleichen beobachtet. Es war aber auch keine einzige Änderung in den Spektren zu beobachten, weder im  $^1\text{H}$  noch im HSQC-Spektrum, was dafür sprach, dass keine Methylierung stattgefunden hatte. Demzufolge ist E2 weder ein Amid noch eine Säure.



**Abb. D-37** Vergleich zweier Chromatogramme von einem fermentierten Extrakt (2006). Blau: 2006-T1; rot: 2006-M12.

#### 4.3.4. Vergleich der fermentierten Extrakte nach HAB mit selbsthergestellten Extrakten

Im Labor wurden wässrige Auszüge hergestellt, um den Einfluss von verschiedenen Parametern bei der Herstellung nach HAB 33c zu untersuchen (siehe G2.7.1.b)). Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen (Tab. D-28 a bis e) zusammengefasst sowie in Abb.

D-38 dargestellt. Die aufgenommene pH-Werte waren vergleichbar in allen Ansätzen (Tab. D-29). Insgesamt fielen die Konzentrationen sehr unterschiedlich aus, selbst im Falle von Wiederholungen einer gleichen Extraktion. Die Extraktionsserien wurden aus tiefgefrorenen frischen Wurzelstücken hergestellt, deren Konzentration an Inhaltsstoffen sehr unterschiedlich war. Es konnte beobachtet werden, dass die Konzentrationen der Wurzelstücke je nach ursprünglichem Vorkommen in der Wurzel (Rand oder Mitte) und unterschiedlichem Wasserverlust im Gefrierbeutel variierten. Deswegen waren die Standardabweichungen in manchen Fällen hoch (z. B. für Loganinsäure im Extrakt „E+“, Tab. D-28 a). Dabei war es unmöglich, die Konzentrationen untereinander zu vergleichen. Daher sind die Konzentrationen als prozentualer Anteil der Anfangskonzentration dargestellt (Abb. D-38). Die Ergebnisse des fermentierten Extraktes aus 2006 wurden als Vergleich herangezogen. Die pH-Werte der vier selbsthergestellten Extrakte (Tab. D-25) waren alle im gleichen Bereich, zwischen pH 4.1 und 4.8 am Anfang (3 h nach Fertigstellen des Ansatzes) und zwischen pH 3.0 und 3.8 am Ende der Extraktion (T7). Interessanterweise war der Ansatz aus reinem Gentiopikrosid am sauersten. Der Auszug ohne Temperaturwechsel („ELH-“ aus Enzian, Laktose und Honig) unterschied sich nur am Ende der Messzeit (nach 7 Monaten) von den anderen Extrakten, mit auf einmal geringeren Konzentrationen an Iridoiden. Dieser Auszug war außerdem der einzige, der bereits 2 Wochen nach dem Ansatzbeginn eine Schimmelbildung zeigte.

Außer dieser Beobachtung gab es hinsichtlich Loganinsäure und Swertiamarin kaum Unterschiede zwischen den Extrakten. Interessanterweise waren die beiden Komponenten während der Lagerung (zwischen 2 und 8 Monaten) in den Extrakten mit Temperaturwechsel nach HAB und ohne Honig („E+“, „EL+“) stabiler im Vergleich zum fermentierten Extrakt aus 2006. Da die Lagerung der selbsthergestellten Extrakte anstatt der 15°C der fermentierten Extrakte bei 5°C durchgeführt wurde, kann dies das unterschiedliche Stabilitätsverhalten erklären.

Gentiopikrosid war im Extrakt ohne Honig am stabilsten („EL+“: Enzian und Laktose mit Temperaturwechsel). Im fermentierten Extrakt wurde Gentiopikrosid zu Beginn der Herstellung schneller abgebaut als bei den anderen Auszügen („E+“ und „ELH-“), war aber stabiler ab 4 Monaten Lagerung. Wurde statt Enzianwurzel reines Gentiopikrosid nach dem

HAB-Verfahren behandelt, wurde dieses noch schneller abgebaut als in den Pflanzenextrakten. Dieser Extrakt („G+“) wurde weiter analysiert (s. Absatz D4.3.5).

Amarogentin zeigte eine ähnliche Tendenz in allen Extrakten, wobei die höchste Stabilität im Extrakt aus Enzian und Laktose nach HAB-Verfahren gefunden wurde („EL+“; weniger als 10 % Abbau nach 6 Monaten) und der schnellste Abbau im Extrakt ohne Temperaturwechsel („ELH-“), mit nur 65 % der Anfangskonzentration nach 7 Monaten Lagerung.

Für die Xanthone Gentisin und Isogentisin waren keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. Sie wurden in allen Fällen gleich schnell abgebaut, so dass 20–50 % des Anfangsgehalts nach 7 Monaten Lagerung verblieben.

Außerdem wurde ein Dekokt nach HAB 23b hergestellt (s. G2.7.1.c), um mögliche Abbauprodukte durch Erhitzung zu beobachten. Dabei wurden keine Zersetzungsprodukte detektiert. Dieser Dekokt enthielt 1.49% Gentiopikrosid, 0.73 % Loganinsäure, 0.13 % Swertiamarin, 0.025% Amarogentin und 0.017% Xanthone (auf die frische Droge bezogen). Im Vergleich zum Absatz D4.3.1, war dieses Dekokt erschöpfend in Hinsicht auf Loganinsäure (mit hier sogar eine höhere extrahierten Menge) und Swertiamarin. Dagegen wurden weniger Gentiopikrosid, Amarogentin und Xanthonen extrahiert.

**Tab. D-28** Konzentration an Iridoiden und Xanthonen (% w/v) in Enzian-Proben nach verschiedenen Extraktionsverfahren. E+: Enzianwurzel, mit Temperaturwechsel nach HAB; EL+: Enzianwurzel und Laktose, mit Temperaturwechsel nach HAB; ELH-: Enzianwurzel, Laktose und Honig, ohne Temperaturwechsel nach HAB; G+: Gentiopikrosid, mit Temperaturwechsel nach HAB.

Loganinsäure Zeit (Tage)	E+		EL+	ELH-	
	C%	RSD (n=3)	C% (n=1)	C%	RSD (n=3)
1	1.53E-01	73.42	2.82E-01	2.98E-01	5.31
3.5	1.56E-01	83.43	2.74E-01	2.80E-01	0.69
7	1.57E-01	74.65	2.80E-01	2.82E-01	14.64
40	1.51E-01	75.25	2.74E-01	2.87E-01	6.21
60	1.48E-01	73.63	2.73E-01	2.90E-01	4.35
120	1.62E-01	78.16	2.93E-01	2.74E-01	13.79
150			2.75E-01		
210	8.63E-02	1.54		7.06E-03	7.22

Swertiamarin Zeit (Tage)	E+		EL+	ELH-	
	C%	RSD (n=3)	C% (n=1)	C%	RSD (n=3)
1	4.75E-02	0.62	4.47E-02	4.56E-02	6.72
3.5	4.36E-02	8.26	4.15E-02	4.48E-02	1.20
7	4.60E-02	3.60	4.28E-02	4.40E-02	16.31
40	4.23E-02	7.01	3.71E-02	4.57E-02	6.74
60	4.19E-02	5.42	3.79E-02	4.47E-02	6.86
120	4.35E-02	0.70	4.02E-02	4.27E-02	8.36
150			3.55E-02		
210	3.87E-02	2.12		9.06E-03	48.17

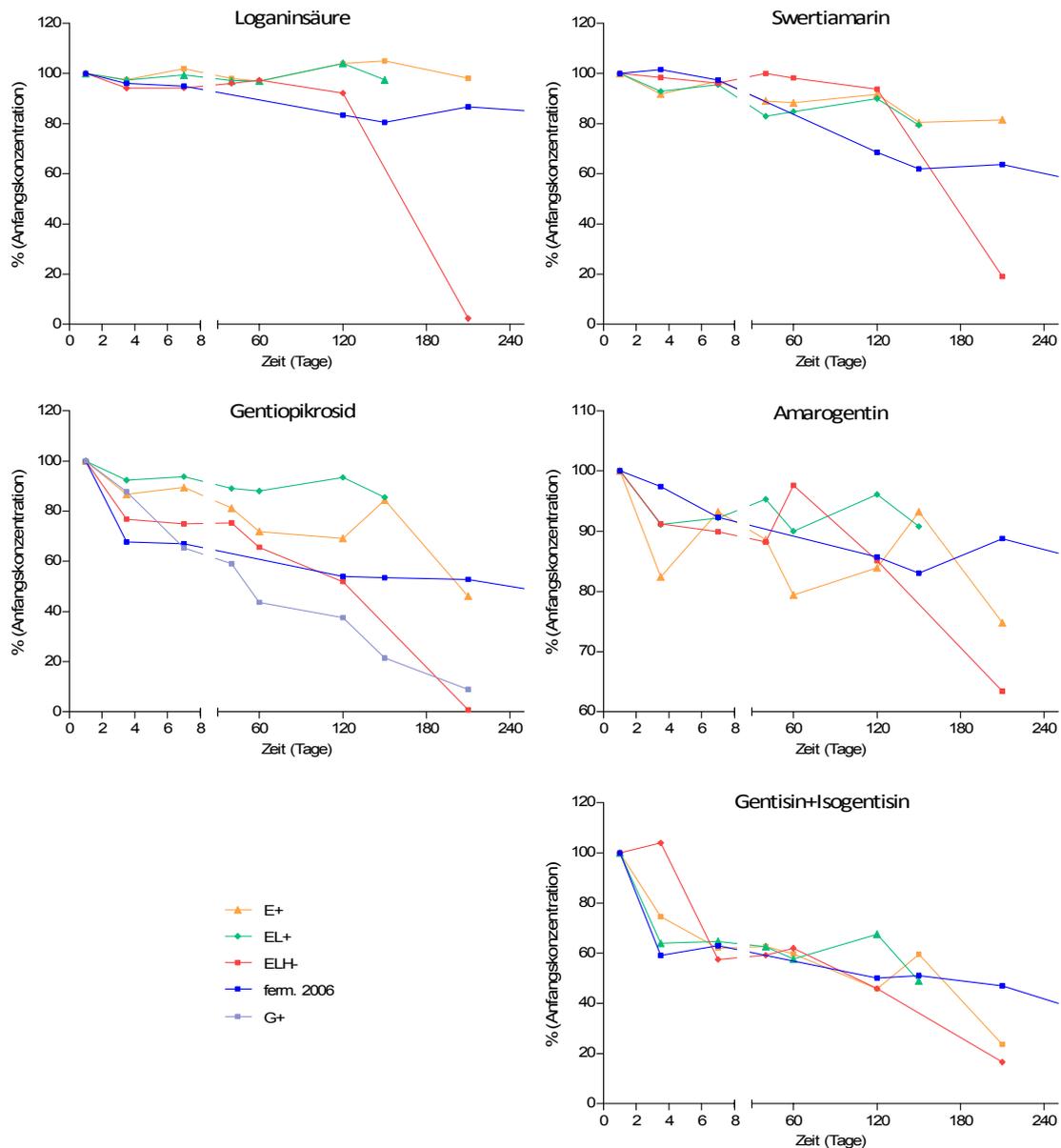
Gentiopikrosid Zeit (Tage)	E+		EL+	ELH-		G+	
	C%	RSD (n=3)	C% (n=1)	C%	RSD (n=3)	C%	RSD (n=2)
0.1						1.22E+00	9.95
1	9.17E-01	39.60	4.71E-01	9.36E-01	49.66	1.07E+00	6.07
3.5	7.69E-01	31.40	4.35E-01	6.99E-01	45.01	7.96E-01	9.38
7	8.16E-01	38.79	4.41E-01	7.21E-01	54.27	7.19E-01	10.62
40	7.27E-01	33.87	4.19E-01	7.01E-01	48.67	5.31E-01	10.05
60	6.36E-01	31.09	4.14E-01	5.89E-01	42.62	4.57E-01	12.59
120	5.90E-01	21.92	4.40E-01	4.16E-01	29.18	2.61E-01	9.73
150			4.02E-01				
210	5.19E-01	4.35		9.71E-03	8.51	1.09E-01	0.46

Amarogentin Zeit (Tage)	E+		EL+	ELH-	
	C%	RSD (n=3)	C% (n=1)	C%	RSD (n=3)
1	8.10E-03	12.19	6.68E-03	1.02E-02	31.25
3.5	6.61E-03	2.18	6.09E-03	9.14E-03	23.15
7	7.56E-03	13.49	6.16E-03	9.41E-03	38.87
40	7.13E-03	5.39	6.37E-03	9.10E-03	33.61
60	6.41E-03	7.38	6.02E-03	9.81E-03	24.34
120	6.72E-03	3.97	6.42E-03	8.42E-03	19.79
150			6.07E-03		
210	6.48E-03	3.87		7.66E-03	2.19

Xanthone Zeit (Tage)	E+		EL+	ELH-	
	C%	RSD (n=3)	C% (n=1)	C%	RSD (n=3)
1	7.41E-04	14.81	5.89E-04	1.09E-03	28.58
3.5	4.65E-04	3.75	3.77E-04	2.60E-03	60.15
7	4.58E-04	11.49	3.81E-04	5.96E-04	9.12
40	4.61E-04	11.79	3.68E-04	5.99E-04	2.19
60	4.41E-04	11.76	3.39E-04	6.44E-04	9.37
120	3.26E-04	24.42	3.98E-04	4.33E-04	33.81
150			2.88E-04		
210	1.89E-04	2.95		2.10E-04	10.42

**Tab. D-29** Vergleich der pH-Werte in den selbsthergestellten Extrakten. E+: Enzianwurzel, mit Temperaturwechsel nach HAB; EL+: Enzianwurzel und Laktose, mit Temperaturwechsel nach HAB; ELH-: Enzianwurzel, Laktose und Honig, ohne Temperaturwechsel nach HAB; G+: Gentiopikrosid, mit Temperaturwechsel nach HAB.

Tag	E+	EL+	ELH-	G+
0	4.3	4.8	4.4	4.1
1	4.0	4.8	4.1	3.5
3.5	4.0	3.7	3.9	3.2
7	3.8	3.3	3.8	3.0

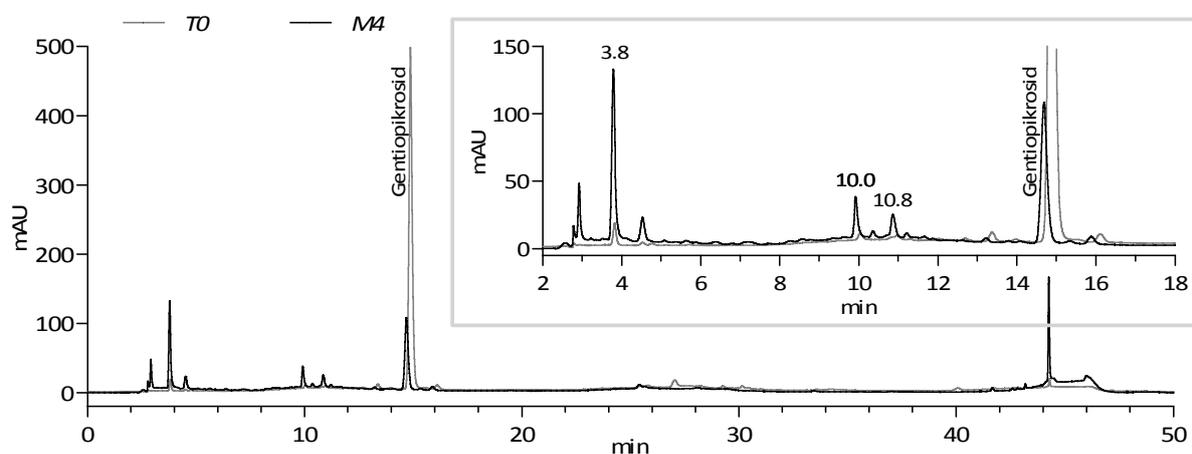


**Abb. D-38** Stabilitätsvergleich von Gentiopikrosid, Swertiamarin, Amarogentin, Logansäure und Xanthonen in % der Anfangskonzentration in verschiedenen Extrakten. E+: Enzianwurzel, mit Temperaturwechsel nach HAB; EL+: Enzianwurzel und Laktose, mit Temperaturwechsel nach HAB; ELH-: Enzianwurzel, Laktose und Honig, ohne Temperaturwechsel nach HAB; ferm 2006: fermentierter Extrakt aus 2006; G+: Gentiopikrosid, mit Temperaturwechsel nach HAB.

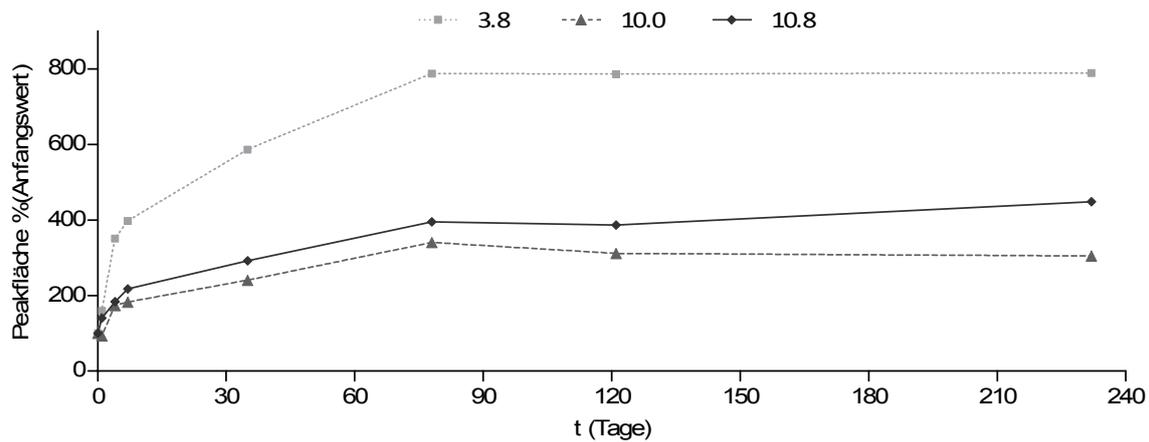
#### 4.3.5. Ermittlung von Folgeprodukten aus Gentiopikrosid im Laufe der Fermentation

Gentiopikrosid wurde den Herstellungsbedingungen nach HAB unterzogen, um dessen Konzentrationsverlauf und die Entstehung möglicher Umsatzprodukten zu ermitteln. Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung sind im vorherigen Absatz in Tab. D-28 c) zusammengefasst sowie in Abb. D-38 graphisch dargestellt.

Eine rasche und gleichmäßige Abnahme von Gentiopikrosid war während der ersten Woche zu beobachten, die während der Lagerung etwas langsamer verlief. In Abb. D-39 sind die Chromatogramme von zwei Proben (nach 3h – T0, sowie nach 4 Monaten – M4) übereinandergelegt. Wenn man den polaren Bereich des Chromatogramms vor den Gentiopikrosidpeak genauer betrachtet (siehe Vergrößerung), entstanden in Zuge der Fermentation der Reinsubstanz fünf Peaks (bei RT 2.9, 3.8, 4.5, 10.0 und 10.8 min), mehr als bei den fermentierten Extrakten der Enzianwurzel (Absatz D4.3.3). Die UV-Spektren der unbekanntenen Verbindungen waren alle sehr ähnlich: die vier ersten Peaks (RT 2.9–10.0 min) hatten ein UV-Maximum bei 217 nm, der letzte (RT 10.8 min) bei 227 nm. Die Zunahme der Fläche der zwei größten Peaks (bei 3.8 und 10.0 min) ist in Abb. D-40 graphisch dargestellt.



**Abb. D-39** HPLC-Chromatogramme der nach HAB-Verfahren behandelten Gentiopikrosid-Probe (Ansatz G+), mit Vergrößerung des vorderen Teils. Grau: nach 3 h; schwarz: nach 4 Monaten.



**Abb. D-40** Bildung von drei Produkten aus Gentiopikrosid während der Fermentation und Lagerung nach HAB (Ansatz G+, RT = 3.8, 10.0 und 10.8 min).

#### 4.3.6. Bitterwertbestimmung

Die drei getesteten Extrakte (zwei Proben des fermentierten Extraktes von 2006 – 2006–T3 und –M12 – sowie ein wässriger Kaltextrakt) hatten die gleiche Pflanzenkonzentration (0.8 g/ml Frischgewicht). Die Ergebnisse der Bitterwertbestimmung sind in Tab. D-30 zusammengefasst. Für die zwei Bestimmungen wurden die Lösungen mit Leitungswasser hergestellt, da destilliertes Wasser wie im Ph.Eur. empfohlen<sup>216</sup> als bitter empfunden wurde. Daher wurde nur die 2. Bestimmung ausgewertet. Hier wurde 10 bis 20 min zwischen den Proben gewartet und der Mund jeweils gründlich mit Wasser gespült.

Der Bitterwert von Amarogentin und Gentiopikrosid beträgt 58 000 000 bzw. 12 000 pro Gramm Substanz.<sup>217</sup> Damit konnte der theoretische Bitterwert der Lösungen berechnet werden. Die anderen Bitterstoffe (Swerosid, Swertiamarin und der Zucker Gentiobiose) weisen so geringe Bitterwerte auf, dass sie fast nicht an der Bitterwirkung der Droge beteiligt sind<sup>217</sup> und deshalb bei der Berechnung unberücksichtigt bleiben.

Bei der zweiten Bestimmung zeigte der wässrige Extrakt den höchsten Bitterwert. Die Probe 2006–T3, die höhere Konzentrationen an Amarogentin und Gentiopikrosid als die fertige Urtinktur aufwies, zeigte jedoch den niedrigsten Bitterwert. Die experimentell ermittelten Werte korrelierten folglich nicht mit den Konzentrationen an Bitterstoffen.

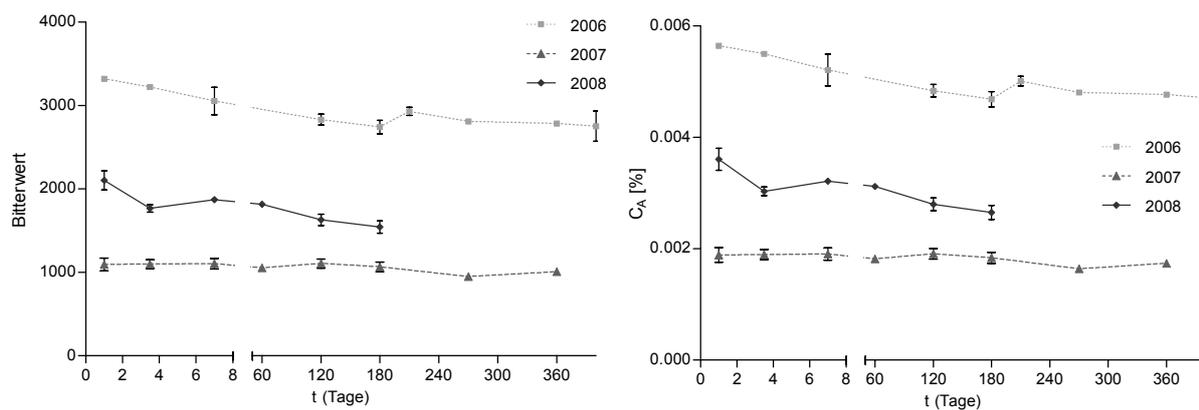
<sup>216</sup> Europäisches Arzneibuch (2008c)

<sup>217</sup> Wagner & Münzig-Vasirian (1975)

Zudem wurden die Bitterwerte für fermentierten Extrakte berechnet (unter Berücksichtigung von Amarogentin und Gentiopikrosid). Die Ergebnisse sind in Abb. D-41 dargestellt. Der Extrakt von 2006, mit der höchsten Konzentration an Amarogentin (Tab. D-30) hatte dabei auch den höchsten Bitterwert, der ungefähr 3000 betrug. Der Extrakt von 2007 hatte die niedrigste Konzentration an Amarogentin und auch den niedrigsten Bitterwert von ca. 1000.

**Tab. D-30** Prozentualer Gehalt an Amarogentin und Gentiopikrosid und ermittelter Bitterwert in den getesteten Extrakten unter Zugrundelegung publizierter Bitterwerte<sup>217</sup>

Probe		2006-T3	2006-M12	Wässriger Extrakt
Konz. (%w/v)	Amarogentin	5.50E-03	4.71E-03	5.74E-03
	Gentiopikrosid	2.67E-01	1.70E-01	3.94E-01
Bitterwert	Bestimmung 2	2095.2	2885.7	4971.4
	Berechnet	3220.7	2752.0	3375.8



**Abb. D-41** Bitterwertbestimmung von fermentierten Extrakten, berechnet über den Bitterstoffgehalt pro Gramm (links) und Amarogentingehaltsbestimmung (% w/v, rechts)

#### 4.4. Mikrobiologische Untersuchungen der fermentierten Extrakte

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung sind in Tab. D-31 zusammengefasst. Einige einzelne Proben von der Extraktcharge aus 2007 enthielten Milchsäurebakterien. Interessanterweise wurden diese Extrakte anstatt mit Molke, mit Laktose und Honig hergestellt (s. Tab. G-2). Die Milchsäureflora stammte also von der Pflanze.

**Tab. D-31** Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Enzianwurzelextrakten

	<hr/>							
Tage	1	3	7	60	120	180	270	360
<hr/>								
2006	-	-	-	-	-	-	-	-
2007	+	+	-	-	+	-	-	-
2008	-	-	-	-	-	-	-	-

\* -: negativer Test; +: positiver Test.

## 5. *Hypericum perforatum*

### 5.1. Methodenentwicklung und Peakzuordnung

Die HPLC-Methode wurde mittels einer Zorbax SB C18-Säule und mit einem Gradient aus 0.05 % Ameisensäure (A), Methanol (B) und Acetonitril (C) in Anlehnung an Brolis et al.<sup>218</sup> optimiert. Die Ameisensäurekonzentration wurde von 0 % (pH 5.5) bis 0.5 % (pH 2.3) variiert und nach einer Optimierungsphase auf 0.05 % (pH 2.7) festgelegt, um eine bestmögliche Auftrennung der Naphthodianthrone, Phloroglucinole sowie der Flavonoide zu erreichen.<sup>219</sup>

Eine erste Zuordnung der Komponenten wurde mit Hilfe von UV-Spektren und Literaturdaten<sup>218,220</sup> am Beispiel eines methanolischen Extraktes aus frischen Johanniskrautpflanzen (100mg/ml, 1:4 in Wasser verdünnt) durchgeführt (Abb. D-42).

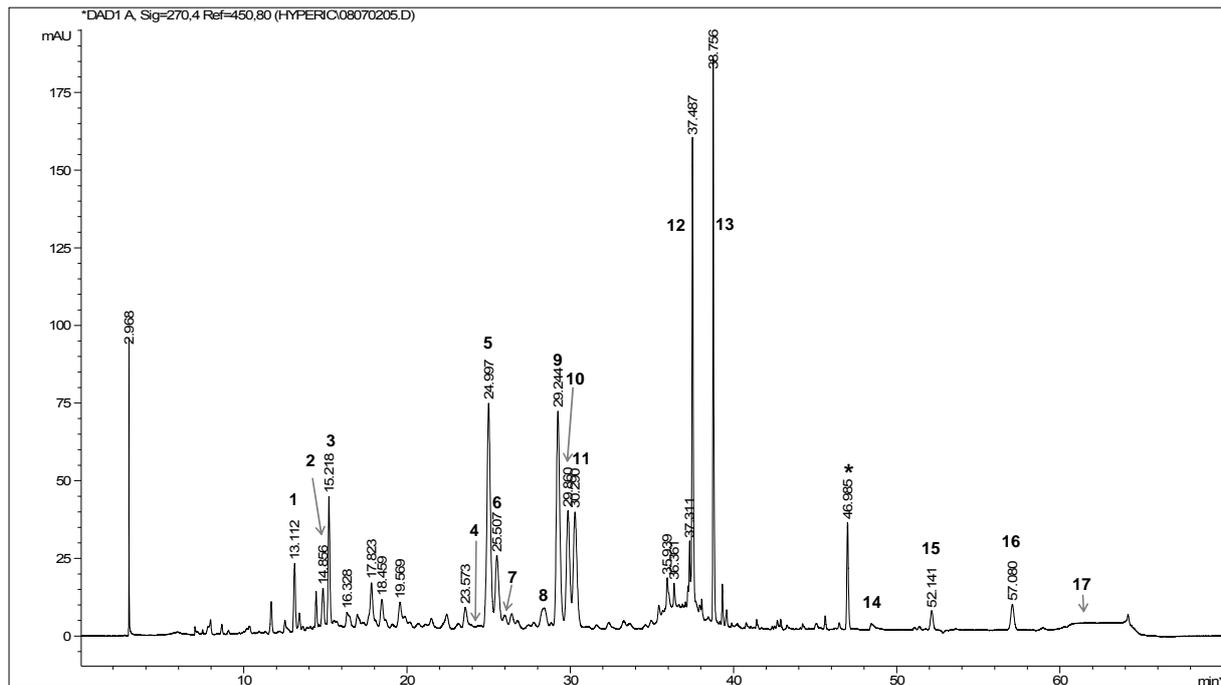
Verbindungen, deren Nummern in der Peakzuordnung fett erscheinen (Abb. D-42), wurden durch Aufstockanalysen bestätigt. Die Zuordnung der Peaks 1 bis 3 stimmte mit den Massen überein, die bei den LC-MS Analysen ermittelt wurden (Methode s. Tab. G-12).

---

<sup>218</sup> Brolis et al. (1998)

<sup>219</sup> Fourneron & Nait-Si (2006)

<sup>220</sup> Schmidt et al. (2008)

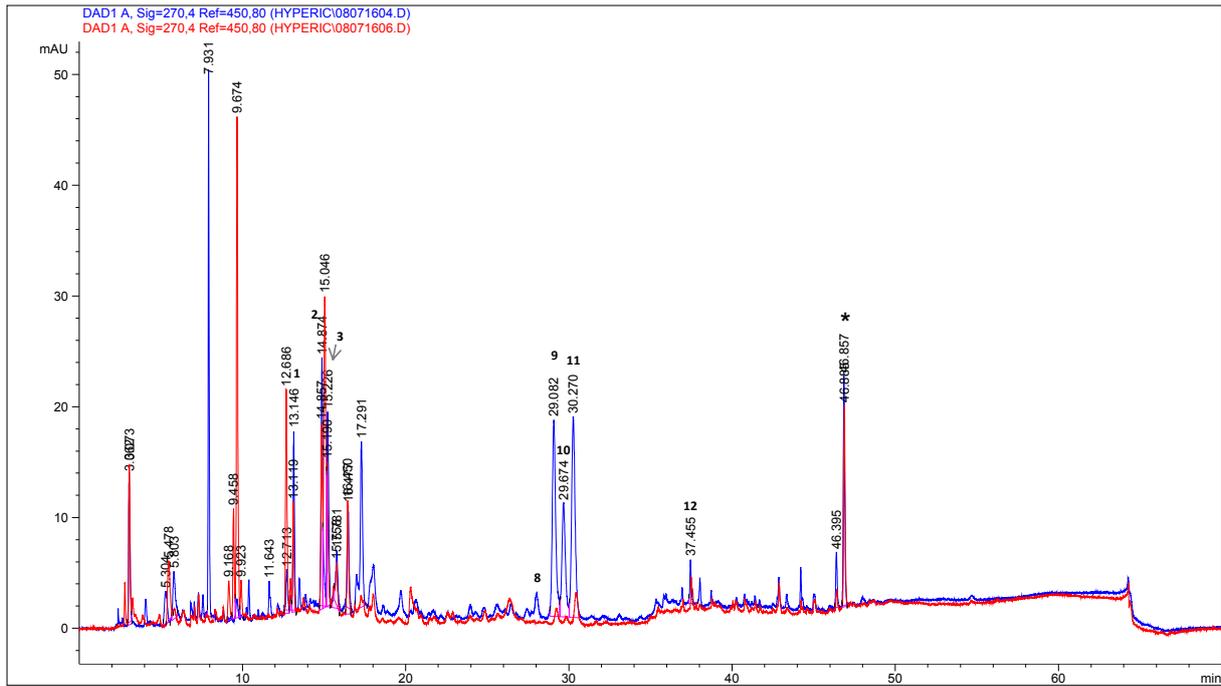


**Abb. D-42** HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus frischen Johanniskrautpflanzen bei 270 nm. 1) Neochlorogensäure; 2) 3-*O-p*-Coumaroyl-chinasäure; 3) Chlorogensäure; 4) Rutin; 5) Hyperosid; 6) Quercetin 3-glucuronid + Isoquercitrin; 7) Flavonoid; 8) Quercetin 3-arabinopyranosid; 9, 10) Flavonoide; 11) Quercitrin; 12) Quercetin; 13) I3,II8-Biapigenin + Kämpferol; 14) Pseudohypericin; 15) Hyperforinderivat, 16) Hyperforin; 17) Hypericin; \*) Geisterpeak aus der Säule.

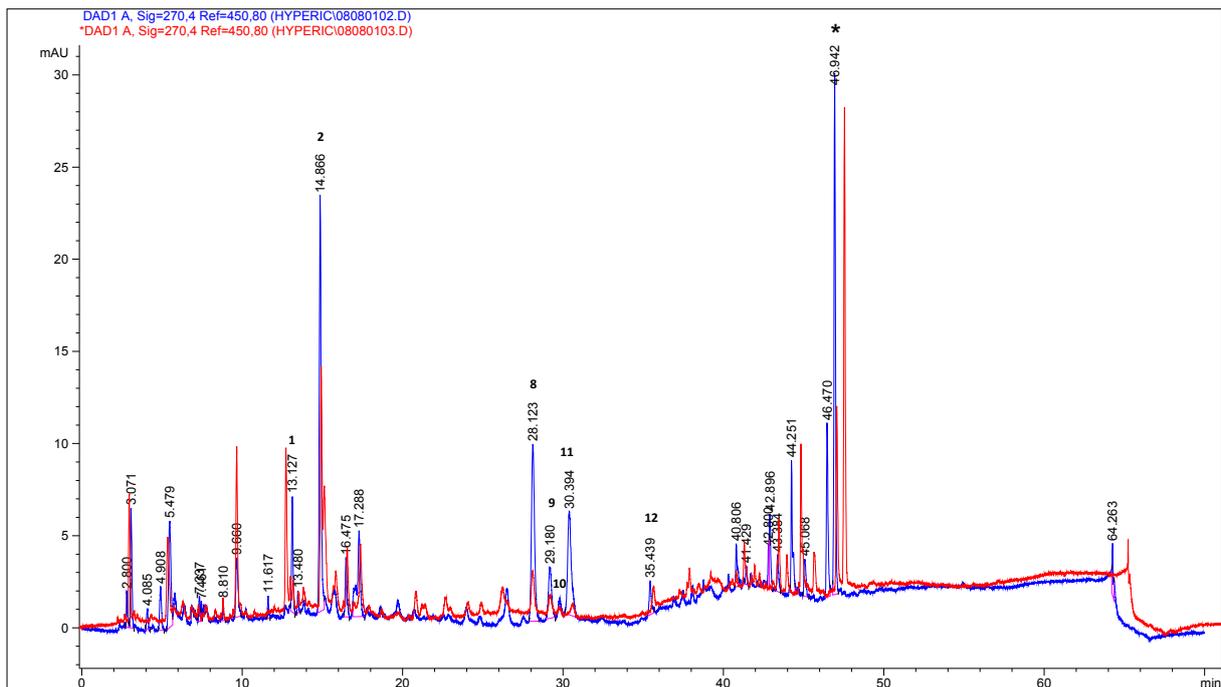
## 5.2. Vergleich der fermentierten Extrakte

Es wurden Proben der Extrakte aus 2006 und 2007, die am Anfang bzw. am Ende der Herstellung gezogen wurden, verglichen (Abb. D-43 bzw. Abb. D-44). Bei beiden Chargen traten die Flavonoid-Peaks (zwischen 29 und 30 min) nach einigen Monaten Lagerung in viel geringerer Menge auf. In keinen Proben konnten Hypericin- und Hyperforinderivate detektiert werden. Da Phloroglucinole und Naphthodianthrone schlecht wasserlöslich sind, wurden einige Proben der fermentierten Extrakte zur HPLC Analyse mit MeOH verdünnt (s. G2.8.2). Auch in diesen Fällen sie nicht detektiert werden. Daher wurden vorhandene feste Extraktionsrückstände (T1 bis T7) mit MeOH extrahiert. In diesen konnten die gewünschten Substanzen detektiert werden. Dadurch wurde belegt, dass weder Phloroglucinole noch Naphthodianthrone während der Herstellung extrahiert wurden; sie blieben in der Pflanzenmatrix zurück.

Die gemessenen pH-Werte (Tab. D-32) waren gleich für die zwei aufgeführten Chargen (2006 und 2007, Werte um pH 4).



**Abb. D-43** HPLC-Chromatogramme zweier Proben des fermentierten Extraktes von 2006: nach 3.5 Tagen (blau) und nach 12 Monaten (rot). Peakzuordnung wie in Abb. D-42.



**Abb. D-44** HPLC-Chromatogramme zweier Proben des fermentierten Extraktes von 2007: nach 3.5 Tagen (blau) und nach 4 Monaten (rot). Peakzuordnung wie in Abb. D-42.

**Tab. D-32 Vergleich der pH-Werte** von Proben aus zwei fermentierten Johanniskrautextrakten (2006 und 2007)

Jahr	T1	T3	T7	M12
2006	3.9	3.9	4.2	3.9
2007	4.2	3.8	3.7	3.7

### 5.3. Mikrobiologische Untersuchungen der fermentierten Extrakte

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf MRS-Agar sind in Tab. D-33 zusammengefasst. Es waren in fast allen Proben Milchsäurebakterien zu finden. Da dieser fermentierte Extrakt mit Laktose und Honig hergestellt wurde (s. Tab. G-2), stammen diese vom Pflanzenmaterial.

**Tab. D-33** Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Johanniskrautextrakten

Tage	1	3	7	60	120	180	270	360
2006		-	+	+	+	-	+	-
2007	-	+	+	+	+		+	+
2008	+	+	+	+	+	+	+	

\* -: negativer Test; +: positiver Test.

## 6. *Nicotiana tabacum*

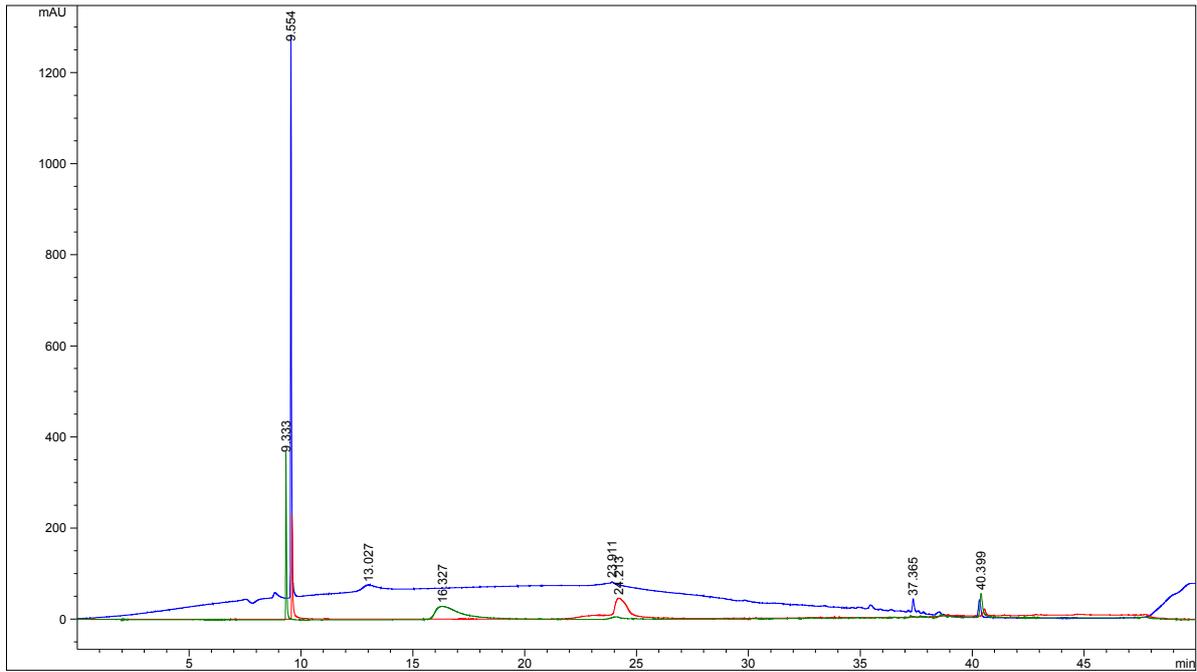
### 6.1. Methodenentwicklung<sup>221</sup>

#### 6.1.1. HPLC–DAD

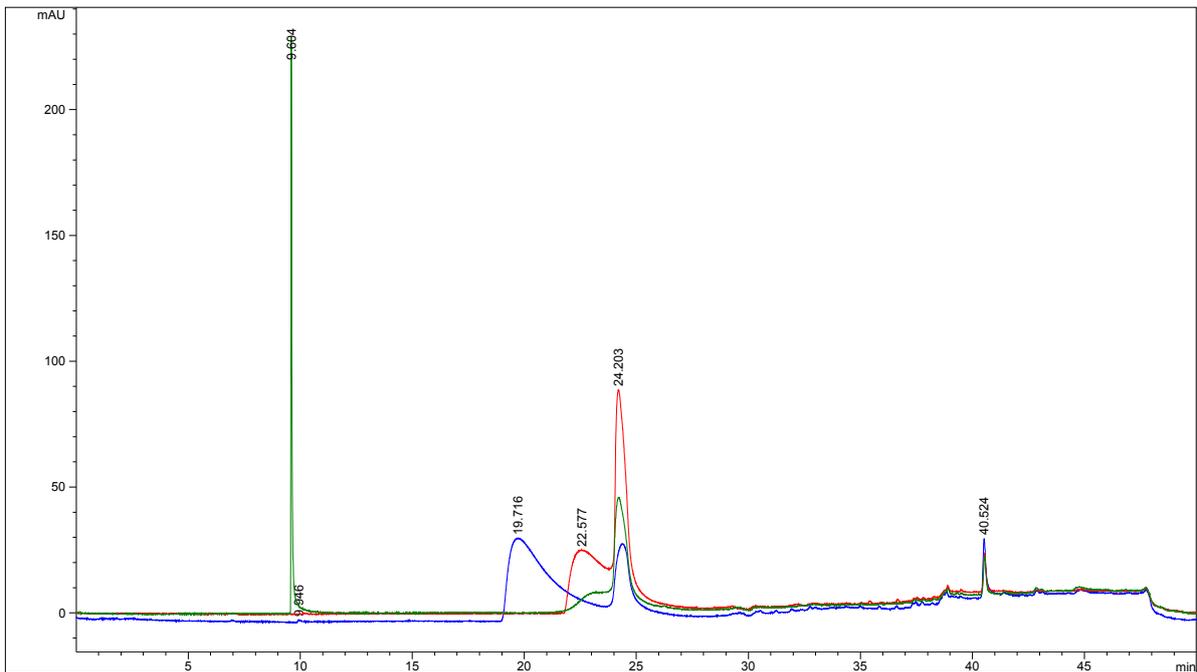
Die Entwicklung einer geeigneten HPLC–Methode (s. Tab. G-11) mit einer RP18–Säule (Zorbax) brachte nicht das erwünschte Ergebnis. Fließmittel B war MeOH, als Laufmittel A wurden verschiedene wässrige Säurelösungen getestet, die einen erheblichen Einfluß auf die Auflösung der Alkaloidpeaks hatten. Bei der Injektion von Nikotin als Referenzsubstanz waren zwei Peaks zu sehen: ein erster Peak bei 10 min und ein zweiter, sehr breit, zwischen 16 und 25 min. Als Beispiel sind drei Chromatogramme einer Nikotinlösung gezeigt, die mit drei verschiedenen wässrigen Laufmitteln, 0.1 % HCOOH (pH 2.72), 5 % HCOOH (pH 1.77) und 2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 1.27), getestet wurden (Abb. D-45). Die zwei Peaks zeigten das Nikotin-übliche UV-Spektrum mit einem Maximum bei 260 nm. Die Form dieser Nikotinpeaks konnte dabei unterschiedlich sein, wie in den Chromatogrammen in Abb. D-47 und Abb. D-46 zu erkennen ist. Da sich die Referenzsubstanz in zwei Peaks, darunter einen sehr breiten Signal, auftrennte, war die Detektion bei kleineren Konzentrationen schwierig und die Kalibrierung unmöglich.

---

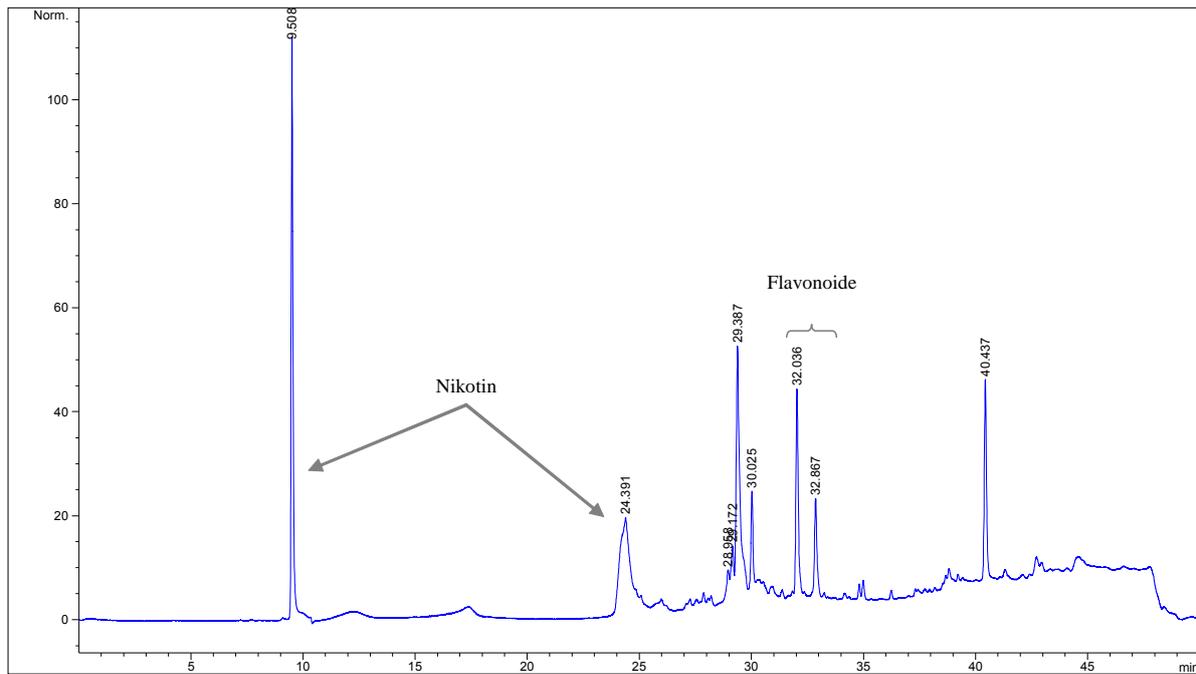
<sup>221</sup> z. T. in Millet et al. (2009)



**Abb. D-45** HPLC-Chromatogramme einer Nikotinlösung (0.5 mM in MeOH/0.1 % HCOOH, 1:1, v/v), injiziert mit verschiedenen wässrigen Laufmitteln. Rot: 0.1 % HCOOH (pH=2.72); grün: 5 % HCOOH (pH=1.77); blau: 2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=1.27).



**Abb. D-46** HPLC-Chromatogramme dreier Nikotinlösungen. Rot: 3.08 mM in HCOOH; blau: 1.85 mM in MeOH; grün: 0.5 mM in MeOH/0.1 % HCOOH 1:1. Wässriges Laufmittel: 0.1 % HCOOH.



**Abb. D-47** HPLC-Chromatogramm einer Probe des fermentierten Tabakextraktes aus 2006 (2006-T3, 50 µl/ml in MeOH; A = 0.1 % HCOOH).

### 6.1.2. GC-MS

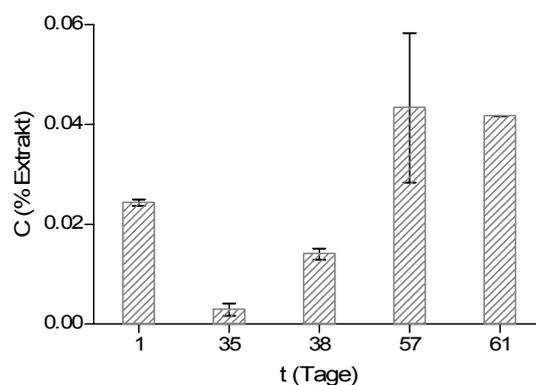
Da die HPLC-Methode nicht zum Ziel führte wurde eine GC-MS Methode zur Quantifizierung der Tabakalkaloide entwickelt. Hierbei wurde der Gradient I (s. G2.1.2.a) mit einer RTX-1 MS Säule und 2,6-di-*t*-Butyl-4-methylphenol (BHT) als internem Standard<sup>222</sup> verwendet. Es wurde im SIM-Modus gemessen und die Massen bei  $m/z$  133 für Nikotin und  $m/z$  220 für BHT (erzeugte Kalibrierdaten nicht gezeigt) verwendet. Diese GC-MS Methode erbrachte allerdings keine angemessene Präzision bei der Gehaltsbestimmung von Nikotin. Mehrmals wiederholte Analysen des fermentierten Extraktes 2006-T3 innerhalb von zwei Monaten ergaben sehr unterschiedliche Ergebnisse, mit einer relativen Standardabweichung von  $\leq 69\%$  bei der Wiederholpräzision (Abb. D-48). Daher konnte keine Gehaltsbestimmung mittels GC-MS durchgeführt werden.

Nach mehreren Injektionsserien von Nikotin Standardlösungen innerhalb mehrerer Monate konnten folgendes festgestellt werden. Erstens hatte der innere Standard BHT zu unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften im Vergleich zu Nikotin, um

<sup>222</sup> Zahlens & Nilsen (1994)

eine zufriedenstellende Gehaltskorrektur zu ermöglichen. Eine andere Option – die Verwendung von radioaktiv markiertem Nikotin<sup>223</sup> – wurde wegen der hohen Kosten dieser Referenzsubstanz nicht berücksichtigt. Zweitens schien Nikotin zum Teil auf der Säule adsorbiert zu werden, so dass der detektierte Nikotingehalt abhängig von der adsorbierten Nikotinmenge war (s. z. B. Abb. D-49). Offensichtlich wurde dieses Phänomen bereits häufig bei Alkaloiden beobachtet, wenn diese mit einer gewöhnlichen Kapillar-Kieselglassäule analysiert wurden.<sup>224</sup>

Die GC–MS Methode wurde aber weiterhin für die Spurenanalyse und die Peak Reinheitsbestimmung verwendet. Die folgenden vier Hauptalkaloide von Tabakblättern wurden in einem methanolischen Extrakt mittels GC-MS detektiert: Nikotin, Nornikotin, Anabasin und Anatabin (Abb. D-50). In den fermentierten Extrakten konnte Anabasin nicht detektiert werden (Abb. D-51).

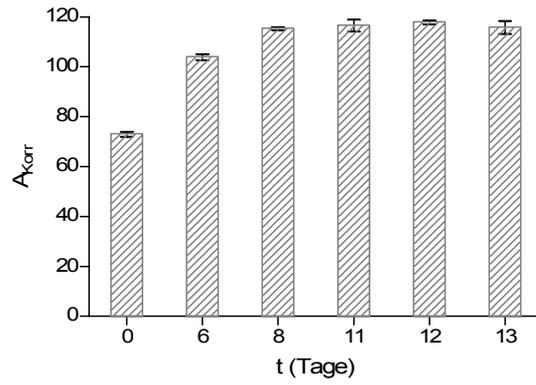


**Abb. D-48** Gehaltsbestimmung von Nikotin in einem fermentierten Extrakt (2006–73) über 2 Monate mittels GC–MS (n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)<sup>225</sup>

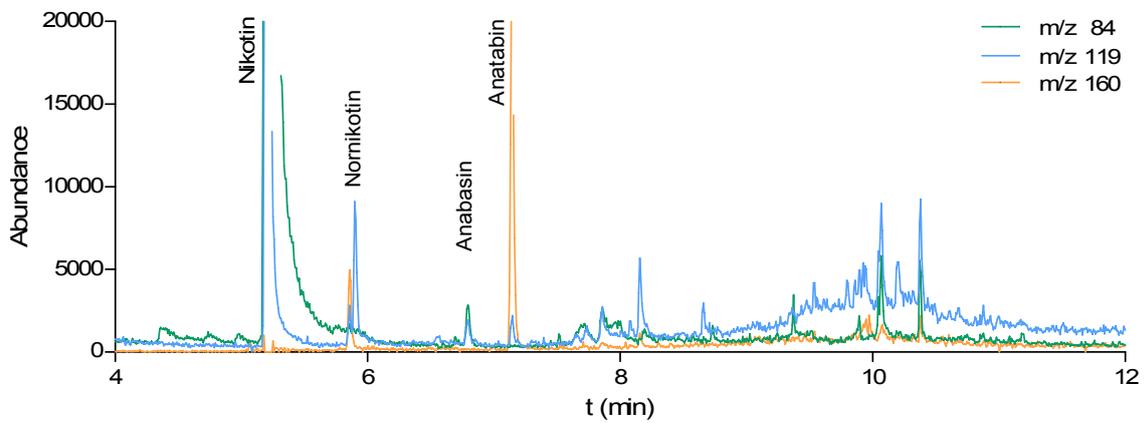
<sup>223</sup> Kim et al. (2005); Wu et al. (2002)

<sup>224</sup> Persönliche Mitteilung, Firma Agilent

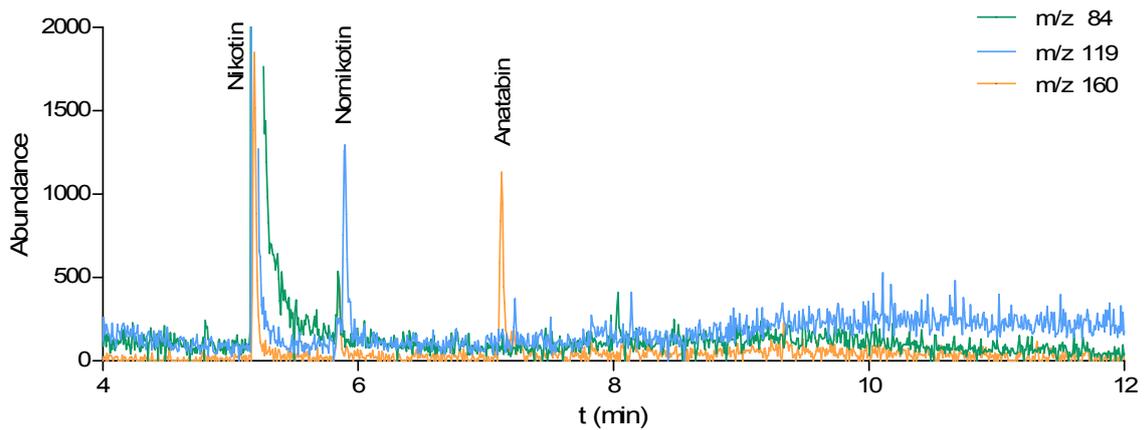
<sup>225</sup> aus Millet et al. (2009)



**Abb. D-49** Korrigierte Fläche mit Standardabweichung von Nikotin in Kalibrierlösungen (100 µg/ml) über zwei Wochen (GC-MS, n=2)



**Abb. D-50** GC-MS-Chromatogramm eines durch Kalt-Extraktion hergestellten MeOH-Extraktes aus frischen Tabakblättern (Ch. NT06)



**Abb. D-51** GC-MS-Chromatogramm einer Proben eines fermentierten Extraktes (2006-T1)

### 6.1.3. GC–FID

Aufgrund der zuvor beschriebenen Problematik wurde letztendlich eine neue GC–FID Methode entwickelt und validiert. Hierzu wurde eine amindesaktivierte Kieselglassäule<sup>226</sup> mit dem Gradient II<sup>227</sup> (s. Absatz G2.1.2.b) verwendet. Lediglich Nikotin konnte mit der GC–FID detektiert werden, weswegen nur Nikotin quantifiziert wurde. Da Anabasin mittels GC–MS in den von der Fa. Wala bereitgestellten Extrakten bereits nach 24 h nicht zu detektieren war (Vergleich Abb. D-50 und Abb. D-51), wurde es für die Quantifizierung von Nikotin als Innerer Standard benutzt. Diese Methode ergab spezifische und robuste Nikotingehalte.

## 6.2. Validierung der GC–FID-Methode<sup>228</sup>

### 6.2.1. Spezifität

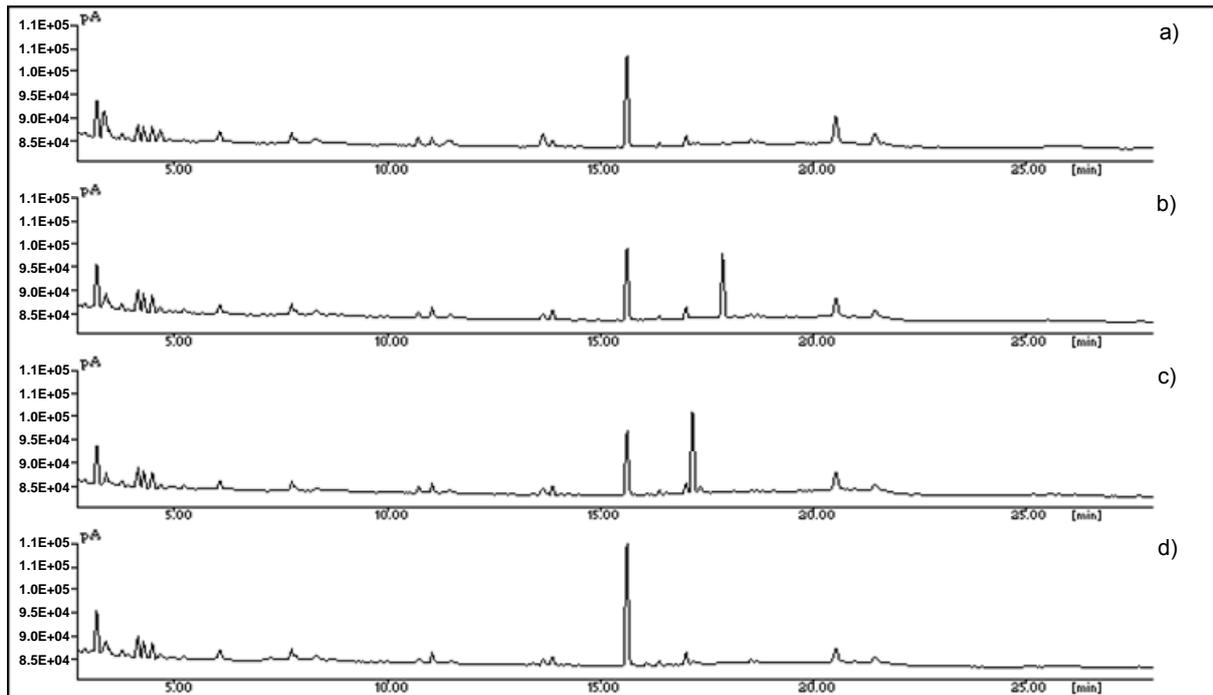
Die Spezifität der Methode wurde durch Aufstocken einer Probe fermentierten Extraktes mit Referenzsubstanzen (Nikotin, Anabasin und Nornikotin) geprüft (Abb. D-52). Die Reinheit des Nikotinpeaks wurde durch Vergleich des Massenspektrums mit dem der Referenzsubstanz mittels GC–MS Analysen geprüft.

---

<sup>226</sup> Persönliche Mitteilung, Firma Agilent

<sup>227</sup> Davis (1986)

<sup>228</sup> Millet et al. (2009)



**Abb. D-52** GC-FID Chromatogramme (Gradient II): a) einer Probe fermentierten Tabakextraktes (2006-T3, 25 µl/ml); b) 2006-T3 (20 µl/ml), aufgestockt mit 5 µg Anabasin; c) 2006-T3 (20 µl/ml), aufgestockt mit 5 µg Nornikotin; d) 2006-T3 (20 µl/ml), aufgestockt mit 5 µg Nikotin<sup>229</sup>

### 6.2.2. Linearität

Die Kalibriergerade für Nikotin wurde durch Referenzsubstanzinjektionen mit 8 verschiedenen Konzentrationen erzeugt (5–60 µg/ml, Abb. D-53, Tab. D-34). Es wurden methanolische Stammlösungen von 0.1 mg/ml von Nikotin und Anabasin vorbereitet. Die Anabasinkonzentration betrug 10 µg/ml in allen Kalibrierlösungen sowie in den Proben zur Quantifizierung. Für Nikotin wurde folgende Kalibrierfunktion berechnet:

$$C_N [\mu\text{g/ml}] = \frac{A_{\text{Korr}} - 0.4313}{4.842}, R^2=0.9992$$

$$A_{\text{Korr}} = \frac{A_{\text{Nikotin}}}{A_{\text{Anabasin}}} \times C_{\text{Anabasin}} \quad (\text{mit } C_{\text{Anabasin}} \text{ in } \mu\text{M})$$

Der Korrelationsfaktor  $R^2$  war hoch genug (0.9992) und die Residuen waren zufällig gestreut, das lineare Modell für die Kalibrierung war also befriedigend.

<sup>229</sup> aus Millet et al. (2009)

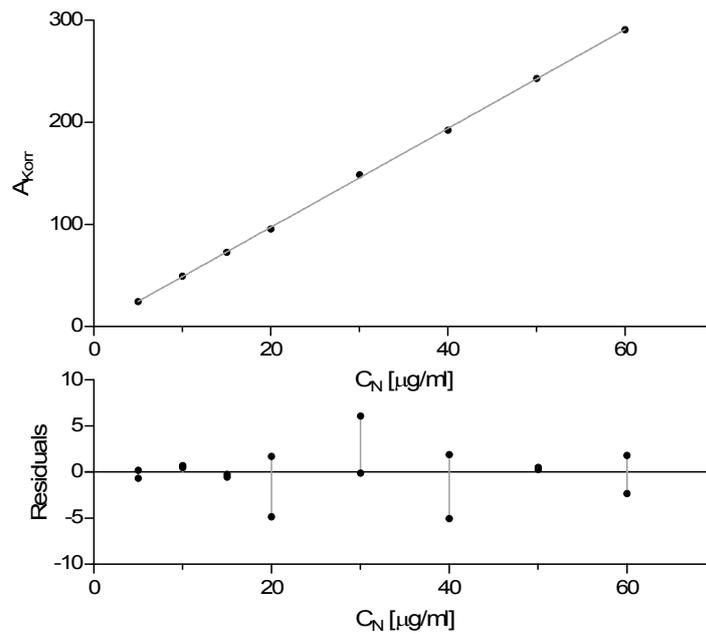


Abb. D-53 Regressionsgerade und Residuenplot für Nikotin

Tab. D-34 Statistische Daten zur Kalibrierung

Anstieg $\pm$ Standardfehler	4.842 $\pm$ 0.037
Anstieg: Konfidenzintervall (95 %)	4.763 – 4.920
Abschnitt $\pm$ Standardfehler	0.4 $\pm$ 1.3
Abschnitt: Konfidenzintervall (95 %)	-2.261 – 3.123
Korrelationskoeffizient $R^2$	0.9992
Kalibrierbereich ( $C_N$ in $\mu\text{g/ml}$ )	5 – 60
Anzahl an Standards	8
Anzahl an Ausführungen	2

### 6.2.3. Bestimmungsgrenze (LLOQ, lower limit of quantification)

Für Nikotin lag die Bestimmungsgrenze bei 5  $\mu\text{g/ml}$  (30.82  $\mu\text{M}$ ), die kleinste gewählte Konzentration der Kalibrierung. Das Signal-Rausch-Verhältnis lag bei 60:1 (ICH Forderung >10:1), die relative Standardabweichung bei der Präzision war <7 % und die maximale Wiederfindungsrate bei 117.8 % (FDA Forderung  $\pm 120$  %). Die Präzisions- und Richtigkeitsdaten nach dreifacher Bestimmung sind in Tab. D-35 zusammengefasst.

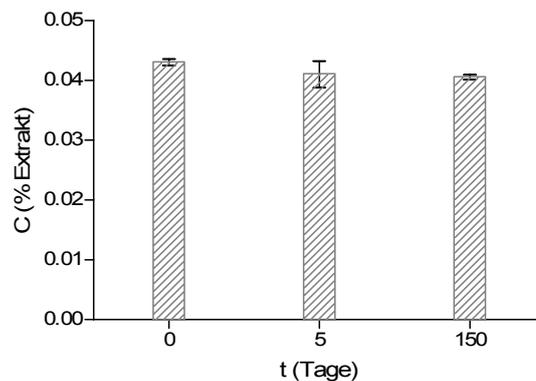
#### 6.2.4. Präzision

##### a) Systempräzision

Um die Stabilität des Systems (GC–FID und Säule) zu prüfen, wurde eine Nikotinprobe (30 µg/ml Nikotin + 10 µg/ml Anabasin) sechsmal am gleichen Tag injiziert. Die relative Standardabweichung lag bei 3 % und die Wiederfindungsrate bei  $<100\pm 4$  %. Das System war folglich präzise genug, um damit eine Validierung durchzuführen. Zusätzlich wurde eine Stabilitätsstudie über einen langen Zeitraum durchgeführt, wobei die ermittelten Konzentrationen einer Probe fermentierten Extraktes (2006–T3) mit 5 Tagen und 5 Monaten Abstand (Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) verglichen wurden. Die Ergebnisse zeigten eine geringe Abweichung (3.8 % RSD) über den Untersuchungszeitraum von 5 Monate (Abb. D-54).

##### b) Intermediär- und Wiederholpräzision

In Tab. D-35 ist eine Zusammenfassung der Präzisionsdaten gezeigt. Die Abweichung bei der intermediären Präzision war für die 30 und 60 µg/ml Nikotinlösungen sowie für den Tabakblätterrauszug sehr gering (0.70-1.89 %). Bei der 5 µg/ml Nikotinlösung war die Abweichung zwar viel höher (6.67 % bei der Präzision), entsprach aber dennoch den Anforderungen.



**Abb. D-54** Langzeit-Stabilitätsprüfung: Gehaltsbestimmung in einer Probe fermentierten Extraktes (2006–T3) über 5 Monate (GC–FID,  $n=2$ , Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)<sup>230</sup>

<sup>230</sup> aus Millet et al. (2009)

**Tab. D-35** Validierungsdaten von Präzision und Richtigkeit für Nikotin

Nikotin Konz. (µg/ml)	mittlere Konz. (exp. bestimmt) (µg/ml)	Wiederholpräzision RSD (%)	Intermediäre Präzision RSD (%)	Wiederfindung (%)
5	5.6	0.55 - 4.01	6.67	103.71 - 117.81
30	29.7	0.96 - 4.20	1.35	98.17 - 100.53
60	60.9	0.27 - 1.02	1.89	99.88 - 103.56
Ferm. Extrakt	7.1	1.11 - 1.97	0.70	—

## c) Wiederholpräzision beim Pipettieren aus einer gleichen Stammlösung

Das mehrfache Pipettieren aus einer gleichen Stammlösung ergab eine Abweichung von 1.78 % bei der Wiederholpräzision und 4.58 % bei der Richtigkeit. Das Pipettieren führte also nicht zu konsequenten Fehlern.

## d) Wiederholpräzision bei der ganzen Probenaufarbeitung

Die mehrfache Aufarbeitung einer Kalibrierlösung (Herstellen der Stammlösung und Verdünnung zur Kalibrierlösung) ergab größere Abweichungen: 7.39 % bei der Wiederholpräzision und 8.79 % bei der Richtigkeit.

**6.2.5. Genauigkeit**

Die Genauigkeit wurde zuerst aus den Wiederholpräzisionsdaten ermittelt. Dafür wurde die Wiederfindung berechnet (Tab. D-35). Für die kleinste Konzentration (LLOQ, s. D6.2.3) lag die Wiederfindung bei 117.8 %, bei den höheren Konzentration war sie im Bereich von 100±5 %. Außerdem wurden Wiederfindungsexperimente durch Aufstocken einer Probe fermentierten Extraktes – 20 µl/ml Extakt, d. h. theoretisch 7.10 µg/ml Nikotin – mit drei Konzentrationen an Standard durchgeführt. Die Ergebnisse, in Tab. D-36 gegeben, lagen alle im Bereich 100±5 %.

**Tab. D-36** Präzision und Genauigkeit durch Aufstocken einer Probe fermentierten Extraktes mit verschiedenen Konzentrationen an Standard

Konz. aufgestockt (µg/ml)	Mittlere Konz. (exp. bestimmt) (µg/ml)	Wiederholpräzision (n=3) RSD (%)	Wiederfindung (%)
5	11.8	0.15	96.97
30	36.0	2.47	96.77
60	63.7	0.09	94.84

### 6.2.6. Robustheit

Die Stabilität einer Referenzlösung nach mehrmaligen Einfrieren und Auftauen wurde überprüft. Obwohl die Präzision immer hoch blieb (RSD <4 %), sank die Wiederfindungsrate unter 90 % nach drei Tagen (Tab. D-37).

**Tab. D-37** Robustheit: Stabilität einer Referenzlösung (30 µg/ml Nikotin) durch Einfrieren und Auftauen

Tag	Nikotin Konz. (µg/ml)	Wiederholpräzision RSD (%)	Intermediäre Präzision RSD (%)	Wiederfindung (%)
1	28.8	0.24		96.02
2	27.7	2.09	3.59	92.25
3	26.8	0.43		89.40

## 6.3. Phytochemische Analysen

### 6.3.1. Erschöpfende Extraktion

#### a) pH-Messungen

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Nikotinoxtraktion zu untersuchen, wurden pH-Messungen bei einer Extraktserie durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen (im Extraktionsmittel bzw. nach dem Einrotieren in Methanol aufgenommen) sind in der nächsten Tabelle zusammengefasst (Tab. D-38).

Bei den pH-Werten vor dem Einrotieren waren die Schwankungen ziemlich groß, da das Extraktionsmittel mitgemessen wurde, das nachher komplett abrotiert wurde. Der pH-Wert nach dem Einrotieren lag für die meisten Extrakte im Bereich pH 4-5. Lediglich die Extrakte mit Ammoniak sowie die wässrigen Kaltextrakte (KE) hatten einen pH-Wert über 5. Interessant ist, dass alle Extrakte ohne Zusatz von Säure oder Base vor dem Einrotieren einen höheren pH-Wert aufwiesen.

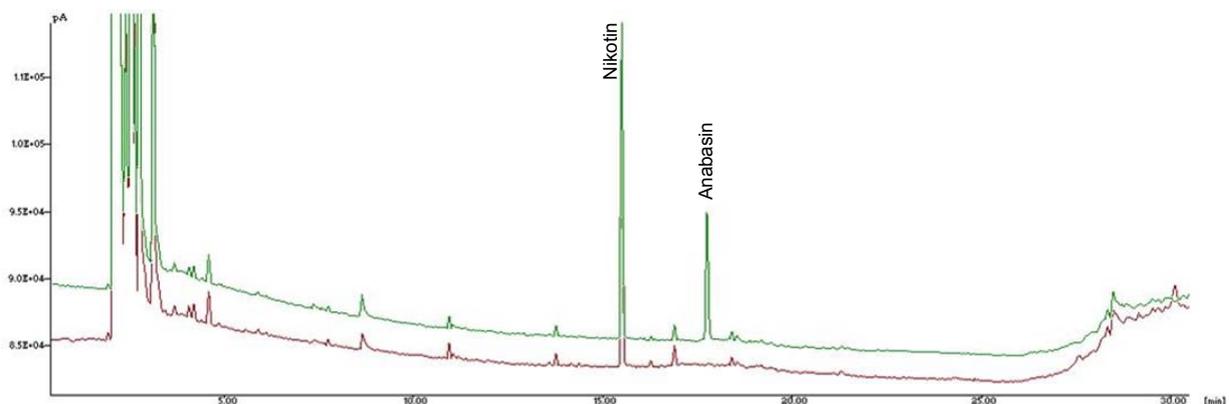
**Tab. D-38** pH-Werte der Extrakte, jeweils vor/nach dem Einrotieren (vor: in ca. 100 ml Extraktionsmittel; nach: mit 2 g frischen Blättern/1.5 ml Methanol)

% MeOH	KE	KE+Ac	KE+US	KE+NH <sub>3</sub>	HE	HE+Ac
0	5,52/4,75	- /6,26	- /4,40			
40	6,04/4,53	4,20/5,07	- /4,44		5,75/4,38	4,15/5,09
60	6,10/4,43	4,53/4,82	- /4,54	10,09/6,82	5,87/4,36	4,46/4,83
80	5,87/4,41	4,72/4,82	6,10/4,52	10,12/6,70	- /4,46	4,72/5,09
100	5,63/4,82	- /4,76	5,59/4,50	9,97/5,63		

KE: Kaltextrakt; Ac: Essigsäure; HE: Heißextrakt; US: Ultraschallbad

### b) Prüfung auf Abwesenheit von Anabasin

Da Anabasin theoretisch in den Tabakblätterextrakten vorhanden sein sollte, wurde bei allen Extrakten verifiziert, dass dieses Alkaloid nicht zu detektieren war. Dafür wurde für jeden Extrakt eine Kontrollprobe hergestellt mit der gleichen Konzentration an Extrakt wie in der Quantifizierungsprobe, aber ohne internen Standard. Die Chromatogramme wurden verglichen. Anabasin konnte in keinem Extrakt detektiert werden (Abb. D-55).



**Abb. D-55** Übereinandergelagerte GC-FID Chromatogramme eines Kaltextraktes (40 % MeOH + 0.5 % CH<sub>3</sub>COOH). Grün: mit 10 µg/ml Anabasin; Rot: ohne Anabasin.

### c) Gehaltsbestimmung von Nikotin in den Extrakten

Alle Extraktionen, außer der Kaltextrakt mit Ammoniak, wurden in Doppelbestimmung, jeweils mit verschiedenen Blättern der gleichen Charge vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abb. D-56 zusammengefasst.

Die beste Extraktion war die Kaltextraktion mit 40 % Methanol und Zusatz von 0.5 % Essigsäure, d. h. mit Nikotin vor allem im protonierten Zustand. In diesem Fall wurde ein Gehalt von 0.087 % in der Endlösung (entsprechend 0.065 % in den frischen Blättern)

bestimmt. Dieses Ergebnis stimmte mit dem von Keinänen et al.<sup>231</sup> überein, die auch mittels flüssigen Stickstoff tiefgefrorene frische Blätter am effizientesten mit 40 % Methanol und 0.5 % Essigsäure bei Raumtemperatur extrahierten. Diese Bedingungen wurden somit als erschöpfend angesehen.

Reines Wasser war hier mit einer Endkonzentration unter 0.03 % das schlechteste Extraktionsmittel, aufgrund der sehr guten Wasserlöslichkeit von Nikotin war dies ein erstaunliches Ergebnis. Wahrscheinlich war das Zerkleinerungsvorgang im Mörser nicht ausreichend, um das Blattgewebe zu zerstören und die Freisetzung von Nikotin zu verbessern. Die anderen Bedingungen ergaben alle eine Nikotinkonzentration von ca. 0.07 % in der Endlösung (d. h. 0.053 % in den frischen Blättern).

Der Zusatz von Ammoniak sollte sowohl die Alkaloide und ihre freien Basen freisetzen als auch das Pflanzengewebe anschwellen lassen.<sup>232</sup> Dabei berichteten Yang et al.<sup>232</sup> über eine 90-95 % Wiederfindungsrate für Nikotin, während in der vorliegenden Arbeit eine maximale Wiederfindungsrate von 78 % ermittelt werden konnte.

Die Extraktion im Ultraschallbad<sup>233</sup> ergab sehr ähnliche Ergebnisse wie die einfache Kaltextraktion. Der einzige größere Unterschied lag in der grünen Farbe der Auszüge (und damit des Chlorophyllgehalts), hier schon ab 0 % Methanol, im Gegensatz zu den anderen Extrakten, die erst ab 60 % Methanol grün waren.

---

<sup>231</sup> Keinänen et al. (2001)

<sup>232</sup> Yang et al. (2002)

<sup>233</sup> Armstrong et al. (1999)

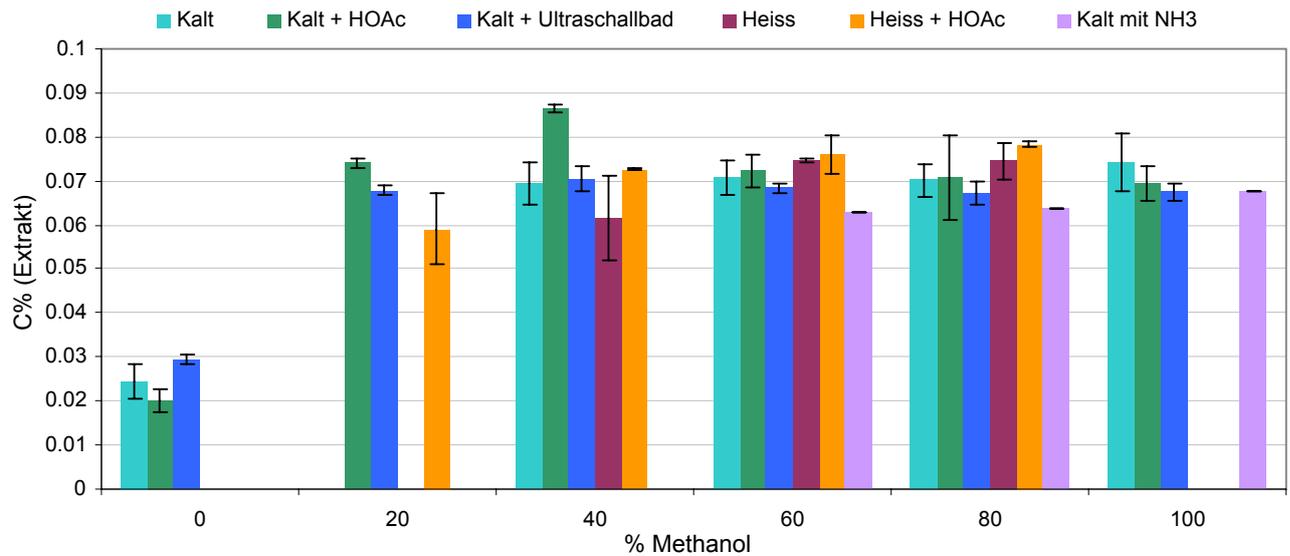


Abb. D-56 Gehaltsbestimmung von Nikotin in Auszügen zur erschöpfenden Extraktion

### 6.3.2. Gehaltsbestimmung von Nikotin in fermentierten Extrakten<sup>234</sup>

Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen für die fermentierten Extrakte 2006–2008 sind in Tab. D-39 zusammengefasst und in Abb. D-57 dargestellt. Die drei Chargen zeigten ein ähnliches Verhalten. Nikotin wurde vor allem während der ersten Woche abgebaut, so dass nach 7 Tagen noch 80 % der Anfangskonzentration verblieb. Während der Lagerung (bei 15°C) waren die Extrakte stabil. Die gemessenen pH-Werte (Tab. D-40) waren gleich für die zwei aufgeführten Chargen (2006 und 2007, Werte um pH 4).

Tab. D-39 Gehaltsbestimmung aller Proben der fermentierten Extrakte von 2006–2008

Probe	Zeit (Tage)	2006		2007		2008	
		C (mg/ml)	RSD(%)	C (mg/ml)	RSD(%)	C (mg/ml)	RSD(%)
24h	1	0.435	7.663	0.292	7.602	0.292	0.882
T3	3.5	0.417	3.185	0.231	3.133	0.231	0.882
T7	7	0.353	4.721	0.237	5.204	0.237	0.882
Mo2	60	0.363	4.418	0.224	6.917	0.224	0.882
Mo4	120	0.384	8.168	0.232	6.662		
Mo6	180	0.380	1.296	0.251	1.759		
Mo9	270			0.245	0.215		
Mo12	360	0.336	7.786	0.234	4.532		

<sup>234</sup> z. T. in Millet et al. (2009)

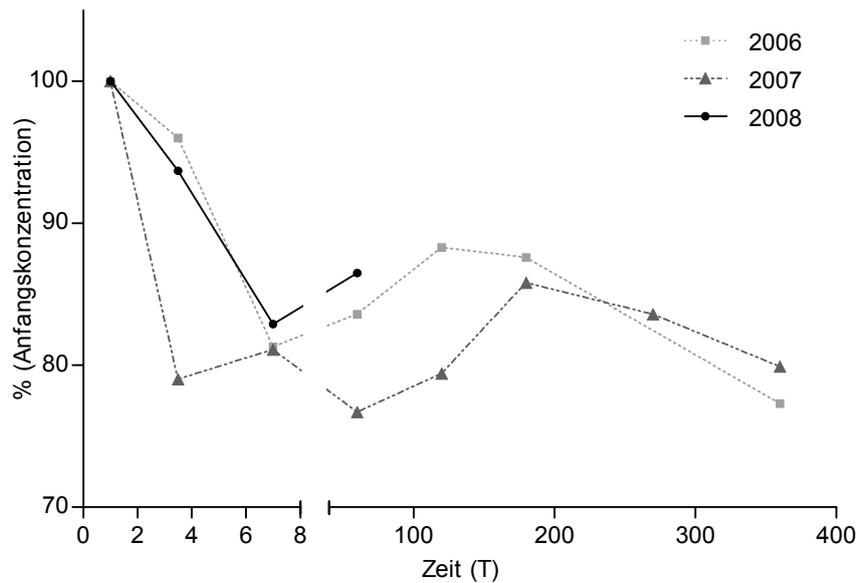


Abb. D-57 Vergleich der fermentierten Extrakte 2006–2008

Tab. D-40 Vergleich der pH-Werte von Proben aus zwei fermentierten Tabakblätterextrakten (2006 und 2007)

Jahr	T1	T3	T7	M12
2006	4.0	3.7	3.7	3.7
2007	3.8	3.8	3.7	4.0

### 6.3.3. Umsetzung von Nikotin in den fermentierten Extrakten<sup>235</sup>

Der beobachtete Abbau von Nikotin während der Herstellung der fermentierten Extrakte regte die Suche nach Umsetzungsprodukten in den vorhandenen Proben an (Abb. D-58). Die gefundenen Abbauprodukte sind in Abb. D-59 dargestellt.

Nornikotin, nicht detektiert nach 24 h Fermentierung, erschien in den Proben nach 3.5 Tagen und nahm über die 12 Monate der Studie zu. Dies stimmte mit einer früheren Beobachtung überein, dass Nornikotin aus Nikotin durch Fermentierungsprozesse produziert werden kann<sup>236</sup> und dieser Metabolit nicht lediglich in der Pflanze genuin biosynthetisiert wird.

Zusätzlich erschien nach 3.5 Tagen ein neuer Peak im Chromatogramm, der über 12 Monate weiter zunahm (RT = 8.1 min, Abb. D-58). Aufgrund spezifischer Fragmente bei  $m/z$  85, 56, 42 und 28 sowie Literaturdaten<sup>237</sup> wurde dieser Peak als 2-Pyrrolidinon identifiziert. Dies

<sup>235</sup> Millet et al. (2009)

<sup>236</sup> Bartholomeusz et al. (2005)

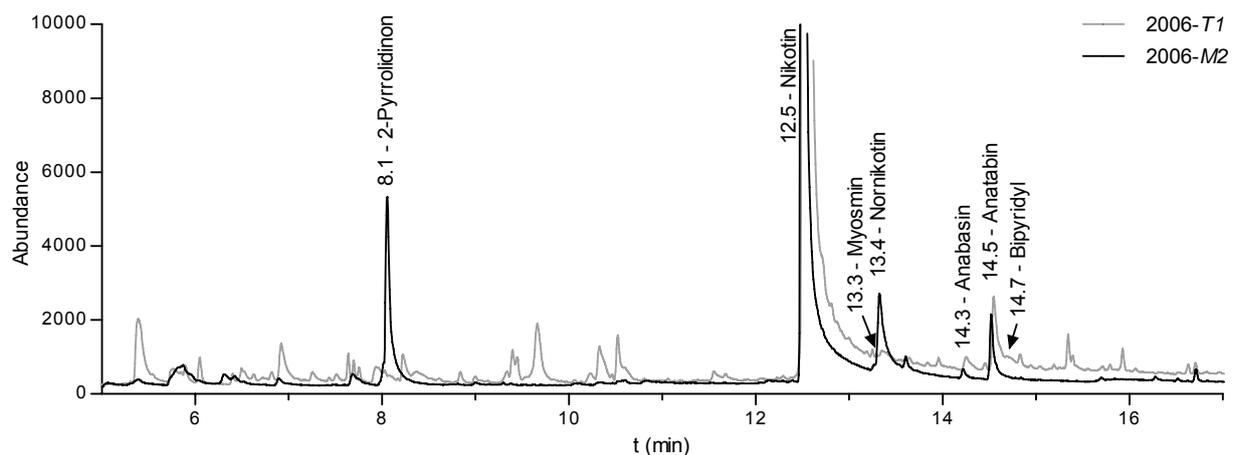
<sup>237</sup> Crotti et al. (2004); Pathak et al. (1990)

wurde anschließend durch Vergleich mit der entsprechenden Referenzsubstanz mittels GC–MS bestätigt.

Außerdem wurden Spuren von Myosmin in allen Extrakten zwischen 24 h und 2 Monaten detektiert, wobei der Peak sich ständig verkleinerte.

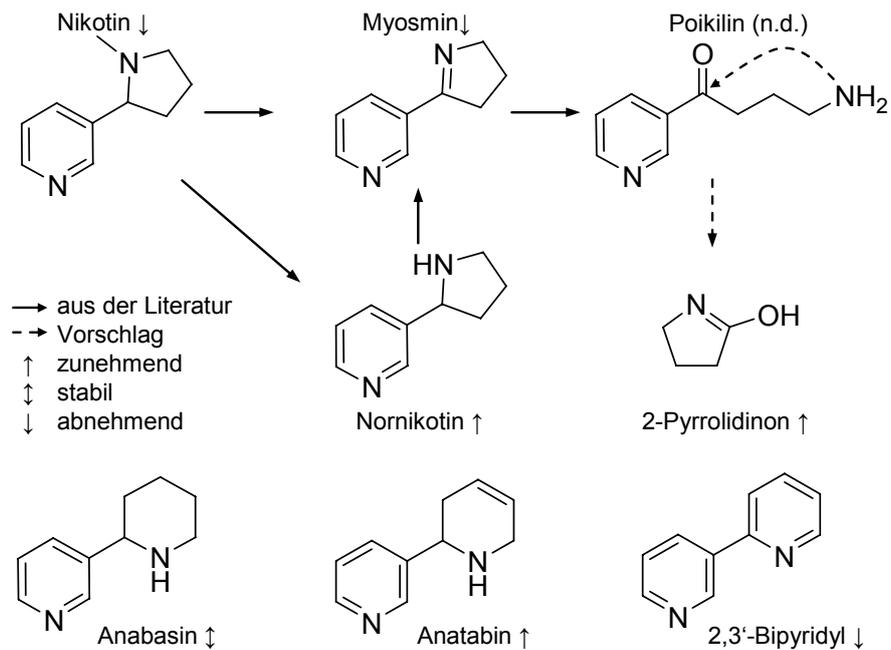
2,3'-Bipyridyl konnte während der zwei ersten Monate mit einer spezifischen Masse  $m/z$  156 detektiert werden. Nach diesem Zeitraum nahm die Fläche des Peaks ab. Der Peak von Anatabin zeigte einen leichten Anstieg, während der von Anabasin zwar sehr klein aber stabil blieb.

Andere bekannte Metabolite von Nikotin wie Nikotinsäure, Cotinin, Nikotinoxide, Nitrosamin, N-Formylornikotin und Derivate<sup>238</sup> wurden in den Proben fermentierter Extrakte nicht detektiert.



**Abb. D-58** GC–MS–Chromatogramm (SIM–Modus:  $m/z$  84, 119 und 160) der Proben 2006–T1 und –M2

<sup>238</sup> Bartholomeusz et al. (2005); Smyth et al. (2007); Wada et al. (1959); Wahlberg et al. (1977); Zhou et al. (2007)



**Abb. D-59** Mögliche strukturelle Modifikationen von Nikotin in einem fermentierten Extrakt (n.d.: nicht detektiert)

### 6.4. Mikrobiologische Untersuchungen der fermentierten Extrakte

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung auf MRS-Agar sind in Tab. D-41 zusammengefasst. Es waren in allen Proben Milchsäurebakterien zu finden. Da dieser fermentierte Extrakt mit Laktose und Honig hergestellt wurde (s. Absatz Tab. G-2), stammen diese Bakterien aus dem Pflanzenmaterial.

**Tab. D-41** Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Tabakextrakten

	Tage	1	3	7	60	120	180	270	360
2006		+		+	+	+	+		+
2007		+	+	+	+	+	+	+	+
2008		+	+	+	+		+	+	

\* -: negativer Test; +: positiver Test.



## E Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden phytochemische und biologische Untersuchungen von fermentierten Extrakten aus frischen Pflanzen durchgeführt und dabei folgende Ergebnisse erhalten:

1. Es wurden chromatographische Methoden entwickelt, die eine Trennung der für den jeweiligen Pflanzenextrakt maßgeblichen Inhaltsstoffe ermöglichen und dabei einen spezifischen Fingerprint der fermentierten Extrakte ergeben. Die verschiedenen Methoden und deren Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

**Tab. E-1** Entwickelte chromatographische Trennmethoden

Pflanze (Pflanzenteil)	Zu analysierende Verbindungsklassen	Methode
<i>Allium cepa</i> (Knolle)	Flavonoide und polare Substanzen, wie Aminosäuren	RP-HPLC
<i>Betula pendula</i> (Blätter)	Flavonoide (bes. <b>Flavonole</b> ) sowie andere phenolische Verbindungen	<b>RP-HPLC</b>
<i>Gentiana lutea</i> (Wurzel)	<b>Iridoide</b> und <b>Xanthonderivate</b>	<b>RP-HPLC</b>
<i>Hypericum perforatum</i> (oberirdische Teile)	Flavonoide, Phloroglucinole und Naphthodianthrone	RP-HPLC
<i>Nicotiana tabacum</i> (Blätter)	Hauptalkaloide (bes. <b>Nikotin</b> )	GC-MS / <b>GC-FID</b>

Die organischen Schwefelderivate aus der Zwiebel konnten mit den verwendeten Methoden nicht detektiert werden. Daher wurde deren Gehalt indirekt als Pyruvat am Beispiel von drei Extrakten ermittelt.

2. Drei dieser Trennmethoden wurden zur Quantifizierung der Hauptinhaltsstoffe validiert. Diese sind in der oberen Tabelle fett gekennzeichnet.
3. Für die Birkenblätter, Enzianwurzeln und Tabakblätter wurden die optimalen Bedingungen für eine erschöpfende Extraktion des Pflanzenmaterials erarbeitet.

4. Für jede Pflanze wurde die chemische Stabilität der fermentierten Extrakte durch Vergleich der Chromatogramme, und wenn möglich, durch Gehaltsbestimmung und zeitliche Verfolgung der Konzentration an Hauptinhaltsstoffen ermittelt. Allgemein wurde beobachtet, dass bei instabilen Inhaltsstoffen der Abbau vor allem während der ersten Woche (Extraktionswoche) stattfand und dass die Urtinkturen am Ende der Lagerung chemisch stabil waren. Im Einzelnen wurde folgendes beobachtet:
- Die Sesquiterpenlactone (bestehend aus Helenalin- und Dihydrohelenalinderivaten) waren in den fermentierten Extrakten aus frischen Arnikapflanzen stabil. Die extrahierte Menge an SLs betrug ca. 0.001% bezogen auf das Frischgewicht.
  - Die Flavonoide erwiesen sich in den fermentierten wässrigen Extrakten aus Zwiebeln, Birkenblättern sowie Johanniskraut als sehr instabil. Der Flavonolabbau wurde quantitativ für die Birkenblätterextrakte bestimmt und betrug 90–100%.
  - Die verschiedenen Inhaltsstoffe in den fermentierten Extrakten aus frischen Enzianwurzeln zeigten ein unterschiedliches Verhalten. In zwei Extraktchargen (2006 und 2008) war das Iridoid Loganinsäure sehr stabil, mit einem Verlust von 0–10% nach 12 Monaten. Für 2007 wurde dagegen ein Abbau von 90% innerhalb der gleichen Zeit ermittelt. Die Secoiridoide Gentiopikrosid und Swertiamarin zeigten ein ähnliches Verhalten, mit einer Abbaurrate von 50% über 12 Monate, wobei der Swertiamaringehalt in der Extraktionswoche zunächst anstieg. Interessanterweise enthielt die Charge von 2007 kein Gentiopikrosid. Der stärkste Bitterstoff Amarogentin war mit einem maximalen Verlust von 15–30% über 12 Monate wesentlich stabiler. Die Xanthonderivate Gentisin und Isogentisin wurden gleichmäßig während der 12 Monate mit einem maximalen Umsatz von 53–69% abgebaut.
  - Die Phloroglucinole und Naphthodianthrone konnten in den fermentierten Extrakten aus frischen Johanniskrautpflanzen nicht detektiert werden. Sie wurden unter den Herstellbedingungen nach HAB nicht extrahiert und deswegen nicht weiter untersucht.

- Nikotin war in den fermentierten Extrakten aus frischen Tabakblättern mäßig stabil, vor allem während der Extraktionswoche. Der maximale Abbau betrug ca. 20% nach 12 Monaten.
5. Die aus den ursprünglichen, für die jeweiligen Pflanzen spezifischen Inhaltsstoffen entstandenen Folgeprodukte wurden mittels HPLC–DAD, LC–MS und GC–MS analysiert und soweit möglich charakterisiert bzw. identifiziert. Es konnten folgende Abbauwege beobachtet werden:
- In den fermentierten Zwiebelextrakten wurden zahlreiche Folgeprodukte detektiert, die leider nicht zugeordnet werden konnten. Die Extrakte zeichneten sich durch starke Umwandlungsraten der chemischen Verbindungen aus.
  - Bei den Birkenblätterextrakten wurden die Quercetinglykoside zuerst zu Quercetin deglykosyliert. Der Gehalt an Quercetin stieg dadurch in den 2 ersten Monaten der Herstellung bis über das 5-fache der Anfangskonzentration, um anschließend wieder abzusinken. Das Hauptphenolderivat 3,4'-Dihydroxypropiofenon 3- $\beta$ -glucosid wurde zu 3,4'-Dihydroxypropiofenon deglykosyliert, dem quantitativ wichtigsten Abbauprodukt. Zusätzlich wurde Chlorogensäure und *p*-Cumaroylchinasäure zur entsprechenden Kaffee- bzw. *p*-Cumarsäure hydrolysiert. Weiterhin konnten Spuren von weiteren Umsatzprodukten wie *p*-Hydroxyphenylpropionsäure, *p*-Hydroxyacetophenon und Catechol nachgewiesen werden, für die sowohl Quercetin als auch Kaffeesäure als Ausgangsverbindung in Frage kommen.
  - Bei den Enzianwurzelextrakten konnten zwei Abbauprodukte in sehr geringen Mengen isoliert werden, Erythrocentaurin und das Strukturähnliche Molekül E2. Beide sind vermutlich aus Gentiopikrosid oder Swertiamarin entstanden.
  - In den Tabakblätterextrakten waren die wesentlichen aus Nikotin gebildeten Produkte das 2-Pyrrolidinon und das Nornikotin.
  - Die Quercetinglykoside in den Zwiebel- und Johanniskrautextrakten waren sehr labil, wobei Quercetin nicht nur als Folgeprodukt, sondern von Anfang an in den Proben detektiert wurde. Eine absolute Zunahme des Peaks konnte

nicht beobachtet werden. Trotzdem war Quercetin das Flavonol, das bis zuletzt nachgewiesen wurde.

6. Änderungen des Herstellungsprozesses nach HAB hatten verschiedene Auswirkungen:
  - Die selbsthergestellten Ansätze ohne Temperaturwechsel aus Birkenblättern sowie aus Enzianwurzeln verschimmelten nach zwei Wochen, im Gegensatz zu den ebenfalls selbsthergestellten Ansätzen mit Temperaturwechsel.
  - Der Zusatz von Molke beschleunigte den Flavonolabbau in den Birkenblätterextrakten.
  - Der Zusatz von Laktose und Honig ergab dagegen keinen detektierbaren Effekt.
7. Als Modellversuche zur Verfolgung der Stoffumwandlungen in den fermentierten Urtinkturen wurden reine Referenzsubstanzen, Hyperosid für die Quercetinglykoside und Gentiopikrosid für die Secoiridoide, den Herstellbedingungen des HAB unterworfen. Die Substanzen waren dabei zwar instabil und wurden abgebaut, allerdings konnte kein Abbauprodukt von Hyperosid detektiert werden und die gebildeten Abbauprodukte aus Gentiopikrosid waren in zu geringen Mengen vorhanden, um charakterisiert werden zu können.
8. Die chemischen und mikrobiologischen Eigenschaften der Ansätze wurden verglichen.
  - Es wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den pH-Werten der verschiedenen Extraktchargen beobachtet. Insgesamt lagen die Werte zwischen pH 3.5 und 5.
  - Die Zwiebel- und Birkenblätterextrakte, mit Molke hergestellt, enthielten alle Milchsäurebakterien, dennoch nicht unbedingt über den ganzen Herstellungsprozess: Für beide Pflanzen waren in der Charge aus 2008 lediglich während der Extraktion Keime zu beobachten. Bei den weiteren Pflanzen, deren Extrakte mit Laktose und Honig, anstatt von Molke,

hergestellt wurden, waren die mikrobiologischen Daten unterschiedlich: In den Enzianwurzelextrakten konnten keine Milchsäurebakterien nachgewiesen werden, Arnikaextrakte enthielten Milchsäurebakterien vorwiegend während der ersten Woche und die Tabakblätter- und Johanniskrautextrakte während des gesamten Herstellungsprozesses.

9. Die biologische Wirksamkeit der fermentierten Urtinkturen aus Zwiebeln und Arnika wurde untersucht und mit verschiedenen Extrakten verglichen.

- Ein fermentierter, ein wässriger und ein methanolischer Zwiebelextrakt, jeweils aus derselben Zwiebelcharge hergestellt, wurden in Hinblick auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften mittels Agardiffusionstests und einer Bakterienwachstumskinetik untersucht. Dabei zeigte der wässrige Extrakt keine, der methanolische Extrakt eine schwache und der fermentierte Extrakt eine stärkere Aktivität, vor allem gegenüber gramnegativen Bakterien.
- Um die entzündungshemmenden Eigenschaften der Arnikaextrakte zu untersuchen, wurden sie auf deren Hemmpotential der DNA–NF- $\kappa$ B-Bindung mittels EMSA getestet. Die verschiedenen Extrakte zeigten eine SL–konzentrationsabhängige Wirkung. Die fermentierten Extrakte wiesen die kleinste SL-Konzentration und dabei auch die schwächste Wirkung auf.



## F Diskussion

### 1. Allgemein

Diese Arbeit liefert einen Beitrag zur Qualitätssicherung von Pflanzenextrakten. Sie erweitert das Wissen über die Stabilität wichtiger Leitsubstanzen sowie deren mögliche Abbauprodukte im wässrigen Milieu unter fermentativen Bedingungen. Die Kenntnis über Umbauprozesse ist wichtig, um die Qualität solcher Extrakte beurteilen zu können. Weiterhin können die fünf entwickelten chromatographischen Methoden und vor allem die drei davon validierten Methoden zur Trennung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe zur Qualitätsprüfung eingesetzt werden.

Der bei der Herstellung der fermentierten Extrakte nach dem HAB vorgesehene Temperaturwechsel der untersuchten Extrakte zeigte einen positiven Effekt auf die Mikroflora der Ansätze, da lediglich in den nicht rhythmisierten Ansätzen eine Schimmelbildung beobachtet wurde. Dies stimmt mit Hauschkas Erkenntnissen bei der Entwicklung des Herstellungsverfahrens überein (s. Absatz B1). Das zeigt, dass die Urtinkturen nach HAB ohne Zusatz von Konservierungsstoffen mikrobiologisch stabil sind.

Der Zusatz von Honig und Laktose zu den meisten fermentierten Auszügen ist zwar nicht ausreichend, um durch erhöhten osmotischen Druck antibakteriell zu wirken. Trotzdem weist Honig selbst antibakterielle Eigenschaften auf. Dies scheint nicht nur aufgrund des Zuckergehalts der Fall zu sein, da der Effekt auch für niedrige Konzentrationen gezeigt wurde, bei denen keine osmotische Wirkung auftreten kann.<sup>239</sup> Honig und Laktose dienen vor allem als Kohlenstoffquelle für die Milchsäurebakterien, die sich dadurch gegen die anderen mitextrahierten Bakterien durchsetzen können. Einige Extrakte, wie die Zwiebel- und Birkenblätterextrakte, werden ohne Honig und Laktose, sondern mit Molke als „Starterkultur“ für Milchsäurebakterien hergestellt. Die Milchsäuregärung führt durch den Glucosemetabolismus zur Bildung organischer Säuren, v. a. Milchsäure<sup>240</sup>, wodurch der pH-Wert der Lösung auf pH 4 sinkt<sup>241</sup>. Das konnte für alle Extrakte beobachtet werden, wodurch

---

<sup>239</sup> Viuda-Martos et al. (2008)

<sup>240</sup> Frey & Hubert (1993)

<sup>241</sup> Roberts & Kidd (2005)

andere, insbesondere pathogene Keime in ihrem Wachstum gehemmt werden. Weiterhin sind die Milchsäurebakterien dafür bekannt, Bacteriocine zu produzieren, Proteine (oder Peptide), die ebenso das Wachstum anderer Stämme hemmen. Diese Bacteriocine wirken v. a. auf grampositive Bakterien wachstumshemmend.<sup>242</sup>

Durch die Dominanz der Milchsäurebakterien sind gute Voraussetzungen für einen geregelten Fermentationsprozeß gegeben. Der größte Teil der Saccharide wird von Milchsäurebakterien durch die Glycosidasen gespalten und die entstandenen Einfachzucker werden dann weiter metabolisiert.<sup>243</sup> Die Glycosidasen können zusätzlich die glykosidischen Bindungen anderer Komponenten, wie z. B. von Flavonolglykosiden spalten. Weiterhin können Oxidationen durch anwesende und produzierte Peroxide im aeroben Milieu stattfinden<sup>243</sup>, trotz des an sich reduktiven Milieus, das durch Milchsäurebakterien<sup>244</sup> geschaffen wird.

## 2. *Allium cepa*

Obwohl die selbsthergestellten Extrakte aufgrund der Ähnlichkeit ihres chromatographischen Fingerprints mit Literaturdaten<sup>245</sup> (s. D1.1.2) problemlos charakterisiert werden konnten, bleibt weiterhin die genaue Zusammensetzung der fermentierten Extrakte unklar. Besonders in den ersten zwei Monaten der Herstellung waren diese Extrakte in ständigem Wandel. Lediglich eine geringe Anzahl der vielen Peaks konnte charakterisiert werden. Die einzige Literaturstelle über die analytische Nachverfolgung der Milchsäuregärung von Zwiebelextrakten zeigte lediglich die Umsetzung von Quercetin-diglucosid in –monoglucosid und -aglykon.<sup>246</sup> Im Fall der vorliegenden Arbeit war das Diglucosid schon nach 24 h Gärung nur noch in Spuren zu detektieren (s. Absatz D1.1.4) und das Monoglucosid sowie das Aglykon wurden fast vollständig innerhalb zwei weiterer Tage vestoffwechselt.

---

<sup>242</sup> Settanni & Corsetti (2008)

<sup>243</sup> Kandler (1983)

<sup>244</sup> Lin & Yen (1999)

<sup>245</sup> Bonaccorsi et al. (2005)

<sup>246</sup> Bisakowski et al. (2007)

Neben den Flavonolen konnte Tryptophan mittels HPLC–DAD in den Zwiebelextrakten identifiziert werden. Viele weitere freie Aminosäuren sind zudem in Zwiebeln enthalten, wie v. a. Glutamin und Arginin, die unter HPLC-Bedingungen aber nicht ohne Derivatisierung (z. B. mit Dansylchlorid) detektiert werden können.<sup>247</sup> In den Chromatogrammen wurden kleinere Peaks mit Tryptophan-ähnlichem UV-Spektrum detektiert (s. Abb. D-2 bis Abb. D-4 und Absatz I4), die teilweise zunehmen, während Tryptophan abgebaut wird. Es ist bekannt, dass Aminosäuren von Milchsäurebakterien metabolisiert werden, vor allem durch Desaminierung zu Ammoniak und Pyruvat und weiter zu Lactat. Weiterhin sind Transaminierungen durch Aminotransferasen häufig.<sup>248</sup> Es ist daher gut möglich, dass weitere phenolische Aminosäuremetabolite gebildet wurden, die im Chromatogramm miterfasst werden.

Wie im Literaturteil beschrieben, sind die publizierten Ergebnisse zur mikrobiologischen Wirkung von Zwiebelextrakten sehr unterschiedlich. Je nach Beitrag zeigten Zwiebelextrakte keine oder eine starke Wirkung. Wurde ein Unterschied zwischen gramnegativen und -positiven Stämme beobachtet, waren sie gegenüber grampositiven Bakterien am aktivsten (s. B4.1.3).<sup>249</sup> Bei den in diesen Berichten verwendeten Extrakten handelt es sich vor allem um wässrige, teilweise auch methanolische Extrakte, die aus frischen oder getrockneten Zwiebeln hergestellt wurden. Diesen teilweise widersprüchlichen Berichten zufolge ist die Wirkung der Zwiebelextrakte höchstwahrscheinlich abhängig von der Zwiebelsorte sowie der Art der Extraktion. Die drei verschiedenen Extrakte, die in dieser Arbeit zur Beurteilung der antimikrobiellen Aktivität untersucht wurden, stammten aus der gleichen Zwiebelcharge. Die selbsthergestellten Extrakte wurden sogar aus demselben Zwiebelbrei hergestellt und zeigten dennoch unterschiedliche Wirksamkeiten, was die Rolle des Extraktionsmittel und der Extraktionsart bestätigt. Weiterhin spielt für die antimikrobielle Wirkung die Extraktzusammensetzung eine Rolle und diese ist wieder abhängig von der Extraktionsmethode, der Zwiebelsorte, der Stickstoffversorgung während des Anbaus<sup>250</sup> sowie von der nachfolgenden Lagerung<sup>251</sup>. Die antibakteriellen Eigenschaften sind besonders

---

<sup>247</sup> Lee et al. (2009)

<sup>248</sup> Liu (2003); Weiller & Radler (1976)

<sup>249</sup> Al Delaimy & Ali (1970); Elnima et al. (1983); Griffiths et al. (2002); Rose et al. (2005); Santas et al. (2010)

<sup>250</sup> Perner et al. (2007)

<sup>251</sup> Abayomi & Terry (2009)

auf die Sulfoxide und anderen organischen Schwefelverbindungen zurückzuführen.<sup>252</sup> Diese Substanzen sind aber sehr instabil in Lösung und besonders flüchtig.<sup>253</sup> Es wäre daher interessant, diese Substanzen nach Inkubation eines Zwiebelextraktes (trocken auf einer Agarplatte oder flüssig in einem Reagenzglas) zu überprüfen.

Erstaunlicherweise beobachteten Santas et al.<sup>254</sup> die antimikrobielle Aktivität von Quercetin und Kämpferol sowie eines weiteren flavonoidreichen Zwiebelextraktes. Die Referenzsubstanzen zeigten dabei eine leicht stärkere und der Extrakt lediglich eine Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterienstämmen. Festzuhalten ist aber, dass Flavonoide allgemein keine starke antimikrobielle Aktivität aufweisen.<sup>255</sup>

Interessanterweise ist in unserem Fall der aktivste Extrakt der einzige, der fast keine Flavonoide aufweist und bei dem interessanterweise der Pyruvatgehalt und damit der Gehalt an schwefelhaltigen Verbindungen am niedrigsten war. Die Unterschiede der Pyruvatkonzentrationen zwischen den selbsthergestellten Extrakten (s. Absatz D1.1.3) könnten auf die unterschiedliche Extraktionsweisen zurückgeführt werden. Die Gewinnung des wässrigen Extraktes, der zur Pyruvatbestimmung hergestellt wurde (s. Absatz G2.4.3), erfolgte durch einmaligen Auszug, während die zwei anderen Extrakte (methanolischer und wässriger, s. Absatz G2.4.1.c) durch dreifache Extraktion gewonnen wurden. Warum in dem fermentierten Extrakt kein Pyruvat detektiert werden konnte ist fraglich und weist entweder auf die Grenze des Testes hin, oder gebildetes Pyruvat reagierte unter den Herstellungsbedingungen der Fermentation weiter.

Ursprünglich weisen Zwiebeln nicht genügend Milchsäurebakterien auf, um eine Fermentation des Extraktes selbst einzuleiten.<sup>256</sup> Bei der Herstellung von Urtinkturen aus Zwiebeln nach HAB wird deswegen Molke als Fermentationsstarter zugesetzt. Milchsäurebakterien bauen Kohlenwasserstoffe, besonders Zucker, ab und produzieren Milchsäure, wobei Pyruvat als für die Bakterien toxische Zwischenstufe entsteht. Das heißt, dass zusätzlich anwesendes Pyruvat auch in die Milchsäuregärung eingehen kann, was

---

<sup>252</sup> Lanzotti (2006); Corzo-Martinez et al. (2007)

<sup>253</sup> Lanzotti (2006)

<sup>254</sup> Santas et al. (2010)

<sup>255</sup> Cushnie & Lamb (2005)

<sup>256</sup> Roberts & Kidd (2005)

Ursache für die negativen Ergebnisse des Pyruvattests für die fermentierte Urtinktur sein könnte.

Wie im allgemeinen Absatz der Diskussion erwähnt, bewirken die überwiegend vorkommenden Milchsäurebakterien bakterizide bzw. bakteriostatische Effekte, u. a. durch Bildung von organischen Säuren, Ethanol und Bacteriocinen. Letztere hemmen besonders das Wachstum grampositiver Bakterien, können aber dennoch gegen gramnegative Bakterien wirksam sein<sup>257</sup>. Dies kann unsere Beobachtungen bei den mikrobiologischen Untersuchungen, d. h. die stärkste Wirkung des fermentierten Extraktes gegenüber gramnegativen Bakterien, erklären.

Bei einem einzigen gramnegativen Bakterienstamm, *Acinetobacter baumannii*, wurde ein „Doppelhemmhof“ bei dem Agardiffusionstest beobachtet (s. Absatz D1.2.2). Eine erste Erklärung dafür wäre die uneinheitliche Verteilung der Inhaltsstoffe des Zwiebelextraktes auf der Agarplatte, was zu einer differenzierenden Wirkung je nach Laufweite führen könnte. Es wäre weiterhin aber auch möglich, dass *A. baumannii* eine heterogene Resistenz gegenüber dem Extrakt aufweist. Dies wurde z. B. mit *Staphylococcus aureus* gegenüber Vancomycin und Methicillin beobachtet.<sup>258</sup>

All diese Beobachtungen stellen einen wichtigen Beitrag zur Qualitätsprüfung fermentierter Zwiebelextrakte dar. Zudem erweitern sie das Verständnis angesichts des aktuellen Trends, sogenannte „wertlose Zwiebeln“ und andere Gemüse durch Fermentierung aufzuwerten bzw. Gemüse auf natürliche Weise länger haltbar zu machen.<sup>259</sup>

### 3. *Arnica montana*

Wie im Allgemeinen Teil erwähnt (s. Absatz B4.2.1.a), enthält die ganze Arnikapflanze vorwiegend Dihydrohelenalinester und es sind die Blüten, im Falle von Arnika des mitteleuropäischen Chemotypes, die Helenalinderivate als Hauptsesquiterpenlactone enthalten. Da vor allem die Helenalinester für die Hemmung des NF- $\kappa$ B-Komplexes

---

<sup>257</sup> Settanni & Corsetti (2008)

<sup>258</sup> Liu & Chambers (2003); Ryffel et al. (1994)

<sup>259</sup> Bisakowski et al. (2007); Gonzalez-Saiz et al. (2007); Roberts & Kidd (2005); Settanni & Corsetti (2008)

verantwortlich sind<sup>260</sup>, sollte die nötige Hemmkonzentration von der Helenalinkonzentration des Extraktes abhängen. Die fermentierten Arnikaextrakte enthalten wegen des wässrigen und kalten Extraktionsprozesses (eine erschöpfende Extraktion wird mit 50 % Methanol bei 60°C erreicht<sup>261</sup>) weniger SLs als die üblichen Extrakte. Zudem kommen vorwiegend DH-Derivate vor, da die Extrakte aus ganzen Pflanzen hergestellt wurden. Folglich zeigten die fermentierten Extrakte eine schwächere Hemmwirkung auf die DNA-Bindung von NF-κB in den EMSA-Assays als die nach den üblichen Verfahren hergestellten Extrakte.

Methyl- oder Ethyladdukte sind die einzigen Umsatzprodukte der Sesquiterpenlactone, die in alkoholischen Arnikaextrakten beobachtet wurden.<sup>262</sup> Durch die wässrige Herstellung der Urtinkturen, auch wenn wahrscheinlich kleine Mengen Ethanol durch die Milchsäuregärung produziert wurden, konnten solche Addukte nicht nachgewiesen werden.

Die fermentierten Extrakte waren am Ende der Herstellung mikrobiologisch stabil, bis auf den Extrakt von 2007, der am Ende der Lagerung eine unerwartete Keimzahlerhöhung zeigte. Die verwendete analytische Methode erlaubte reproduzierbare Ergebnisse und war folglich zur Qualitätsprüfung der Arnikaextrakte geeignet. Außerdem konnte damit gezeigt werden, dass die fermentierten Extrakte chemisch stabil waren.

#### 4. *Betula pendula*

Die entwickelte und validierte HPLC-Methode zur Analyse der Flavonole sowie anderer phenolischer Verbindungen in den Birkenblätterextrakten ergab spezifische und reproduzierbare Ergebnisse. Sie ist somit zur Qualitätsprüfung auch von weiteren flavonolhaltigen Drogen geeignet. Die ermittelten Flavonolglykosidmengen wichen zwischen den drei verwendeten Extraktchargen deutlich voneinander ab, mit den höchsten Konzentrationen in den Proben aus 2007. Die Birkenblätter stammten alle aus dem WALA-Garten (Eckwälden), bis auf die Charge von 2006, die aus Wildsammlung herrührte (Hörnle, Boll). Der Ursprung der Blätter kann folglich nicht der einzige Grund für diese Schwankungen sein. Eine hohe Variabilität ist jedoch nicht weiter erstaunlich, da bekannt ist, dass der

---

<sup>260</sup> Lyss et al. (1997)

<sup>261</sup> Willuhn & Leven (1991)

<sup>262</sup> Schmidt et al. (2000)

Flavonoidgehalt in den Birkenblättern durch das Blattentwicklungsstadium<sup>263</sup> sowie durch verschiedene äußere Parameter<sup>264</sup> wie z. B. die UV-Licht Strahlung<sup>265</sup>, die CO<sub>2</sub>-Konzentration und die Temperatur<sup>266</sup> bedingt ist. In unserem Fall wurden die Blätter jedes Jahr im gleichen Entwicklungsstadium gepflückt, nämlich am Ende des Wachstums der jungen Blätter im Mai. Somit bleiben lediglich die äußeren Parameter als möglicher Grund für die beobachtete Variabilität.

Der Abbau der Quercetinglykoside erfolgte mit unterschiedlichen Kinetiken: Quercitrin (Quercetin 3-rhamnosid) war das stabilste, gefolgt von Quercetin (Q) 3-arabinopyranosid, Isoquercitrin (Q 3-glucosid) und den drei letzten, Hyperosid (Q 3-galactosid), Q 3-glucuronid und Q 3-arabinofuranosid, die am schnellsten abgebaut wurden. Das deutet darauf hin, dass die Stabilität der Flavonole vom Zuckerrest abhängig ist. Hein et al. beobachteten einen ähnlichen Zucker-abhängigen Metabolismus der Flavonolglykoside bei der Untersuchung der Abbaukinetik bei Fermentation durch die Darmflora. Hier war ebenso Quercitrin am stabilsten.<sup>267</sup>

Die Deglykosylierung der Flavonolglykoside sowie von 3,4'-Dihydroxypropiophenon 3- $\beta$ -glucosid können teilweise den in den Birkenblätter endogenen  $\beta$ -Glykosidasen, die durch Mörsern und eine nicht denaturierende Extraktion freigesetzt werden, zugeschrieben werden. Weiterhin enthalten die fermentierten Extrakte, v. a. durch den Molkezusatz, Milchsäurebakterien, die selbst eine solche Aktivität aufweisen.<sup>268</sup> Dies wäre ebenso ein Grund für den schnelleren Abbau der Flavonolglykoside in den selbsthergestellten Extrakten mit Molke im Vergleich zu den rein wässrigen Ansätzen (s. Absatz D3.3.4).

Es konnte keine Erklärung für die unterschiedliche Quercetin-Zunahme in den verschiedenen fermentierten Extrakten gefunden werden. Die pH-Werte und Proteinkonzentrationen scheinen dafür nicht verantwortlich zu sein, da ähnliche Werte für die getesteten Extrakte ermittelt wurden. Die mikrobiologischen Daten waren ebenso gleich für die Chargen 2006–2008.

---

<sup>263</sup> Laitinen et al. (2002)

<sup>264</sup> Laitinen et al. (2000)

<sup>265</sup> Lavola (1998)

<sup>266</sup> Kuokkanen et al. (2003)

<sup>267</sup> Hein et al. (2008)

<sup>268</sup> Grimaldi et al. (2005)

Der Abbau von Chlorogen- und *p*-Cumaroylchinasäure zu Kaffee- bzw. *p*-Cumarsäure ist wahrscheinlich auf eine Hydrolyse in wässrigem Milieu zurückzuführen. Weiterhin sind verschiedene Bakterien dafür bekannt, Chlorogensäure hydrolysieren zu können, was bereits *in vivo* durch menschliche Darmbakterien beobachtet wurde.<sup>269</sup>

Die Bildung von Catechol aus Quercetin wurde in einem Review über den Metabolismus phenolischer Verbindungen im menschlichen Darm von Selma et al. dargestellt.<sup>270</sup> Hierfür wird die Dissertation von Aura zitiert,<sup>271</sup> in der wiederum selbst nicht Catechol (1,2-Dihydroxybenzol), sondern 3,4-Dihydroxytoluol erwähnt wird. Die Entstehung von Catechol wurde allerdings aus Protocatechusäure durch Milchsäuregärung beobachtet.<sup>272</sup> Darüber hinaus ist Protocatechusäure ein Oxidationsprodukt von Quercetin.<sup>273</sup> Wie im allgemeinen Teil der Diskussion erwähnt, können solche Oxidationen durch aerobe Milchsäuregärung beobachtet werden. In den fermentierten Birkenblätterextrakten konnte keine Protocatechusäure detektiert werden, aber die Spuren Catechol könnten auf einen solchen Abbau hinweisen.

Aura beobachtete, ebenso wie bei unseren fermentierten Extrakten, einen starken Abbau von Quercetin, aber ein schwaches Auftreten von Abbauprodukten nach *in vitro* Metabolisierung mit Kolonbakterien.<sup>271</sup> Die einzige mögliche Erklärung dafür ist die Bildung von Metaboliten, die nicht mit den verwendeten analytischen Methoden (HPLC-DAD, LC-MS und GC-MS) detektierbar sind. Der Nachweis von kleineren Metaboliten von Quercetin wurde bereits publiziert, wie Acetat und Butyrat, bei den es sich um die Hauptmetaboliten durch *Eubacterium ramulus* handelt<sup>274</sup>, sowie auch Kohlensäure. Kohlensäurebildung durch Quercetin-Metabolismus wurde bereits 1959 *in vivo*, nach Rattenfütterung mit radioaktiven Quercetin, beobachtet.<sup>275</sup> Zusätzlich wurde gezeigt, dass Kohlensäure sogar als Hauptprodukt des menschlichen Metabolismus von Quercetin gebildet wird.<sup>276</sup> Daraus könnte geschlossen

---

<sup>269</sup> Couteau et al. (2001)

<sup>270</sup> Selma et al. (2009)

<sup>271</sup> Aura (2005)

<sup>272</sup> Curiel et al. (2010)

<sup>273</sup> Buchner et al. (2006); Makris & Rossiter (2002)

<sup>274</sup> Schneider et al. (1999)

<sup>275</sup> Kallianos et al. (1959)

<sup>276</sup> Walle et al. (2001)

werden, dass die Milchsäuregärung von Quercetin und deren Glykoside möglicherweise vorwiegend zur Bildung kleinerer organischer Säuren, wie Kohlensäure führt.

## 5. *Gentiana lutea*

Wie im Allgemeinen Teil beschrieben, enthalten die Wurzeln des gelben Enzians generell vorwiegend Gentiopikrosid (s. Absatz B4.4.1). Interessanterweise wurde kein Gentiopikrosid im fermentierten Extrakt von 2007 detektiert, im Gegensatz zu den weiteren Chargen. Die Wurzeln von 2007 waren die einzigen, die nicht aus Wildsammlung, sondern aus dem WALA-Garten (Eckwälden) stammten. Die Inhaltsstoffführung der Wurzeln ist wahrscheinlich stark von den Umweltbedingungen abhängig. So wurde aus angebauten Enzianwurzeln aus Japan kein Gentiopikrosid detektiert, aber die anderen Iridoide mit Swertiamarin als Hauptbitterstoff.<sup>277</sup> Dieses war ebenfalls der Fall bei der Charge aus 2007. Andere phytochemische Untersuchungen von kultivierten Enzianwurzeln aus Osteuropa zeigten, dass Gentiopikrosid mehr in jungen (zweijährigen) als in fünfjährigen Pflanzen produziert wird<sup>278</sup> und dass dessen Konzentration von der Herkunft der Pflanze<sup>279</sup> abhängig ist. Dies wird von unseren Beobachtungen bestätigt.

In den fermentierten Extrakten wurde ein Anstieg der Swertiamarinkonzentration während der ersten Tage der Extraktion beobachtet (s. Absatz D4.3.2). Da in der gleichen Zeit Gentiopikrosid stark abgebaut wurde, ist es denkbar, dass Swertiamarin aus Gentiopikrosid unter fermentativen Bedingungen produziert wurde. Biosynthetisch entsteht Gentiopikrosid aus Swertiamarin durch Bildung einer Doppelbindung.<sup>280</sup> Wegen des sauren wässrigen Milieus der fermentierten Extrakte ist es dennoch möglich, dass Swertiamarin durch Wasseranlagerung aus Gentiopikrosid gebildet wurde.

Erythrocentaurin, das Hauptabbauprodukt in unseren fermentierten Enzianwurzelextrakten, wurde bereits in zwei Gentianaceen-Arten nachgewiesen: *Enicostemma hyssopifolium* und

---

<sup>277</sup> Ando et al. (2007)

<sup>278</sup> Radanovic et al. (2007)

<sup>279</sup> Tanase et al. (2007)

<sup>280</sup> Inouye et al. (1967)

*Swertia lawii*.<sup>281</sup> Es wurde außerdem aus *Gentiana lutea* isoliert<sup>282</sup>, es konnte aber nicht nachvollzogen werden, ob es genuin vorhanden ist oder durch eine alkalische Extraktion aus Swertiamarin gebildet wurde. Erythrocentaurin wurde beispielsweise von Kariyone et al. 1927 (zitiert in Kubota<sup>283</sup>) aus Swertiamarin durch Hydrolyse mit Emulsin (Enzym aus bitteren Mandeln) gewonnen. Erythrocentaurin wurde auch nach anaerober Inkubation von Gentiopikrosid und Swertiamarin mit verschiedenen Darmbakterien (u. a. Milchsäurebakterien)<sup>284</sup> sowie nach Fermentation von Swertiamarin mit *Aspergillus niger* (als  $\beta$ -D-Glucosidase produzierender Mikroorganismus)<sup>285</sup> isoliert. Zudem wurde vor kurzem berichtet, dass nach Behandlung von Gentiopikrosid mit reiner  $\beta$ -Glucosidase ebenso Erythrocentaurin gebildet wird.<sup>286</sup>

In den fermentierten Extrakten konnte nicht ermittelt werden, ob Erythrocentaurin aus Swertiamarin oder Gentiopikrosid gebildet wurde, da beide Iridoide während der Herstellung abgebaut wurden. Es dürfte nicht genuin in den Wurzeln vorhanden sein, da es in selbsthergestellten Extrakten (wässrig und methanolisch) nicht detektiert werden konnte. In dem Ansatz aus Gentiopikrosid, das statt Enzianwurzel den Herstellbedingungen nach HAB unterzogen wurde (s. Absatz D4.3.5), wurde auch kein Erythrocentaurin produziert. Bei den fermentierten Extrakten wurden lediglich in der Charge von 2007 Milchsäurebakterien detektiert, eine Charge die kein Gentiopikrosid, etwas weniger Swertiamarin und einen gleich großen Erythrocentaurinpeak, im Vergleich zu anderen Chargen aufwies. Daraus kann gefolgert werden, dass die genuinen  $\beta$ -Glykosidasen der Pflanze für die Umsetzung zu Erythrocentaurin verantwortlich sind.

Im Ansatz, in dem die Pflanzenteile durch Gentiopikrosid ersetzt wurden, unter Zusatz von Laktose und Honig (Extrakt G+, Absatz D4.3.5) war der Bitterstoff sehr instabil. Einige Folgeprodukte wurden zwar detektiert, konnten aber nicht zugeordnet werden. Erythrocentaurin konnte nicht detektiert werden. Für dessen Bildung fehlten die pflanzeigenen Enzyme, um Gentiopikrosid bzw. Swertiamarin zu deglykosylieren. Der

---

<sup>281</sup> Ghosal et al. (1974)

<sup>282</sup> Marekov et al. (1965)

<sup>283</sup> Kubota et al. (1961)

<sup>284</sup> El Sedawy et al. (1989b); El Sedawy et al. (1989a)

<sup>285</sup> Jun et al. (2008)

<sup>286</sup> Wang et al. (2009)

dennoch rasche Verlust von Gentiopikrosid fand wahrscheinlich aufgrund des sauren wässrigen Milieus (pH 4, s. Tab. D-29) statt.

In den fermentierten Extrakten war der Xanthongehalt sehr gering, da Xanthone von vornherein nur sehr begrenzt mit Wasser extrahiert werden, wie bei dem Versuch zur erschöpfenden Extraktion beobachtet wurde (s. Absatz D4.3.1). Sonst Üblicherweise sind in frischen wie in getrockneten Wurzeln gleiche Mengen an Xanthone zu finden.<sup>287</sup>

Wenn man die Enzianwurzeln als Bitterdroge berücksichtigt, ist der Bitterwert ein wichtiger Parameter zur Qualitätsprüfung dieser Droge.<sup>288</sup> Dennoch sind organoleptische Prüfungen hierfür zu ungenau, wie hier gezeigt wurde (s. Absatz D4.3.6). Die HPLC-Analysen der frischen Droge ermöglichten die Gehaltsbestimmung aller Bitterstoffe. Die Amarogentinkonzentration reicht prinzipiell allein zur Bestimmung des theoretischen Bitterwerts aus, da Gentiopikrosid an nur ca. 0.8% der Bitterwirkung der Enziandroge beteiligt ist.<sup>289</sup> Deswegen hatten Schwankungen der Konzentration von Gentiopikrosid und Swertiamarin wenig Auswirkung auf diesen Wert (s. Abb. D-41).

## 6. *Hypericum perforatum*

Es wurde eine spezifische HPLC-Methode zur Trennung aller wichtigen Sekundärstoffe des Johanniskrautes entwickelt. Da die Elution der Naphthodianthrone und Phloroglucinderivate stark vom pH-Wert abhängt,<sup>290</sup> wurde durch die Optimierung des pH-Wertes des wässrigen Laufmittels eine leistungsfähige Trennung erzielt. Diese Methode wurde zwar nicht validiert, dennoch ist sie für Qualitätsprüfungen von gewöhnlichen Johanniskrautextrakten (sowohl aus frischen oder getrockneten Pflanzen) geeignet. Für die fermentierten Extrakte könnte die bereits für die Birkenblätter validierte Methode zur Quantifizierung der Flavonoide verwendet werden, da hier weder Naphthodianthrone noch Phloroglucinderivate detektierbar waren.

---

<sup>287</sup> Carnat et al. (2005)

<sup>288</sup> Enzianwurzelmonographie in Europäisches Arzneibuch (2008a); Europäisches Arzneibuch (2008c)

<sup>289</sup> Wagner & Münzig-Vasirian (1975)

<sup>290</sup> Fourneron & Nait-Si (2006)

Nach bisherigem Stand des Wissens tragen die Hypericinderivate und Flavonoide wahrscheinlich zu der hauptsächlich durch Phloroglucinderivate bedingten antidepressiven Eigenschaften der Pflanze bei.<sup>291</sup> Interessanterweise wurden die Naphthodianthrone und Phloroglucinole des Johanniskrauts nicht in den untersuchten Fermentationsbedingungen extrahiert, da sie in Wasser sehr schlecht löslich sind.<sup>292</sup> Deshalb konnten deren mögliche Abbauprodukte nicht untersucht werden. Weiterhin waren nur noch Spuren der Flavonoide am Ende der Herstellung der Urtinktur enthalten (s. Abb. D-43 und Abb. D-44). Es wäre interessant, die antidepressive Wirkung der fermentierten Extrakte zu untersuchen um zu ermitteln, ob diese Extrakte trotz der fehlenden Phloroglucinderivate eine antidepressive Wirkung aufweisen.

## 7. *Nicotiana tabacum*

Die entwickelte und validierte GC-Methode war einfach zu handhaben, schnell, sehr gut reproduzierbar und spezifisch. Die Verwendung einer amindeaktivierten Kapillarsäule verhinderte die Adsorption von Nikotin an der Säule und garantierte wiederholbare Ergebnisse über mehrere Monate. Dies steht im Gegensatz zu den ersten Versuchen mit einer gewöhnlichen Dimethylpolysiloxan-Kapillarsäule. Diese Methode ist geeignet, um zur Quantifizierung von Nikotin und dabei zur Qualitätsprüfung von Tabakextrakten verwendet zu werden. Um diese Methode zur Spurenanalyse von Nikotin und seinen Metaboliten in biologischen Proben, wie Haaren oder Körperflüssigkeiten zu verwenden, wäre es dagegen sinnvoller, sie auf eine GC-MS-Anlage zu übertragen, da die Detektionsgrenze viel niedriger ist als mittels Flammenionisation-Detektion.

Der Nikotin-Verlust um ca. 20 % während der Herstellung und einjährigen Lagerung der fermentierten Extrakte führte vor allem zur Anreicherung von Nornikotin und 2-Pyrrolidinon. Die erste Substanz, ein *N'*-Demethylierungsprodukt von Nikotin, wurde früher in *Nicotiana* Zellsuspensionskulturen beobachtet und eine oxidative Eliminierung der *N'*-Methylgruppe vorgeschlagen.<sup>293</sup> Ein ähnlicher Metabolismus könnte durch Fermentierung der frischen

---

<sup>291</sup> Butterweck & Schmidt (2007)

<sup>292</sup> Ang et al. (2004)

<sup>293</sup> Bartholomeusz et al. (2005)

Blätter im Wässrigen stattfinden. Myosmin, ein bekannter Metabolit von Nikotin und Nornikotin, der unter enzymatischen Bedingungen sowie Sauerstoffausschluss gebildet wird<sup>294</sup> und zusätzlich als Abbauprodukt einer wässrigen Nikotininlösung nach Belüften und Belichten berichtet wurde<sup>295</sup>, konnte in den wässrigen Urtinkturen nach HAB lediglich in Spuren detektiert werden. Dies ist jedoch nicht weiter erstaunlich, da Myosmin in Wasser spontan mit einer Ringöffnung reagiert, um Poikilin zu bilden (s. Abb. D-59).<sup>296</sup> Poikilin wurde jedoch nicht detektiert. Es ist somit durchaus möglich, dass es zu 2-Pyrrolidinon weiter reagierte, das Hauptumsatzprodukt von Nikotin in den fermentierten wässrigen Extrakten. 2-Pyrrolidinon wurde in der Literatur als Produkt der Destillation von sogenanntem „flue-cured“ (röhrengetrocknetem) Tabak erwähnt.<sup>297</sup> Die Toxizität von 2-Pyrrolidinon ist sehr gering gegenüber der von Nicotin. Beide wurden durch Mikrotox-Test im Meeresorganismus *Photobacterium phosphoreum* ermittelt, mit einem EC50-Wert von 2.3 g/l für 2-Pyrrolidinon<sup>298</sup> und  $5.7 \times 10^{-6}$  g/l für Nicotin<sup>299</sup>.

---

<sup>294</sup> Bartholomeusz et al. (2005); Wada et al. (1959)

<sup>295</sup> Smyth et al. (2007)

<sup>296</sup> Haines et al. (1945)

<sup>297</sup> Lloyd et al. (1976)

<sup>298</sup> Campbell & Striebig (1999)

<sup>299</sup> Chou & Hee (1993)



## G Experimenteller Teil

### 1. Material

#### 1.1. Herkunft des untersuchten Pflanzenmaterials

Das Pflanzenmaterial jeder zu untersuchenden Pflanze wurde von der Firma WALA Heilmittel GmbH (Bad Boll/Eckwälden) erhalten. Es wurde jeweils 50 g Pflanzenmaterial, das unmittelbar nach der Ernte gereinigt, getrocknet und bei mind. -20°C tiefgefroren wurde sowie 2×10 g gemahlenes tiefgefrorenes Pflanzenmaterial zur Verfügung gestellt. Alle bereitgestellten Chargen sind in Tab. G-1 aufgelistet. Zusätzlich wurden getrocknete Birkenblätter aus dem Jahr 2004 (Ch. BP04) sowie getrocknete Enzianwurzeln von 2005 (Ch. GL05) untersucht. Alle Pflanzen, die aus den WALA-Heilpflanzengärten (Bad Boll/Eckwälden) stammten, wurden biologisch-dynamisch nach Demeter-Richtlinien angebaut.

**Tab. G-1** Chargen und Orte der Ernte der verschiedenen Pflanzen

Pflanze	Pflanzenteile	2005	2006	2007	2008	Ernteort
<i>Allium cepa</i>	Zwiebel		AC06	AC07	AC08	WALA Garten, Eckwälden
<i>Arnica montana</i>	Ganze Pflanze		AM06	AM07	AM08	Vogesen, Frankreich
<i>Betula pendula</i>	Blätter	BP05	BP06	BP07	BP08	WALA Garten, Eckwälden (bzw. 2006: Hörnle, Boll)
<i>Gentiana lutea</i>	Wurzeln		GL06	GL07	GL08	Vogesen, Frankreich (bzw. 2007: WALA Garten, Eckwälden)
<i>Hypericum perforatum</i>	Ganze Pflanze		HP06	HP07	HP08	WALA Garten, Eckwälden
<i>Nicotiana tabacum</i>	Blätter		NT06	NT07	NT08	WALA Garten, Eckwälden

#### 1.2. Fermentierte wässrige Extrakte

Die fermentierten wässrigen Extrakte wurden von der Firma WALA bereitgestellt. Die Extrakte wurden im firmeneigenen Herstellbereich nach offiziellen Vorschriften<sup>300</sup> hergestellt (Tab. G-2). Der Extraktionsablauf war für jeden Extrakt identisch. Ausgelöst durch die natürliche mikrobielle Flora der Pflanze bzw. der zugesetzten Molke erfolgte eine spontane Gärung über 7 Tage. Nach 3.5 Tage bei 37 °C wurden die Pflanzenbestandteile abgetrennt.

<sup>300</sup> HAB 33 (2003); HAB 34 (2003)

Die resultierende trübe Lösung wurde über weitere 3.5 Tagen bei Raumtemperatur fermentiert. Während dieser Woche wurde der Extrakt jeden Vormittag und Abend gerührt und 2 h auf Eis gestellt. Am siebten Tag wurde die Lösung sterilfiltriert und anschließend die Asche aus der abfiltrierten Pflanze zugegeben. Die verschiedenen Schritte dieser Extraktion sind in Tab. G-3 zusammengefasst. Nach 24 Stunden (*T1*), 3.5 Tagen (*T3*) und 7 Tagen (*T7*) sowie nach 2, 4, 6, 9 und 12 Monaten (*M2–M12*) Lagerung bei 15°C im Dunkeln wurden Stichproben genommen. In Tab. G-4 sind alle zur Verfügung gestellten Proben zusammengefasst. Sie wurden alle unverzüglich tiefgefroren und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Der pH-Wert der Proben wurde während der Extraktionswoche regelmäßig mittels pH-Papier geprüft. Diese Daten sind im Ergebnisteil bei den jeweiligen Pflanzen wiedergegeben.

**Tab. G-2** Verwendete Vorschriften aus dem HAB und Zusammensetzung der Extrakte

Pflanze	Vorschrift <sup>300</sup>	Teile				Laktose-Monohydrat	Ungefähre Konzentration (g Frischpflanze/ml)
		Pflanze	Wasser	Honig	Molke		
<i>A. cepa</i>	34a	100			50		2
<i>A. montana</i>	33c	100	125	0.75		0.75	0.8
<i>B. pendula</i>	34e	100	225		50		0.36
<i>G. lutea</i>	33c	100	125	0.75		0.75	0.8
<i>H. perforatum</i>	33c	100	125	0.75		0.75	0.8
<i>N. tabacum</i>	33b	100	75	0.75		0.75	1.33

**Tab. G-3** Extraktionsverlauf mit Details des Temperaturwechsels in den Herstellvorschrift nach HAB

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7
morgens 2 h		37°C			RT			
		0°C			0°C		Filtern (steriler Mull)	
	Ansatzbeginn	37°C			RT		Aschezugabe	
abends 2 h	37°C							
	0°C			Abpressen (Baumwolltuch)	0°C		Lagerung 15°C	
	37°C				RT			

**Tab. G-4** Proben, die aus den fermentierten Extrakten zwischen 2005 und 2008 gezogen wurden

Pflanze	Jahr	Charge	T1	T3	T7	M2	M4	M6	M9	M12
<i>Allium cepa</i>	2006	AL06	x	x	x	x	x	x	x	x
	2007	AL07	x	x	x	x	x	x	x	x
	2008	AL08	x	x	x					
<i>Arnica montana</i>	2005	AM05								x
	2006	AM06	x	x	x	x	x	x		x
	2007	AM07	x	x	x	x	x	x	x	x
	2008	AM08	x	x	x	x	x			
<i>Betula pendula</i>	2005	BP05		x	x					x
	2006	BP06	x	x	x		x	x	x	
	2007	BP07	x	x	x	x	x	x		x
	2008	BP08	x	x	x	x	x	x		
<i>Gentiana lutea</i>	2006	GL06	x	x	x		x	x	x	x
	2007	GL07	x	x	x	x	x	x	x	x
	2008	GL08	x	x	x	x	x	x		
<i>Hypericum perforatum</i>	2006	HP06	x	x	x	x	x	x		x
	2007	HP07	x	x	x	x	x		x	x
	2008	HP08	x	x	x	x	x			
<i>Nicotiana tabacum</i>	2006	NT06	x	x	x	x	x	x		x
	2007	NT07	x	x	x	x	x	x	x	x
	2008	NT08	x	x	x	x				

### 1.3. Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind in nachfolgender Tab. G-5 aufgelistet.

**Tab. G-5** Allgemein verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton p.a.	Merck, Darmstadt
Acetonitril HPLC	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure (p.a., ≥98 %)	Roth, Karlsruhe
<i>p</i> -Anisaldehyd	Sigma, USA
Deuterierte Lösungsmittel ([D3]-MeOH/[D5]-Pyridin)	Deutero, Kastellaun
Dichlormethan p.a.	Merck, Darmstadt
Dinatriumphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig, 99.8 %)	Sigma, Seelze
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethylacetat p.a.	Merck, Darmstadt
Kieselgel (Korngröße 0.0630–0.200 mm; 70–230 mesh ASTM)	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	Fluka, Seelze
Methanol HPLC	Roth, Karlsruhe
<i>o</i> -Phosphorsäure (reinst, 85 %)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend, 37 %)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (konz., 95-97 %)	Riedel de Haën, Seelze
Sephadex® LH 20	Pharmacia (GE Healthcare), Schweden
Tetrahydrofuran p.a.	Sigma, Seelze

## 1.4. Referenzsubstanzen

Folgende Referenzsubstanzen wurden verwendet:

**Tab. G-6** Referenzsubstanzen

Chemikalie	Hersteller
Acacetin (purum, DC)	Roth, Karlsruhe
Amarogentin ( $\geq 97$ %, HPLC)	Chromadex, Wesel
DL-Anabasin ( $>98$ %, GC-MS)	Extrasynthèse, Genay, France
Apigenin (purum, DC)	Roth, Karlsruhe
Catechol (99 %)	Acros Organics, Geel, Belgien
Chlorogensäure ( $>97$ %)	Roth, Karlsruhe
<i>p</i> -Cumarsäure (purum, DC)	Roth, Karlsruhe
2,6-di- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol ( $>99$ %)	Sigma, Seelze
Ferulasäure (purum, DC)	Roth, Karlsruhe
Gentiopikrosid ( $>98$ %, HPLC)	Extrasynthèse, Genay, France
<i>p</i> -Hydroxyacetophenone ( $>98$ %),	Acros Organics, Geel, Belgien
<i>p</i> -Hydroxyphenylethanol (97 %),	Maybridge Trevillet, Tintagel, England
<i>m</i> -Hydroxyphenylpropionsäure ( $>98$ %)	Alfa Aesar, Karlsruhe
<i>p</i> -Hydroxyphenylpropionsäure (98 %)	Acros Organics, Geel, Belgien
Hyperforin (Dicyclohexyl Ammonium Salz, 61.5 % freie Säure, HPLC)	Geschenk von Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe
Hypericin ( $>99$ % HPLC)	Planta natural products, Wien, Österreich
Hyperosid ( $>98$ %, HPLC)	Extrasynthèse, Genay, France
Hyperosid (purum, DC)	Roth, Karlsruhe
Isoquercitrin (purum, DC)	Roth, Karlsruhe
Kaffeesäure (purum, DC)	Roth, Karlsruhe
Kämpferol ( $>96$ %, HPLC)	Fluka, Seelze
Kämpferol 3- $\beta$ -glucuronid	Isoliert aus <i>A. montana</i> <sup>301</sup> , Institutseigene Referenzsammlung
Loganinsäure ( $\geq 99$ %, HPLC)	Extrasynthèse, Genay, France
2-Methylpyperidin (98 %)	Aldrich, Steinheim
Nikotin (bidest., $>98$ %)	Roth, Karlsruhe
( $\pm$ )-Nornikotin (98 %, DC)	Fluka, Seelze
Pseudohypericin ( $>98$ % HPLC)	Planta natural products, Wien, Österreich
2-Pyrrolidinon (99 %, GC)	Aldrich, Steinheim
Quercetin 3- $\beta$ -glucuronid	Isoliert aus <i>A. montana</i> <sup>301</sup> , Institutseigene Referenzsammlung
Quercetin, Dihydrat ( $\geq 98$ %, HPLC)	Sigma, Seelze
Quercetin-3-arabinoglucosid HPLC ( $\geq 99$ %)	Roth, Karlsruhe
Quercitrin ( $\geq 98$ %)	Roth, Karlsruhe
Rutin (purum, DC)	Roth, Karlsruhe
(-)- $\alpha$ -Santonin ( $>99$ %)	Sigma, Seelze
Swertiamarin (98 %, HPLC)	TimTec, Newark, USA
L-Tryptophan ( $>99$ %)	Merck, Darmstadt

<sup>301</sup> Merfort & Wendisch (1988)

## 1.5. Verbrauchsmaterialien

Die im Experimentellen Teil erwähnten Verbrauchsmaterialien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tab. G-7** Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1.7 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe
15 ml- und 50 ml-Tubes	Falcon, USA
6-well-Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Platten (PS-microplate, flacher Boden, glasklar, Cat. # 655101)	Greiner bio-one, Frickenhausen
DC-Alufohlen Kieselgel 60 F <sub>254</sub> 20×20 cm	Merck, Darmstadt
Einmalhandschuhe rotiprotect Latex	Roth, Karlsruhe
Einmalküvetten – Halbmikroküvetten Plastibrand® PMMA	Roth, Karlsruhe
Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
Membranfilter Nylon (0.45 µm, 47 mm; zur Lösungsmittelfiltration)	GE Water&Process Tech., Trevose, US
Omnifix®-F 1ml Luer Spritzen	BBraun, Melsungen
Omnifix® 10 ml Luer Lock Spritzen	BBraun, Melsungen
Pasteurpipetten (230 mm)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Roth, Karlsruhe
RP18–Eurosil Bioselect (100 Å, 15–25µ, 5×150 mm)	Knauer, Berlin
Rundfilter (Papier, MN615, 7 cm)	Macherey Nagel, Düren
Seesand	Roth, Karlsruhe
Spritzenfilter 0.45 µm	Roth, Karlsruhe
Vials für DC/GC-MS (2 ml Crimp vials)	Chromacol LTD, England
Watte (bel de Luxe)	Hartmann, Heidenheim

## 1.6. Geräte

Die Geräte, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sind in Tab. G-8 aufgeführt. Die Chromatographie- und Spektrometrie-Anlagen sind im Kapitel G2.1 beschrieben.

**Tab. G-8** Allgemein verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
CAMAG DC-Doppeltrogkammer	CAMAG, Schweiz
CAMAG Probenautomat ATS 4	CAMAG, Schweiz
CAMAG Reprostar Photoeinheit	CAMAG, Schweiz
DC-Zerstäuber	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Pipetten (versch. Größen)	Eppendorf, Hamburg
Filtrationsanlage (Lösungsmittel)	Millipore, USA
Fraktionssammler Retriever II	Teledyne Isco, USA
Gefriertrocknung Alpha 2-4 LSC	Christ, Osterode
Gelkammer (EMSA-Gele) mit Spacer	Thoma, Freiburg
Geltrockner Model 583	Bio Rad, München
Handstückzähler (Zellzählung)	Roth, Karlsruhe
Kaffeemühle – IKA Analysenmühle A10	IKA Labortechnik, Staufen

Gerät	Hersteller
Laborheizplatte Thermoplate S	Desaga / Sarstedt, Nümbrecht
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RET	Jahnke & Kunkel, Staufen
Membranpumpe KNF Laboport	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Microplate Reader Model 550	Bio Rad, München
pH-Elektrode Inlab 4231 (3 mm Durchmesser)	Mettler Toledo, Schweiz
pH-Meter CG 825	Schott, Hofheim/Ts
Phosphoimager FLA-3000	Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan
Photometer – Ultrospec 2100pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Schweiz
Rotationsverdampfer	IKA Works, Staufen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Stuttgart
Tischzentrifuge Rotina 35R	Hettich-AG, Schweiz
Trockenschrank	Heraeus, Stuttgart
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Bandelin, Berlin
Vakuumpumpe	Roth, Karlsruhe
Vortex Mixer IKA MS2-S8	IKA Works, Staufen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Waagen	Mettler-Toledo, Zürich, Schweiz
Wasserbad HB4 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad, schüttelnd GFL 1083	GFL, Burgwedel
Wasserfiltration-Anlage (MilliQ Plus PF, 18.2 M $\Omega$ cm bei 25°C)	Millipore, USA

## 1.7. Computerprogramme

Die folgenden Programme bzw. Datenbanken wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

**Tab. G-9** Computerprogramme und Datenbanken

Software	Hersteller
Beilstein Crossfire Commander 7.1	Elsevier Information Systems GmbH, Niederlande
ChemDraw Ultra 8.0	CambridgeSoft, USA
ChemStation für HPLC (v. A.10.02)	Agilent, USA
ChemStation für GC (v. C.00.00)	Agilent, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc.
H-NMR	ACD Labs, Canada
ISI web of knowledge	Thomson Reuters, USA
MestreNova	MestreLab Research S.L., Spanien
Millenium32	Waters Corporation, Milford, USA
NIST Mass Spectral Library (v.1.7)	NIST, Gaithersburg, USA
Reference Manager 12	Thomson Reuters, USA
Scifinder Scholar	CAS, USA
WinCats	CAMAG, Schweiz

## 2. Phytochemische Untersuchungen

### 2.1. Instrumentelle Analytik

Die Pflanzenanalysen wurden mittels Flüssigkeits- bzw. Gaschromatographie durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Methoden werden in den nächsten Absätzen beschrieben.

#### 2.1.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

##### a) HPLC–DAD

System I stammte von der Firma Waters (Eschborn, Deutschland) und bestand aus zwei HPLC Pumpen 510, einer Pumpen-Steuereinheit sowie einem 996 Photodiodenarray. Das System zur Handinjektion stammte von der Firma Reodyne (Rohnert Park, USA). Die Analysendaten wurden mit Hilfe des Programms Millennium32 (Waters) bearbeitet.

System II war ein HP-1090 System series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA), ausgestattet mit Autosampler, ternärer Pumpe und Photodiodenarray-Detektor. Die Analysensoftware war Chemstation (Agilent).

Es wurden jeweils 20 µl Probe injiziert. Die einzelnen verwendeten Säulen, Laufmittel, Gradienten und Detektionswellenlängen sind in den nächsten Tabellen aufgelistet (Tab. G-10 und Tab. G-11).

**Tab. G-10** HPLC–Säulen

	Säule	Maß	Hersteller
Verwendet	Symmetry C18 (Sym.)	C18, 3.5 µm, 150×4.6 mm	Waters, Eschborn
	Zorbax SB	C18, 3.5µm, 250×4.6mm	Agilent, Waldbronn
Zusätzlich getestet	Hypersil ODS	C18, 5 µm, 125×4.6 mm	Bischoff, Leonberg
	Luna	C18, 3 µm, 150×4.6 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
	Nova-pak	C18, 4 µm, 250×4.6 mm	Waters, Eschborn
	Spherisorb ODS	C18, 5 µm, 125×4.6 mm	Waters, Eschborn
	SymmetryShield RP <sub>8</sub>	C8, 5 µm, 150×3.9 mm	Waters, Eschborn

**Tab. G-11** HPLC–UV: Verwendete Gradienten und Wellenlängen für die verschiedenen untersuchten Pflanzen. Abk.: f = Fluss (ml/min); HCOOH = Ameisensäure; HAc = Essigsäure; Sym. = Symmetry C18-Säule

Pflanze	Säule	Laufmittel und Gradient										UV (nm)	
<i>A. cepa</i>	Zorbax	A: 0.05 % HCOOH (v/v); B: MeOH; f=1.0										280	
		t (min)	0	2	17	20	21	22	27	28	35	351	
		%B	0	0	45	80	80	100	100	0	0		
<i>B. pendula</i>	Sym.	A: H <sub>2</sub> O/THF/ACN/ HAc (90:4:1:5, v/v/v/v); B: MeOH; f=1.2										280	
		t (min)	0	5	35	37	46	49	55	56	60	351	
		%B	10	10	20	60	60	100	100	10	10		
<i>G. lutea</i>	Zorbax	A: 0.5 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (v/v); B: MeOH; f=1.0										235	
		t (min)	0	3	6	18	25	35	40	42	45	50	280
		%B	15	15	30	35	70	70	100	100	15	15	
<i>H. perf.</i>	Zorbax	A: 0.05 % HCOOH (v/v); B: MeOH; C: ACN; f=1.0										270	
		t (min)	0	10	30	40	55	60	61	70			
		%B	0	0	10	15	20	20	0	0			
		%C	0	15	20	75	80	80	0	0			
<i>N. tabacum</i>	Zorbax	A: verschiedene; B: MeOH										260	
		t (min)	0	10	30	40	41	50					
		%B	0	0	100	100	0	0					
		f	0.3	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5					

## b) LC–MS

LC–MS Analysen wurden im Analytiklabor der WALA Heilmittel GmbH durchgeführt. Das Agilent HPLC-System (Series 1200, Agilent, Waldbronn) war ausgestattet mit einem Entgaser G1322A, einer binären Gradientenpumpe G1312A, einem Autosampler G1329A, einem Säulenofen G1316A und einem Photodiodenarray-Detektor G1315B. Das LC–System war gekoppelt mit einem HCT ultra ion trap Detektor (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Germany) mit einer ESI Quelle, operierend im negativen und positiven Modus. Full scan-Massenspektren der HPLC-Eluat wurden während der chromatographischen Trennung aufgenommen und ergaben  $[M-H]^-$  bzw.  $[M+H]^+$  (sowie  $[M+Na]^+$ -und  $[M+K]^+$ -) Ionen. Um weitere strukturelle Informationen zu gewinnen, wurden diese Ionen eingefangen und fragmentiert, um substanztypische Fragmente des jeweiligen Analyten zu gewinnen. Die MS<sup>n</sup>-Daten wurden über einen automatischen MS/MS-Modus mit einer Komponentenstabilität von 100 % generiert. Die Instrumente wurden durch Agilent Chemstation und Esquire Control Software (6.1, Bruker Daltonics, Billerica, USA) gesteuert.

Die Auftrennung erfolgte über die Zorbax Säule (Tab. G-10) mit vorgeschalteter Vorsäule (C18; 4×2.0 mm, Phenomenex, Aschaffenburg). Als Fließmittel A diente eine 0.05 %ige

Ameisensäurelösung, als Fließmittel B wurde Methanol eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min, pro Lauf wurden 20 µl Probe injiziert. Die einzelnen verwendeten Gradienten und Wellenlängen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tab. G-12** LC–MS: Verwendete Gradienten und Wellenlängen für die verschiedenen untersuchten Pflanzen.

Pflanze		Gradient										UV (nm)
<i>A. cepa</i>	t (min)	0	2	17	20	21	22	27	28	35		280
	%B	0	0	45	80	80	100	100	0	0		351
<i>B. pendula</i>	t (min)	0	3	6	18	25	35	40	42	45	50	280
	%B	15	15	30	35	70	70	100	100	15	15	351
<i>G. lutea</i>	t (min)											235
	%B											280
<i>H. perforatum</i>	t (min)	0	10	30	40	55	60	61	70			270
	%B	0	15	30	90	100	100	0	0			590

### 2.1.2. Gaschromatographie

#### a) GC–MS

Die Gaschromatographischen (GC)-Analysen wurden an einem HP6890 series GC-System durchgeführt, das mit einem Agilent 5973 Network Mass Selective Detector gekoppelt war. Als Trägergas fand Helium 5.0 Verwendung. Als Säule kam eine Kapillarsäule (25 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm df) mit 0.25 µm Dimethylpolysiloxan beschichtet zum Einsatz (RTX-1 MS, Restek, Bad Homburg, Deutschland). Die Flussrate betrug 1.0 ml/min. Die Injektor- und Detektortemperatur wurde jeweils auf 280°C eingestellt. Injektionsvolumina von 1 µl wurden 1:10 gesplittet. Es wurden zwei verschiedene Temperaturprogramme verwendet, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

**Tab. G-13** GC–MS: Temperaturgradienten

Parameter	Gradient I			Gradient II	
Temperatur (°C)	120	160	275	60	220
Dauer (min)	2	1	10	0	10
Aufheizrate (°C/min)	10	60	–	10	–

**b) GC–FID**

Die GC-Analysen wurden an einem HP 6890 series GC-System mit FID-Detektor durchgeführt. Es wurde eine Amin-deaktivierte Kapillar-Säule (RTX-35 Amine, 30 m, 0.25 mm ID, 0.5  $\mu\text{m}$  df) der Firma Restek (Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Als Trägergas fand Stickstoff Verwendung. Die Flussrate betrug 1.0 ml/min. Als Temperaturprogramm wurde Gradient II verwendet (Tab. G-13). Die Injektor- und Detektortemperatur wurden jeweils auf 290°C eingestellt. Injektionsvolumina von 1  $\mu\text{l}$  wurden 1:50 gesplittet.

**2.2. Andere chromatographische und spektroskopische Verfahren****2.2.1. Säulenchromatographie**

Allgemeine Angaben zu den Säulenmaterialien und Vorgehensweise sind im folgenden Absatz ausgeführt, während verwendeter Elutionsmittelsysteme und Säulendimensionen bei der Vorschrift der jeweiliger Auftrennung wiedergegeben werden.

**a) Kieselgel 60**

Das Kieselgel wurde mit dem Elutionsmittel aufgeschlämmt und in die Säule gefüllt. Bis zum vollständigen Absinken des Säulenbetts wurde weiter mit Elutionsmittel gespült. Die zu trennende Fraktion wurde an trockenes Kieselgel adsorbiert, auf das benetzte Kieselgel gestreut und mit einer Schicht Seesand bedeckt. Eluiert wurde mit einem aus der DC abgeleiteten Fließmittelsystem, der Reinigungsschritt mit reinem Methanol durchgeführt.

**b) Sephadex® LH 20**

Das in Methanol gelagerte Sephadex® LH 20 wurde in entsprechender Menge blasenfrei als Säule gepackt. Der Extrakt wurde in möglichst wenig Elutionsmittel gelöst und konzentriert auf die Säule gegeben. Nach Einsinken dieser Lösung wurde das Elutionsmittel vorsichtig dazugegeben. Am Ende wurde das Säulenmaterial durch weiteres Spülen mit Methanol gereinigt.

**2.2.2. Niederdruckflüssigkeitschromatographie (Lobar)**

Die Trenneinheit bestand aus einer Glassäule (Classic CL 15/450 S, 450×15 mm, Kronlab, Sinsheim), die mit einer RP-18 Umkehrphase (Eurosil Bioselect 100-30 C18; 100 Å, 20–45  $\mu\text{m}$ , irregulär; Säulenbetthöhe ca. 38 cm; Knauer Eurochrom, Berlin) gefüllt und an eine

programmierbare Pumpe (S 1990, Latek, Eppelheim) angeschlossen war. Die Probenaufgabe erfolgte mit Probenschleifen von 1 ml oder 2 ml Fassungsvermögen. Zu trennende Fraktionen wurden möglichst konzentriert in dem zu Beginn verwendeten Elutionsmittel gelöst. Als Elutionsmittel dienten Methanol-Wasser-Mischungen, deren Methanolanteil in 5 oder 10 %-Schritten bis zum reinen Methanol erhöht wurde. Die Gradientenerhöhung erfolgte jeweils nach ca. 1 h bzw. nach Ende eines Substanzpeaks. Alle Lösungsmittel wurden mit Hilfe einer Millipore-Filteranlage filtriert und im Ultraschallbad entgast. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption im UV-Bereich (Detektor mit variabler Wellenlänge, Labomatic, Allschwil, Schweiz), angeschlossen an einen Schreiber (SE 120 BBC, Goerz Metrawatt, Nürnberg).

Vor der Trennung wurde die Säule mindestens 2 h mit dem zuerst eingesetzten Elutionsmittel bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert, am Ende der Trennung wurde mit reinem Methanol gespült. Nach einer durchgeführten DC-Kontrolle wurden die Reagenzgläser zu Unterfraktionen vereint. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abgetrennt.

### **2.2.3. Fraktionierung**

Bei allen Säulenchromatographiemethoden wurde das Eluat in 5- oder 20 ml-Reagenzgläsern mittels Fraktionssammler aufgefangen. Fraktionen wurden per DC bzw. wenn nötig HPLC oder GC-MS kontrolliert und ähnliche Fraktionen vereint.

### **2.2.4. Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die zu untersuchenden Fraktionen wurden in 1.5 ml Probengläschen gefüllt und 25 µl davon mit einem Auftrageautomaten (Camag, Schweiz) bandenförmig (0.4–0.7 cm) auf Kieselgelplatten aufgesprüht. Es wurden DC-Alufolien der Größe 20 x 10 cm, die mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt) beschichtet waren, verwendet. Nachdem die Banden getrocknet waren, wurde mit einem der unten angegebenen Fließmittelsysteme (1) und (2) über eine Strecke von ca. 8 cm entwickelt. Die Platten wurden mit einem Föhn getrocknet und bei kurz- (254 nm) und langwelligem (366 nm) UV-Licht sowie Tageslicht betrachtet. Dabei wurden bei 254 nm die fluoreszenzlöschenden und bei 366 nm die fluoreszierenden Zonen detektiert. Nach Bedarf wurde mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz derivatisiert und die Platten photographiert. Die R<sub>f</sub>-Werte der isolierten Verbindungen und die jeweilige Färbung sind bei den Substanzeigenschaften angegeben.

Fließmittelsysteme (v/v):

(1) THF/Toluol/HCOOH/H<sub>2</sub>O, 16:8:2:1

(2) EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O, 75:14:11

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz:

Eine Mischung aus 85 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 5 ml Schwefelsäure konz. wurde vorsichtig hergestellt. Nach dem Abkühlen auf RT wurden 0.5 ml Anisaldehyd hinzugefügt. Das Reagenz wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Entwickelte, trockene DC-Platten wurden ganzflächig besprüht und bei 110–120°C auf einer Heizplatte bis zur vollständigen Farbentwicklung erhitzt.

**2.2.5. NMR-Spektroskopie**

Die NMR-Spektren wurden mit einem DRX 400 MHz NMR-Spektrometer (Bruker, Billerica, USA) aufgenommen. Messfrequenzen waren 400.13 MHz für die <sup>1</sup>H- und 100.63 MHz für die <sup>13</sup>C-Messungen. Die Proben wurden gefriergetrocknet, in deuteriertem Lösungsmittel gelöst – Methanol ([D<sub>3</sub>]-MeOH) oder Pyridin ([D<sub>5</sub>]-Pyridin) – und für die Messung in NMR-Röhrchen überführt (507-HP; 5 mm, 7 inch; Norell, Landisville, USA).

Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben und auf Trimethylsilan (TMS) bezogen. Die Kopplungskonstante J ist in Hz angegeben. Die Spektren wurden mit der Software MestReNova abgebildet.

**2.2.6. Massenspektrometrie**

a) EI-MS

EI-Massenspektren wurden mit Direkteinlass auf einem TSQ 700 (Thermo Fisher, Waltham, USA) aufgenommen. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV, die Ionenanalyse wurde mit einem Tripel-Quadrupol durchgeführt.

b) ESI- und APCI-MS

ESI- und APCI-Massenspektren wurden auf einem LCQ-Advantage (Thermo Fisher, Waltham, USA) gemessen. Die Ionenanalyse wurde mittels Iontrap durchgeführt.

### 2.2.7. UV-Spektroskopie

Die Messung der Absorption erfolgte mit einem Uvikon 933 UV/VIS-Zweistrahl-Spektrometer (Kontron Instruments). Die Küvetten hatten eine Schichtdicke von  $d=1$  cm und ein Fassungsvermögen von 1.5 ml. Alle Messungen erfolgten bei RT in dem jeweiligen Lösungsmittel gegen das Lösungsmittel als Referenz.

## 2.3. Methodvalidierung

Die entwickelten Trenn- und Quantifizierungsmethoden wurde anhand der Anforderungen der FDA<sup>302</sup> sowie der ICH<sup>303</sup> validiert und auf Spezifität, Linearität, Präzision, Genauigkeit und Robustheit getestet. Die Richtlinien wurden entsprechend der Literatur<sup>304</sup> verglichen. Einige Erläuterungen zur Validierung werden wiedergegeben.

### 2.3.1. Linearität

Nach ICH<sup>303</sup> beschreibt die Linearität die Fähigkeit einer analytischen Methode Ergebnisse zu erhalten, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe sind.

### 2.3.2. Detektionsgrenze (LOD, limit of detection)

Die Nachweisgrenze ist die kleinste Konzentration, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis noch größer als 3:1 ist.<sup>303</sup>

### 2.3.3. Bestimmungsgrenze (LLOQ, lower limit of quantification)

Die Bestimmungsgrenze ist der kleinste Wert der Kalibrierkurve, der folgende Anforderungen erfüllen kann. Nach der FDA<sup>302</sup> sollte die maximale Abweichung bei der Präzision und der Richtigkeit bei 20 % liegen. Nach der ICH<sup>303</sup> sollte das Signal-Rausch-Verhältnis größer als 10:1 sein.

### 2.3.4. Präzision

Präzision bezeichnet den Grad der Übereinstimmung zwischen verschiedenen Messungen der gleichen Probe. Die Präzisionsberechnungen wurden in Wiederholungspräzision und

---

<sup>302</sup> US FDA (1994); US FDA (2001)

<sup>303</sup> ICH-Q2A (1995); ICH-Q2B (1996)

<sup>304</sup> Ermer & Miller (2005); Chandran & Singh (2007)

intermediäre Präzision (Reproduzierbarkeit) unterteilt. Erstere wurde durch Injektion von drei Proben an einem Tag bestimmt. Dies wurde an drei Tagen durchgeführt und die Daten aller drei Tage dienten zur Berechnung der intermediären Präzision. Die Präzision wurde für jeweils drei Konzentrationen der Referenzsubstanzen bestimmt sowie für einen Pflanzenextrakt. Nach den Anforderungen der FDA sollten alle Daten bei der Berechnung der Präzision und der Richtigkeit eine maximale prozentuale Abweichung von 15 % zeigen (20 % für den LLOQ-Wert).

### 2.3.5. Richtigkeit

Die Richtigkeit drückt den Grad der Übereinstimmung zwischen aktuellem Wert und wahren Wert aus. Sie wird hier als Wiederfindungsrate dieses wahren Wertes angegeben.

Aktueller Wert (AW): Mittelwert der experimentellen Peakfläche.

Wahrer Wert (WW): theoretische Peakfläche; berechnet durch Einsetzen der Referenzkonzentration in die Kalibrierfunktion.

## 2.4. *Allium cepa* L.

Die verwendeten Zwiebeln waren gelbe Zwiebeln der Sorte Stuttgarter Riese.

### 2.4.1. Extrakte

#### a) Fermentierte Extrakte

Die Aliquote der WALA-Tinkturen wurden 1:2 (v/v) in dest. Wasser verdünnt und vor Injektion in das HPLC-Gerät zentrifugiert. Die verwendeten LC-Methoden sind in Tab. G-11 und Tab. G-12 aufgeführt.

#### b) WALA-Matrix 33c

Es wurde zusätzlich ein „leerer“ Ansatz (ohne Pflanzen), nach Vorschrift HAB 33c, mit jeweils 6 mg/ml Honig und Laktose in dest. Wasser hergestellt.

#### c) Weitere Extrakte

Es wurde ein methanolischer und ein wässriger Extrakt aus jeweils 20 g frischen Zwiebeln (Ch. AC06, tiefgefroren), die dreimal mit 15 ml Methanol bzw. Wasser extrahiert wurden, hergestellt. Nach Vereinigung und Filtration der Auszüge – mittels Trichter und Filterpapier

bzw. durch Vakuumfiltration für den wässrigen Extrakt – wurde der methanolische Extrakt eingeeengt und der wässrige Extrakt gefriergetrocknet, bevor sie jeweils in 20 ml Wasser aufgenommen wurden. Die jeweils erhaltene Lösung (Endkonzentration 1 g/ml Frischgewicht) wurde zentrifugiert und der Rückstand nach Verdünnung (1:2, v/v) in Wasser mittels HPLC untersucht.

#### **2.4.2. Probenaufarbeitung zur GC–MS-Analyse**

1 ml Zwiebelextrakt wurde gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol aufgenommen, 5 min ins Ultraschallbad gehalten und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Vial überführt und in das GC–MS-Gerät injiziert.

#### **2.4.3. Pyruvatbestimmung<sup>305</sup>**

Die Pyruvatbestimmung wurde für drei Zwiebelextrakte (der fermentierte Extrakt 2006–M12, ein wässriger und ein methanolischer Extrakt, s. G2.4.1.c) sowie für die frischen, gemahlene Zwiebeln der Ch. AC06 (Grundlage der drei Extrakte) durchgeführt.

Die bei -20°C gelagerten Extrakte wurden aufgetaut, zentrifugiert (10 min bei 14000 rpm), filtriert (0.45 µm Spritzenfilter) und 1:10 mit Wasser verdünnt. Jeweils zweimal 0.25 ml Extrakt wurden mit 0.5 ml einer 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung (0.0125 % w/v in 2 mol/l HCl) und 0.75 ml Wasser in einem Reaktionsgefäß versetzt. Dieses Gemisch wurde kurz auf einem Vortexer gerührt und 10 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde es mit 2.5 ml einer 0.6 mol/l NaOH-Lösung versetzt und die Absorption der Lösung in Einmalküvetten bei 420 nm gemessen.

2 g gemahlene Zwiebeln wurden in einer Kaffeemühle mit 3 ml Wasser extrahiert. Der Brei wurde abzentrifugiert, filtriert (0.45 µm Spritzenfilter) und 1:10 mit Wasser verdünnt, bevor er wie die Extrakte weiterbehandelt wurde.

Es wurde eine Kalibrierkurve hergestellt, indem Kalibrierlösungen von 0.03–1 mmol/l aus einer 1 mmol/l Pyruvatsäure–Stocklösung vorbereitet, anschließend mit DNPH behandelt und photometrisch gemessen wurden.

---

<sup>305</sup> Abayomi & Terry (2009); Schwimmer & Weston (1961)

## 2.5. *Arnica montana*

### 2.5.1. Extrakte

#### a) Fermentierte Extrakte

Die Proben der fermentierten Extrakte wurden vor der GC–MS Analyse aufgearbeitet. Diese Aufarbeitung ist im Absatz G2.5.2 detailliert beschrieben.

#### b) Extraktion nach Willuhn und Leven<sup>306</sup>

1 g bereits gemöserte Frischpflanze (Ch. AM06) wurde zweimal mit 50 ml Wasser-Methanol (1:1, v/v) 30 min lang warm (ca. 60°C) extrahiert. Die vereinten filtrierten Auszüge wurden mit Santonin versetzt und wie im Absatz G2.5.2 beschrieben weiter behandelt.

#### c) Extrakt nach HAB 3c<sup>307</sup>

3 g bereits gemöserte Frischpflanze (Ch. AM06) wurden mit 1.50 g 43 % EtOH versetzt und bei 20°C in einem verschlossenen Gefäß 10 Tage lang unter wiederholtem Umschütteln gelagert. Danach wurde abgepresst und filtriert.

#### d) Kalter wässriger Extrakt

2 g bereits gemöserte Frischpflanze (Ch. AM06) wurde aufgetaut und dreimal 1 h unter Rühren in destilliertem Wasser (2 ml/g Droge) bei RT extrahiert. Der Auszug wurde jeweils nach Zentrifugieren mit der Pipette abgenommen. Die vereinten Phasen wurden eingefroren und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in destilliertem Wasser aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.8 g/ml Frischgewicht.

#### e) Herstellung der Matrix nach HAB 33c

Eine wässrige Lösung aus jeweils 6 mg/ml Honig und Laktose wurde mit Temperaturwechsel nach HAB 33c<sup>308</sup> hergestellt (s. Absatz G1.2) und dann bei -20°C gelagert.

### 2.5.2. Aufarbeitung der Extrakte nach Willuhn und Leven<sup>306</sup>

0.5–1.5 ml Extrakt wurde mit Santonin als internem Standard (0.1–0.2 ml einer 0.1 %igen methanolischen Lösung) versetzt und unter Vakuum reduziert, bis kein Methanol und

---

<sup>306</sup> Willuhn & Leven (1991)

<sup>307</sup> HAB 3 (2003)

<sup>308</sup> HAB 33 (2003)

Ethanol mehr vorhanden war. Der verbliebene wässrige Extrakt wurde dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgezogen, die Lösung eingedampft und anschließend in 10 ml 50 %igem Methanol gelöst. Die Lösung wurde mit Aluminiumoxid (3 g) versetzt und zentrifugiert, der Überstand einrotiert und in 1 ml Methanol gelöst.

### 2.5.3. Ermittlung des Gehalts an Sesquiterpenlactonen<sup>309</sup>

Nach der Aufarbeitung wurden die Proben mittels GC–MS mit dem im Absatz G2.1.2 aufgeführten Gradienten I und im SIM–Modus bei  $m/z$  244 und  $m/z$  246 analysiert. Die erste Masse diente der Flächenermittlung der Helenalinderivate, die zweite der der Dihydrohelenalinderivate. Alle zu untersuchenden Proben wurden zweifach aufgearbeitet. Der Gehalt wurde als Helenalinisobutyrat bzw. Dihydrohelenalinmethacrylat berechnet. Die Sesquiterpenlactonkonzentrationen wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Helenalinderivate:} \quad C_{\text{SL1}} [\mu\text{M}] = 0.5210 \times A_{\text{SL1,corr}}$$

$$\text{Dihydrohelenalinderivate:} \quad C_{\text{SL2}} [\mu\text{M}] = 0.680 \times A_{\text{SL2,corr}}$$

$$\text{Mit} \quad A_{\text{SL,corr}} = \frac{A_{\text{SL}}}{A_{\text{IST}}} \times C_{\text{IST}}$$

Hierbei ist  $C_{\text{IST}}$  die Konzentration und  $A_{\text{IST}}$  die Peakfläche des internen Standard Santonin,  $C_{\text{SL}}$  die Konzentration und  $A_{\text{SL}}$  die Peakfläche des zu bestimmenden Sesquiterpenlactons.

## 2.6. *Betula pendula*

### 2.6.1. Extrakte

#### a) Fermentierte Extrakte

Die Proben wurden aufgetaut, 1:3 (v/v) mit Wasser verdünnt, mittels Vortexer homogenisiert, zentrifugiert (2 min bei 14000 rpm) und der Überstand wurde mittels HPLC analysiert. Die verwendeten HPLC–Methoden sind in den Tab. G-11 und Tab. G-12 gegeben.

Die Validierung wurde anhand der Probe 2005–73 durchgeführt.

---

<sup>309</sup> Wagner & Merfort (2007)

b) HAB-Vorschrift 34e<sup>310</sup> und Varianten

Ein Ansatz aus frischen Blättern wurde in Anlehnung an die HAB-Vorschrift 34e selbst hergestellt. Da nach Vorversuchen 1 g Frischpflanze ca. 3.6 mg Hyperosid enthält, wurde zudem ein Ansatz nach gleicher Vorschrift mit 3.64 mg Hyperosid anstelle der Pflanze vorbereitet.

Dazu wurden drei Auszüge parallel angesetzt, mit der gleichen Konzentration an Pflanzen wie bei WALA, aber mit anderen Molke/Wasser-Verhältnissen und ohne der nach HAB vorgegebenen Temperaturwechsel.

Die verschiedenen Auszüge sind in Tab. G-14 zusammengefasst. Während der Herstellung dieser Auszüge wurde jeweils nach 24 h (Tag 1), nach dem Abpressen (Tag 3.5, im Fall „H3.6+“ wurde allerdings zentrifugiert und nicht abgepresst) und nach der Filtration am Tag 7 eine Probe gezogen. Danach wurden die Auszüge im Kühlschrank aufbewahrt (5°C). Zwei weitere Proben wurden nach 3 und 10 Wochen gezogen.

Die Birkenblätterextrakte wurden aufgetaut, zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und mit Wasser 1:3 (v/v) verdünnt. Nach weiterem Zentrifugieren wurden diese Lösungen in das HPLC-Gerät injiziert.

**Tab. G-14** Zusammensetzung der hergestellten Auszüge

Extrakt	Teile			Temperaturwechsel nach HAB
	Pflanze	Hyperosid	Molke	
HAB-34e	100		50	ja
W-	100		275	nein
WM-	100		137.5	nein
M-	100		275	nein
H3.6+		100 (3.64 mg)	50 (0.5 ml)	ja

c) Extrakterstellung für die Gehaltsbestimmung von Flavonoiden nach Ph.Eur.<sup>311</sup>

Laut Vorschrift des Europäischen Arzneibuches zur Gehaltsbestimmung der Flavonoide in Birkenblättern<sup>311</sup> wurden 0.2 g getrocknete Blätter (Ch. BP04) und 0.4 g frische Blätter (Ch. BP05) in einer analytischen Kaffeemühle gemahlen, mit jeweils 1 ml Methenaminlösung

<sup>310</sup> HAB 34 (2003)

<sup>311</sup> Europäisches Arzneibuch (2008b)

(5 g/l), 20 ml Aceton und 2 ml Salzsäure versetzt und 30 min unter Rückfluss extrahiert. Der erhaltene Auszug wurde filtriert, der Rückstand wieder 10 min unter Rückfluss extrahiert. Die vereinten Extrakte wurden mit Aceton auf 100 ml verdünnt.

d) Methanolischer Heißextrakt

1 g frische Blätter (Ch. BP05) bzw. 100 mg getrocknete Blätter (Ch. BP04) wurden kleingeschnitten und gründlich gerieben, mit 10 ml MeOH versetzt und dreimal 30 min unter Rückfluss extrahiert. Die zusammengefassten Auszüge wurden eingeeengt und in 10 ml MeOH (bzw. 1 ml für die getrocknete Droge) aufgenommen.

e) Heißextrakte zur erschöpfenden Extraktion

Frische, gefrorene Blätter (Ch. BP06) wurden unmittelbar vor der Extraktion gemörsert. Die Droge wurde dreimal 30 min in Methanol, Wasser oder Methanol/Wasser unter Rückfluss erhitzt (10 ml/g frischer Droge). Der Auszug wurde jeweils abfiltriert. Die drei entstandenen Auszüge wurden vereint und zur Trockene eingeeengt bzw. die rein wässrigen Extrakte gefriergetrocknet. Danach wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.4 g/ml. Die erhaltenen methanolischen Lösungen wurden vor der Injektion in das HPLC-Gerät 5:95 (v/v) mit Wasser verdünnt.

f) Kaltextrakte zur erschöpfenden Extraktion

Die frischen Blätter (Ch. BP06) wurden gemörsert, dreimal 1 h unter Rühren mit Methanol, Wasser oder Methanol/Wasser (10 ml/g frischer Droge) bei RT extrahiert. Der Auszug wurde jeweils abfiltriert. Die vereinten Phasen wurden zur Trockene eingeeengt bzw. die rein wässrigen Auszüge gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.4 g/ml. Die erhaltenen methanolischen Lösungen wurden vor der Injektion in das HPLC-Gerät 5:95 (v/v) mit Wasser verdünnt.

### 2.6.2. Aufarbeitung der fermentierten Extrakte zur GC-MS Analyse

1 ml Birkenblätterextrakt wurde gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol aufgenommen, kurz im Ultraschallbad behandelt (ca. 5 min) und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Vial überführt und in das GC-MS-Gerät injiziert (Temperaturgradient II).

### 2.6.3. Gehaltsbestimmung von Flavonoiden nach Ph.Eur.<sup>312</sup>

Der Gehalt einer getrockneter Droge (Ch. BP04), frischer Blätter (Ch. BP05) und eines fermentierten Extraktes (Ch. BP05) wurde nach Ph.Eur. bestimmt. Die Extraktion nach Ph.Eur. ist im Absatz G2.6.1.c) aufgeführt. Die gleiche Vorschrift wurde für 5 ml fermentierten Extrakt verwendet, indem er mit Aceton zu 100 ml verdünnt wurde.

20 ml acetonische Lösung wurde mit 20 ml Wasser versetzt und dreimal mit 10–15 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetat Phasen wurden vereint, zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und anschließend auf 50 ml mit Ethylacetat verdünnt.

Untersuchungslösung: 10 ml erhaltene Stammlösung wurden mit 1 ml Aluminiumchloridreagenz versetzt (0.02 g/ml Aluminiumchlorid in einer 5 %igen methanolischen Essigsäurelösung) und auf 25 ml mit einer 5 %igen methanolischen Essigsäurelösung verdünnt.

Kompensationsflüssigkeit: 10 ml erhaltene Stammlösung wurden auf 25 ml mit einer 5 %igen methanolischen Essigsäurelösung verdünnt.

Messung: Nach 30 min wurde die Absorption der Untersuchungslösungen bei 425 nm gegen die Kompensationsflüssigkeit gemessen. Der Prozentgehalt an Flavonoiden wurde als Hyperosid nach folgender Formel berechnet:  $C(\%) = A \times \frac{1.25}{m}$  wobei  $A$  die gemessene Absorption bei 425 nm und  $m$  die Einwaage der Droge in Gramm ist.

### 2.6.4. Isolierung von 3,4'-Dihydroxypropiophenon aus einem fermentierten Extrakt

Die Vorbereitung einer Sephadex-Säule ist im Absatz G2.2.1 detailliert aufgeführt. 4.9 ml fermentierter Extrakt (Probe 2008–M6) wurden gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand (160.3 mg) wurde in 2 ml Methanol aufgenommen, kurz im Ultraschallbad behandelt (5 min) und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben. Methanol diente als Laufmittel für die Auftrennung. Das Eluat wurde in 5 ml-Reagenzglaschen aufgenommen. Reinheitskontrollen wurden mittels DC (Fließmittelsystem 1, s. Sektion G2.2.4) sowie mittels HPLC und GC–MS durchgeführt. Somit konnte eine Fraktion erhalten werden, die

---

<sup>312</sup> Europäisches Arzneibuch (2008b)

hauptsächlich 3,4'-Dihydroxypropiophenon enthielt. Diese Fraktion wurde vakuum- und gefriergetrocknet und mittels NMR analysiert. Wegen der sehr kleinen Menge an isoliertem Produkt (2.5 mg) konnte kein  $^{13}\text{C}$ -Spektrum aufgenommen werden. Ein HSQC-Spektrum ermöglichte aber eine komplette strukturelle Aufklärung (nicht gezeigt). Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist in Abb. D-26 gezeigt. Folgende analytische Daten wurden ermittelt:

3,4'-Dihydroxypropiophenon ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ , 166.18 g/mol)

HPLC–DAD: RT=3.6 min

LC–MS: [M]=166 (nach Analyse im pos. und neg. Modus)

GC–MS (Gradient II): RT= 17.1 min;  $m/z$  166 (M, 14), 121 (100), 93 (19), 65 (15)

NMR: s. Absatz D3.3.5

UV:  $\lambda_{\text{max}}$ (HPLC-Laufmittel) nm: 277.

DC:  $R_f = 0.68$  (Fließmittelsystem 1); Färbung: löscht bei 254 nm, keine Fluoreszenz bei 366 nm, nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz leicht gelb, Fleck erscheint dann bei 366 nm stärker.

### 2.6.5. Entwicklung und Validierung einer HPLC–Methode<sup>313</sup>

Die Validierung wurde für Hyperosid auf System I (siehe Sektion G2.1.1) begonnen und aus organisatorischen Gründen auf System II weitergeführt, für Quercetin komplett auf System II durchgeführt.

Aufgrund der höheren Instabilität von Flavonoiden in wässrigen Extrakten wurden Standardabweichungen von maximal 5 % für Analysen der Referenzlösungen und 10 % für die Birkenblätterextrakte toleriert.

#### a) Linearität

Stammlösungen von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hyperosid und 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Quercetin in Methanol (HPLC–Qualität) wurden separat in 10 ml Messkolben hergestellt. Kalibrierlösungen wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit Methanol (HPLC–Qualität) vorbereitet, um Hyperosidlösungen von 2 bis 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und Quercetinlösungen von 1 bis 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zu erhalten. Jede Konzentration wurde doppelt bestimmt (Abb. D-18 bis Abb. D-20).

---

<sup>313</sup> Millet et al. (2010)

**b) Präzision**

Die Präzisionsanalyse vom System II wurde durch sechsmalige Injektion an einem Tag anhand einer Quercetin- (5 µg/ml) und einer Hyperosidprobe (50 µg/ml) durchgeführt.

Die Wiederhol- und Intermediärpräzision wurden durch Analyse von jeweils drei Proben verschiedener Konzentrationen über den ganzen Kalibrierungsbereich (1, 5 und 10 µg/ml Quercetin; 2, 50 und 200 µg/ml Hyperosid) sowie für einen fermentierten Extrakt (BW05-T3) ermittelt. Diese Messungen wurden dreimal pro Tag und an drei verschiedenen Tagen (Tab. D-9 bzw. Tab. D-11) wiederholt.

**c) Genauigkeit**

Die Genauigkeit wurde zuerst aus der Präzisionsstudie ermittelt. Dazu wurde ein Aufstockversuch gemacht mit einer Probe aus 50 µl fermentiertem Extrakt (BW05-T3) und einer Konzentration an Quercetin (1 µg/ml) bzw. zwei Konzentrationen an Hyperosid (45.10 und 153.75 µg/ml). Die erhaltenen Lösungen wurden mit Wasser auf 200 µl verdünnt (Tab. D-10 bzw. Tab. D-12).

**d) Robustheit**

Die Stabilität der Proben im Autosampler wurde ermittelt, indem 4 Proben (1, 5 und 10 µg/ml Quercetin sowie fermentierter Extrakt BW05-T3) dreimal pro Tag und an drei folgenden Tagen analysiert wurden (Tab. D-13). Dazu wurden diese Proben drei Tage lang im Autosampler (bei 20°C) belassen. Die drei Injektionsserien wurden jeweils mit einem Intervall von ca. 21 h mit der kleinsten Konzentration gestartet.

Der zweite Robustheitstest wurde durch Einfrieren und Auftauen zweier Proben, einer Hyperosidlösung mit 57 µg/ml und einer Quercetinlösung mit 5 µg/ml, durchgeführt (Tab. D-14). Die zwei Proben wurden jeweils in drei Aliquote verteilt, das erste wurde direkt in das HPLC-Gerät injiziert, das zweite wurde einmal und das dritte zweimal eingefroren, aufgetaut und dann injiziert.

**2.6.6. Analytische Daten zu den Abbauprodukten in den fermentierten Extrakten****a) *p*-Hydroxyphenylethanol**

HPLC-DAD: RT=3.8 min

UV: λ (nm)= 277

GC-MS: RT= 13.2 min (Gradient II); *m/z* 138 [M], 107 and 78

Vergleich: Aufstockversuch

b) Catechol (1,2-Dihydroxybenzol, auch Brenzcatechin)

HPLC–DAD: RT=5.3 min

UV:  $\lambda$  (nm)= 277

GC–MS: RT= 10.2 min (Gradient II);  $m/z$  110, 81 and 64

Vergleich: Aufstockversuch

c) Kaffeesäure

HPLC–DAD: RT=7.6 min

UV:  $\lambda$  (nm)= 298 (sh); 324

LC–MS: [M]=180 (nach Analyse im pos. und neg. Modus)

Vergleich: Aufstockversuch

d) *p*-Hydroxyphenylpropionsäure

HPLC: RT=8.3 min

UV:  $\lambda$  (nm)= 277

GC–MS: RT= 15.8 min (Gradient II);  $m/z$  110, 81 and 64

Vergleich: Aufstockversuch

e) *p*-Cumarsäure

HPLC: RT= 12.9 min

UV:  $\lambda$  (nm)= 310

LC–MS: [M]= 164 (nach Analyse im pos. und neg. Modus)

Vergleich: Aufstockversuch

## 2.7. *Gentiana lutea*

### 2.7.1. Extrakte

a) Fermentierte Extrakte

Die von Fa. WALA bereitgestellten Proben wurden zwischen 1:4 und 1:1 (v/v) mit Wasser verdünnt, zentrifugiert und in die HPLC injiziert. Die verwendeten analytischen Methoden sind in den Tab. G-11 und Tab. G-12 aufgeführt.~

b) HAB Vorschrift 33c mit Varianten<sup>314</sup>

Selbsthergestellte Ansätze wurden aus den frischen, gemahlene Wurzeln (Ch. GL06) nach der Vorschrift 33c des HAB mit folgenden Änderungen gewonnen:

- ohne Honig
- ohne Honig und ohne Laktose
- ohne Temperaturwechsel (eine Woche lang bei RT)

Während der Extraktionswoche wurden Proben nach 24 h, 3.5 und 7 Tagen entnommen. Nach dieser Woche wurden die Auszüge in den Kühlschrank gestellt (bei 5°C), und regelmäßig Proben während der folgenden 6 Monate entnommen. Diese Extrakte wurden wie die fermentierten Extrakte analysiert (G2.7.1.a).

- Gentiopikrosid mit Honig, Laktose und Temperaturwechsel nach HAB

17.8 mg isoliertes Gentiopikrosid (Fraktion F2, 75.8 % rein, siehe Absatz G2.7.4.b), was der Menge an Gentiopikrosid in 2 g frischen Wurzeln entspricht, wurden mit 2.5 ml dest. Wasser, 15 mg Laktose und 15 mg Honig versetzt. Proben aus dem Ansatz wurden nach 3 h, 24 h, 4 Tage, 1.5, 2.5 und 4 Monaten entnommen. Der Auszug wurde 1:9 (v/v) mit Millipore Wasser verdünnt und mittels HPLC analysiert. Der Ansatz wurde zweimal durchgeführt.

c) Dekokt nach HAB 23b<sup>315</sup>

1.0 g gemahlene Wurzeln (Ch. GL06) wurde mit 11 ml heißem Wasser versetzt und 30 min lang unter Rückfluss extrahiert. Danach wurde abgepresst und filtriert. Der resultierende Auszug wurde 1:2 (v/v) mit Wasser für die HPLC-Analyse verdünnt.

## d) Wässriger Kaltextrakt zur Bitterwertbestimmung

2 g frische, gemahlene Wurzeln (Ch. GL06) wurden dreimal mit jeweils 2 ml Wasser bei RT extrahiert. Die vereinten Auszüge wurden gefriergetrocknet und in Wasser aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.8 g/ml Frischgewicht. Der Extrakt wurde zur HPLC-Analyse 1:10 (v/v) mit Wasser verdünnt.

---

<sup>314</sup> HAB 34 (2003)

<sup>315</sup> HAB 23 (2003)

## e) Methanolischer Heißextrakt der getrockneten Droge

Die getrocknete, pulverisierte Droge (Ch. GL05) wurde dreimal 30 min in Methanol<sup>316</sup> unter Rückfluss erhitzt (25 ml/g Droge). Der Auszug wurde jeweils vakuumfiltriert. Die drei entstandenen Auszüge wurden vereint und zur Trockene eingengt. Danach wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.1 g/ml (auf dem Trockengewicht bezogen).

## f) Heißextrakte zur erschöpfenden Extraktion

Die frische Droge (Ch. GL06) wurde aufgetaut, gemörsert und dreimal 30 min in Methanol<sup>316</sup>, Wasser oder Methanol/Wasser unter Rückfluss erhitzt (10 ml/g frische Droge). Der Auszug wurde jeweils abfiltriert. Die drei entstandenen Auszüge wurden vereint und zur Trockene eingengt. Danach wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.4 g/ml. Die erhaltenen methanolischen Lösungen wurden dann 5:95 in Millipore-Wasser verdünnt vor Injektion in das HPLC-Gerät.

## g) Kaltextrakte zur erschöpfenden Extraktion

Die frischen Wurzeln (Ch. GL06) wurden aufgetaut, gemörsert und dreimal 1 h unter Rühren mit Methanol, Wasser oder Methanol/Wasser (10 ml/g frischer Droge) bei RT extrahiert. Der Auszug wurde jeweils abfiltriert. Die vereinten Phasen wurden zur Trockene eingengt bzw. für wässrige Auszüge eingefroren und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.4 g/ml. Die erhaltenen methanolischen Lösungen wurden anschließend mit Millipore-Wasser 5:95 (v/v) verdünnt und in das HPLC-Gerät injiziert.

h) Herstellung der Matrix nach HAB 33c<sup>317</sup>

Eine wässrige Lösung aus 6 mg/ml Honig und Laktose wurde nach HAB Temperaturwechsel hergestellt (s. Absatz G1.2) und anschließend bei -20°C gelagert.

**2.7.2. Bitterwertbestimmung**

Die Bestimmung des Bitterwerts wurde nach Vorgaben des Ph.Eur.<sup>318</sup> mit sieben Personen durchgeführt.

---

<sup>316</sup> Carnat et al. (2005)

<sup>317</sup> HAB 33 (2003)

Um Geschmacksunterschiede bei der Beurteilung der Bitterkeit innerhalb der Mitglieder des Arbeitskreises zu korrigieren, ist es erforderlich, einen Korrekturfaktor für jeden Prüfer zu ermitteln. Dieser wurde nach Testen verschiedener Verdünnungen einer Chininhydrochlorid-Lösung ermittelt.

Drei Auszüge wurden getestet: die fermentierten Extrakte 2006–T1 und –Mo12 sowie ein kalter wässriger Extrakt der gleichen Konzentration (s. Absatz G2.7.1.d). Es wurden daraus jeweils Verdünnungen hergestellt und die kleinste Konzentration, ab der jeder Prüfer den Bittergeschmack wahrnahm, diente zur Berechnung des Bitterwerts.

### 2.7.3. Isolierung von Gentisin

#### a) Xanthon-Extraktion

Die Xanthon-Extraktion und die Isolierung erfolgten nach der Vorschrift von Menkovic et al.<sup>319</sup> Der Extraktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt (Fließmittelsystem 2, Sektion G2.2.4). 75.0 g getrocknete Wurzeln wurden dreimal 12 h mit 200 ml MeOH bei RT extrahiert. Die vereinten Auszüge wurden eingeeengt. Der dickflüssige braune Rückstand (19 g) wurde in 150 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Sukzessive Extraktionen mit TBME (3 × 200 ml) und EtOAc (3 × 200 ml) ergaben nach dem Einengen die Fraktionen R<sub>TBME</sub> (1.65 g) bzw. R<sub>EtOAc</sub> (0.71 g). HPLC-Chromatogramme der zwei Fraktionen sind in den folgenden Abbildungen zu sehen (Abb. G-1 und Abb. G-2). Gentisin und Isogentisin (Abb. G-3) wurden fast quantitativ mit TBME extrahiert, die Bitterstoffe bevorzugt in der EtOAc-Phase angereichert. Diese Extraktionen wurden zweimal parallel durchgeführt.

---

<sup>318</sup> Europäisches Arzneibuch (2008c)

<sup>319</sup> Menkovic et al. (2002)

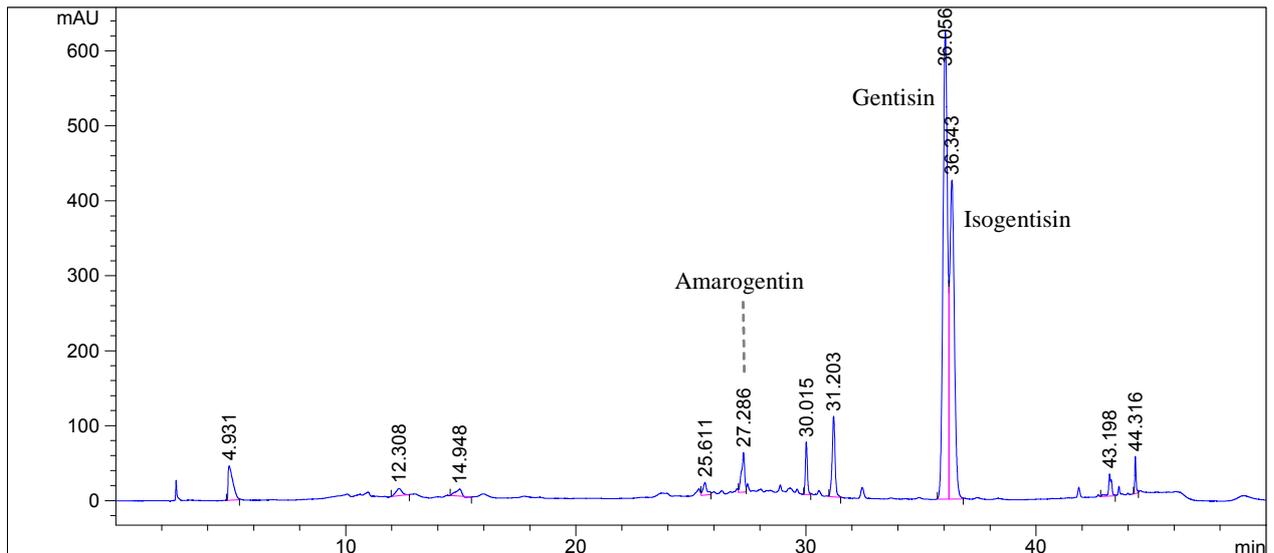


Abb. G-1 HPLC-Chromatogramm der TBME-Fraktion aus Enzianwurzel

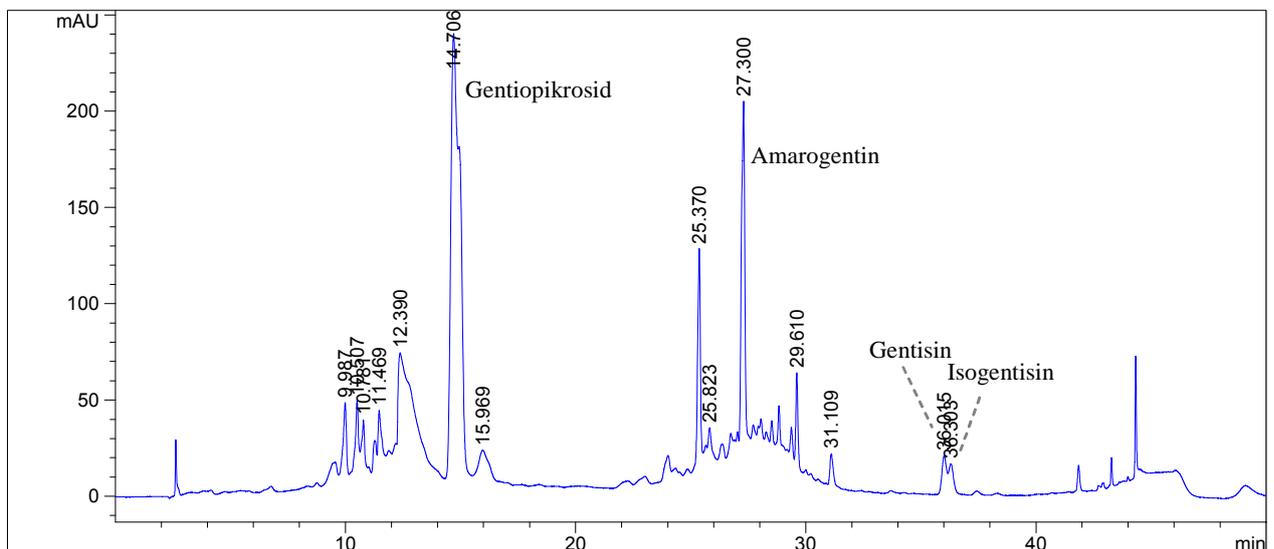


Abb. G-2 HPLC-Chromatogramm der EtOAc-Fraktion aus Enzianwurzel

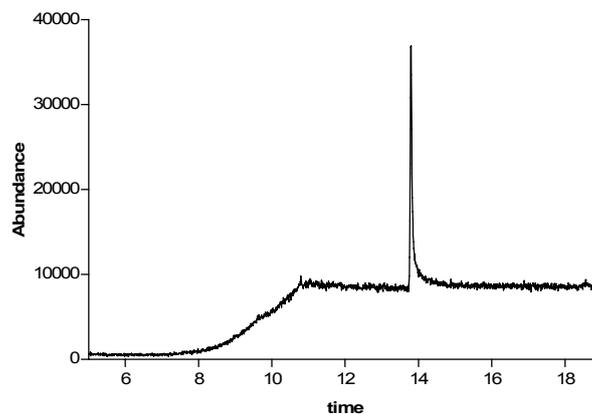


Abb. G-3 Die zwei Hauptxanthonderivate von *G. lutea*: Gentisin (a) und Isogentisin (b).

b) Säulenchromatographie und Umkristallisierung

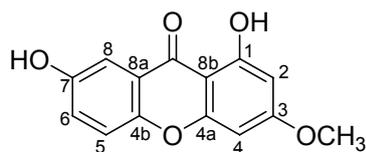
Die Fraktion  $R_{TBME}$  wurde mittels Säulenchromatographie weiter aufgearbeitet. Dafür wurde Kieselgel 60 in einer Säule von 4 cm ID und 30 cm Höhe gefüllt. Die Vorbereitung einer Kieselgelsäule ist im Absatz G2.2.1 detailliert erklärt. Das Laufmittel war ein Gemisch aus

Cyclohexan und Ethylacetat 6:4 (v/v). Gentisin und Isogentisin konnten nicht über die Kieselgelsäule getrennt werden, sie wurden zusammen eluiert. Verunreinigungen konnten aber abgetrennt werden, so dass die Endfraktionen lediglich Gentisin und Isogentisin enthielten. Weiterhin wurden die Fraktionen mit den zwei Xanthonen in kaltem Methanol umkristallisiert. Hierdurch konnten 54.2 mg reines Gentisin isoliert werden. Die Reinheit wurde über HPLC, GC-MS (Abb. G-4) und NMR (Abb. G-5, Abb. G-6) bestätigt. Übrig blieb ein Gemisch mit einem Überschuss an Isogentisin, das aber nicht rein isoliert werden konnte.



**Abb. G-4** GC-Chromatogramm von Gentisin nach Umkristallisation in kaltem Methanol

c) Analytik-Daten von Gentisin



Gentisin (1,7-dihydroxy-3-methoxyxanthone).

$C_{14}H_{10}O_5$ . 258.23 g/mol.  $^1H$ -NMR (400 MHz, [D5]-Pyridin)  $\delta$  = 8.00 (d,  $J=2.9$ , H-8); 7.54 (dd,  $J=9.0$ , 3.0, H-6); 7.47 (d,  $J=9.0$ , H-5); 6.57 (d,  $J=2.3$ , H-2); 6.53 (d,  $J=2.3$ , H-4); 3.73 (s,  $OCH_3$  an C-3).  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, [D5]-Pyridin)  $\delta$  = 182.3 (C=O); 168.3 (C-3); 165.1 (C-1); 159.5 (C-4<sup>a</sup>); 156.8 (C-7); 151.3 (C-4b); 126.6 (C-6); 122.9 (C-8<sup>a</sup>); 121.6 (C-5); 110.5 (C-8); 105.2 (C-8b); 98.6 (C-2); 94.0 (C-4); 57.2 ( $CH_3O$ ). MS (GC-MS, EI):  $m/z$  258 (M, 100), 229 (66). UV  $\lambda_{max}$ (MeOH) nm: 237, 259, 309, 373. DC:  $R_f$  = 0.88 (Fließmittelsystem 2); Färbung: löscht bei 254 nm, keine Fluoreszenz bei 366 nm, nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz leicht braun. Die NMR-, MS- und UV-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>320</sup>

<sup>320</sup> Hayashi & Yamagishi (1988); Ikeya et al. (1991)

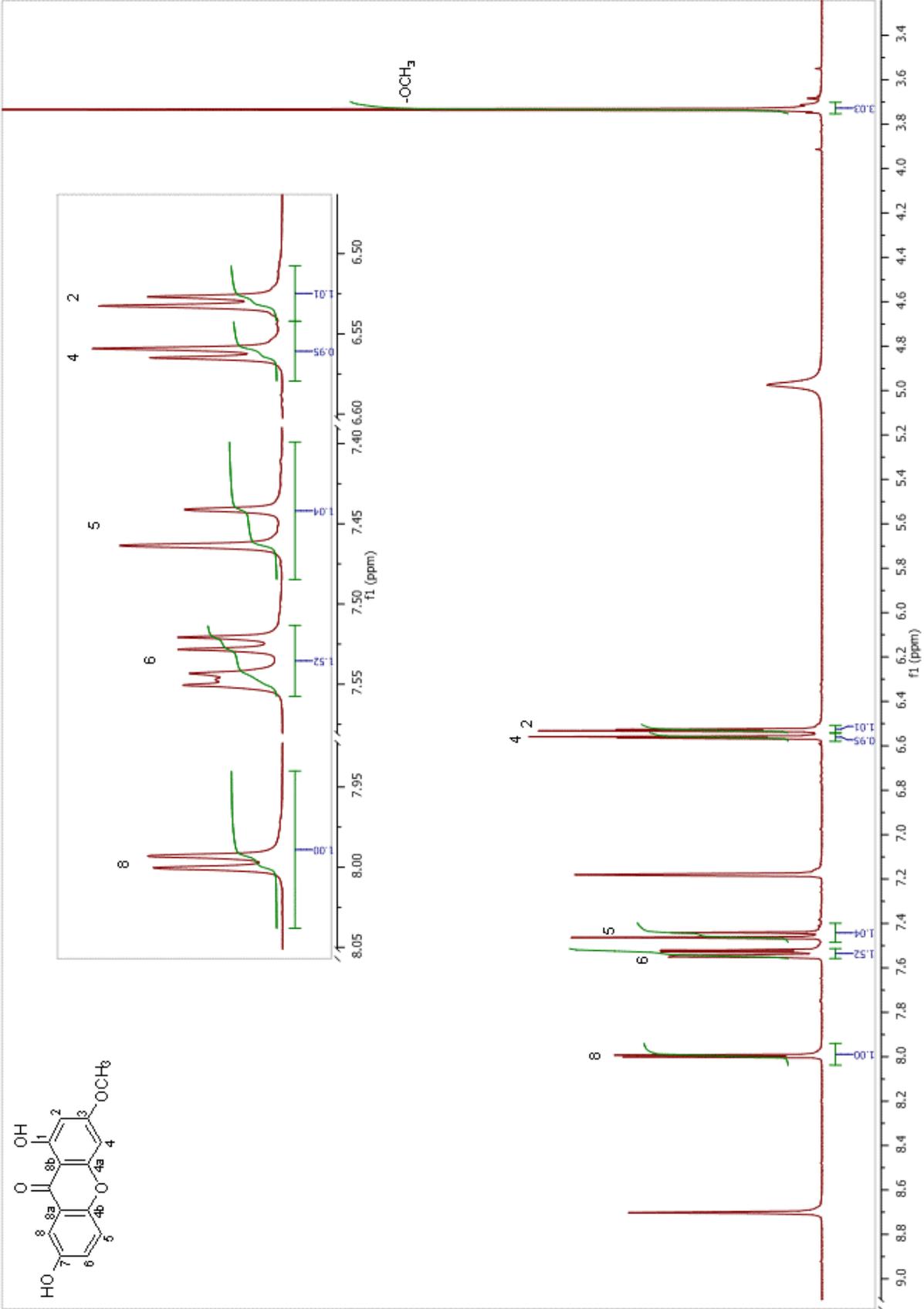
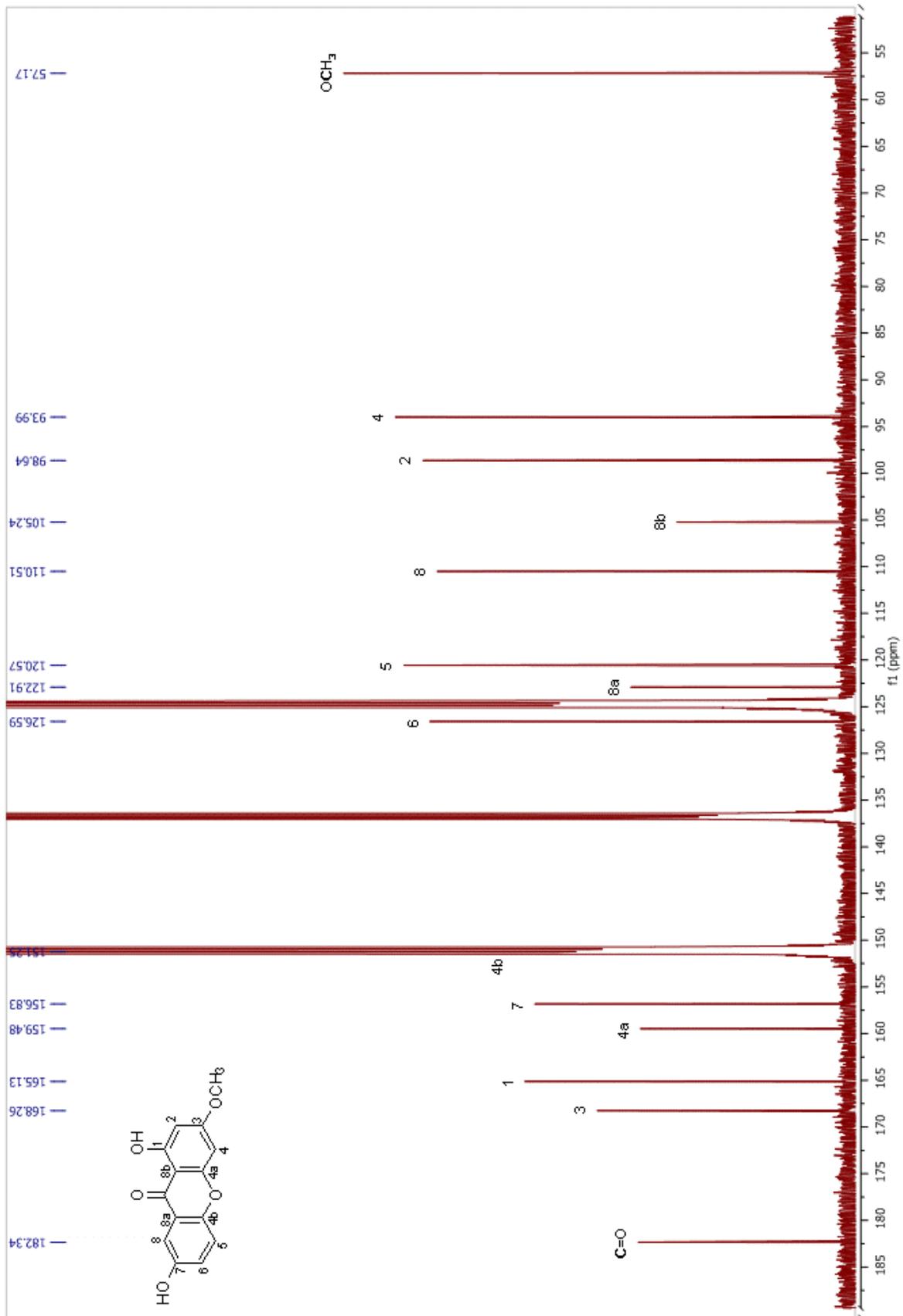
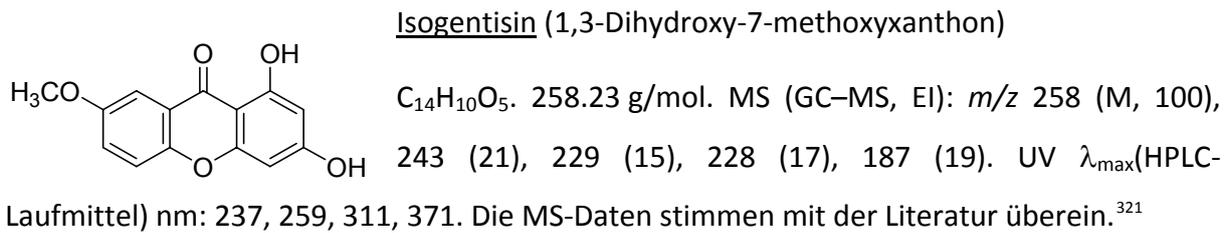


Abb. G-5 Gentisin: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, [D<sub>5</sub>]-Pyridin)



**Abb. G-6** Gentisin: <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, [D<sub>5</sub>]-Pyridin)

## d) MS- und UV-Daten von Isogentisin

**2.7.4. Isolierung von Gentiopikrosid**

## a) Gentiopikrosid Extraktion

Der Wasserrückstand aus der Gentsinextraktion wurde weiterverwendet, um daraus Gentiopikrosid zu isolieren. Hierzu wurde der Rückstand gefriergetrocknet. Das Gesamtgewicht nach Gefrier Trocknung betrug 49.119 g. Obwohl Methanol quantitativ Gentiopikrosid extrahierte, wurde im folgenden *n*-Butanol verwendet, wodurch die Zuckerfraktion abgetrennt werden konnte, um die spätere Aufreinigung zu erleichtern. Das Iridoidglykosid wurde einmal mit 135 ml und zweimal mit 70 ml *n*-Butanol extrahiert, jeweils 12 h bei RT. Die Auszüge wurden vereint und zur Trockene eingengt. Das Gewicht des Auszuges betrug 1.623 g. Die Quantifizierung mittels HPLC erbrachte 269 mg Gentiopikrosid. Der Rest, sehr reich an Zuckern, wurde in Methanol aufgenommen.

## b) Mitteldruck-RP-Säulenchromatographie

Ein Teil des Auszuges (0.975 g) wurde in 2 ml Methanol verdünnt und auf einer RP18-Säule (s. Absatz G2.2.2) gegeben. Laufmittel war zu Beginn 15 % Methanol, dass nach jeder Stunde um 5 % Methanol erhöht wurde. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1.4 ml/min. Gentiopikrosid wurde bei 30 % Methanol eluiert.

Es wurden drei Gentiopikrosid-Fractionen erhalten: die erste enthielt zusätzlich Loganinsäure und Swertiamarin (F1), die zweite sehr geringe Mengen an Swertiamarin und Swerosid (F2), die letzte zusätzlich nur Swerosid (F3). Die Gewichte und mittels HPLC ermittelten Anteile an Gentiopikrosid sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

---

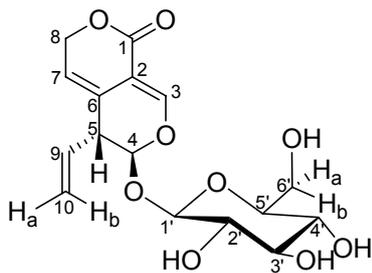
<sup>321</sup> Pinheiro et al. (1998)

**Tab. G-15** Gewicht und Konzentration an Gentiopikrosid der drei Fraktionen nach RP18-Säule

Fraktion	Gewicht	Konzentration Gentiopikrosid
F1	15.8 mg	74.9 %
F2	90.7 mg	75.8 %
F3	77.9 mg	61.0 %

Von der Fraktion F2 wurden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analysen durchgeführt (Abb. G-7 und Abb. G-8).

c) NMR- und UV-Daten von Gentiopikrosid (Fraktion F2)



**Gentiopikrosid** ((5R,6S)-6-((2S,3S,4S,5S)-tetrahydro-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2H-pyran-2-yloxy)-5,6-dihydro-5-vinyl-pyrano[3,4-c]pyran-1(3H-on)).

$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_9$ . 356.32 g/mol.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.48 (d,  $J=1.3$ , H-3); 5.79 (ddd,  $J=17.2$ , 10.3, 6.9, H-9); 5.69 (d,  $J=2.9$ , H-4); 5.63-5.66 (m, H-7); 5.27 (ddd,  $J=17.2$ , 1.4, 1.4, H-10b); 5.24 (ddd,  $J=10.3$ , 1.4, 1.3, H-10<sup>a</sup>); 5.11 (ddd,  $J=17.7$ , 2.5, 1.1, H-8<sup>a</sup>); 5.06 (dd,  $J=17.7$ , 3.6, H-8b); 4.67 (d,  $J=8.0$ , H-1'); 3.93 (dd,  $J=11.9$ , 2.2, H-6'b); 3.68 (dd,  $J=11.9$ , 6.13, H-6'a); 3.32-3.41 (m, H-5), H-3', H-5'); 3.27 (dd,  $J=9.5$ , 9.0, H-4'); 3.18 (dd,  $J=9.1$ , 8.0, H-2').  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 166.3 (C-1); 150.6 (C-3); 135.0 (C-9); 127.0 (C-6); 118.5 (C-10); 117.2 (C-7); 105.0 (C-2); 100.2 (C-1'); 98.5 (C-4); 78.4 (C-5'); 78.0 (C-3'); 74.6 (C-2'); 71.5 (C-4'); 70.9 (C-8); 62.8 (C-6'); 46.6 (C-5). MS (LC-MS, pos.ESI):  $m/z$  395 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ ), 379 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 357 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). MS (LC-MS, neg.ESI):  $m/z$  355 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ). UV  $\lambda_{\text{max}}$ (HPLC-Laufmittel) nm: 242, 275. Die NMR-, MS- und UV-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>322</sup> DC:  $R_f=0.38$  (Fließmittelsystem 2); Färbung: löscht bei 254 nm, keine Fluoreszenz bei 366 nm, nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz dunkelbraun.

<sup>322</sup> Changzeng & Dequan (1997); Takeda et al. (1999); Zhou et al. (2006)

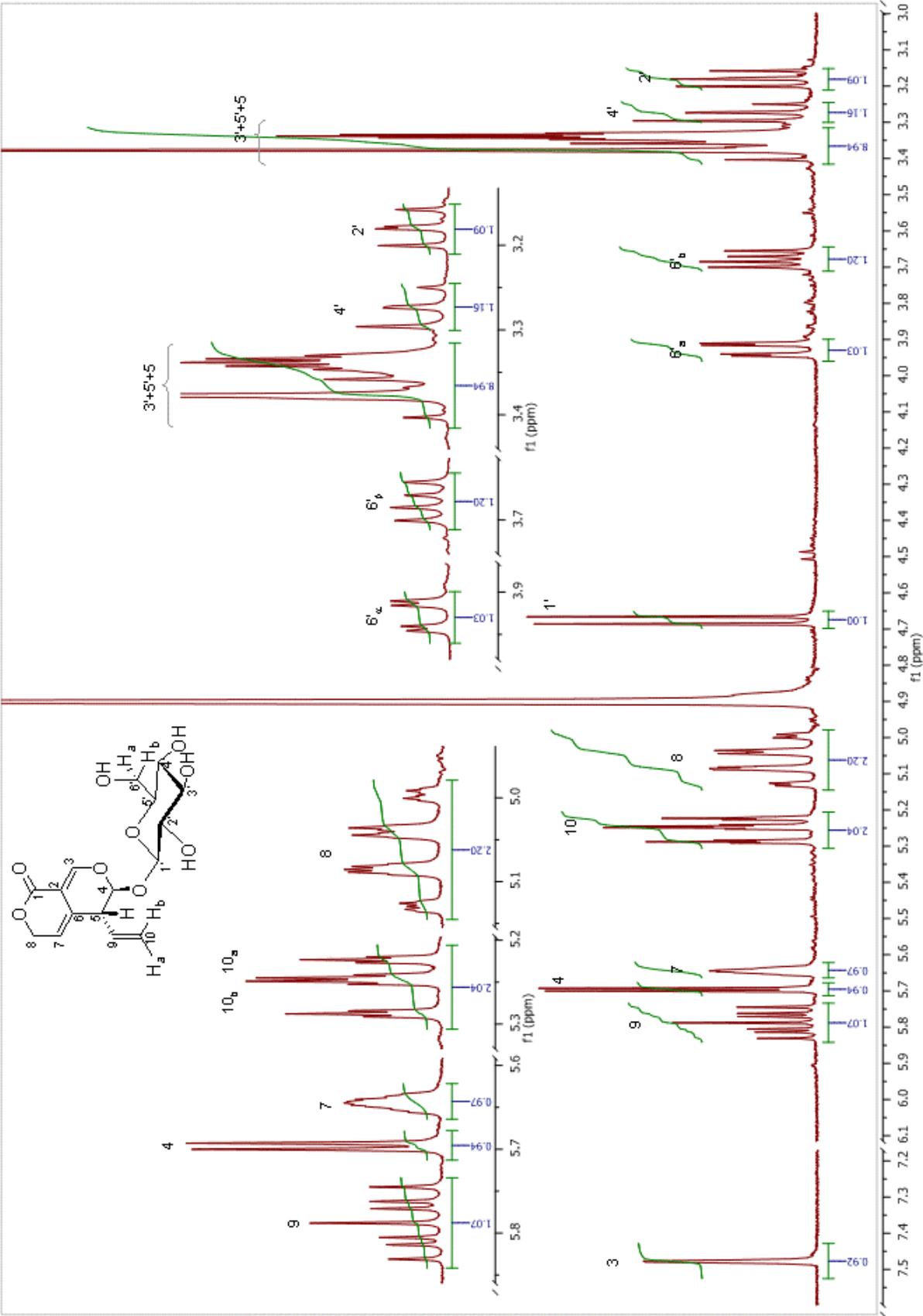


Abb. G-7 Gentiopikrosid: <sup>1</sup>H-NMR (Fraktion F2, 400 MHz, [D<sub>4</sub>]-Methanol)

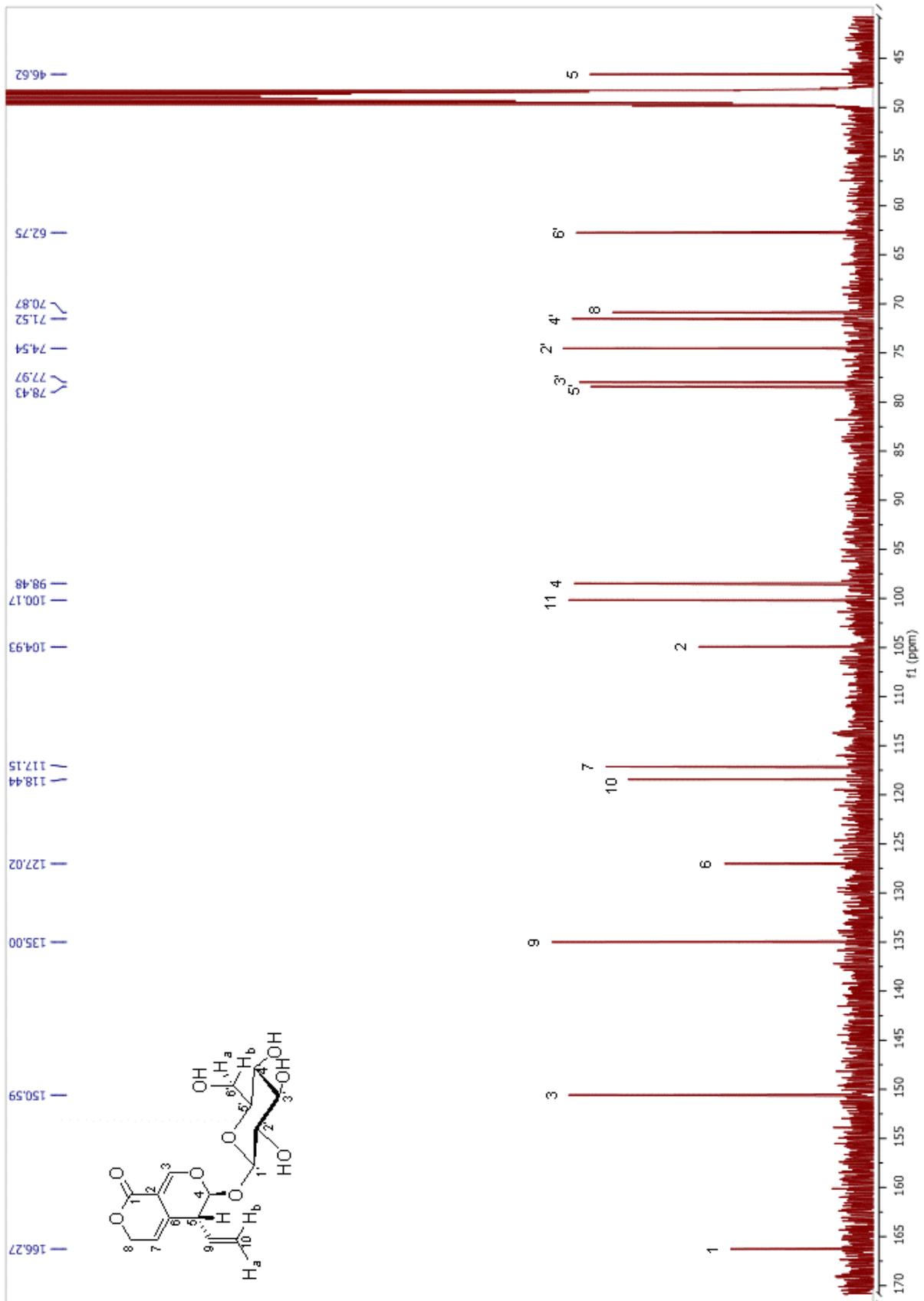


Abb. G-8 Gentiopikrosid:  $^{13}\text{C}$ -NMR (Fraktion F2, 400 MHz,  $[\text{D}_4]\text{-Methanol}$ )

### 2.7.5. Isolierung des Peaks P3 durch Fraktionierung einer Urtinktur mittels RP-18 Lobar-Chromatographie

5 ml Urtinktur aus 2006 wurden mit einer RP-18 Säule aufgetrennt. Zwei Aliquote aus der fertigen Urtinktur von 2006, einmal 2 und einmal 3 ml wurden gefriergetrocknet und ergaben ein Gewicht von 125 bzw. 180 mg. Sie wurden jeweils säulenchromatographisch an einer RP18–Säule aufgetrennt (s. Absatz G2.2.2). Der Fluss betrug 1 ml/min, der Lauf begann mit 30 % Methanol, wobei der Anteil an Methanol anschließend stetig erhöht wurde. Die Detektion erfolgte bei 235 nm. Die gesammelten Fraktionen wurden per DC (Fließmittel 2, Sektion G2.2.4) und HPLC analysiert.

Hierbei wurde eine unbekannte Substanz, P3, isoliert werden (Peak bei 17.6 min, Abb. G-8). Die gesammelten Fraktionen aus zwei separaten Fraktionierungen, wurden vereint, im Vakuum eingengt und gefriergetrocknet (1.69 mg). Diese Probe wurde zur MS– und NMR–Analyse verwendet.

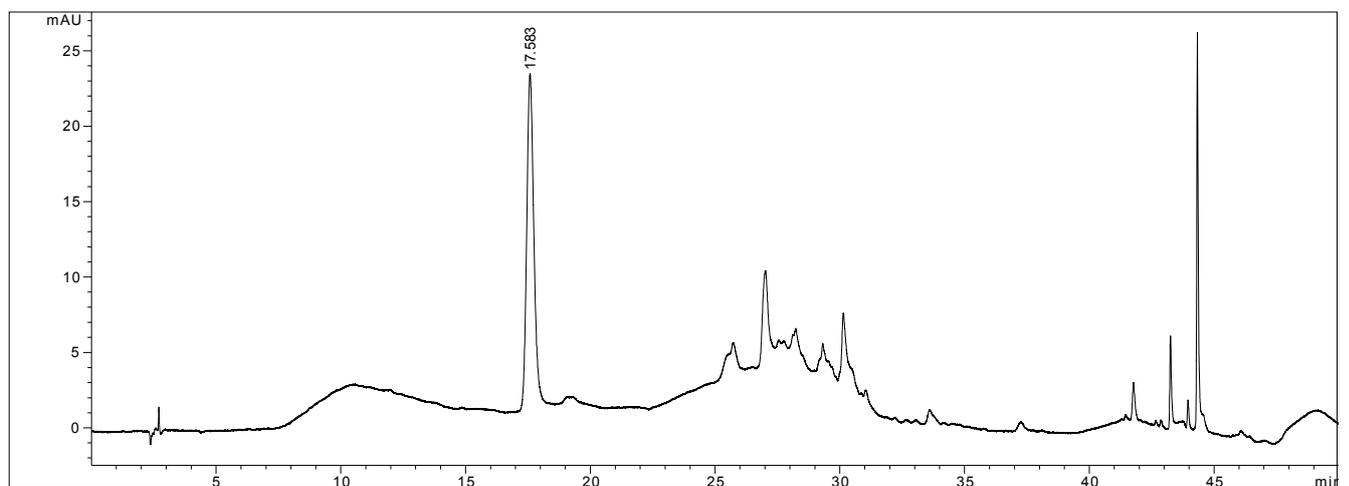
Der HPLC-Peak P3 (Gemisch zweier Stoffe) ergab folgende analytische Daten:

DC: Keine Detektion aufgrund der geringen Menge.

UV:  $\lambda_{\max}$ (HPLC-Laufmittel) nm: 228, 300.

MS (dir.EI):  $m/z$  176 (M, 100), 148 (28), 120 (65), 119 (77), 91 (66). MS (dir.pos.APCI):  $m/z$  177 ( $[M+H]^+$ ). MS (dir.neg.APCI):  $m/z$  175 ( $[M-H]^-$ ).

NMR: s. Absatz D4.3.3



**Abb. G-9** HPLC–Chromatogramm der Fraktion mit P3 (bei 17.6 min; die anderen Peaks sind Verunreinigungen aus der Säule bzw. Geisterpeaks; Detektion bei 235 nm).

### 2.7.6. Versuch zur Methylierung von E2 aus P3

Die isolierte Fraktion P3 (Gemisch aus Erythrocentaurin und E2; ca. 1 mg) wurde mit einem Tropfen TMS–Diazomethan (in Methanol/Benzol 2:7, bei RT, unter Stickstoff) versetzt. Nach ca. 15 min wurde das Lösungsmittel am Vakuum abgetrennt und die Probe mittels NMR analysiert.

### 2.7.7. Entwicklung und Validierung einer HPLC–Methode

Die Validierung der Methode zur Bestimmung der Inhaltsstoffe in den Enzianwurzelextrakten umfasste folgende Parameter: Spezifität, Linearität, Präzision und Genauigkeit. Sie wurde nach den Richtlinien der FDA<sup>323</sup>, unter Berücksichtigung der ICH-Vorgaben<sup>324</sup> durchgeführt. Die verschiedenen Begriffe sind im Absatz G2.3 erklärt.

#### a) Spezifität

Peakauflösung und -reinheit (von ChemStation Software berechnet) wurden verifiziert. Die Matrix der WALA-Enzianextrakte (dest. Wasser mit Laktose und Honig versetzt) wurde in das HPLC-Gerät injiziert, um das Rauschen der Basislinie zu ermitteln und um zu überprüfen, dass diese die Quantifizierung der Hauptkomponenten nicht beeinträchtigt.

#### b) Linearität

Kalibrierungen wurden für Gentiopikrosid, Amarogentin, Swertiamarin, Loganinsäure und Gentsin mittels Referenzsubstanzeninjektionen durchgeführt. Für die vier Iridoide wurden 0.1 %ige Stammlösungen in Methanol zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt. Für Gentsin wurde eine 0.1 mg/ml Stammlösung in Acetonitril hergestellt und mit Wasser/Acetonitril 4:1 (v/v) verdünnt. Die Injektionen wurden jeweils zwei Mal durchgeführt.

#### c) Präzision und Genauigkeit

Die Methodenpräzision wurde für jeweils drei Konzentrationen an Referenzsubstanz bestimmt sowie für eine Probe fermentierten Extrakt (2006–T3) und einen methanolischen Enzianwurzelauszug der Konzentration 25 mg/ml. Um die Genauigkeit zu ermitteln, wurden Wiederfindungsraten aus diesen Experimenten berechnet.

---

<sup>323</sup> US FDA (1994); US FDA (2001)

<sup>324</sup> ICH-Q2A (1995); ICH-Q2B (1996)

## **2.8. *Hypericum perforatum***

### **2.8.1. Extrakte**

#### a) Fermentierte Extrakte

Die von der Fa. WALA bereitgestellten Proben, wurden zwischen 1:1 und 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt, zentrifugiert und in das HPLC-Gerät injiziert. Die verwendeten Methoden sind in den Tab. G-11 und Tab. G-12 wiedergegeben.

#### b) Methanolische Extrakte

200 mg bereits gemörserte Pflanze (Ch. HP06) wurde dreimal 20 min im Ultraschallbad (RT) in 1 ml 50 %igen Methanol extrahiert. Die vereinten Auszüge wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und in 2 ml 50 %igen Methanol aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.1 g/ml. Zur HPLC-Analyse wurde dieser Extrakt 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt.

### **2.8.2. Aufarbeitung der fermentierten Extrakte zur Anreicherung von Naphthodianthronen und Phloroglucinolen**

Eine Auswahl fermentierter Extrakte (2006-T1 und -M2; 2007-T1, -T7 und -M3; 2008-T1, -T7 und -M2) wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils 1:1 (v/v) mit Methanol verdünnt und in das HPLC-Gerät injiziert. Falls vorhanden wurde der Rückstand mit 1 ml Methanol extrahiert (10 min im Ultraschallbad bei RT). Der dabei erhaltene methanolische Extrakt wurde nach Zentrifugieren ebenfalls mittels HPLC analysiert.

## **2.9. *Nicotiana tabacum***

### **2.9.1. Extrakte**

#### a) Fermentierte Extrakte

30 µl aus den von der Fa. WALA bereitgestellten Proben wurden jeweils mit 100 µl Anabasin-Stammlösung (0.1 µg/ml) versetzt und auf 1 ml mit Methanol verdünnt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben mittels GC-FID untersucht.

b) Methanolische Extrakte

9 g frische Tabakblätter (Ch. NT06) wurden geschnitten, gemörsert und dreimal 1 h bei RT in 20 ml Methanol extrahiert. Die zusammengefassten Auszüge wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt und in 10 ml 50 %igen Methanol aufgenommen. Die Endkonzentration entsprach 0.9 g/ml. Zur HPLC-Analyse wurde dieser Extrakt 1:1 (v/v) mit Wasser verdünnt. Zur GC-Analyse wurde er wie die fermentierten Extrakte behandelt (Absatz a).

c) Auszüge zur erschöpfenden Extraktion

Ca. 50 g frische Blätter (Ch. NT06) wurden abgewogen, geschnitten und im Mörser zerkleinert. Der Blätterbrei wurde in Aliquote zu je 2 g (genau gewogen) geteilt und diese wurden unmittelbar eingefroren (-20°C). Kurz vor der Extraktion wurden diese Aliquote auf RT gebracht. Jede Extraktion bestand aus insgesamt drei Extraktionsschritten mit je 20 ml Extraktionsmittel. Nach jedem Extraktionsschritt wurde filtriert und der Filter anschließend abgekratzt. Der Rückstand wurde wiederum mit 20 ml Extraktionsmittel extrahiert. Die drei Extrakte wurden dann vereint und der pH-Wert überprüft. Nach dem Einengen wurde der Rückstand in Methanol p.a. aufgenommen (Endkonzentration 1.33 g/ml Frischgewicht). An diesen Lösungen wurde wiederum der pH-Wert überprüft.

Dabei wurden verschiedene Bedingungen getestet:

- Das Extraktionsmittel war ein Methanol-Wasser Gemisch mit verschiedenen Verhältnissen.
- Die Auszüge wurden entweder kalt (RT, 1 h Extraktion), heiß (unter Rückfluss, 30 min Extraktion) oder im Ultraschallbad<sup>325</sup> (RT, 40 min) durchgeführt;
- Dem Extraktionsmittel wurde 0.5 % Essigsäure<sup>326</sup> oder 3.5 % Ammoniak<sup>327</sup> zugesetzt.

Die Extraktion mit Ammoniak verlief etwas anders, indem die 2 g frische Droge zuerst mit 4 ml Ammoniak übergossen und 15 min quellen gelassen wurde.

Aus den Methanolextrakten wurden anschließend die GC-Proben hergestellt. Für eine erste Probe zur qualitativen Kontrolle wurden 30 µl Extrakt auf 1 ml mit Methanol verdünnt. Die

---

<sup>325</sup> Armstrong et al. (1999)

<sup>326</sup> Keinänen et al. (2001)

<sup>327</sup> Yang et al. (2002)

zweite Probe zur Gehaltsbestimmung enthielt 30 µl Extrakt/ml Methanol und dazu 10 µg/ml Anabasin als internen Standard.

### **2.9.2. Probenaufarbeitung zur Analyse von Minorverbindungen mittels GC–MS**

1 ml fermentierter Tabakblätterextrakt wurde gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol aufgenommen, kurz im Ultraschallbad gehalten (~5 min) und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Glasfläschen überführt und in das GC–MS-Gerät injiziert (Temperaturgradient II).

### **2.9.3. Entwicklung und Validierung einer GC–FID Methode<sup>328</sup>**

Lediglich Nikotin konnte mittels GC–FID detektiert werden, weswegen lediglich Nikotin quantifiziert wurde. Da Anabasin in den Wala-Extrakten nicht mittels GC-MS zu detektieren war (Vergleich Abb. D-50 und Abb. D-51), wurde es für die Quantifizierung von Nikotin als Innerer Standard benutzt.

#### **a) Linearität**

Nikotin wurde durch Injektion von Referenzsubstanzen kalibriert. Es wurden methanolische Stammlösungen von 0.1 mg/ml von Nikotin bzw. Anabasin in 10 ml-Messkolben vorbereitet. Die Kalibrierlösungen wurden hergestellt, indem 100 µl Anabasinstocklösung mit 50–600 µl Nikotinstammlösung gemischt und auf 1000 µl mit Methanol verdünnt wurden. Die Anabasinkonzentration in allen Kalibrierlösungen sowie in den Proben zur Quantifizierung betrug jeweils 10 µg/ml. Die Referenzsubstanzlösungen wurden jeweils zweimal injiziert. Die Kalibrierlösungen hatten eine Konzentration zwischen 5 und 60 µg/ml.

#### **b) Präzision**

Eine Nikotinprobe (30 µg/ml Nikotin + 10 µg/ml Anabasin) wurde sechsmal am gleichen Tag injiziert, um die Stabilität des Systems (GC + Säule) zu zeigen. Die langfristige Systemstabilität wurde kontrolliert, indem der ferm. Extrakt (2006, T3) bei -20°C gelagert und mit 5 Monaten Abstand analysiert wurde.

Für die Wiederhol- und intermediäre Präzision wurden vier Proben vorbereitet: drei Nikotinproben der Konzentrationen 5, 30 und 60 µg/ml und ein ferm. Extrakt (2006, T3)

---

<sup>328</sup> Millet et al. (2009)

20 µl/ml in Methanol verdünnt. Die Proben wurden mit 10 µg/ml Anabasin versetzt und jeweils aliquotiert und eingefroren, so dass an jedem Tag ein neues Aliquot aufgetaut wurde. Diese Proben wurden an 3 Tagen jeweils dreimal injiziert. Das erste Aliquot aus Tabakblätterextrakt wurde sechsmal injiziert, die anderen dreimal.

Um die Wiederholpräzision beim Pipettieren zu berechnen, wurden sechs Nikotinproben (30 µg/ml) aus einer gleichen Stammlösung pipettiert.

Um die Wiederholpräzision bei der Probenaufarbeitung zu ermitteln, wurden 6 Nikotinproben (30 µg/ml) aus 6 frisch hergestellten Stammlösungen vorbereitet.

Um die Wiederfindungsrate beim Aufstocken zu berechnen, wurden drei Proben aus einem ferm. Tabakblätterextrakt (2006, T3) vorbereitet und mit verschiedenen Konzentrationen an Nikotin aufgestockt. Die Proben enthielten 20 µl/ml der Tinktur, d. h. theoretisch 7.10 µg/ml Nikotin. Die dazu gespikten Mengen an Nikotin sind in der nächsten Tabelle gegeben.

c) Richtigkeit

Ein Aufstockexperiment wurde durchgeführt, um dabei die Wiederfindungsrate von Nikotin zu berechnen. Ein ferm. Extrakt (2006–T3, mittlere Konzentration 7.1 µg/ml) wurde mit drei Konzentrationen an Nikotin aufgestockt. Dafür wurden 20 µl des Extrakts mit 100 µl Anabasinstocklösung und entweder 50, 300 oder 600 µl Nikotinstammlösung versetzt. Jede erhaltene Probe wurde mit Methanol auf 1000 µl verdünnt.

d) Robustheit

Für die Robustheit wurde die Stabilität bei mehrmaligen Einfrieren und Auftauen einer Referenzlösung überprüft. Hierzu wurde eine Nikotinlösung (30 µg/ml) dreimal täglich, 3 Tage lang gaschromatographisch analysiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und jeweils 30 min vor der ersten Injektion bei RT aufgetaut. Nach der dritten Injektion wurden die Proben wieder eingefroren.

### 3. Biologische Untersuchungsmethoden

#### 3.1. Mikrobiologische Untersuchung der fermentierten Extrakte

Alle Proben der fermentierten Extrakte wurden durch die Firma WALA GmbH auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar untersucht. MRS-Agar dient der Isolierung, Keimzahlbestimmung und Kultivierung von *Lactobacillus* spp.

#### 3.2. Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von Zwiebelextrakten

Die Testlösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und am Anfang der Experimente tiefgefroren. Sie wurden kurz vor Gebrauch bei RT aufgetaut. Testlösungen waren eine fertige fermentierte Urtinktur (2006–M12, ca. 1 g/ml Frischgewicht), ein wässriger und ein methanolischer Extrakt, wobei letzterer zur Trockene einrotiert und wieder in Wasser aufgenommen wurde (beide mit einer Endkonzentration von 1 g frischen Zwiebeln/ml). Destilliertes Wasser (steril) diente als Negativ- und Octenisept (Wunddesinfektionsmittel, Schülke-Mayr, Norderstedt) als Positiv-Kontrolle. Die 10 benutzten ATCC Bakterienstämme sind in der nächsten Tabelle gelistet.

**Tab. G-16** Verwendeten Bakterienstämme

Gramnegative	Grampositive
<i>Klebsiella (K.) pneumoniae</i> – ATCC 700603	<i>Staphylococcus (S.) aureus</i> (MSSA) – ATCC 29213
<i>Stenotrophomonas (S.) maltophilia</i> – ATCC 13637	MRSA – ATCC 43300
<i>Escherichia (E.) coli</i> – ATCC 25922	<i>S. epidermidis</i> – ATCC 12228
<i>Pseudomonas (Ps.) aeruginosa</i> – ATCC 27853	<i>Enterococcus (E.) faecalis</i> – ATCC 29212
<i>Acinetobacter (A.) baumannii</i> – ATCC 19606	<i>E. faecium</i> – ATCC 6057

Die anfängliche Vorgehensweise der in Absätze G3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Experimente war wie folgt: Bakteriensuspensionen der 10 Bakterienstämme in Tryptone Soya Bouillon (TSB, Oxoid, Basingstoke, GB), die ursprünglich auf Blutagar kultiviert wurden (heipha Dr. Müller GmbH, Germany), wurden auf eine Konzentration von  $10^8$  KBE/ml (koloniebildende Einheiten) mittels photometrischer Messung eingestellt (MicroScan Turbidity Meter, Dade Behring, Chicago, USA).

### 3.2.1. Agardiffusionstest

Die  $10^8$  KBE/ml enthaltenden Bakteriensuspensionen wurden auf  $10^5$  KBE/ml mit TSB verdünnt. Diese wurden auf Müller-Hinton (MH) Agarplatten (Merck, Darmstadt) gegossen und auf der Oberfläche verteilt. Der Überstand wurde abpipettiert. Die Agarplatten wurden mindestens 15 min bei RT stehen gelassen, bis sie trocken waren, bevor sie ausgestanzt wurden (6 mm Durchmesser). Je 50  $\mu$ l der Testlösungen wurden unverdünnt in die entstandenen Lücken pipettiert. Der Agardiffusionstest wurde für alle Bakterienstämme zwei Mal durchgeführt.

### 3.2.2. Bakterienwachstumskinetik

Die  $10^8$  KBE/ml enthaltenden Bakteriensuspensionen wurden auf  $10^4$  KBE/ml mit TSB verdünnt. 1 Teil Urtinktur bzw. Wasser oder Octenisept wurde mit 9 Teilen dieser Bakteriensuspensionen gemischt. Diese Lösungen wurden in 3 Reaktionsgefäße (1.5 ml, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) verteilt, die jeweils 0, 4 und 24 h bei 37°C inkubiert wurden. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde ein bestimmtes Volumen auf MH-Agarplatten ausplattiert. Diese Platten wurden wiederum 24 h inkubiert, bevor sie ausgezählt wurden. Die Wachstumskinetik wurde mindestens zwei Mal pro Bakterienstamm durchgeführt.

## 3.3. Bestimmung der Wirkung der Arnikaextrakte auf den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B

Die Aktivitätsbestimmung wurde mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt.

### 3.3.1. Material

**Tab. G-17** Für die EMSAs verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Lsg., wässrig (30 % AA, 0,8 % Bis)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Merck, Darmstadt
Aprotinin (from Bovine Lung)	Sigma, USA
$\gamma$ - $^{33}$ P-ATP	Amersham, Freiburg
Albumin (BSA, biotinfrei)	Roth, Karlsruhe
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)	Gibco BRL Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure), Dinatriumsalz, Dihydrat	Roth, Karlsruhe
EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
FBS (Fetal bovine serum)	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
HEPES ([4-(2-Hydroxy-ethyl)-piperazino]-ethano-sulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Hepes Buffer 1 M	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin 500x	Roche, Mannheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Deisenhofen
Poly(d(i-c)) Na 50 Ab (Polydesoxy-inosinyl-desoxycytidylsäure, doppelsträngig)	Roche, Mannheim
Streptomycin (siehe Penicillin)	Roche, Mannheim
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	Gibso BRL, Karlsruhe

### 3.3.2. Prinzip

Zur Untersuchung der sequenzspezifischen Bindung von Proteinen (z. B. Transkriptionsfaktoren) an doppelsträngige DNA werden sog. Electrophoretic Mobility Shift Assays, auch Bandshift-Assay oder Gelshift-Assay genannt, verwendet. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass DNA-Moleküle in einer Gelelektrophorese langsamer wandern, wenn ein Protein oder Proteinkomplex an sie gebunden hat.

Ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment wurde mit Proteinextrakten inkubiert und die entstandenen Protein-DNA-Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auswertung der Bandshift-Analyse erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers. Neben dem Signal des nicht komplexierten DNA-Fragmentes tritt bei der Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes eine zusätzliche Bande mit deutlich verändertem Laufverhalten aufgrund der langsameren Wanderungsgeschwindigkeit des Protein-DNA-Komplexes im Gel auf („Bandshift“).

### 3.3.3. Zellkultur

Bei den HaCaT-Zellen handelt es sich um die erste permanente epitheliale Haut-Zell-Linie. Es sind humane adhärenente Keratinozyten, die von einer histologisch normalen Haut eines Erwachsenen entnommen wurden.<sup>329</sup>

HaCaT-Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, gefüllt mit 20–30 ml DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium, Gibco, Karlsruhe), unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Dem Medium wurde 10 % FBS (V/V, Fetal Bovine Serum, Sigma, Hamburg) und 1 ml Antibiotikallösung (100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) zugesetzt.

Die HaCaT-Zellen wurden durch sog. Trypsinieren subkultiviert. Bei Trypsin handelt es sich um eine Serin-Protease, die die Auswüchse der Zellen verdaut. Um die Zellen zu splitten wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 3-5 ml PBS (1 x) gewaschen und anschließend zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden 8-10 min lang mit 5 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C behandelt. Allerdings darf die Einwirkzeit auf die Zellen nicht länger als 10 min betragen, da ansonsten nicht nur die Auswüchse verdaut werden würden, sondern auch Proteine der Zellmembran. Nach Zugabe von 6 ml DMEM-Medium wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 2.5 ml in eine neue Flasche überführt und mit 10 - 15 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet.

Für die Versuche wurden die Zellen schon am Vortag in kleine Petrischalen (60×15 mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen) in einer Dichte von ca. 700 000 – 1 000 000 Zellen in 5 ml „Hunger-Medium“ ausplattiert. Bei dem „Hunger-Medium“ handelt es sich um DMEM-Medium, dem nur 1 ml Antibiotikallösung (100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) zugesetzt wird (ohne FBS). Durch das Hungern der Zellen erreicht man eine niedrigere Grundstimulierung der Zellen. Allerdings wird auch das Wachstum der Zellen beeinflusst, deswegen werden die HaCaT-Zellen in einer höheren Dichte ausplattiert als andere Zellen, die für EMSA-Versuche verwendet werden.

10 x PBS – Puffer (Stocklösung):      80 g NaCl, 2 g KCl, 7.65 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1000 ml mit dd H<sub>2</sub>O (30 min autoklavieren bei 121°C, 2 bar)

---

<sup>329</sup> Boukamp et al. (1988)

### 3.3.4. Herstellung der Testlösungen

Die Extrakte und WALA-Proben wurden zentrifugiert und der Überstand für die Proteinextraktion weiterverwendet.

### 3.3.5. Proteinextrakte

Die Zellen in 5 ml Medium wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Testlösungen für 1 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für eine weitere Stunde unter denselben Bedingungen stimuliert. Hierzu wurden die HaCaT-Zellen mit 1 µl humaner TNF-α-Lösung (Stocklösung 4 ng/µl) versetzt. Als Negativkontrolle diente ein völlig unbehandelter Ansatz der HaCaT-Zellen, als Positivkontrolle ein nur mit TNF-α für 1 h stimulierter Ansatz. Anschließend wurden Proteingestamtextrikte von den Zellen hergestellt und im EMSA auf NF-κB-DNA-Bindeaktivität untersucht.

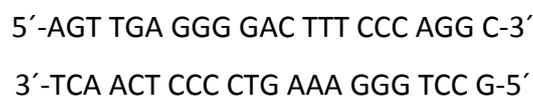
Zur Herstellung der Gesamtproteinextrakte wurden die HaCaT-Zellen von der Petrischale abgeschabt, in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1600 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml kaltem PBS resuspendiert, in 1.5 ml - Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 20 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Pellets in 50 µl eiskaltem Totex-Puffer (s.u.) suspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte während der 30 minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurde für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße (Safe-lock) überführt und sofort bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Totex-Stammlösung: 20 mM HEPES pH 7.9, 350 mM NaCl, 20 % (V/V) Glycerol, 1 % NP-40, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA

Kurz vor Verwendung wurden der Stammlösung 0.5 mM DTT, 0.1 % PMSF und 0.1 % Aprotinin zugegeben, mit dem Vortexer durchmischt und abzentrifugiert.

### 3.3.6. Herstellung der DNA-Sonden

Zur Detektion des Transkriptionsfaktors NF-κB wurde das NF-κB-Oligonukleotid als DNA-Sonde verwendet. Es besitzt folgende Sequenz:



Diese Sequenz wurde als Doppelstrang von der Firma Promega (Madison, USA) bezogen und direkt für die radioaktive Markierung verwendet.

### Radioaktive Markierung der DNA:

Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Polynukleotidkinase aus dem Bakteriophagen T4 (T4-PNK, Promega, Madison, USA) radioaktiv markiert. Das Enzym katalysiert den Transfer der terminalen, radioaktiven Phosphatgruppe von  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  auf die 5'-OH Enden der doppelsträngigen DNA und kann zusätzlich eine 5'-terminal stehende, nicht radioaktive Phosphatgruppe gegen den radioaktiven Phosphatrest aus dem  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  austauschen. Zur Trennung der markierten DNA von überschüssigem, freien  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  wurde der Ansatz säulenchromatographisch gereinigt.

Das Reaktionsgemisch, bestehend aus 1  $\mu\text{l}$  doppelsträngigem Oligonukleotid (25 ng/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$   $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  (Amersham, Freiburg, Deutschland), 5  $\mu\text{l}$  10 x Kinase-Puffer (Promega, Madison, USA), 2  $\mu\text{l}$  T4-PNK (10 U/ $\mu\text{l}$ ) und 37  $\mu\text{l}$  sterilem Millipore  $\text{H}_2\text{O}$ , wurde für 40-60 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende chromatographische Reinigung erfolgte nach dem Protokoll für die MicroSpin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia, Freiburg). Dabei erhielt man 50  $\mu\text{l}$  fast reine DNA-Sonde, die bei 4°C gelagert wurde.

### **3.3.7. Durchführung des EMSA**

Die Proteingestamtextrikte aus den unterschiedlich behandelten Zellen wurden mit der für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa\text{B}$  spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sequenz inkubiert. Dem Bindemix wurde mit Poly(dIdC) ein synthetischer, repetitiver DNA-Strang hinzugefügt, um unspezifische Bindungen abzufangen und falsch-positive Bandshifts zu vermeiden. Nach der Inkubation erfolgte eine Elektrophorese in einem nativen, also nicht denaturierenden Polyacrylamidgel. Anschließend wurde das Gel getrocknet und mittels Phosphoimager ausgewertet.

#### 1. Herstellung eines 4 %-igen Polyacrylamidgels

Hierfür wurden folgende Reagenzien zusammengegeben: 60 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (Millipore), 3.5 ml TBE (10-fach), 10 ml Acrylamid, wässrig (30 % AA, 0.8 % Bis), 400  $\mu\text{l}$  APS (10 %), 40  $\mu\text{l}$  TEMED.

Das Gel mußte innerhalb von 5min gegossen werden. Die komplette Polymerisation war nach ca. 2 h abgeschlossen.

#### 2. Vorbereitung des Binde-Mixes (EMSA-Mix)

Pro Ansatz wurden als Bindemix (EMSA-Mix) zusammenpipettiert: 2  $\mu\text{l}$  BSA-Lösung (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  Poly(dIdC) (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  Puffer D+, 4  $\mu\text{l}$  Puffer F, 4  $\mu\text{l}$  Millipore  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{l}$   $\gamma\text{-}^{33}\text{P}$ -markiertes Oligonukleotid (0.5 ng, entspricht  $\sim 25$  fmol)

### 3. Inkubation

15 µl EMSA-Mix wurden zu jeweils 5 µl Proteingesamtextrakt aus den unterschiedlich behandelten Zellen hinzugegeben, kurz abzentrifugiert und 25 min bei RT inkubiert.

### 4. Gelelektrophorese

Das Gel wurde in eine vertikale Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und der Elektrodenpuffer (TBE, 0.5-fach) eingefüllt. Die Proben wurden nach Ablauf der Inkubationszeit auf das Gel gegeben und die Elektrophorese bei einer Spannung von 200 V (14–22 mA) durchgeführt, bis ein gleichzeitig dazugegebener Standard (Bromphenolblau) 10 cm weit gelaufen ist.

### 5. Trocknen und Einlesen des Gels

Das Gel wurde für 1 h bei 80°C getrocknet und auf einen Phosphoimager BAS-Film überführt. Dieser wurde je nach Stärke der Radioaktivität 16–22 h belichtet und der Film anschließend im Phosphoimager ausgewertet.

## **3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die quantitative Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte bei allen Extrakten mittels des Bio-Rad Protein Assays nach Bradford (Bio-Rad Quick Start™ Bradford Dye Reagent 1x). Dieser Assay beruht auf der Bildung von stabilen Farbstoff-Protein-Komplexen aus Coomassie Brilliant Blue G-250 Farbstoff und löslichen Proteinen.

Eine Kalibriergerade wurde durch Verdünnung eines Albuminstandards (biotinfrei, >98 %, Roth, Karlsruhe) angefertigt. Die Messung von 5 µl Probe (Proteinextrakt oder Standard), die ca. 20 min mit 250 µl Reagenz inkubiert wurden, erfolgte via Absorptionsmessung bei 595 nm auf einer unbeschichteten 96-well Platte im Microplate-Reader. Die Proteinextrakte mussten i.d.R. 1:1 bis 1:5 (v/v) verdünnt werden, die Pflanzenextrakte wurden unverdünnt verwendet. Das Reagenz wurde mittels einer Mehrkanalpipette (Transferpette®) zugegeben, entstehende Luftblasen wurden vor der Messung entfernt. Absorptionen im Bereich von 0.2 bis 0.9 wurden in die Auswertung mit einbezogen.



## H Literaturverzeichnis

AALINKEEL R., BINDUKUMAR B., REYNOLDS J.L., SYKES D.E., MAHAJAN S.D., CHADHA K.C. & SCHWARTZ S.A., The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *Prostate* 2008, 68(16), 1773-1789.

ABAYOMI L.A. & TERRY L.A., Implications of spatial and temporal changes in concentration of pyruvate and glucose in onion (*Allium cepa* L.) bulbs during controlled atmosphere storage. *J. Sci. Food Agric.* 2009, 89(4), 683-687.

ABDOU I.A., ABOUZEID A.A., ELSHERBE M.R. & ELGHEAT Z.H.A., Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qual. Plant. Mat. Vegetabil.* 1972, 22(1), 29-35.

ABERHAM A., SCHWAIGER S., STUPPNER H. & GANZERA M., Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthenes and xanthone glycosides in *Gentiana lutea* L. roots by RP-HPLC and LC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 45(3), 437-442.

ACHENBACH H., WAIBEL R. & ADDAE-MENSAH I., Lignans and other constituents from *Carissa edulis*. *Phytochemistry* 1983, 22(3), 749-753.

ADAM K.P. & BECKER H., Analytik biogener Arzneistoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 4, 2000.

AL DELAIMY K.S. & ALI S.H., Antibacterial action of vegetable extracts on growth of pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 1970, 21(2), 110-112.

ALBERT A., SAREEDENCHAI V., HELLER W., SEIDLITZ H.K. & ZIDORN C., Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. *Oecologia* 2009, 160(1), 1-8.

AMES J.M., BAILEY R.G. & MANN J., Analysis of furanone, pyranone, and new heterocyclic colored compounds from sugar-glycine model Maillard systems. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47(2), 438-443.

ANDO H., HIRAI Y., FUJII M., HORI Y., FUKUMURA M., NIIHO Y., NAKAJIMA Y., SHIBATA T., TORIIZUKA K. & IDA Y., The chemical constituents of fresh Gentian root. *J. Nat. Med.* 2007, 61(3), 269-279.

ANG C.Y.W., HU L.H., HEINZE T.M., CUI Y.Y., FREEMAN J.P., KOZAK K. & LUO W.H., Instability of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and degradation of hyperforin in aqueous solutions and functional beverage. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52(20), 6156-6164.

ARMSTRONG D.W., WANG X.D., LEE J.T. & LIU Y.S., Enantiomeric composition of nornicotine, anatabine, and anabasine in tobacco. *Chirality* 1999, 11(1), 82-84.

AURA A.M. In vitro digestion models for dietary phenolic compounds. *Dissertation*, VTT Biotechnology, Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland, 2005.

AVATO P. & GUGLIELMI C., Determination of major constituents in St. John's Wort under different extraction conditions. *Pharm. Biol.* 2004, 42(1), 83-89.

BARTHOLOMEUSZ T., BHOGAL R.K., MOLINIE R., FELPIN F.X., MATHE-ALLAINMAT M., MEIER A.C., DRAGER B., LEBRETON J., ROSCHER A., RICHARD R.J. & MESNARD F., Nicotine demethylation in *Nicotiana* cell suspension cultures: *N*<sup>4</sup>-formylnicotine is not involved. *Phytochemistry* 2005, 66(20), 2432-2440.

BAYER T., WAGNER H. & DORSCH W., New biologically-active sulfur-containing-compounds from *Allium cepa*. *Planta Med.* 1988, 54(6), 560.

BERGONZI M.C., BILIA A.R., CASIRAGHI A., CILURZO F., MINGHETTI P., MONTANARI L. & VINCIERI F.F., Evaluation of skin permeability of sesquiterpenes of an innovative supercritical carbon dioxide *Arnica* extract by HPLC/DAD/MS. *Pharmazie* 2005, 60(1), 36-38.

BFARM. Monographien der Kommission E (Phytotherapie), Köln, Bundesanzeiger, 1999.

BIBER A., FRANCK-KARL G., WAIMER F., RIEGERT U. & WIGET R., Analytical characterisation of homeopathic mother tinctures. *Pharmeur. Sci. Notes* 2009, 2009(1), 1-4.

BILIA A.R., BERGONZI M.C., MAZZI G. & VINCIERI F.F., Analysis and stability of the constituents of artichoke and St. John's wort tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2002, 28(5), 609-619.

BILIA A.R., BERGONZI M.C., MORGENNI F., MAZZI G. & VINCIERI F.F., Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int. J. Pharm.* 2001, 213(1-2), 199-208.

BISAKOWSKI B., ATWAL A.S., GARDNER N. & CHAMPAGNE C.P., Effect of lactic acid fermentation of onions (*Allium cepa*) on the composition of flavonol glucosides. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2007, 42(7), 783-789.

BLOCK E., *Allium* chemistry: GC-MS analysis of thiosulfinates and related compounds from onion, leek, scallion, shallot, chive, and chinese chive. *J. Agric. Food Chem.* 1992a, 40(12), 2431-2438.

BLOCK E., *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and chinese chive. uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *J. Agric. Food Chem.* 1992b, 40(12), 2418-2430.

BLOCK E., The organosulfur chemistry of the genus *Allium* - Implications for the organic-chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992c, 31(9), 1135-1178.

BONACCORSI P., CARISTI C., GARGIULLI C. & LEUZZI U., Flavonol glucoside profile of Southern Italian red onion (*Allium cepa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53(7), 2733-2740.

BONACCORSI P., CARISTI C., GARGIULLI C. & LEUZZI U., Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chem.* 2008, 107(4), 1668-1673.

BOUKAMP P., PETRUSSEVSKA R.T., BREITKREUTZ D., HORNING J., MARKHAM A. & FUSENIG N.E., Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell-line. *J. Cell Biol.* 1988, 106(3), 761-771.

BRAHMACHARI G., MONDAL S., GANGOPADHYAY A., GORAI D., MUKHOPADHYAY B., SAHA S. & BRAHMACHARI A.K., *Swertia* (Gentianaceae): chemical and pharmacological aspects. *Chem. Biodivers.* 2004, 1(11), 1627-1651.

BROLIS M., GABETTA B., FUZZATI N., PACE R., PANZERI F. & PETERLONGO F., Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography - UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *J. Chromatogr. A* 1998, 825(1), 9-16.

BRUNNEMANN K.D., PROKOPCZYK B., DJORDJEVIC M.V. & HOFFMANN D., Formation and analysis of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Crit. Rev. Toxicol.* 1996, 26(2), 121-137.

BUCHNER N., KRUMBEIN A., ROHN S. & KROH L.W., Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20(21), 3229-3235.

BUCHNER N. Thermischer Abbau von Flavonolglycosiden. *Dissertation*, TU Berlin, Institut für Lebensmittelchemie, 2008.

BUTTERWECK V. & SCHMIDT M., St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med. Wochenschr.* 2007, 157(13-14), 356-361.

- CAI J.B., LIU B.Z., LIN P. & SU Q.D., Fast analysis of nicotine related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by megabore capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 2003, 1017(1-2), 187-193.
- CAMPBELL H.L. & STRIEBIG B.A., Evaluation of *N*-methylpyrrolidone and its oxidative products toxicity utilizing the microtox assay. *Environ. Sci. Technol.* 1999, 33(11), 1926-1930.
- CARNAT A., FRAISSE D., CARNAT A.P., FELGINES C., CHAUD D. & LAMAISON J.L., Influence of drying mode on iridoid bitter constituent levels in gentian root. *J. Sci. Food Agric.* 2005, 85(4), 598-602.
- CHANDRAN S. & SINGH R.S.P., Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie* 2007, 62(1), 4-14.
- CHANGZENG W. & DEQUAN Y., Diterpenoid, sesquiterpenoid and secoiridoid glucosides from *Aster auriculatus*. *Phytochemistry* 1997, 45(7), 1483-1487.
- CHAPELLE J.P., Isolement de dérivés seco-iridoïdes d'*Anthocleista zambesiaca*. *Phytochemistry* 1973, 12(5), 1191-1192.
- CHIALVA F., FRATTINI C. & MARTELLI A., Unusual essential oils with aromatic properties - III. Volatile components of gentian roots. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1986, 182(3), 212-214.
- CHOQUENET B., COUTEAU C., PAPARIS E. & COIFFARD L.J.M., Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. *J. Nat. Prod.* 2008, 71(6), 1117-1118.
- CHOU C.C. & HEE S.S.Q., Separation of pH, dilution, ionic-strength and chemical matrix effects for biological monitoring of urines with the Microtox® test using nicotine, cotinine and reference urines. *J. Biolumin. Chemilumin.* 1993, 8(1), 39-48.
- CIOLINO L.A., TURNER J.A., MCCAULEY H.A., SMALLWOOD A.W. & YI T.Y., Optimization study for the reversed-phase ion-pair liquid chromatographic determination of nicotine in commercial tobacco products. *J. Chromatogr. A* 1999, 852(2), 451-463.
- CITOVA I., GANZERA M., STUPPNER H. & SOLICH P., Determination of gentisin, isogentisin, and amarogentin in *Gentiana lutea* L. by capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* 2008, 31(1), 195-200.
- CLIFFORD M.N., JOHNSTON K.L., KNIGHT S. & KUHNERT N., Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51(10), 2900-2911.
- COREA G., FATTORUSSO E., LANZOTTI V., CAPASSO R. & IZZO A.A., Antispasmodic saponins from bulbs of red onion, *Allium cepa* L. var. Tropea. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53(4), 935-940.
- CORZO-MARTINEZ M., CORZO N. & VILLAMIEL M., Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci. Technol.* 2007, 18(12), 609-625.
- COUTEAU D., MCCARTNEY A.L., GIBSON G.R., WILLIAMSON G. & FAULDS C.B., Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 90(6), 873-881.
- CROTTI A.E.M., FONSECA T., HONG H., STAUNTON J., GALEMBECK S.E., LOPES N.P. & GATES P.J., The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004, 232(3), 271-276.
- CUI Y., MORGENSTERN H., GREENLAND S., TASHKIN D.P., MAO J.T., CAI L., COZEN W., MACK T.M., LU Q.Y. & ZHANG Z.F., Dietary flavonoid intake and lung cancer - A population-based case-control study. *Cancer* 2008, 112(10), 2241-2248.
- CULBRETH D.M.R., A manual of materia medica and pharmacology, 6. Ed. Aufl., Lea Brothers & Co., 1917. <http://chestofbooks.com/health/materia-medica-drugs/Manual-Pharmacology/images/fig-313-Gentiana-lutea.jpg>

- CURIEL J.A., RODRIGUEZ H., LANDETE J.M., DE LAS RIVAS B. & MUNOZ R., Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chem.* 2010, 120(1), 225-229.
- CUSHNIE T.P.T. & LAMB A.J., Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2005, 26(5), 343-356.
- DALLENBACH-TÖLKE K. Anwendung des Prisma-Modells auf verschiedene chromatographische Methoden bei polaren Inhaltsstoffen von Pharmakopöe-Drogen. *Dissertation*, ETH Zürich, 1986.
- DALLENBACH-TÖLKE K., NYIREDY S., MEIER B. & STICHER O., HPLC analysis of the flavonoid glycosides from *Betulae folium*. *Planta Med.* 1987, 53(2), 189-192.
- DAVIS R.A., The determination of nicotine and cotinine in plasma. *J. Chromatogr. Sci.* 1986, 24(4), 134-141.
- DOUGLAS J.A., SMALLFIELD B.M., BURGESS E.J., PERRY N.B., ANDERSON R.E., DOUGLAS M.H. & GLENNIE V.L.A., Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: a rapid analytical method and the effects of flower maturity and simulated mechanical harvesting on quality and yield. *Planta Med.* 2004, 70(2), 166-170.
- DUPONT M.S., MONDIN Z., WILLIAMSON G. & PRICE K.R., Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48(9), 3957-3964.
- EDWARDS B.G., Ultraviolet spectra of some indole derivatives, including tryptophan and gramicidin. *Arch. Biochem.* 1949, 21(1), 103-108.
- EL SEDAWY A.I., HATTORI M., KOBASHI K. & NAMBA T., Metabolism of gentiopicroside (gentiopicrin) by human intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.* 1989a, 37(9), 2435-2437.
- EL SEDAWY A.I., SHU Y.Z., HATTORI M., KOBASHI K. & NAMBA T., Metabolism of swertiamarin from *Swertia japonica* by human intestinal bacteria. *Planta Med.* 1989b, 55(2), 147-150.
- ELNIMA E.I., AHMED S.A., MEKKAWI A.G. & MOSSA J.S., The anti-microbial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie* 1983, 38(11), 747-748.
- ERMER J. & MILLER J.H.M., Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH., Strassburg, Europäischen Arzneibuch-Kommission, 2008a, 6.0.
- EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH. *Betulae folium*, 2008b, 6.2(Monographien), 4913-4915.
- EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH. Bitterwert, 2008c, 6.0(2.8.15), 328-329.
- EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH. Urtinkturen für homöopathische Zubereitungen, 2008d, 6.0(Monographien), 1520-1521.
- FOURNERON J.D. & NAIT-SI Y., Effect of eluent pH on the HPLC-UV analysis of hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Phytochem. Anal.* 2006, 17(2), 71-77.
- FRANZ C. & FRITZ D., Cultivation of *Gentiana lutea* and main substances of some ecotypes. *Planta Med.* 1975, 28(3), 289-300.
- FREY L. & HUBERT J., *Lactobacilli*, oxygen, metabolism and antagonism. *Lait* 1993, 73(2), 133-144.
- FUJISAWA H., SUMA K., ORIGUCHI K., KUMAGAI H., SEKI T. & ARIGA T., Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56(11), 4229-4235.

FUZZATI N., GABETTA B., STREPPONI I. & VILLA F., High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and multiple mass spectrometry studies of hyperforin degradation products. *J. Chromatogr. A* 2001, 926(1), 187-198.

GANZERA M., EGGER C., ZIDORN C. & STUPPNER H., Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chim. Acta* 2008, 614(2), 196-200.

GANZERA M., ZHAO J. & KHAN I.A., *Hypericum perforatum* - Chemical profiling and quantitative results of St. John's Wort products by an improved high-performance liquid chromatography method. *J. Pharm. Sci.* 2002, 91(3), 623-630.

GARCIA-LAFUENTE A., GUILLAMON E., VILLARES A., ROSTAGNO M.A. & MARTINEZ J.A., Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 2009, 58(9), 537-552.

GARCIA-PINERES A.J., CASTRO V., MORA G., SCHMIDT T.J., STRUNCK E., PAHL H.L. & MERFORT I., Cysteine 38 in p65/NF-KB Plays a Crucial Role in DNA Binding Inhibition by Sesquiterpene Lactones. *J. Biol. Chem.* 2001, 276(43), 39713-39720.

GHOSAL S., SINGH A.K., SHARMA P.V. & CHAUDHUR R.K., Chemical constituents of *Gentianaceae* .9. Natural occurrence of erythrocentaurin in *Enicostemma hyssopifolium* and *Swertia lawii*. *J. Pharm. Sci.* 1974, 63(6), 944-945.

GOBBO-NETO L. & LOPES N.P., Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (*Asteraceae*) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56(4), 1193-1204.

GONZALEZ-SAIZ J.M., PIZARRO C., ESTEBAN-DIEZ I., RAMIREZ O., GONZALEZ-NAVARRO C.J., SAIZ-ABAJO M.J. & ITOIZ R., Monitoring of alcoholic fermentation of onion juice by NIR spectroscopy: Valorization of worthless onions. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55(8), 2930-2936.

GRIFFITHS G., TRUEMAN L., CROWTHER T., THOMAS B. & SMITH B., Onions - A global benefit to health. *Phytother. Res.* 2002, 16(7), 603-615.

GRIMALDI A., BARTOWSKY E. & JIRANEK V., Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 99(5), 1061-1069.

GU X., CAI J., YANG J. & SU Q., Ultrasonic extraction followed by a novel filtration and clean-up device for screening of some polyphenols in tobaccos. *J. Sep. Sci.* 2005, 28(2), 184-188.

GÜNTHER S. Inhaltsstofforientierte Untersuchungen von wässrigen Extrakten aus *Gentianae radix*. *Diplomarbeit*, FH Isny, 2004.

HAB, Arzneiträger und Hilfsstoffe. Homöopathisches Arzneibuch, 2009a, (H5.3.).

HAB, Homöopathisches Arzneibuch, Amtliche Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag, 2009b.

HAB 23, Spezielle Herstellungsvorschriften - Vorschrift 23. Homöopathisches Arzneibuch, 2003, (H5.4.).

HAB 3, Spezielle Herstellungsvorschriften - Vorschrift 3. Homöopathisches Arzneibuch, 2003, (H5.4.).

HAB 33, Spezielle Herstellungsvorschriften - Vorschrift 33. Homöopathisches Arzneibuch, 2003, (H5.4.).

HAB 34, Spezielle Herstellungsvorschriften - Vorschrift 34. Homöopathisches Arzneibuch, 2003, (H5.4.).

HAGERROM. Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2006, 5. Ed.

HAINES P.G., EISNER A. & WOODWARD C.F., Chemical reactivity of myosmine. *J. Am. Chem. Soc.* 1945, 67(8), 1258-1262.

HÄNSEL R. & STICHER O., Pharmakognosie, Phytopharmazie, 7. Aufl., Springer-Verlag, Heidelberg, 2004.

HARBORNE J.B. & WILLIAMS C.A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000, 55(6), 481-504.

HAUSCHKA R., Neue Wege der Heilmittelherstellung (Das Wesen des Rhythmus'). Heilmittellehre: ein Beitrag zu einer zeitgemäßen Heilmittelerkenntnis, 6. Aufl., Klostermann, Frankfurt am Main 2004, (20), 220-227.

HAVSTEEN B., Flavonoids, a class of natural-products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 1983, 32(7), 1141-1148.

HAYASHI T. & YAMAGISHI T., Two xanthone glycosides from *Gentiana lutea*. *Phytochemistry* 1988, 27(11), 3696-3699.

HEIGL D. & FRANZ G., Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. *Pharmazie* 2003, 58(12), 881-885.

HEILMANN J. & MERFORT I., Current information on the metabolism of flavonoids. I. Absorption and metabolism of flavonols. *Pharm. Unserer Zeit* 1998, 27(2), 58-65.

HEIN E.M., ROSE K., VAN'T SLOT G., FRIEDRICH A.W. & HUMPF H.U., Deconjugation and degradation of flavonol glycosides by pig cecal microbiota characterized by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56(6), 2281-2290.

HILLER K. & MELZIG M.F., Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen, Area Verlag, Erfstadt, 2005.

HILPISCH U., HARTMANN R. & GLOMBITZA K.W., New dammaranes, esterified with malonic acid, from leaves of *Betula pendula*. *Planta Med.* 1997, 63(4), 347-351.

HOSTETTMANN K. & WAGNER H., Xanthone glycosides. *Phytochemistry* 1977, 16(7), 821-829.

HUGHES B.G. & LAWSON L.D., Antimicrobial effects of *Allium sativum* L. (garlic), *Allium ampeloprasum* L. (elephant garlic), and *Allium cepa* L. (onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. *Phytother. Res.* 1991, 5(4), 154-158.

ICH-Q2A International Conference of Harmonization (ICH) - Text on Validation of Analytical Procedures (1995) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073381.pdf> (accessed May 2010)

ICH-Q2B International Conference of Harmonization (ICH) - Validation of analytical procedures: methodology (1996) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf> (accessed May 2010)

IKEYA Y., SUGAMA K., OKADA M. & MITSUHASHI H., 2 Xanthenes from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry* 1991, 30(6), 2061-2065.

IMAI S., TSUGE N., TOMOTAKE M., NAGATOME Y., SAWADA H., NAGATA T. & KUMAGAI H., Plant biochemistry: An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature* 2002, 419(6908), 685.

INDU M.N., HATHA A.A.M., ABIROSH C., HARSHA U. & VIVEKANANDAN G., Antimicrobial activity of some of the South-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Braz. J. Microbiol.* 2006, 37(2), 153-158.

- INOUE H., UEDA S. & NAKAMURA Y., Zur Biosynthese der bitteren Glucoside der Gentianazeen, des Gentiopicrosids, des Swertiamarins und des Swerosids. *Tetrahedron Lett.* 1967, 8(33), 3221-3226.
- JENSEN S.R. & SCHRIPEMA J., Chemotaxonomy and pharmacology of *Gentianaceae*. *Gentianaceae - Systematics and natural history*, Cambridge University Press, 2001, (6), 573-631.
- JULKUNEN-TIITTO R., HÄGGMAN H., APHALO P.J., LAVOLA A., TEGELBERG R. & VETELI T., Growth and defense in deciduous trees and shrubs under UV-B. *Environ. Pollut.* 2005, 137(3), 404-414.
- JUN C., XUE-MING Z., CHANG-XIAO L. & TIE-JUN Z., Structure elucidation of metabolites of swertiamarin produced by *Aspergillus niger*. *J. Mol. Struct.* 2008, 878(1-3), 22-25.
- JÜRGENLIEMK G. & NAHRSTEDT A., Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 2002, 68(1), 88-91.
- JUSTESEN U. & ARRIGONI E., Electrospray ionisation mass spectrometric study of degradation products of quercetin, quercetin-3-glucoside and quercetin-3-rhamnoglucoside, produced by in vitro fermentation with human faecal flora. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001, 15(7), 477-483.
- KAKUDA R., MACHIDA K., YAOITA Y., KIKUCHI M. & KIKUCHI M., Studies on the constituents of *Gentiana* species. II. A new triterpenoid, and (S)-(+)- and (R)-(-)-gentiolactones from *Gentiana lutea*. *Chem. Pharm. Bull.* 2003, 51(7), 885-887.
- KALLIANOS A.G., PETRAKIS P.L., SHETLAR M.R. & WENDER S.H., Preliminary studies on degradation products of quercetin in the rat's gastrointestinal tract. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 81(2), 430-433.
- KANDLER O., Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983, 49(3), 209-224.
- KARONEN M., OSSISOV V., SINKKONEN J., LOPONEN J., HAUKIOJA E. & PIHLAJA K., Quantitative analysis of polymeric proanthocyanidins in birch leaves with normal-phase HPLC. *Phytochem. Anal.* 2006, 17(3), 149-156.
- KEINÄNEN M., Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41(11), 1986-1990.
- KEINÄNEN M. & JULKUNEN-TIITTO R., High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *J. Chromatogr. A* 1998, 793(2), 370-377.
- KEINÄNEN M., OLDHAM N.J. & BALDWIN I.T., Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49(8), 3553-3558.
- KESKI-SAARI S., PUSENIUS J. & JULKUNEN-TIITTO R., Phenolic compounds in seedlings of *Betula pubescens* and *B. pendula* are affected by enhanced UVB radiation and different nitrogen regimens during early ontogeny. *Glob. Chang. Biol.* 2005, 11(7), 1180-1194.
- KIM I., DARWIN W.D. & HUESTIS M.A., Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2005, 814(2), 233-240.
- KISAKI T., MAEDA S., KOIWAI A., MIKAMI Y., SASAKI T. & MATSUSHITA H., Transformation of tobacco alkaloids. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 1978, 9(5), 308-316.
- KOIWAI A., SUZUKI F., MATSUZAKI T. & KAWASHIMA N., The fatty acid composition of seeds and leaves of *Nicotiana* species. *Phytochemistry* 1983, 22(6), 1409-1412.
- KOS O. Phytochemische und pharmakologisch-biologische Untersuchungen von *Arnica montana* und *Vernonia triflosculosa*. *Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau, 2005.

- KUBEC R. & DADAKOVA E., Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives-A comparative study. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216(41), 6957-6963.
- KUBOTA T., TOMITA Y. & SUZUKI K., Synthesis of erythrocentaurin semicarbazone. *Tetrahedron Lett.* 1961, (6), 223-225.
- KUOKKANEN K., YAN S.C. & NIEMELA P., Effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on the leaf chemistry of birch *Betula pendula* (Roth) and the feeding behaviour of the weevil *Phyllobius maculicornis*. *Agric. For. Entomol.* 2003, 5(3), 209-217.
- LAITINEN M.L., JULKUNEN-TIITTO R. & ROUSI M., Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *J. Chem. Ecol.* 2000, 26(7), 1609-1622.
- LAITINEN M.L., JULKUNEN-TIITTO R. & ROUSI M., Foliar phenolic composition of European white birch during bud unfolding and leaf development. *Physiol. Plant.* 2002, 114(3), 450-460.
- LANZOTTI V., The analysis of onion and garlic. *J. Chromatogr. A* 2006, 1112(1-2), 3-22.
- LASS C., VOCANSON M., WAGNER S., SCHEMPP C.M., NICOLAS J.F., MERFORT I. & MARTIN S.F., Anti-inflammatory and immune-regulatory mechanisms prevent contact hypersensitivity to *Arnica montana* L. *Exp. Dermatol.* 2008, 17(10), 849-857.
- LAVOLA A., Soluble carbohydrates and secondary phytochemicals in *Betula* as affected by SO<sub>2</sub>-pollution. *Water Air Soil Pollut.* 1998, 107(1-4), 25-34.
- LEE E.J., YOO K.S., JIFON J. & PATIL B.S., Characterization of shortday onion cultivars of 3 pungency levels with flavor precursor, free amino acid, sulfur, and sugar contents. *J. Food Sci.* 2009, 74(6), C475-C480.
- LEE M.W., TANAKA T., NONAKA G.I. & HAHN D.R., Phenolic compounds on the leaves of *Betula platyphylla*. *Arch. Pharmacol Res.* 1992, 15(3), 211-214.
- LEE S.U., LEE J.H., CHOI S.H., LEE J.S., OHNISI-KAMEYAMA M., KOZUKUE N., LEVIN C.E. & FRIEDMAN M., Flavonoid content in fresh, home-processed, and light-exposed onions and in dehydrated commercial onion products. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56(18), 8541-8548.
- LIN M.Y. & YEN C.L., Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47(4), 1460-1466.
- LIU C. & CHAMBERS H.F., *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: Epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47(10), 3040-3045.
- LIU S.-Q., Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 83(2), 115-131.
- LLOYD R.A., MILLER C.W., ROBERTS D.L., GILES J.A., DICKERSON J.P., NELSON N.H., RIX C.E. & AYERS P.H., Flue-cured tobacco flavor. I. Essence and essential oil components. *Tob. Sci.* 1976, 40-48.
- LYSS G., KNORRE A., SCHMIDT T.J., PAHL H.L. & MERFORT I., The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- $\kappa$ B by directly targeting p65. *J. Biol. Chem.* 1998, 273(50), 33508-33516.
- LYSS G., SCHMIDT T.J., MERFORT I. & PAHL H.L., Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF- $\kappa$ B. *Biol. Chem.* 1997, 378(9), 951-962.
- MAKRIS D.P. & ROSSITER J.T., Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: A preliminary investigation. *J. Food Compos. Anal.* 2002, 15(1), 103-113.

- MAN C.N., GAM L.H., ISMAIL S., LAJIS R. & AWANG R., Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2006, 844(2), 322-327.
- MAREKOV N., MOLLOV N. & POPOV S., Minor alkaloids of *Gentiana* species. *Dokl. Bulg. Acad. Nauk.* 1965, 18(11), 999-1002.
- MAROTTI M. & PICCAGLIA R., Characterization of flavonoids in different cultivars of onion (*Allium cepa* L.). *J. Food Sci.* 2002, 67(3), 1229-1232.
- MENKOVIC N., SAVIKIN-FODULOVIC K., BULATOVIC V., ALJANCIC I., JURANIC N., MACURA S., VAJS V. & MILOSAVLJEVIC S., Xanthones from *Swertia punctata*. *Phytochemistry* 2002, 61(4), 415-420.
- MERFORT I., Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *J. Chromatogr. A* 2002, 967(1), 115-130.
- MERFORT I., Arnika: Neue Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus einer traditionellen Heilpflanze. *Forsch. Komplementärmed. Klass. Naturheilkd.* 2003, 10(SUPPL. 1), 45-48.
- MERFORT I., PIETTA P.G., MAURI P.L., ZINI L., CATALANO G. & WILLUHN G., Separation of sesquiterpene lactones from *Arnicae flos* DAB 10 by micellar electrokinetic chromatography. *Phytochem. Anal.* 1997, 8(1), 5-8.
- MERFORT I. & WENDISCH D., Flavonoid glycosides from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Planta Med.* 1987, (5), 434-437.
- MERFORT I. & WENDISCH D., Flavonoid glucuronides from the Flowers of *Arnica montana*. *Planta Med.* 1988, (3), 247-250.
- MERFORT I. & WENDISCH D., New flavonoid glycosides from *Arnicae Flos* DAB 9. *Planta Med.* 1992, 58(4), 355-357.
- MERFORT I., Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* 1992, 31(6), 2111-2113.
- MILLET A., STINTZING F. & MERFORT I., Validation of a GC-FID method for rapid quantification of nicotine in fermented extracts prepared from *Nicotiana tabacum* fresh leaves and studies of nicotine metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 49(5), 1166-1171.
- MILLET A., STINTZING F. & MERFORT I., Flavonol quantification and stability of phenolics in fermented extracts from fresh *Betula pendula* leaves. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010.
- MOGREN L.M., OLSSON M.E. & GERTSSON U.E., Quercetin content in field-cured onions (*Allium cepa* L.): effects of cultivar, lifting time, and nitrogen fertilizer level. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54(17), 6185-6191.
- MONDY N., DUPLAT D., CHRISTIDES J.P., ARNAULT I. & AUGER J., Aroma analysis of fresh and preserved onions and leek by dual solid-phase microextraction-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2002, 963(1-2), 89-93.
- MONDY N., NAUDIN A., CHRISTIDES J.P., MANDON N. & AUGER J., Comparison of GC-MS and HPLC for the analysis of *Allium* volatiles. *Chromatographia* 2001, 53, S356-S360.
- MORI K., QIAN Z.H. & WATANABE S., Preparative bioorganic chemistry. XVI. Synthesis of 3,4'-dihydroxypropiophenone 3- $\beta$ -D-glucopyranoside, a constituent of *Betula platyphylla* var. *japonica*, by enzymatic transglucosylation. *Liebigs Ann. Chem.* 1992, 1992(5), 485-487.
- NEMETH K. & PISKULA M.K., Food content, processing, absorption and metabolism of onion flavonoids. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 2007, 47, 397-409.

- NICOLAEVA G.G., GLYZIN V.Y., MLADENTSEVA M.S., SHEICHENKO V.I. & PATUDIN A.V., Xanthones of *Gentiana lutea*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 1983, (1), 107-108.
- NISSERON S., CHAUVETTE C., BATTARD J.C. & PORTHAULT M., Liquid chromatography separation of polyphenols. Application to tobacco extract analysis. *Analisis* 1984, 12(10), 523-534.
- NOLLER CR., Chemistry of organic compounds, 3. Aufl., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1965.
- OSSIPOV V., NURMI K., LOPONEN J., HAUKIOJA E. & PIHLAJA K., High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *J. Chromatogr. A* 1996, 721(1), 59-68.
- OSSIPOVA S., OSSIPOV V., HAUKIOJA E., LOPONEN J. & PIHLAJA K., Proanthocyanidins of mountain birch leaves: Quantification and properties. *Phytochem. Anal.* 2001, 12(2), 128-133.
- ÖZTÜRK N., KORKMAZ S., ÖZTÜRK Y. & BASER K.H.C., Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra*), on cultured chicken embryonic fibroblasts. *Planta Med.* 2006, 72(4), 289-294.
- PAGES G., MAZARIN M., SERGENT M., PHAN-TAN-LUU R. & DELAURENT C., Optimization of the assay of naphthodianthrones in dry St John's wort extract by reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 385(4), 716-723.
- PAHL H.L., Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 1999, 18(49), 6853-6866.
- PASSREITER C.M., Co-occurrence of 2-pyrrolidineacetic acid with the pyrrolizidines tussilaginic acid and isotussilaginic acid and their 1-epimers in *Arnica* species and *Tussilago farfara*. *Phytochemistry* 1992, 31(12), 4135-4137.
- PATHAK T., THOMAS N.F., AKHTAR M. & GANI D., Synthesis of [4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-, (4R)[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]- and (4S)[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]- 4-(methylnitrosamino)-1-(3'-pyridyl)-1-butanone, c-4 deuteriated isotopomers of the procarcinogen nnk. *Tetrahedron* 1990, 46(5), 1733-1744.
- PELTONEN P.A., VAPAAVUORI E. & JULKUNEN-TIITTO R., Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. *Glob. Chang. Biol.* 2005, 11(8), 1305-1324.
- PERNER H., SCHWARZ D., KRUMBEIN A., LI X. & GEORGE E., Influence of nitrogen forms and mycorrhizal colonization on growth and composition of Chinese bunching onion. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2007, 170(6), 762-768.
- PERRY N.B., BURGESS E.J., GUITIAN M.A.R., FRANCO R.R., MOSQUERA E.L., SMALLFIELD B.M., JOYCE N.I. & LITTLEJOHN R.P., Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: helenalin and dihydrohelenalin chemotypes in Spain. *Planta Med.* 2009, 75(6), 660-666.
- PIETTA P.G., Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63(7), 1035-1042.
- PILLAI B.V.S. & SWARUP S., Elucidation of the flavonoid catabolism pathway in *Pseudomonas putida* PML2 by comparative metabolic profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68(1), 143-151.
- PINHEIRO T.R., CECHINEL V., SANTOS A.R.S., CALIXTO J.B., MONACHE F.D., PIZZOLATTI M.G. & YUNES R.A., Three xanthones from *Polygala cyparissias*. *Phytochemistry* 1998, 48(4), 725-728.
- PLATEL K. & SRINIVASAN K., Studies on the influence of dietary spices on food transit time in experimental rats. *Nutr. Res.* 2001, 21(9), 1309-1314.
- PRICE K.R. & RHODES M.J.C., Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 74(3), 331-339.

- PURI S., HANDA G., KALSOTRA A.K., GUPTA V.K., SHAWL A.S., SURI O.P. & QAZI G.N., Preparative high-performance liquid chromatographic separation of naphthodianthrone from St. John's Wort. *J. Chromatogr. Sci.* 2006, 44(4), 177-180.
- RADANOVIC D., NASTOVSKI T., JANKOVIC T., SAVIKIN K., MENKOVIC N. & ZDUNIC G., The amount of secondary metabolites in cultivated *Gentiana lutea* L. *Planta Med.* 2007, 73(9), 300.
- RAMOS F.A., TAKAISHI Y., SHIROTORI M., KAWAGUCHI Y., TSUCHIYA K., SHIBATA H., HIGUTI T., TADOKORO T. & TAKEUCHI M., Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54(10), 3551-3557.
- RECHNER A.R., SMITH M.A., KUHNLE G., GIBSON G.R., DEBNAM E.S., SRAI S.K.S., MOORE K.P. & RICE-EVANS C.A., Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 36(2), 212-225.
- RESEMANN J., MAIER B. & CARLE R., Investigations on the conversion of onion aroma precursors S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides in onion juice production. *J. Sci. Food Agric.* 2004, 84(14), 1945-1950.
- RICKLING B. & GLOMBITZA K.W., Saponins in the leaves of birch - hemolytic dammarane triterpenoid esters of *Betula pendula*. *Planta Med.* 1993, 59(1), 76-79.
- RISNER C.H., KISER M.J. & DUBE M.E., An aqueous high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and other sugar-containing materials. *J. Food Sci.* 2006, 71(3), C179-C184.
- ROBERTS J.S. & KIDD D.R., Lactic acid fermentation of onions. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2005, 38(2), 185-190.
- RODRIGUEZ GALDON B., RODRIGUEZ C.T., RODRIGUEZ E.M.R. & ROMERO C.D., Fructans and major compounds in onion cultivars (*Allium cepa*). *J. Food Compos. Anal.* 2009, 22(1), 25-32.
- RODRIGUEZ GALDON B., TASCÓN RODRIGUEZ C., RODRIGUEZ RODRIGUEZ E.M. & DIAZ ROMERO C., Organic acid contents in onion cultivars (*Allium cepa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56(15), 6512-6519.
- RODRIGUEZ S., MARSTON A., WOLFENDER J.L. & HOSTETTMANN K., Iridoids and secoiridoids in the Gentianaceae. *Curr. Org. Chem.* 1998, 2(6), 627-648.
- ROSE P., WHITEMAN M., MOORE P.K. & ZHU Y.Z., Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Nat. Prod. Rep.* 2005, 22(3), 351-368.
- RYFFEL C., STRASSLE A., KAYSER F.H. & BERGERBACH B., Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 38(4), 724-728.
- SAITOH F., NOMA M. & KAWASHIMA N., The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. *Phytochemistry* 1985, 24(3), 477-480.
- SALMINEN J.P., Effects of sample drying and storage, and choice of extraction solvent and analysis method on the yield of birch leaf hydrolyzable tannins. *J. Chem. Ecol.* 2003, 29(6), 1289-1305.
- SANTAS J., ALMAJANO M.P. & CARBO R., Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa* L.) extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2010, 45(2), 403-409.
- SAVIKIN K., MENKOVIC N., ZDUNIC G., STEVIC T., RADANOVIC D. & JANKOVIC T., Antimicrobial activity of *Gentiana lutea* L. extracts. *J. Biosci.* 2009, 64(5-6), 339-342.
- SCHIEBER A., HILT P., CONRAD J., BEIFUSS U. & CARLE R., Elution order of quercetin glycosides from apple pomace extracts on a new HPLC stationary phase with hydrophilic endcapping. *J. Sep. Sci.* 2002, 25(5-6), 361-364.

- SCHMIDT B., JAROSZEWSKI J.W., BRO R., WITT M. & STAERK D., Combining PARAFAC analysis of HPLC-PDA profiles and structural characterization using HPLC-PDA-SPE-NMR-MS experiments: Commercial preparations of St. John's wort. *Anal. Chem.* 2008, 80(6), 1978-1987.
- SCHMIDT T.J., BOMME U. & ALFERMANN A.W., Sesquiterpene lactone content in leaves of in vitro and field cultivated *Arnica montana*. *Planta Med.* 1998, 64(3), 268-270.
- SCHMIDT T.J., MATTHIESEN U. & WILLUHN G., On the stability of sesquiterpene lactones in the officinal arnica tincture of the german pharmacopoeia. *Planta Med.* 2000, 66(07), 678-681.
- SCHNEIDER H., SCHWIERTZ A., COLLINS M.D. & BLAUT M., Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.* 1999, 171(2), 81-91.
- SCHRODER E. & MERFORT I., Thermospray liquid-chromatographic mass-spectrometric studies of flavonoid glycosides from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis* extracts. *Biol. Mass Spectrom.* 1991, 20(1), 11-20.
- SCHWIMMER S. & WESTON W.J., Onion flavor and odor - Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. *J. Agric. Food Chem.* 1961, 9(4), 301-&.
- SEELINGER G., MERFORT I., WOLFLE U. & SCHEMPP C.M., Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules* 2008, 13(10), 2628-2651.
- SELMA M.V., ESPIN J.C. & TOMÁS-BARBERAN F.A., Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57(15), 6485-6501.
- SETTANNI L. & CORSETTI A., Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 121(2), 123-138.
- SLIMESTAD R., FOSSEN T. & VAGEN I.M., Onions: A source of unique dietary flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55(25), 10067-10080.
- SMOCZKIEWICZ M.A., NITSCHKE D. & WIELADEK H., Micro-determination of steroid and triterpene saponin glycosides in various plant materials. 1. *Allium* species. *Mikrochim. Acta* 1982, 2(1-2), 43-53.
- SMYTH T.J., RAMACHANDRAN V.N., MCGUIGAN A., HOPPS J. & SMYTH W.F., Characterisation of nicotine and related compounds using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their detection by liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21(4), 557-566.
- SPITALER R., WINKLER A., LINS I., YANAR S., STUPPNER H. & ZIDORN C., Altitudinal variation of phenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: A 3-year comparison. *J. Chem. Ecol.* 2008, 34(3), 369-375.
- SRINIVASAN D., NATHAN S., SURESH T. & LAKSHMANA PERUMALSAMY P., Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2001, 74(3), 217-220.
- STICHER O. & MEIER B., Quantitative determination of the bitter principles in the roots of *Gentiana lutea* and *Gentiana purpurea* with HPLC. *Planta Med.* 1980, 40(1), 55-67.
- SZUCS Z., DÁNOS B. & NYIREDY S., Comparative analysis of the underground parts of *Gentiana* species by HPLC with diode-array and mass spectrometric detection. *Chromatographia* 2002, 56(SUPPL.), S19-S23.
- TAKEDA Y., MASUDA T., HONDA G., TAKAISHI Y., ITO M., ASHURMETOV O.A., KHODZHIMATOV O.K. & OTSUKA H., Secoiridoid glycosides from *Gentiana olivieri*. *Chem. Pharm. Bull.* 1999, 47(9), 1338-1340.
- TANASE M., SAND C., BOBIT D., LAZURCA D., BONCUT M., BARBU C.H. & POP M.R., Variation of the morphological characteristics and active principles in wild and cultivated *Gentiana lutea* L. from Romania. *Planta Med.* 2007, 73(9), 293.

TEUSCHER E., MELZIG M.F. & LINDEQUIST U., Biogene Arzneimittel, 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1997.

TORIUMI Y., KAKUDA R., KIKUCHI M., YAOITA Y. & KIKUCHI M., New triterpenoids from *Gentiana lutea*. *Chem. Pharm. Bull.* 2003, 51(1), 89-91.

TOURNAIRE C., CROUX S., MAURETTE M.T., BECK I., HOCQUAUX M., BRAUN A.M. & OLIVEROS E., Antioxidant activity of flavonoids - Efficiency of singlet oxygen ( $^1\Delta_G$ ) quenching. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 1993, 19(3), 205-215.

TSIAGANIS M.C., LASKARI K. & MELISSARI E., Fatty acid composition of *Allium* species lipids. *J. Food Compos. Anal.* 2009, 19(6-7), 620-627.

US FDA Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods (1994) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf> (accessed May 2010)

US FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (2001) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf> (accessed May 2010)

VADEMECUM ANTHROPOSOPHISCHE ARZNEIMITTEL, Der Merkurstab - Zeitschrift für Anthroposophische Medizin, 61, Supplement, 2008.

VAGEN I.M. & SLIMESTAD R., Amount of characteristic compounds in 15 cultivars of onion *Allium cepa* L. in controlled field trials. *J. Sci. Food Agric.* 2008, 88, 404-411.

VAINIOTALO P., JULKUNEN-TIITTO R., JUNTHEIKKI M.-R., REICHARDT P. & AURIOLA S., Chemical characteristics of herbivore defenses in *Betula pendula* winter-dormant young stems. *J. Chromatogr. A* 1991, 547, 367-376.

VAN DER NAT J., VAN DER SLUIS W.G. & LABADIE R.P., Gentiogenal, a new antimicrobial iridoid derived from gentiopicrin (gentiopicroside). *Planta Med.* 1982, 45(7), 161-162.

VEROTTA L., LOVAGLIO E., STERNER O., APPENDINO G. & BOMBARDELLI E., Oxidative fragmentation of the bridged  $\beta$ -triketone core of hyperforin. *European J. Org. Chem.* 2004, 2004(6), 1193-1197.

VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERNANDEZ-LOPEZ J. & PEREZ-ALVAREZ J.A., Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.* 2008, 73(9), R117-R124.

WADA E., KISAKI T. & SAITO K., Autoxidation of nicotine. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 79, 124-130.

WAGNER H. & MÜNZIG-VASIRIAN K., Eine chemische Wertbestimmung der Enziandroge. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 1975, 115(34), 1233-1239.

WAGNER S. Sesquiterpenlactone: Neuronale Netze als QSAR-Modell sowie pharmakokinetische Untersuchungen am Beispiel von *Arnica montana*. *Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau, 2006.

WAGNER S. & MERFORT I., Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different *Arnica* preparations using a validated GC-MSD method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43(1), 32-38.

WAGNER S., SUTER A. & MERFORT I., Skin penetration studies of *Arnica* preparations and of their sesquiterpene lactones. *Planta Med.* 2004, 70(10), 897-903.

WAHLBERG I., KARLSSON K., AUSTIN D.J., JUNKER N., ROERADE J., ENZELL C.R. & JOHNSON W.H., Tobacco chemistry. 39. Effects of flue-curing and aging on volatile basic constituents of Virginia tobacco. *Phytochemistry* 1977, 16(8), 1233-1235.

WALA, Arzneimittelverzeichnis, 31. Aufl., WALA Heilmittel GmbH, Bad Boll/Eckwälden, 2009.

WALLE T., WALLE U.K. & HALUSHKA P.V., Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J. Nutr.* 2001, 131(10), 2648-2652.

WANG C.L., LIU J.L., LIU Z.L., LI X.S. & CAO X.Y., Biomimetic transformation of gentiopicroside to erythrocentaurin. *Chin. Chem. Lett.* 2009, 20(2), 150-152.

WEILLER H.G. & RADLER F., Metabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from wine. *Eur. Food Res. Technol.* 1976, 161(3), 259-266.

WHO. WHO (World Health Organization) monographs on selected medicinal plants.-Vol. 1., 1999, World Health Organization Geneva(1).

WILLUHN G., Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von *Arnica*-Arten. *Planta Med.* 1972, 22(5), 1-33.

WILLUHN G., Sesquiterpenlactone, potentielle Leitsubstanzen für die Arzneistofffindung. Struktur und biologisch-pharmakologische Aktivitäten. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 1987, 127(48), 2511-2517.

WILLUHN G., *Arnica montana* L. - Porträt einer Arzneipflanze. *Pharm. Ztg.* 1991, 136(37), 2453-2468.

WILLUHN G. & LEVEN W., Neue Ergebnisse der Arnikaforschung. *Pharm. Unserer Zeit* 1981, 10(1), 1-7.

WILLUHN G. & LEVEN W., Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Sesquiterpenlactone von Arnikablüten DAB 9. *Pharm. Ztg. Wiss.* 1991, 1(136), 32-39.

WU W., ASHLEY D.L. & WATSON C.H., Determination of nicotine and other minor alkaloids in international cigarettes by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2002, 74(19), 4878-4884.

XIAO H. & PARKIN K.L., Isolation and identification of potential cancer chemopreventive agents from methanolic extracts of green onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 2007, 68(7), 1059-1067.

YANG S.S., SMETENA I. & HUANG C.B., Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 373(8), 839-843.

YILDIZ D., Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* 2004, 43(6), 619-632.

ZAHLEN K. & NILSEN O.G., Nicotine in hair of smokers and nonsmokers - Sampling procedure and gas-chromatographic mass-spectrometric analysis. *Pharmacol. Toxicol.* 1994, 75(3-4), 143-149.

ZHOU J., BAI R. & ZHU Y., Determination of four tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21(24), 4086-4092.

ZHOU Y., DI Y.T., GESANG S., PENG S.L. & DING L.S., Secoiridoid glycosides from *Swertia mileensis*. *Helv. Chim. Acta* 2006, 89(1), 94-102.

# I Anhang

## 1. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril	LC–MS	Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie
ACSO(s)	Alk(en)ylcysteinsulfoxid(e)		
ATCC	American Type Culture Collection		
COSY	Correlated Spectroscopy	LLOQ	Bestimmungsgrenze (lower limit of quantification)
$\delta$	Chemische Verschiebung [ppm]		
d	Dublett (NMR)	LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
DC	Dünnschichtchromatographie		
dest.	Destilliertes Wasser	m	Multipllett (NMR)
DH	Dihydrohelenalin	M	Monat
dir.	Direkt	min	Minute
EI, ESI	Electron Impact (Elektronenstoß-Ionisation), Electrospray Ionization	neg.	Negativ
		NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappaB
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
		p.a.	Pro analysi
FDA	Food and Drug Administration, US	pos.	Positiv
ferm.	fermentiert	R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
FM	Fließmittel	RP	Reversed Phase, Umkehrphase
GC–MS	Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie	rpm	Rounds per minute, Umdrehungszahl pro Minute
		RSD	relative Standardabweichung
h	Stunde	RT	Raumtemperatur
H	Helenalin	s	Singulett (NMR)
HMBC	Heteronuclear multiple quantum correlation	sh	Schulter (UV-Spektren)
		SIM	Einzelion (Selected Ion Monitoring)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation	SL(s)	Sesquiterpenlacton(e)
Hz	Hertz	t	Tripllett (NMR)
ICH	International Conference of Harmonization	T	Tag
ID	Innendurchmesser	TIC	Total Ion Chromatogramm
J	Kopplungskonstante	TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
KBE	Kolonienbildende Einheiten	UV	Ultraviolett
		v	Volumen

Weitere Abkürzungen von Chemikalien sind im experimentellen Teil zu finden.

## 2. Abbildungsverzeichnis

Abb. B-1 Gelbe Zwiebel ( <i>Allium cepa</i> L.)	7
Abb. B-2 Genuine Cysteinsulfoxide der Zwiebel und deren Abbauprodukte	9
Abb. B-3 <i>Arnica montana</i> L.	13
Abb. B-4 Struktur der Sesquiterpenlactone von <i>Arnica montana</i> und deren Esterresten	14
Abb. B-5 Eingriff von Sesquiterpenlactonen in die NF- $\kappa$ B Kaskade (IL: Interleukin; p: Protein; P: Phosphat; R: Receptor; TNF: Tumornekrosefaktor; Ub: Ubiquinon)	16
Abb. B-6 Blätter der <i>Betula pendula</i> Roth.	18
Abb. B-7 Metabolismus von Quercetin und Rutin bei in-vivo Untersuchungen im Menschen und Tier	22
Abb. B-8 Abbauprodukte der in-vitro Umsetzung durch Fäkalflora von Quercetin, Isoquercitrin und Rutin	22
Abb. B-9 Oxidationsprodukte aus Quercetin, erhalten nach Heißextraktion der getrockneten Haut von gelben Zwiebeln (Ausschnitt aus)	23
Abb. B-10 Reaktionswege für die Oxidation von Quercetin durch thermische Behandlung. I: Spaltung, II: Nukleophiladdition	23
Abb. B-11 Blüte von <i>Gentiana lutea</i> L.	24
Abb. B-12 Gelber Enzian mit Wurzeln	24
Abb. B-13 Hauptinhaltsstoffe der Wurzel des gelben Enzians	25
Abb. B-14 Umsetzung von Gentiopikrosid (= Gentiopicrin) mit $\beta$ -Glucosidase und Bildung von Gentiogenal	27
Abb. B-15 Mögliche Bildung von Gentiopikrosidmetaboliten nach der Fermentation mit Darmbakterien. G1: Erythrocentaurin; G2: Gentiopicral	27
Abb. B-16 Johanniskrautpflanze ( <i>Hypericum perforatum</i> L.)	28
Abb. B-17 Naphthodianthrone (links) und Phloroglucinderivate (rechts) in Johanniskraut	28
Abb. B-18 Abbauprodukte von Hyperforin in Hexanextrakten	30
Abb. B-19 Produkte nach oxidativen Umsatz von Hyperforin	31
Abb. B-20 Blätter und Blüte von <i>Nicotiana tabacum</i> L.	32
Abb. B-21 Hauptalkaloide der Tabakblätter	32
Abb. D-1 HPLC–UV (a) und GC–MS (b) Chromatogramme (280 nm): blau, methanolischer Extrakt (ME); rot, wässriger Extrakt (AE); grün, fermentierter wässriger Extrakt (FAE, jeweils 1:2 (v/v) mit Wasser verdünnt). 1) Tryptophan; 2) Quercetin 3,4'-di-O- $\beta$ -glucosid; 3) Quercetin 3-O- $\beta$ -glucosid ; 4) Quercetin 4'-O- $\beta$ -glucosid; 5) Isorhamnetin 4'-O- $\beta$ -glucosid; 6) Quercetin; I) Methylpyruvat ; II) 3-Hydroxymethylfuran; III) Propylenglycol; IV) Pyranon; V) Catechol; VI) 5-Hydroxymethylfurfural; VII) Palmitinsäure.	38
Abb. D-2 HPLC-Chromatogramme der fermentierten Extrakte 2006–2008 nach 24 h. Blau: 2006, rot: 2007, grün: 2008. Peakzuordnung: s. Abb. D-1 (F = Flavonoid)	41
Abb. D-3 HPLC-Chromatogramme der fermentierten Extrakte 2006–T1, –T3 und –T7. Pfeile ( $\uparrow$ ) zeigen Peaks an, die größer geworden sind, ( $\downarrow$ ) zeigen Komponenten an, die abgebaut wurden. Zuordnung der charakterisierten und identifizierten Peaks: s. Abb. D-1 (F: Flavonoid, A: Aminosäure ähnlich).	42

- Abb. D-4 HPLC-Chromatogramme der Stufenkontrollen 2006–T7 und –M2. Pfeile (↑) zeigen Peaks an, die größer geworden sind, (↓) zeigen Komponenten an, die abgebaut wurden. Zuordnung der charakterisierten und identifizierten Peaks: s. Abb. D-1 (A: Aminosäure ähnlich). 43
- Abb. D-5 HPLC-Chromatogramme der Stufenkontrollen 2006–M2, M6 und M12. Pfeile (↑) zeigen Peaks an, die größer geworden sind, (↓) zeigen Komponenten an, die abgebaut wurden. Zuordnung der charakterisierten und identifizierten Peaks: s. Abb. D-1 (A: Aminosäure ähnlich). 44
- Abb. D-6 Agarplatten von ausgewählten gramnegativen Bakterienstämmen. Von links nach rechts: *K. pneumoniae*, *S. maltophilia*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *A. baumannii*. ZW = WALA-Urtinktur; 2 = methanolischer Extrakt; 3 = wässriger Extrakt; + = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle. 46
- Abb. D-7 Agarplatten von ausgewählten grampositiven Bakterienstämmen. Von links nach rechts: *S. epidermis*, *S. aureus*, MRSA, *E. faecalis* und *E. faecium*. ZW = WALA-Urtinktur; 2 = methanolischer Extrakt; 3 = wässriger Extrakt; + = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle. 46
- Abb. D-8 Hemmhofdurchmesser für den fermentierten Extrakt (FAE) und die Positivkontrolle (Octenisept) bei den gramnegativen Stämmen (links) und den grampositiven Stämmen (rechts). 47
- Abb. D-9 Wachstumskinetik von zwei ausgewählten Bakterienstämmen in Anwesenheit eines fermentierten Extraktes (FAE) bzw. Wasser (Negativkontrolle) 48
- Abb. D-10 Darstellung der Kolonienzahl (= KBE) (%) beim fermentierten Extrakt (2006–M12, bezogen auf die Ergebnisse mit Wasser) 48
- Abb. D-11 GC–MS–Chromatogramm einer Probe eines fermentierten Arnikaextraktes (2006–M12); SIM-Modus. 49
- Abb. D-12 Stabilitätsvergleich der gesamten SLs (in % der Anfangskonzentration) in den fermentierten Extrakten von 2006 bis 2008. 52
- Abb. D-13 Wirkung von vier fermentierten Arnikaextrakten (Proben 2005–M12, 2006–T3, –M12 und 2007–T3) auf die NF-κB-DNA-Bindung in HaCaT-Zellen. Bahn „-“ zeigt unstimulierte Kontrollzellen; Bahn „+“ zeigt Zellen, die lediglich mit TNF-α behandelt wurden. In den anderen Bahnen wurden die Zellen 1 h mit den angegebenen Mengen an Arnikauszug vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 U/ml TNF-α 1h stimuliert. Ein gefülltes Dreieck zeigt die Stelle des NF-κB-DNA-Komplexes an. Der Ring deutet eine unspezifische Bindung an und die Raute ungebundenes Oligonukleotid. 54
- Abb. D-14 Wirkung von selbsthergestellten Arnikaextrakten auf die NF-κB-DNA-Bindung. Bahn „-“ zeigt unstimulierte Kontrollzellen; Bahn „+“ zeigt Zellen, die lediglich mit TNF-α behandelt wurden. Bei den anderen Bahnen wurden die Zellen 1 h mit der angegebenen Menge an Arnika-Auszügen vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 U/ml TNF-α 1h stimuliert. Ein gefülltes Dreieck zeigt die Stelle des NF-κB-DNA-Komplexes an. Der Ring deutet eine unspezifische Bindung an und die Raute ungebundenes Oligonukleotid. 55
- Abb. D-15 Wirkung der WALA-Matrix (Laktose und Honig in dest. Wasser, s. G2.5.1.e)) auf die NF-κB-DNA-Bindung in HaCaT-Zellen. Bahn „-“ zeigt unstimulierte Kontrollzellen; Bahn „+“ zeigt Zellen, die lediglich mit TNF-α behandelt wurden. In den anderen Bahnen wurden die Zellen 1 h mit den angegebenen Mengen an WALA-Matrix vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 U/ml TNF-α 1 h

- stimuliert. Ein gefülltes Dreieck zeigt die Stelle des NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexes an. Der Ring deutet eine unspezifische Bindung an und die Raute ungebundenes Oligonukleotid. 56
- Abb. D-16 Chromatogramme der Probe nach einem Tag Extraktion des fermentierten Extraktes aus 2007. a) HPLC–UV bei 351 nm; b) HPLC–UV, früher Retentionszeitbereich bei 280 nm. Peakzuordnung: 1) 3,4'-Dihydroxypropiofenon 3-O-  $\beta$ -glucopyranosid; 2) Neochlorogensäure; 3) 3-*p*-Cumaroylchinasäure; 4) *p*-Hydroxyphenylethanol; 6) Chlorogensäure; 8) 5-*p*-Cumaroylchinasäure; 11) Myricetin 3-O-  $\beta$ -galactosid + Myricetin 3-O-  $\beta$ -glucuronid; 13) Myricetin 3-O-  $\beta$ -glucosid; 14) Hyperosid; 15) Rutin + Isoquercitrin; 16) Quercetin 3-O-  $\beta$ -glucuronid; 17) Quercetin 3-O-arabinopyranosid; 18) Kaempferol 3-O-glykosid; 19) Quercetin 3-O- $\alpha$ -arabinofuranosid; 20) Quercitrin; 22) Apigenin; 23) Acacetin. 58
- Abb. D-17 Residuenplot der Hyperosidkalibrierung mit System I unter Zugrundelegung eines lineares Modells 59
- Abb. D-18 Kalibrierkurve und Residuenplot für 10 Konzentrationen der Hyperosid Referenzlösungen (2–200  $\mu$ g/ml) jeweils doppelt injiziert in das System I unter Zugrundelegung eines nichtlinearen Modells 60
- Abb. D-19 Kalibrierkurve und Residuenplot für 6 Konzentrationen der Hyperosid Referenzlösungen (2–205  $\mu$ g/ml), doppelt injiziert in das System II unter Zugrundelegung eines nichtlinearen Modells 61
- Abb. D-20 Kalibrierkurve und Residuenplot für 5 Konzentrationen der Quercetin-Referenzlösungen (1–10  $\mu$ g/ml), doppelt injiziert in System II unter Zugrundelegung eines nichtlinearen Modells 63
- Abb. D-21 Vergleich des Gesamtgehaltes an Flavonolglykosiden (% Frischgewicht) von verschiedenen Auszügen. 68
- Abb. D-22 Graphische Darstellung der Gehaltsbestimmung einzelner Flavonolglykoside in verschiedenen Auszügen. 68
- Abb. D-23 Gehaltsbestimmungen der Flavonole in den fermentierten Extrakten 2005–2008 (% w/v). Für die Strukturformeln, s. B4.3.1. 71
- Abb. D-24 Prozentualer Abbau der Flavonolglykoside in fermentierten Extrakten aus 2006–2008 72
- Abb. D-25 Stabilitätsvergleich der Flavonolglykoside in den Ansätzen H3.6+ (Hyperosid und Matrix), HAB 34e sowie mit Wasser (W-), Molke/Wasser (1:1; WM-) und Molke (M-) 74
- Abb. D-26 3,4'-Dihydroxypropiofenon:  $^1$ H-NMR (400 MHz, [D4]-MeOH). Die Hauptverunreinigung ist Milchsäure (\*). 77
- Abb. D-27 Chromatogramme von zwei Proben des fermentierten Extraktes aus 2007. Grau: Probe 2007–T1; schwarz: Probe 2007–M6. a) HPLC–UV bei 351 nm; b) HPLC–UV, früher Retentionszeitbereich bei 280 nm; c) GC–MS. Peakzuordnung: 1) 3,4'-Dihydroxypropiofenon 3-O- $\beta$ -glucopyranosid; 2) Neochlorogensäure; 3) 3-*p*-Cumaroylchinasäure; 4) *p*-Hydroxyphenylethanol; 5) 3,4'-Dihydroxypropiofenon; 6) Chlorogensäure; 7) Catechol; 8) 5-*p*-Cumaroylchinasäure; 9) Kaffeesäure; 10) *p*-Hydroxyphenylpropionsäure; 11) Myricetin 3-O-  $\beta$ -galactosid + Myricetin 3-O-  $\beta$ -glucuronid; 12) *p*-Cumarsäure; 13) Myricetin 3-O-  $\beta$ -glucosid; 14) Hyperosid; 15) Rutin + Isoquercitrin; 16) Quercetin 3-O-  $\beta$ -glucuronid; 17) Quercetin 3-arabinopyranosid; 18) Kaempferol 3-glykosid; 19) Quercetin 3- $\alpha$ -arabinofuranosid; 20) Quercitrin; 21) Quercetin; 22) Apigenin; 23) Acacetin; X) *p*-Hydroxyacetophenon. 79
- Abb. D-28 Mögliche Wege zum Umsatz der phenolischen Verbindungen in fermentierten wässrigen Extrakten nach HAB 80

- Abb. D-29 Chromatogramm eines MeOH-Extraktes (s. G2.7.1.e) mit Peakzuordnung: 1) Loganinsäure; 2) Swertiamarin; 3) Gentiopikrosid; 4) Swerosid; 5,6) Isoorientinglykoside; 7) Amarogentin; 8) Gentsin; 9) Isogentsin. Der Peak bei 10.4 min zeigte ähnliche UV-Spektren und LC-MS-Daten wie Loganinsäure. 83
- Abb. D-30 Chromatogramm der Matrix (1:1 mit Wasser verdünnt) 83
- Abb. D-31 Regressionsgerade und Residuenplot für die fünf untersuchten Substanzen 85
- Abb. D-32 Gehaltsbestimmung (% w/w Frischgewicht) von verschiedenen Auszügen mit Standardabweichung (n=2). 89
- Abb. D-33 Stabilitätsvergleich der Iridoide und Xanthone im Verlauf der Fermentation von Enzianwurzelnexttrakten 93
- Abb. D-34 P3: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, [D4]-MeOH) 95
- Abb. D-35 P3: <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, [D4]-MeOH) 96
- Abb. D-36 P3: Methylierung einer organischen Säure mittels TMS-Diazomethan 98
- Abb. D-37 Vergleich zweier Chromatogramme von einem fermentierten Extrakt (2006). Blau: 2006-T1; rot: 2006-M12. 98
- Abb. D-38 Stabilitätsvergleich von Gentiopikrosid, Swertiamarin, Amarogentin, Loganinsäure und Xanthonen in % der Anfangskonzentration in verschiedenen Extrakten. E+: Enzianwurzel, mit Temperaturwechsel nach HAB; EL+: Enzianwurzel und Laktose, mit Temperaturwechsel nach HAB; ELH-: Enzianwurzel, Laktose und Honig, ohne Temperaturwechsel nach HAB; ferm 2006: fermentierter Extrakt aus 2006; G+: Gentiopikrosid, mit Temperaturwechsel nach HAB. 102
- Abb. D-39 HPLC-Chromatogramme der nach HAB-Verfahren behandelten Gentiopikrosid-Probe (Ansatz G+), mit Vergrößerung des vorderen Teils. Grau: nach 3 h; schwarz: nach 4 Monaten. 103
- Abb. D-40 Bildung von drei Produkten aus Gentiopikrosid während der Fermentation und Lagerung nach HAB (Ansatz G+, RT = 3.8, 10.0 und 10.8 min). 104
- Abb. D-41 Bitterwertbestimmung von fermentierten Extrakten, berechnet über den Bitterstoffgehalt pro Gramm (links) und Amarogentingehaltsbestimmung (% w/v, rechts) 105
- Abb. D-42 HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extraktes aus frischen Johanniskrautpflanzen bei 270 nm. 1) Neochlorogensäure; 2) 3-O-p-Coumaroyl-chinasäure; 3) Chlorogensäure; 4) Rutin; 5) Hyperosid; 6) Quercetin 3-glucuronid + Isoquercitrin; 7) Flavonoid; 8) Quercetin 3-arabinopyranosid; 9, 10) Flavonoide; 11) Quercitrin; 12) Quercetin; 13) I3,I8-Biapigenin + Kämpferol; 14) Pseudohypericin; 15) Hyperforin-derivat, 16) Hyperforin; 17) Hypericin; \*) Geisterpeak aus der Säule. 108
- Abb. D-43 HPLC-Chromatogramme zweier Proben des fermentierten Extraktes von 2006: nach 3.5 Tagen (blau) und nach 12 Monaten (rot). Peakzuordnung wie in Abb. D-42. 109
- Abb. D-44 HPLC-Chromatogramme zweier Proben des fermentierten Extraktes von 2007: nach 3.5 Tagen (blau) und nach 4 Monaten (rot). Peakzuordnung wie in Abb. D-42. 109
- Abb. D-45 HPLC-Chromatogramme einer Nikotinlösung (0.5 mM in MeOH/0.1 % HCOOH, 1:1, v/v), injiziert mit verschiedenen wässrigen Laufmitteln. Rot: 0.1 % HCOOH (pH=2.72); grün: 5 % HCOOH (pH=1.77); blau: 2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=1.27). 112
- Abb. D-46 HPLC-Chromatogramme dreier Nikotinlösungen. Rot: 3.08 mM in HCOOH; blau: 1.85 mM in MeOH; grün: 0.5 mM in MeOH/0.1 % HCOOH 1:1. Wässriges Laufmittel: 0.1 % HCOOH. 112

Abb. D-47 HPLC-Chromatogramm einer Probe des fermentierten Tabakextraktes aus 2006 (2006-T3, 50 µl/ml in MeOH; A = 0.1 % HCOOH).	113
Abb. D-48 Gehaltsbestimmung von Nikotin in einem fermentierten Extrakt (2006-T3) über 2 Monate mittels GC-MS (n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)	114
Abb. D-49 Korrigierte Fläche mit Standardabweichung von Nikotin in Kalibrierlösungen (100 µg/ml) über zwei Wochen (GC-MS, n=2)	115
Abb. D-50 GC-MS-Chromatogramm eines durch Kalt-Extraktion hergestellten MeOH-Extraktes aus frischen Tabakblättern (Ch. NT06)	115
Abb. D-51 GC-MS-Chromatogramm einer Proben eines fermentierten Extraktes (2006-T1)	115
Abb. D-52 GC-FID Chromatogramme (Gradient II): a) einer Probe fermentierten Tabakextraktes (2006-T3, 25 µl/ml); b) 2006-T3 (20 µl/ml), aufgestockt mit 5 µg Anabasin; c) 2006-T3 (20 µl/ml), aufgestockt mit 5 µg Nornikotin; d) 2006-T3 (20 µl/ml), aufgestockt mit 5 µg Nikotin	117
Abb. D-53 Regressionsgerade und Residuenplot für Nikotin	118
Abb. D-54 Langzeit-Stabilitätsprüfung: Gehaltsbestimmung in einer Probe fermentierten Extraktes (2006-T3) über 5 Monate (GC-FID, n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)	119
Abb. D-55 Übereinandergelegte GC-FID Chromatogramme eines Kaltextraktes (40 % MeOH + 0.5 % CH <sub>3</sub> COOH). Grün: mit 10 µg/ml Anabasin; Rot: ohne Anabasin.	122
Abb. D-56 Gehaltsbestimmung von Nikotin in Auszügen zur erschöpfenden Extraktion	124
Abb. D-57 Vergleich der fermentierten Extrakte 2006-2008	125
Abb. D-58 GC-MS-Chromatogramm (SIM-Modus: m/z 84, 119 und 160) der Proben 2006-T1 und -M2	126
Abb. D-59 Mögliche strukturelle Modifikationen von Nikotin in einem fermentierten Extrakt (n.d.: nicht detektiert)	127
Abb. G-1 HPLC-Chromatogramm der TBME-Fraktion aus Enzianwurzel	175
Abb. G-2 HPLC-Chromatogramm der EtOAc-Fraktion aus Enzianwurzel	175
Abb. G-3 Die zwei Hauptxanthonderivate von <i>G. lutea</i> : Gentisin (a) und Isogentisin (b).	175
Abb. G-4 GC-Chromatogramm von Gentisin nach Umkristallisation in kaltem Methanol	176
Abb. G-5 Gentisin: <sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, [D5]-Pyridin)	177
Abb. G-6 Gentisin: <sup>13</sup> C-NMR (400 MHz, [D5]-Pyridin)	178
Abb. G-7 Gentiopikrosid: <sup>1</sup> H-NMR (Fraktion F2, 400 MHz, [D4]-Methanol)	181
Abb. G-8 Gentiopikrosid: <sup>13</sup> C-NMR (Fraktion F2, 400 MHz, [D4]-Methanol)	182
Abb. G-9 HPLC-Chromatogramm der Fraktion mit P3 (bei 17.6 min; die anderen Peaks sind Verunreinigungen aus der Säule bzw. Geisterpeaks; Detektion bei 235 nm).	183
Abb. I-1 UV-Spektren des fermentierten Zwiebelextrakt von 2006; A: Aminosäure-ähnlich; F: Flavonoid.	221

Die Abbildungen B-1, 3, 6, 11, 16, 20, D-7 und 8 sind eigene Aufnahmen der Autorin.

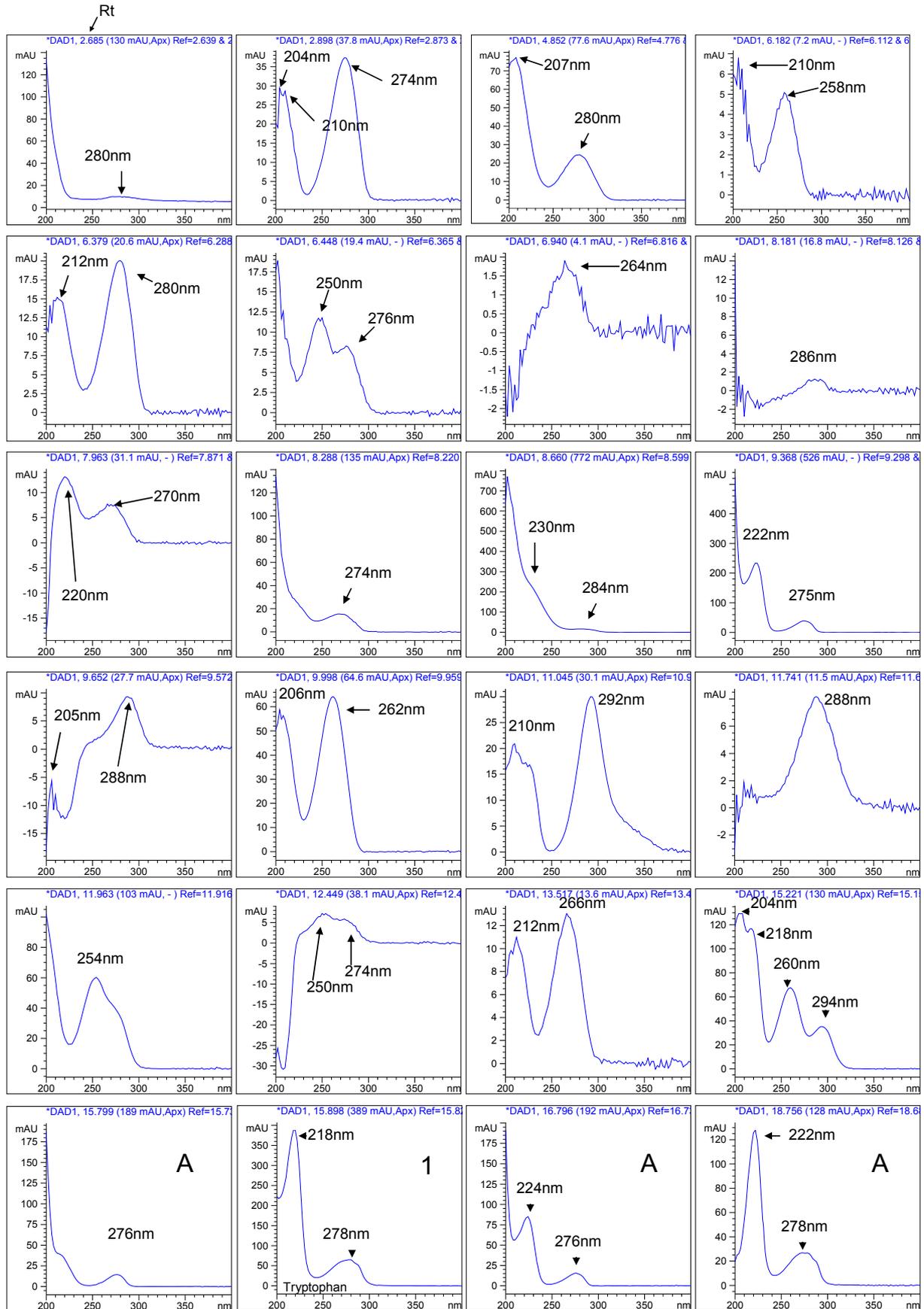
### 3. Tabellenverzeichnis

Tab. B-1 Flavonolglykoside der Zwiebel (Glc: Glucosid).....	8
Tab. B-2 Flavonolglykoside der Birkenblätter (in ihrer üblichen Elutionsreihenfolge bei HPLC-Analysen; Ara(f): Arabinofuranosid, Ara(p): Arabinopyranosid, Gal: Galaktosid, Glc: Glucosid, Glucu: Glucuronid, Glyk: Glykosid, Rha: Rhamnose) .....	19
Tab. C-1 Inhaltstoffgruppen und Pflanzen, die in dieser Arbeit untersucht wurden .....	35
Tab. D-1 Photometrische Pyruvatgehaltsbestimmung in den drei Extrakten sowie in den verwendeten Zwiebeln und Vergleich mit der mittels GC–MS ermittelten Methylpyruvat–Peakfläche .....	40
Tab. D-2 Vergleich der pH-Werte von Proben aus zwei fermentierten Zwiebelextrakten (2006 und 2007).....	40
Tab. D-3 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Zwiebelextrakte .....	44
Tab. D-4 Gehalt (% w/v) an SL, Helenalin (H)– und Dihydrohelenalin (DH)–Derivaten in fermentierten Arnikaextrakten aus den Jahrgängen 2005 bis 2008 .....	51
Tab. D-5 Vergleich der pH-Werte von Proben aus zwei fermentierten Arnikaextrakten (2006 und 2007).....	52
Tab. D-6 Sesquiterpenlactongehalt in den selbsthergestellten Frischpflanzenextrakten (in %, auf Extrakt (w/v) bzw. auf frische Droge (w/w) bezogen) und Vergleich mit Proben nach 12 Monaten des fermentierten Extraktes von 2006 .....	53
Tab. D-7 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Arnikaextrakte.....	53
Tab. D-8 Sesquiterpenlactongehalt (% w/v) und der zur vollständigen NF-κB–Komplex-Hemmung notwendige Konzentrationsbereich (bezogen auf die Kontrolle) an fermentierten bzw. selbsthergestellten Arnikaextrakten .....	54
Tab. D-9 Wiederhol– und Intermediärpräzision für Hyperosid in Referenzlösungen und Birkenblätterextrakten; a) System I, b) System II. ....	62
Tab. D-10 Genauigkeitstest durch Aufstocken eines fermentierten Extraktes (3.18 µg/ml Hyperosid) mit verschiedenen Hyperosidkonzentrationen.....	62
Tab. D-11 Wiederhol– und Intermediärpräzision für Quercetin in Referenzlösungen (3 Konzentrationen) und einem Birkenblätterextrakt (BW05-T3, 1:3 in dest. Wasser verdünnt) auf System II.....	64
Tab. D-12 Genauigkeitstest durch Aufstocken einer Probe fermentierten Extraktes (6.3 µg/ml Quercetin) mit 1 µg/ml Quercetin.....	64
Tab. D-13 Autosampler–Stabilitätstest für drei Konzentrationen an Quercetinlösungen und einem fermentierten Extrakt (BW05-T3, verdünnt 1:3 in dest. Wasser), System II. Konzentrationen und Wiederfindungsrate sind für 1/2/3 Tage im Autosampler angegeben. ....	65
Tab. D-14 Gefrier-Tau Stabilitätstest für zwei Referenzlösungen mit dem System II.....	65
Tab. D-15 Gehaltsbestimmungen zweier Chargen Blätter sowie eines fermentierten Extraktes nach Ph.Eur. und mittels HPLC.....	66

Tab. D-16 Gehaltsbestimmung der gesamten Flavonolglykoside und Quercetin in vier fermentierten Extrakten (2005–2008, Konzentration in % Extrakts, w/v) .....	72
Tab. D-17 Vergleich der pH-Werte in vier untersuchten fermentierten Birkenblätterextrakten (2005–2008)....	72
Tab. D-18 Gehaltsbestimmungen der Flavonolglykoside in den selbsthergestellten Extrakten.....	74
Tab. D-19 NMR-Daten von 3,4'-Dihydroxypropiofenon mit Literaturvergleich. <sup>1</sup> H-NMR: 400 MHz, [D <sub>4</sub> ]-MeOH. ....	76
Tab. D-20 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Birkenblätterextrakten.....	81
Tab. D-21 Ergebnisse der Proteinbestimmung für jeweils 2 Proben der fermentierten Birkenblätterextrakte von 2007 und 2008 .....	81
Tab. D-22 LOD- und LLOQ-Werte sowie Kalibrierdaten für die fünf untersuchten Referenzsubstanzen .....	84
Tab. D-23 Präzision und Genauigkeit für fünf charakteristische Komponenten aus Enzianwurzel sowie zwei Exktrakte .....	87
Tab. D-24 Gehaltsbestimmung der Iridoide und Xanthone in den fermentierten Extrakten 2006–2008 .....	91
Tab. D-25 Vergleich der pH-Werte von Proben aus den drei studierten fermentierten Enzianwurzelextrakten (2006–2008).....	93
Tab. D-26 NMR-Daten von Erythrocentaurin mit Literaturvergleich. <sup>1</sup> H-NMR: 400 MHz, <sup>13</sup> C-NMR: 100 MHz, [D <sub>4</sub> ]-MeOH. Literatur: <sup>1</sup> H-NMR: 90 MHz, <sup>13</sup> C-NMR: 22.5 MHz, CDCl <sub>3</sub> .....	94
Tab. D-27 NMR-Daten von E2. <sup>1</sup> H-NMR: 400 MHz, <sup>13</sup> C-NMR: 100 MHz, [D <sub>4</sub> ]-MeOH.....	97
Tab. D-28 Konzentration an Iridoiden und Xanthonen (% w/v) in Enzian-Proben nach verschiedenen Extraktionsverfahren. E+: Enzianwurzel, mit Temperaturwechsel nach HAB; EL+: Enzianwurzel und Laktose, mit Temperaturwechsel nach HAB; ELH-: Enzianwurzel, Laktose und Honig, ohne Temperaturwechsel nach HAB; G+: Gentiopikrosid, mit Temperaturwechsel nach HAB. ....	100
Tab. D-29 Vergleich der pH-Werte in den selbsthergestellten Extrakten. E+: Enzianwurzel, mit Temperaturwechsel nach HAB; EL+: Enzianwurzel und Laktose, mit Temperaturwechsel nach HAB; ELH-: Enzianwurzel, Laktose und Honig, ohne Temperaturwechsel nach HAB; G+: Gentiopikrosid, mit Temperaturwechsel nach HAB. ....	102
Tab. D-30 Prozentualer Gehalt an Amarogentin und Gentiopikrosid und ermittelter Bitterwert in den getesteten Extrakten unter Zugrundelegung publizierter Bitterwerte.....	105
Tab. D-31 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Enzianwurzelextrakten.....	106
Tab. D-32 Vergleich der pH-Werte von Proben aus zwei fermentierten Johanniskrautextrakten (2006 und 2007) .....	109
Tab. D-33 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Johanniskrautextrakten .....	110
Tab. D-34 Statistische Daten zur Kalibrierung.....	118
Tab. D-35 Validierungsdaten von Präzision und Richtigkeit für Nikotin .....	120
Tab. D-36 Präzision und Genauigkeit durch Aufstocken einer Probe fermentierten Extraktes mit verschiedenen Konzentrationen an Standard.....	120

Tab. D-37 Robustheit: Stabilität einer Referenzlösung (30 µg/ml Nikotin) durch Einfrieren und Auftauen .....	121
Tab. D-38 pH-Werte der Extrakte, jeweils vor/nach dem Einrotieren (vor: in ca. 100 ml Extraktionsmittel; nach: mit 2 g frischen Blättern/1.5 ml Methanol).....	122
Tab. D-39 Gehaltsbestimmung aller Proben der fermentierten Extrakte von 2006–2008.....	124
Tab. D-40 Vergleich der pH-Werte von Proben aus zwei fermentierten Tabakblätterextrakten (2006 und 2007) .....	125
Tab. D-41 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Milchsäurebakterien mittels MRS-Agar für die verschiedenen Chargen der fermentierten Tabakextrakten .....	127
Tab. E-1 Entwickelte chromatographische Trennmethoden .....	129
Tab. G-1 Chargen und Orte der Ernte der verschiedenen Pflanzen.....	149
Tab. G-2 Verwendete Vorschriften aus dem HAB und Zusammensetzung der Extrakte.....	150
Tab. G-3 Extraktionsverlauf mit Details des Temperaturwechsels in den Herstellvorschrift nach HAB.....	150
Tab. G-4 Proben, die aus den fermentierten Extrakten zwischen 2005 und 2008 gezogen wurden.....	151
Tab. G-5 Allgemein verwendete Chemikalien.....	151
Tab. G-6 Referenzsubstanzen .....	152
Tab. G-7 Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	153
Tab. G-8 Allgemein verwendete Geräte.....	153
Tab. G-9 Computerprogramme und Datenbanken .....	154
Tab. G-10 HPLC–Säulen.....	155
Tab. G-11 HPLC–UV: Verwendete Gradienten und Wellenlängen für die verschiedenen untersuchten Pflanzen. Abk.: f = Fluss (ml/min); HCOOH = Ameisensäure; HAC = Essigsäure; Sym. = Symmetry C18-Säule .....	156
Tab. G-12 LC–MS: Verwendete Gradienten und Wellenlängen für die verschiedenen untersuchten Pflanzen.	157
Tab. G-13 GC–MS: Temperaturgradienten .....	157
Tab. G-14 Zusammensetzung der hergestellten Auszüge.....	166
Tab. G-15 Gewicht und Konzentration an Gentiopikrosid der drei Fraktionen nach RP18-Säule.....	180
Tab. G-16 Verwendeten Bakterienstämme .....	189
Tab. G-17 Für die EMSAs verwendete Chemikalien.....	190
Tab. J-1 Chromatographic separation methods used .....	223
Tab. K-1 Méthodes de séparation chromatographique utilisées.....	229

### 4. Zusätzliche Daten



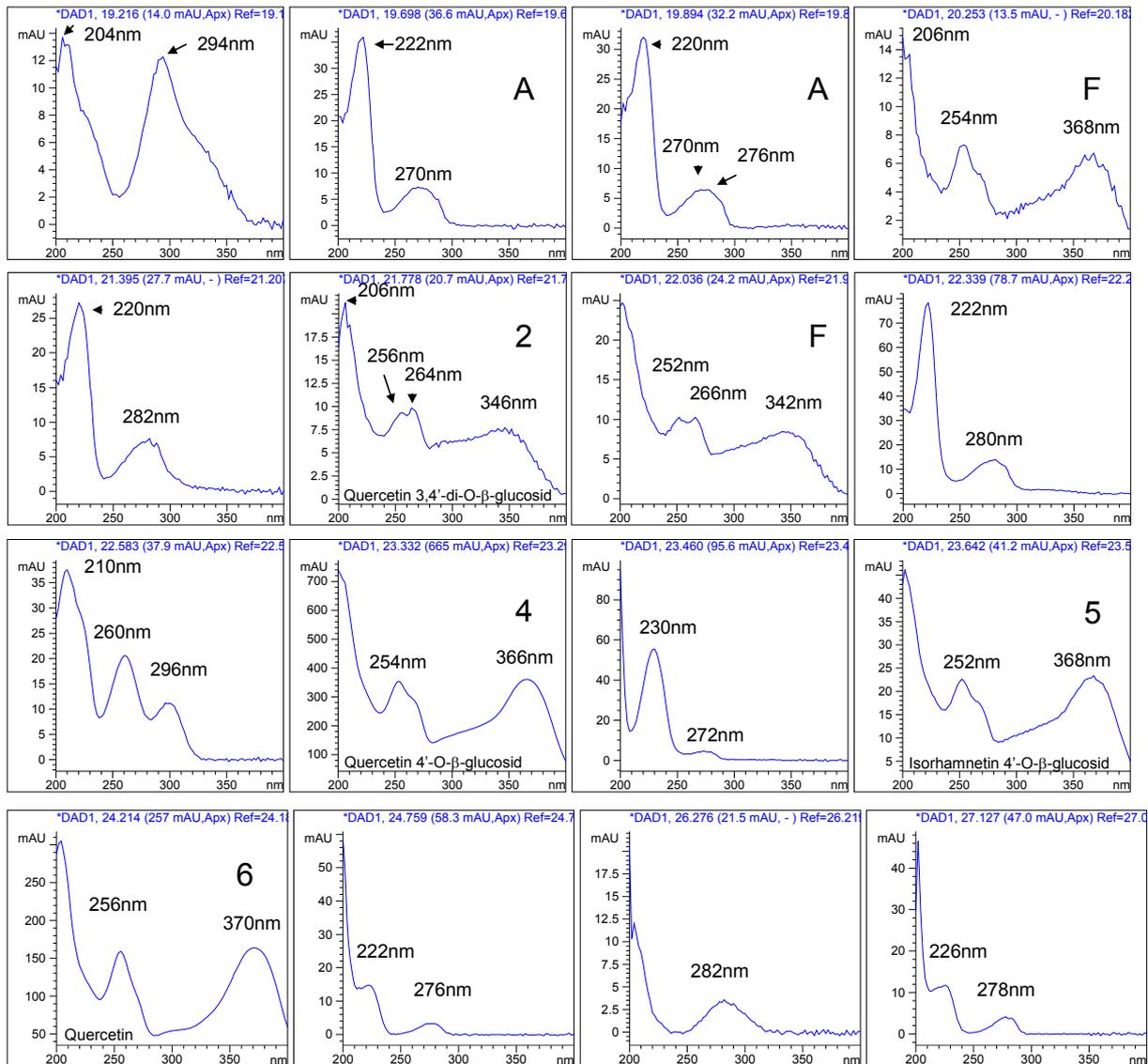


Abb. I-1 UV-Spektren des fermentierten Zwiebelextrakt von 2006; A: Aminosäure-ähnlich; F: Flavonoid.



## J Abstract in english

In the present work, phytochemical and biological analyses of fermented aqueous extracts from fresh plants were conducted to assess their stability. These extracts underwent a spontaneous fermentation through the co-extraction of the natural microflora as well as temperature changes during seven days (according to the “HAB”, the german homeopathic pharmacopoeia). Addition of whey or lactose and honey to the plant-water mixture results in the enrichment of lactic acid bacteria. The whole process leads to a lactic acid fermentation of the extracts. Following results were obtained:

1. **Chromatographic methods** were developed, which allowed good separation of the detectable compounds and provided an excellent fingerprint of the fermented extracts. These methods and their properties are listed in the next table.

**Tab. J-1** Chromatographic separation methods used

Plant (part)	Compounds to analyze	Method
<i>Allium cepa</i> (bulb)	Flavonoids and polar substances, like amino acids	RP-HPLC
<i>Arnica montana</i> (aerial parts)	Sesquiterpene lactones (SLs)	GC-MS*
<i>Betula pendula</i> (leaves)	Flavonoids (particularly <b>flavonols</b> ) as well as other phenolic compounds	<b>RP-HPLC</b>
<i>Gentiana lutea</i> (root)	<b>Iridoids</b> and <b>xanthoderivatives</b>	<b>RP-HPLC</b>
<i>Hypericum perforatum</i> (aerial parts)	Flavonoids, phloroglucinols and naphthodianthrones	RP-HPLC
<i>Nicotiana tabacum</i> (leaves)	Main alkaloids (particularly <b>nicotine</b> )	GC-MS / <b>GC-FID</b>

\*This method was developed by a former PhD-Student<sup>330</sup>

The organic sulphur compounds of *Allium cepa* could not be detected using these methods. Their concentrations were calculated based on three extracts using a pyruvate assay.

<sup>330</sup> Wagner & Merfort (2007)

2. Three of the developed chromatographic methods were validated for the **quantification of the main compounds** (in bold in the above table).
3. **Best conditions for an exhaustive extraction** were obtained for extracts from fresh birch leaves, gentian roots and tobacco leaves.
4. The **chemical stability of the fermented extracts** was investigated for each plant by dint of comparison of chromatograms and if possible through a time dependant quantitative analysis of the main compounds. In general, unstable compounds were mostly degraded during the first week (= during the extraction period) and mother tinctures were still chemically stable at the end of their shelf life (6–12 months). We could also observe that:
  - Sesquiterpene lactones (helenaline and dihydrohelenaline derivatives) were stable in all fermented *Arnica* extracts. The extracted content reached about 0.001 % (fresh weight).
  - Flavonoids turned out to be highly unstable in the fermented extracts from onions, birch leaves and St. John's wort. The decomposition rate was quantitatively determined in the birch leaves extract to be between 90 and 100 %.
  - The main compounds in the fermented extracts from fresh gentian roots showed a different behavior. In two batches of extract (2006 and 2008), iridoid loganic acid was very stable, with a degradation of only 0–10 % after 12 months. In contrast, a decomposition of 90 % within the same time was observed for 2007. The secoiridoids gentiopicroside and swertiamarin showed similar behavior, with a decay of 50 % over 12 months, although the content of swertiamarin rose during the week of extraction. Interestingly enough, the 2007 load did not contain gentiopicroside. The strongest bitter compound, amarogentin, was much more stable, with a maximum decomposition of 15–30 % over 12 months. The two detected xanthone derivatives, gentisin and isogentisin, were reduced evenly during the 12 months, with a maximum degradation of 53–69 %.

- Phloroglucinols and naphthodianthrones could not be detected in the fermented extracts from fresh St. John's wort. They could not be extracted under these conditions and therefore were not further examined.
  - Nicotine was slightly unstable in the fermented extracts from fresh tobacco leaves, particularly during the extraction week. The maximum degradation amounted to around 20% after 12 months.
5. The **decomposition products of the main phytochemicals** were analyzed by means of HPLC-DAD, LC-MS and GC-MS and, if possible, characterized and/or identified. The following degradation pathways could be observed:
- The fermented onion extracts were very unstable. Many decomposition products were detected which could unfortunately not be characterized.
  - In the birch leaf extracts, the quercetin glycosides were deglycosylated to quercetin first. The content of quercetin rose during the two first months of production to over the 5-fold of the initial concentration, before it later on sank. The main phenolics, 3,4'-dihydroxypropiophenone 3- $\beta$ -glucoside, was deglycosylated to 3,4'-Dihydroxypropiophenone which was the main decomposition product detected. Additionally, chlorogenic acid and p-cumaroylchonic acid were hydrolyzed to caffeic and p-cumaric acid, respectively. Evidences for traces of further degradation products were found such as phydroxyphenylpropionic acid, phydroxyacetophenone and catechol. They could have been formed either from quercetin or caffeic acid.
  - Two conversion products could be isolated in very small quantities from the fermented gentian extracts: the aldehyde erythrocentaurin and the similar molecule E2. Both were probably produced from the degradation of gentiopicroside or swertiamarin.
  - The main decomposition product of nicotine in the tobacco leaf extracts were 2pyrrolidinone and nornicotine.
  - The quercetin-glycosides in onion and St. John's wort extracts were rapidly decomposed, but in this case quercetin was detected from the beginning in

the samples. An increase of the peak could not be observed, nevertheless, quercetin was the most stable flavonol.

6. **Changes in the production process** had different **effects**:

- The extracts from birch leaves as well as from gentian roots which were prepared without temperature changes became moldy after two weeks, in contrary to all extracts prepared with temperature changes, according to HAB requirements.
- Addition of whey accelerated the decomposition of the flavonols in the birch leaf extracts.
- Addition of lactose and honey resulted in no detectable effect.

7. As a **model experiment for the production of decomposition products**, pure reference substances – Hyperosid for the quercetin-glycosides and gentiopicrosid for the secoiridoids – were subjected to the conditions of a rhythmisation. The substances were thereby unstable and rapidly decomposed. Nonetheless no conversion product from hyperosid could be detected and the formed decomposition products of gentiopicrosid were present in too small quantities to be characterized.

8. The **chemical and microbiological properties** of the extracts were compared.

- No substantial differences were observed between the pH values of the different batches of extract. Altogether the values laid between pH 3.5 and 5.
- Onion and birch leaves extract, produced with whey, contained all lactic acid bacteria, but not necessarily over the entire production process: In the batch of 2008, germs could only be observed during the extraction. For the other plants, the extracts were produced with lactose and honey instead of whey and the microbiological data were different: No lactic acid bacteria could be detected in the gentian root extracts, arnica extracts contained lactic acid bacteria mainly during the first week (extraction week) and the tobacco leaves and St. John's wort extracts during the whole manufacturing process.

9. The **biological activity of the fermented mother tinctures from onions and arnica** was examined and compared with different types of extracts.

- A fermented, an aqueous and a methanolic onion extract (prepared in each case from the same onion batch) were examined with regard to their antimicrobial properties by means of agar diffusion tests and bacteria growth kinetics. The aqueous extract showed no activity, the methanolic extract a weak activity and the fermented one a moderate activity, especially against gram-negative bacteria.
- In order to examine the anti-inflammatory activity of the arnica extracts, their inhibition potential of the DNA–NF- $\kappa$ B-connection was tested by means of EMSA assays. The different extracts showed a SL-concentration dependent effect. The fermented extracts exhibited the smallest SL-concentration and also the weakest effect.



## K Résumé en français

Au cours de ce travail, des analyses phytochimiques et biologiques d'extraits fermentés, produits à base de plantes fraîches, ont été conduites pour évaluer leur stabilité. Ces extraits subissent une fermentation spontanée, par le biais de la co-extraction de la flore bactérienne naturelle, ainsi que des variations de température durant sept jours (d'après le « HAB », la Pharmacopée homéopathique allemande). L'ajout de lactosérum d'une part ou de lactose et de miel d'autre part conduit à un enrichissement en lactobacilles. Finalement, le procédé complet provoque une fermentation lactique des extraits. Les résultats suivants ont été obtenus :

1. Des **méthodes chromatographiques** ont été développées, permettant la séparation des composés principaux des extraits de plantes respectifs. Ces méthodes et leurs propriétés sont résumées dans le tableau ci-dessous.

**Tab. K-1** Méthodes de séparation chromatographique utilisées

Plante (partie)	Composés analysés	Méthode
<i>Allium cepa</i> (oignon)	Flavonoïdes et substances polaires, comme des acides aminés	RP-HPLC
<i>Arnica montana</i> (parties aériennes)	Sesquiterpène lactones (SLs)	GC-MS*
<i>Betula pendula</i> (feuilles)	Flavonoïdes (particulièrement <b>flavonols</b> ) ainsi que d'autres composés phénoliques	<b>RP-HPLC</b>
<i>Gentiana lutea</i> (racines)	<b>Iridoïdes</b> et <b>xanthones</b>	<b>RP-HPLC</b>
<i>Hypericum perforatum</i> (parties aériennes)	Flavonoïdes, dérivés du phloroglucinol et naphthodianthrones	RP-HPLC
<i>Nicotiana tabacum</i> (feuilles)	Alcaloïdes (particulièrement la <b>nicotine</b> )	GC-MS / <b>GC-FID</b>

\*Cette méthode avait été développée par un ancien doctorant<sup>331</sup>

<sup>331</sup> Wagner & Merfort (2007)

Les composés organiques soufrés de l'oignon n'ont pas pu être détectés avec les méthodes utilisées. Leur contenu a été calculé à titre indicatif pour trois extraits, au moyen d'une analyse de la teneur en pyruvate.

2. Trois des méthodes chromatographiques développées ont été **validées** pour la **quantification des composés principaux**. Ceux-ci sont marqués en gras dans le tableau ci-dessus.
3. **Les meilleures conditions pour une extraction maximale** des composés de plantes fraîches ont été identifiées pour les feuilles de bouleau, les racines de gentiane et les feuilles de tabac.
4. La **stabilité des extraits fermentés** a été étudiée pour chaque plante. En général, les composés instables ont été dégradés principalement pendant la première semaine (c'est-à-dire au cours de la période d'extraction) et les teintures mères étaient stables à la fin de la période de stockage (6-12 mois). Plus précisément, les observations suivantes ont été faites :
  - Les lactones sesquiterpéniques (dérivés de l'hélénaline et de la dihydrohélénaline) étaient stables dans tous les extraits fermentés d'arnica. Le contenu extrait s'élevait à environ 0.001 % (sur la base du poids frais).
  - Les flavonoïdes se sont avérés être très instables dans les extraits fermentés d'oignons, de feuilles de bouleau et de millepertuis. Leur décomposition a été quantifiée dans l'extrait de feuilles de bouleau et représentait 90–100 %.
  - Les principaux composés des extraits fermentés de racines de gentiane ont montré un comportement différent. Pour deux lots de l'extrait (années 2006 et 2008), l'acide loganique, un iridoïde, était très stable, avec une dégradation de 0–10 % après 12 mois. En revanche, une décomposition de 90 % dans le même délai a été observée pour l'année 2007. Deux secoiridoïdes, le gentiopicroside et la swertiamarine, ont montré un comportement similaire, avec une décomposition de 50% sur 12 mois, bien que la teneur en swertiamarine ait augmenté au cours de la semaine d'extraction. Fait

intéressant, la charge de 2007 ne contenait pas de gentiopicroside. Le plus fort composé amer, l'amarogentin, était beaucoup plus stable, avec une décomposition maximale de 15–30% sur 12 mois. Les deux xanthones détectées, la gentisine et l'isogentisine, ont été décomposés uniformément au cours des 12 mois, avec une dégradation maximale de 53–69%.

- Les phloroglucinols et naphthodianthrones n'ont pas pu être détectés dans les extraits fermentés de millepertuis. Ils ne pouvaient pas être extraits dans ces conditions et n'ont donc pas pu être examinés.
- La nicotine était légèrement instable dans les extraits fermentés de feuilles de tabac frais, en particulier pendant la semaine d'extraction. La dégradation maximale s'élevait à approximativement 20% après 12 mois.

5. Les **produits de décomposition des principaux composés phytochimiques** furent analysés au moyen d'analyses HPLC-DAD, LC-MS et GC-MS et, si possible, identifiés. Les voies de dégradation suivantes purent être observées :

- Les extraits fermentés d'oignons étaient très instables. Beaucoup de produits de décomposition furent détectés, qui, malheureusement, ne purent pas être caractérisés.
- Dans les extraits de feuilles de bouleau, les glycosides de la quercétine furent tout d'abord deglycosylés en quercétine. La quantité de cette dernière augmenta durant les deux premiers mois de la production (jusqu'à plus de cinq fois la concentration de départ), avant de baisser à son tour. Le principal dérivé phénolique, le 3,4'-dihydroxypropiophenone 3- $\beta$ -glucoside, fut deglycosylé pour donner la 3,4'-dihydroxypropiophenone, le principal produit de décomposition observé. De plus, les acides chlorogénique et p-coumaroylchinique furent hydrolysés, donnant les acides caféique et p-coumarique, respectivement. Des traces d'autres produits de décomposition ont pu être mises en évidence, comme l'acide p-hydroxyphenylpropionique, la p-hydroxyacetophenone et le catechol. Ils peuvent avoir été formés à partir de la décomposition de la quercétine ou de l'acide caféique.
- Deux produits de conversion ont pu être isolés en petite quantité d'un extrait fermenté de racines de gentianes: un aldéhyde, l'erythrocentaurine ainsi que

la molécule E2, de structure similaire. Cette dernière n'a pas pu être entièrement caractérisée. Les deux molécules proviennent probablement de la dégradation du gentiopicroside ou de la swertiamarine.

- Le principal produit de décomposition de la nicotine dans les extraits fermentés de feuilles fraîches de tabac étaient la 2-pyrrolidinone ainsi que la nornicotine.
- Les glycosides de la quercétine dans les extraits d'oignon et de millepertuis furent rapidement décomposés, mais dans les deux cas, la quercétine a pu être détectée dès le premier jour d'extraction. Un accroissement du pic ne put pas être observé, mais néanmoins, la quercétine était le flavonol le plus stable dans ces extraits.

6. Les **modifications faites dans le procédé de fabrication**, d'après le HAB, des extraits fermentés eurent des effets variés :

- Les extraits de feuilles de bouleau ainsi que de racines de gentiane qui furent préparés sans variation de température moisirent après deux semaines, contrairement aux extraits préparés avec variation de température.
- L'addition de lactosérum accéléra la décomposition des flavonols dans les extraits de feuilles de bouleau.
- L'addition de lactose et de miel n'eut aucun effet détectable.

7. En guise de **modèle pour la production de molécules de décomposition**, des molécules de référence – l'hypéroside pour les glycosides de la quercétine et le gentiopicroside pour les sécoiridoïdes – ont été soumises aux conditions d'extraction des extraits fermentés, avec variation de température. Les molécules étudiées se montrèrent instables et se décomposèrent rapidement. Néanmoins, aucun produits de décomposition de l'hypéroside ne purent être détectés et les molécules formées à partir de la dégradation du gentiopicroside étaient présentes en trop petites quantités pour pouvoir être caractérisées.

8. Les **caractéristiques chimiques et microbiologiques** des extraits furent comparées.

- Les différences entre les pH des différents lots d'extraits étaient non significatives. Les valeurs étaient toutes entre pH 3.5 et 5.
- Les extraits d'oignon et de feuilles de bouleau, produits avec du lactosérum, contenaient toutes des lactobacilles, mais pas toujours pendant tout le processus de production: dans le lot de 2008, des germes ne purent être observés que lors de l'extraction. Pour les autres plantes, les extraits furent préparés avec du lactose et du miel au lieu du lactosérum et les données microbiologiques étaient différentes: Aucun germe de lactobacilles ne put être détecté dans les extraits de racines de gentiane, les extraits d'arnica contenaient principalement des lactobacilles dans les échantillons pris lors de la semaine d'extraction et les extraits de feuilles de tabac et de millepertuis en comportaient tout au long du processus de fabrication.

**9. L'activité biologique des teintures mères fermentées d'oignon et d'arnica fut examinée et comparée avec celle de différents types d'extraits.**

- Les caractéristiques antimicrobiennes d'un extrait d'oignon fermenté, d'un aqueux et d'un méthanolique (tous préparés à partir du même lot d'oignons) furent analysées au moyen d'un test de diffusion sur agar et d'une cinétique de croissance bactérienne en milieu liquide. L'extrait fermenté montra une activité modérée, surtout envers les bactéries gram-négatives testées, l'extrait méthanolique une activité faible et l'extrait aqueux aucune activité.
- Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits d'arnica, leur potentiel d'inhibition de la liaison DNA–NF- $\kappa$ B fut examinée avec un test EMSA. Les différents extraits montrèrent une activité dépendante de leur concentration en lactones sesquiterpéniques. Les extraits fermentés exhibèrent la plus faible concentration ainsi que la plus faible activité anti-inflammatoire.



## L Danksagung – Acknowledgment – Remerciements

Das Projekt fand als Kooperation zwischen Frau Prof. Dr. Irmgard Merfort (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Universität Freiburg) und der Firma WALA Heilmittel GmbH statt.

Frau Prof. Dr. Irmgard Merfort, Ihnen danke ich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können sowie für Ihre Betreuung und die große Unabhängigkeit, die Sie mir von Anfang an zugetraut haben. Ein Dankeschön auch für Ihre sehr schnelle Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Florian Stintzing (WALA Heilmittel GmbH) danke ich herzlich für die Zusammenarbeit, die hunderten Literaturmails, die immer hilfreiche, interessante und freundliche Fernbetreuung sowie für die Übernahme des Korreferats. Ich bedanke mich ebenso für die Korrektur dieses Manuskripts und Ihre Jagd nach den letzten Fehlern.

Vielen Dank ebenfalls an Dr. Gabriel Ossenkamp (früher bei WALA Heilmittel GmbH) für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit zu starten und für die Fernbetreuung im ersten Jahr. Danke, dass Du mir dieses schöne Thema vorgeschlagen hast, ich habe es von Anfang bis Ende spannend gefunden, auch wenn die Methodenentwicklung anfangs langwierig war!

Ganz besonders möchte ich mich auch bedanken bei:

- Allen Mitarbeitern des WALA-Pflanzenlabors, die drei Jahren lang tausende „Millet-Proben“ gezogen haben, meistens ohne zu wissen, wo diese komischen, geheimnisvollen Proben hingehen sollten.
- Herrn Selinger (ebenfalls vom Pflanzenlabor) für die Erklärungen, damit ich im Labor fermentierte Ansätze selbst anfertigen konnte.
- Julia Bertrams für alle LC-MS Analysen bei der WALA sowie für das regelmäßige Nachschauen unseren Daten. Es hat mich gefreut, 3 Tagen mit Dir arbeiten zu dürfen.
- Petra Molnar und Gabriela Biczko, vom WALA-Analytiklabor, für die Probenlogistik.
- Steffen Wagner für die Betreuung in den ersten Monaten meiner Arbeit, für die Einführung in die Welt der HPLC-Technik und des Rumschraubens sowie in das Validierungssystem. Danke auch, dass Du am Anfang da warst, um meine Fragen

anzuhören! Dank Dir habe ich gemerkt, wie hilfreich es ist, eine Frage laut zu stellen: Die Lösung kommt meist irgendwie von selbst!

- Ein großes Dankeschön an Raymund Klein von der Firma Bayer für seine HPLC-Notrufnummer und alle Tipps, dank denen ich (fast) alles selbst reparieren konnte.
- Barbara für die EMSAs und ihren ständigen HaCaT-Kampf...
- Herrn Brecht und Herrn Warth für die Durchführung der NMR- bzw. MS-Analysen.
- Prof. Jonas für die Möglichkeit, meine Zwiebelsäfte bei ihm auf antibakterielle Wirkung testen zu können.
- Inge Engels für die Einführung in die Bakterienwelt und die sehr nette Zusammenarbeit.
- Evelyn Lamy für Ihre „¾ Jahr“-Arbeit mit den Zwiebelsaft-Analysen und für die netten Gespräche. Ich hoffe, dass unser Paper etwas wird!
- Prof. Brückner und Luc Nachbauer für die Möglichkeit, den Ansatz zur Methylierung durchführen zu können.
- Nicho Bartl für seine Hilfe und seine Geduld bei der Gentisin-Isolierung, *Allium*-Chromatogramm-Vergleiche, und vor allem bei den Millionen Arnika-Aufarbeitungen... Es hat mich gefreut, mit Dir zu arbeiten.
- Der WALA GmbH für die Finanzierung eines Teils meiner Doktorarbeit.
- Dem DAAD für 10 Monate Finanzierung sowie dem DAAD-Freundeskreis für den netten DAAD-Stammtisch – fantastisch um tolle Leute in einer fremden Stadt kennenzulernen!
- Allen PBIII-Praktikantinnen, Polina, Myriam, Anne, Sylvia und Marie, für die nette Mitarbeit und ihre fleißigen Pflanzenextraktionen.
- Andrea Horz (IGA) für die Grammatikkorrektur der Einleitung.
- Christoph für das Nachschauen eines Stückchens der Einleitung.
- Katrin, Kathrin und Sandra für die Grammatikkorrektur des ganzen Restes und die tollen Erklärungen zu meinen Fragen: Was ist der Unterschied zwischen Ablauf und Verlauf??? Öööh, warum schreibt man das so??? usw. ... ;-)

And because a PhD-Thesis is not just work, but much more a big peace of life:

Many thanks to the whole Merfort's group for the nice and friendly ambiance. I will miss all of you. I hope to see you in Grenoble! Thanks also to our "visitors" from all over the world,

I loved this international flair!! Ein besonderer Dank an Torsten und Cleber, es war schön, mit Euch das Büro zu teilen. And thanks a lot to Marcio for your whistling in the lab, your smile and your “relax!!!”.

Vielen lieben Dank an die Künstlerinnen der Koch-AG für die freundliche und kreative Bereitschaft fleisch- und weizenfrei zu kochen!!!! Wir hätten echt ein Kochbuch publizieren können... :-)

Vielen lieben Dank an Roza, Jara, Anna, Iannis, Almir, Carlo, Katarina, Alessandra und Tamy für all unsere (Koch-)Abende, spannenden Diskussionen und wertvollen Freundschaften! Ihr habt so sehr dazu beigetragen, dass meine Zeit hier so schön und reich war!

Weiterhin muss ich mich auch bei der Casa Española für ihre leckeren Patatas fritas bedanken, sowie bei Afghan-Eck und Kucci für die besten Auberginen der Stadt!

Und weil Freiburg nicht nur kulinarisch interessant war, möchte ich mich ganz herzlich bei Maruma für Ihre yogische Unterstützung bedanken. Eine Doktorarbeit ist auch ein Ausdauersport und Yoga hat mir die Kraft und Ausdauer geschenkt, um bis zum Ende durchhalten zu können.

Danke an Tine, Bety und Edda für unser freundliches, fröhliches und ruhiges Zuhause. Es war schön, mit Euch zusammen zu leben!

Danke auch an Judith, Nicolai und Paula für Eure Freundschaft! Es hat mir sehr gut getan, in den letzten Monaten manchmal aus der Stadt fliehen zu können, um Euch zu besuchen. Ich freue mich schon auf den kleinen 4. der Familie! :-)

Merci à la troupe de la Tête d’Ours, pour nos weekends et aussi pour vos mails, vos nouvelles, vos joies, vos bêtises ... C’était bien de vous sentir proche !

Merci à Sev de m’avoir fait connaître WALA, à mes parents pour leur confiance et la liberté qu’ils m’ont offerte dans tous mes choix, toutes mes décisions. Merci aussi à maman pour son assistance téléphonique avec mise en route automatique de fontaine...

Michaël, merci simplement d’être là !!!!! Et merci aussi de m’avoir offert cette bouée ensoleillée à Gières, ça m’a beaucoup aidée à tenir, et aussi à écrire vite ! Youhou, bientôt la fin de tant de temps à distance !!!!



## M Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name	Agnès Millet
Geburtsdatum	24. April 1982
Geburtsort	Conflans Sainte-Honorine (F)
Staatsangehörigkeit	Französisch
Familienstand	Ledig
<i>E-mail</i>	millet_agnes(a)yahoo.fr

### SCHULBILDUNG

07/2000	Baccalauréat (Abitur) mit Naturwissenschaftlichem Schwerpunkt und Vermerk „Mention Européenne“
09/1997–07/2000	Lycée Galilée, Cergy (F)
09/1993–07/1997	Collège La Justice, Cergy (F)
09/1988–07/1993	Ecole primaire La Justice, Cergy (F)

### AKADEMISCHE AUSBILDUNG

04/2006	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Universität Freiburg unter Leitung von Prof. Dr. I. Merfort
12/2005	Studiumabschluß als Diplomchemikerin der Technischen Universität Dresden sowie „Diplôme d’Ingénieur“ der Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux (ECPM), Straßburg (F) – Äquivalenz Master’s Degree
11/2004–03/2005	Chemie-Diplom an der Technische Universität Dresden, Vertiefungsfach Organische Chemie, im Rahmen eines

- Doppeldiplomstudienganges mit der Louis Pasteur Universität in Straßburg (F)
- 09/2002–06/2004 Dreisprachiges Hauptstudium im Fach Organische Chemie an der ECPM, Straßburg (F)
- 09/2000–06/2002 Grundstudium am Lycée Honoré de Balzac, Paris (F), zur Vorbereitung der nationalen Aufnahmeprüfungen zu den französischen Chemiehochschulen (Grandes Ecoles). Hauptfächer: Physik, Chemie und Mathematik

#### BISHERIGE FORSCHUNGSTÄTIGKEITEN UND PRAKTIKA

- 03 – 12/2005 Diplomarbeit an der TU Dresden im Arbeitskreis von PD Dr. Martin Hiersemann – „Arbeiten zur enantioselektiven Totalsynthese von Agardhilacton, einem Oxylipin aus der Rotalge *Aghardhiella subulata*“
- 07 – 10/2004 Givaudan Schweiz AG (Dübendorf, CH) im Labor für Synthese neuer Duftmoleküle, unter Betreuung von Dr. Granier – Organische Synthese und GC-Analytik
- 07/2003 Institut Fresenius, Angewandte Festkörperanalytik GmbH (Dortmund) – Oberflächenanalytik bei porösen Feststoffe

#### SPRACHEN

- |             |                              |
|-------------|------------------------------|
| Französisch | Muttersprache                |
| Deutsch     | Verhandlungssicher           |
| Englisch    | Sehr gut in Wort und Schrift |