

Cimicifugae rhizoma: Phytoanalytische Charakterisierung von Kulturpflanzen und Entwicklung alternativer Prüfmethoden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marian Bittner

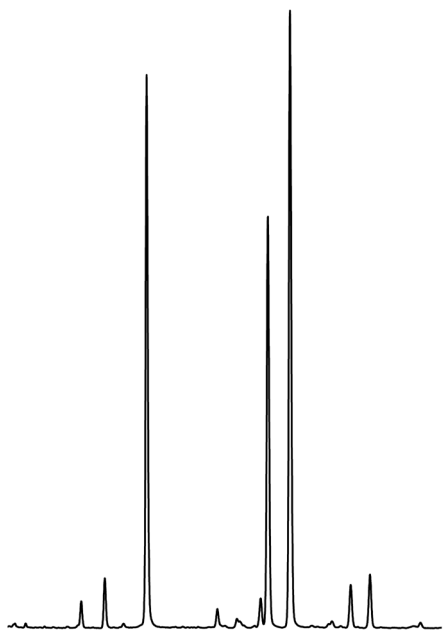
Berlin 2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum November 2014 bis Oktober 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweitgutachter: Prof. Dr. Werner Knöss

Tag der Disputation: 16.05.2018



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Traubensilberkerze.....	4
1.2 Pflanzliche Arzneimittel.....	8
1.3 Kultivierung der Traubensilberkerze.....	9
1.4 (Pharmazeutische) Qualität von <i>Cimicifugae rhizoma</i>	12
1.5 Chemometrie in der Phytoanalytik.....	16
1.6 Nahinfrarotspektroskopie in der Phytoanalytik.....	18
1.7 Metabolomik in der Phytoanalytik.....	20
1.8 Zielsetzung.....	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Exemplare von <i>A. racemosa</i> (L.) und anderen <i>Actaea</i> spp.	24
2.2 Anlagen, Geräte und Software.....	29
2.2.1 Mahlen und Extraktion.....	29
2.2.2 Dünnschichtchromatografie.....	29
2.2.3 Flüssigchromatografie.....	29
2.2.4 Spektroskopie und Massenspektrometrie.....	30
2.2.5 Software.....	30
2.2.6 Sonstige Geräte.....	30
2.3 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Standards.....	31
2.4 Probenvorbereitung.....	32
2.4.1 Vorbereitung und Mahlen der Proben.....	32
2.4.2 Extraktion der Proben.....	33
2.5 Instrumentell-analytische Methoden.....	34

2.5.1	Dünnschichtchromatografie (HPTLC).....	34
2.5.2	Quantifizierung der Polyphenole mittels LC/DAD.....	35
2.5.3	Quantifizierung der Triterpenglykoside mittels LC/ELSD.....	36
2.5.4	Identifizierung von Metaboliten mittels LC/MS.....	37
2.5.5	Chemical Profiling mittels UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS/MS ^E	38
2.5.6	UV-Spektroskopie.....	38
2.5.7	FT-NIR-Spektroskopie.....	38
2.5.8	FT-Raman-Spektroskopie.....	39
2.6	Multivariate Analysemethoden und Statistik.....	39
2.6.1	Explorative Analyse der quantitativen Daten aus LC/DAD/ELSD.....	39
2.6.2	Chemical Profiling mittels UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS/MS ^E	40
2.6.3	Multivariate Klassifizierung für qualitative Analyse (UVS/LDA).....	40
2.6.4	Multivariate Regression für quantitative Analyse (NIRS).....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Charakterisierung von Kulturpflanzen.....	42
3.1.1	Validierung und Verifizierung der quantitativen LC-Methoden.....	42
3.1.2	Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatografie.....	53
3.1.3	Polyphenole und Triterpenglykoside in <i>Cimicifugae rhizoma</i>	58
3.1.4	Non-targeted Chemical Profiling via UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS/MS ^E	76
3.2	Identifizierung von <i>Cimicifugae rhizoma</i>	83
3.2.1	Identifizierung mittels UVS/LDA.....	84
3.2.2	Identifizierung anhand von Polyphenol-Mustern.....	87
3.2.3	Identifizierung mittels NIR-Spektroskopie.....	90
3.3	Quantitative Schwingungsspektroskopie.....	93
3.3.1	FT-Raman-Spektroskopie.....	93
3.3.2	FT-NIR-Spektroskopie.....	94
4	Diskussion.....	101
4.1	Quantifizierung mittels Flüssigchromatografie.....	101
4.2	<i>Cimicifugae rhizoma</i> aus Kultur.....	103
4.3	Identifizierung von <i>Cimicifugae rhizoma</i>	107

4.4	Quantifizierung mittels FT-NIR-Spektroskopie	110
	Anhang	113
1.	Polyphenole und Triterpenglykoside in <i>Cimicifugae rhizoma</i>	113
2.	Massenspektren der Polyphenole und Triterpenglykoside	119
3.	Polyphenole und Triterpenglykoside in LC/MS	121
	Zusammenfassung	122
	Summary	124
	Literaturverzeichnis	126
	Abbildungsverzeichnis	136
	Tabellenverzeichnis	138
	Publikationsverzeichnis	139
	Danksagung	140
	Lebenslauf	141
	Eidesstattliche Erklärung	142

Abkürzungsverzeichnis

1/2D	First/Second derivation (1./2. Ableitung)
AMG	Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln
ANN	Artificial neural networks
ANOVA	Analysis of variances
BP	British Pharmacopoeia
BPC	Base-peak chromatogram
cGMP	Current Good Manufacturing Practices
CH/VMP	Committee for Medicinal Products for Human/Veterinary Use
CSV	Comma-separated values (Dateiformat)
DAD	Diodenarray-Detektor
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDQM	European Directorate for Quality of Medicines
EIC	Extracted ion chromatogram
ELSD	Evaporative light scattering detector (Lichtstreuendetektor)
EMA	European Medicines Agency
ER	Error rate
ESCOP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI	Electrospray-ionisation
FC	Fold change
(FI)MS	(Flow injection) Mass spectrometry
(FT-)NIR(S)	(Fourier transform) Near-infrared (spectroscopy)
GC	Gas chromatography (Gaschromatografie)
HCA	Hierarchical cluster analysis
HMPC	Committee on Herbal Medicinal Products
(HP)TLC	(High performance) Thin-layer chromatography
HRS	Herbal reference substance (des EDQM)
ICH	International Conference on Harmonisation
IQR	Inter quartile range (Interquartilsabstand)
L1/10%out	Leave-one/10%-out cross validation
LDA	Linear discriminant analysis
LOD/Q	Limit of detection/quantification
MIR(S)	Mid-infrared (spectroscopy)

MMN	Min-max-normalisation
MSC	Multiplicative scatter correction
MVA	Multivariate analysis (Multivariate Analysemethoden)
NER	Non-error rate
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
PCA	Principle component analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Principle component regression oder polymerase chain reaction
Ph. Eur.	Pharmacopoeia European
PLS(R/-DA)	Partial least squares (regression/-discriminant analysis)
QTOF	Quatropole time-of-flight (Quadrupol-Flugzeit-Analysator)
(RM)SECV	(Root mean) Square error of cross validation
RMSEP	Root mean square error of prediction
RP	Reversed phase (Umkehrphase)
RPD	Ratio of performance to deviation (SEP/SD)
(R)SD	(Relative) Standard deviation
SEC	Standard error of calibration
SEP	Standard error of prediction
SIMCA	Soft independent modelling of class analogies
SST	System suitability test
SVN	Standard vector normalisation
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TIC	Total ion chromatogram
(U/HP)LC	(Ultra/High performance) Liquid chromatography
USP	United States Pharmacopoeia

1 Einleitung

Die Therapie von Erkrankungen mit pflanzlichen Heilmitteln ist der Ursprung aller Arzneimittelanwendung. Das Wissen um heilsame Pflanzen war bereits in verschiedensten Urvölkern der Welt ein integraler Bestandteil in ihrer Stammeskultur. Über die Antike bis in die Zeit zum Ende des 19. Jahrhunderts wurde diese Heilkultur stets weiterentwickelt und über Generationen weitergegeben. All diesen Entwicklungsstufen ist gemein, dass das Wissen um Heilpflanzen den Heilkundlern vorbehalten war. Diese Heilkundler waren Botaniker, Mediziner und Apotheker in einer Person. Heilpflanzen wurden in der Regel in der freien Natur gesammelt und unmittelbar am Patienten angewandt.

Heute stellen in Deutschland Phytopharmaka mit 172 Mio. abgegebenen Packungen im Jahr 2016 (Umsatz EUR 1,6 Mrd.) einen bedeutenden Markt dar [1]. Die Herstellung von Arzneimitteln ist industrialisiert. In der Wertschöpfungskette finden sich viele Parteien, vom Anbauer bzw. Sammler, den Großhändlern und Herstellern bis hin zu den Ärzten und den Apothekern als letzte Instanz vor der Abgabe eines solchen pflanzlichen Arzneimittels. Der große Bedarf an Arzneidroge führt häufig zur Notwendigkeit eines kommerziellen Anbaus der Arzneipflanzen. Die Vertriebswege über verschiedene Großhändler machen eine Prüfung auf pharmazeutische Qualität einer Arzneidroge als Ausgangsstoff für die Herstellung eines Phytopharmakons obligat.

Die Therapie mit pflanzlichen Heilmitteln beruht auf der Erfahrung des jeweiligen Heilkundigen und der langjährigen Anwendung. Die heutige Medizin verlangt jedoch zunehmend nach klinischer Evidenz (Evidenzbasierte Phytotherapie). In entsprechenden Studien soll eine Wirksamkeit eines Phytopharmakons belegt werden. Ein solcher Nachweis kann jedoch nur gelingen, wenn die Qualität eines solchen Phytopharmakons reproduzierbar ist. Aufgrund der naturgegebenen großen Diversität von Arzneipflanzen, vor allem im Hinblick auf Schwankungen innerhalb einer Spezies, gelingt es oft nicht einen solchen Nachweis zu erbringen. Da auch noch eine Vielzahl von unterschiedlichen Extraktionsverfahren und Darreichungsformen neben Varietäten und Subspezies existieren, ist es meist unmöglich, eine allgemein gültige Evidenz bezogen auf die Anwendung einer bestimmten Art oder gar Gattung (z. B. „*Cimicifuga*“) zu erbringen. Vielmehr kann eine solche nur produkt- bzw. extrakt-spezifisch erbracht werden. Eine reproduzierbare Herstellung, von der Beschaffung der Arzneidroge, über die Extraktion, bis hin zur Produktion, stellt dabei eine Voraussetzung für das Gelingen eines solchen Nachweises dar.

Die in den östlichen Wäldern von Nordamerika heimische Traubensilberkerze – *Actaea racemosa* (L.) – gehört zu den am besten untersuchten Arzneipflanzen. Traditionell wird sie in den USA und Europa zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden eingesetzt. Pharmakologische Studien bestätigen eine nicht hormonartige Wirksamkeit [2-6] und deuten einen Einfluss der Inhaltsstoffe auf den Neurotransmitterhaushalt an [7-10]. Damit scheint

auch die Sicherheit im Hinblick auf die Promotion von hormonabhängigen Tumoren gegeben zu sein [11]. Dies macht die Traubensilberkerze für viele Patientinnen und behandelnde Ärzte zu einer Alternative zu Hormonersatztherapien und anderen Behandlungsoptionen [12].

Ein Cochrane Review aus dem Jahr 2012 kam zu der Schlussfolgerung, dass die derzeitige Datenlage zu heterogen ist, um eine klare Aussage über die Wirksamkeit von „*Cimicifuga* spp.“ zur Therapie von Wechseljahresbeschwerden treffen zu können [13]. Auf der anderen Seite stehen zahlreiche Studien, die in der Lage waren, eine signifikante Verbesserung der entsprechenden Symptomatik zu erzielen [14-20]. Was haben diese Studien gemeinsam? Sie verwendeten spezifische Extrakte in Produkten, die eine pharmazeutische Qualität, nachgewiesen durch eine Zulassung als pflanzliches Arzneimittel, aufwiesen [21]. Die Wirksamkeit eines pflanzlichen Arzneimittels wird scheinbar maßgeblich durch seine (pharmazeutische) Qualität bestimmt.

In allen oben genannten Studien bestätigte sich neben der Wirksamkeit der Traubensilberkerze auch ihre Sicherheit im Hinblick auf hormonabhängige Tumore und andere, weniger schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Dennoch wird immer wieder vor dem Auftreten von Leberschäden im Zusammenhang mit der Einnahme von Produkten der Traubensilberkerze gewarnt [22,23]. Ein systematischer Review von gemeldeten Fällen, durchgeführt vom USP „Dietary Supplement Information Expert Committee“, kommt zu dem Entschluss, dass ein solcher Zusammenhang „möglich, jedoch nicht wahrscheinlich“ ist [23]. Ein Assessment Report des HMPC aus dem Jahr 2006 fasst Fallberichte aus USA und Europa zusammen und wertet deren Auftreten als ein Signal, auch wenn der Zusammenhang zwischen *Actaea racemosa* und Hepatotoxizität nicht eindeutig ist [24]. Die Fallberichte sind in der Regel schlecht dokumentiert. Trotzdem wurden Warnhinweise in die Fachinformationen der entsprechenden Produkte aufgenommen [25]. Ein kanadischer Bericht zur Arzneimittelsicherheit von Produkten der Traubensilberkerze führt einige Fälle der Hepatotoxizität auf eine Verfälschung der entsprechenden Produkte zurück [26]. Die Unbedenklichkeit von pflanzlichen Heilmitteln der Traubensilberkerze scheint daher vermutlich auch mit der korrekten Identität/Reinheit des Ausgangsmaterials zusammenzuhängen.

Die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von pflanzlichen Arzneimitteln hängt maßgeblich von der pharmazeutischen Qualität ab. Der Annex 7 der europäischen GMP Richtlinien *Manufacture of Herbal Medicinal Products* schreibt daher eine Prüfung von Identität und Verunreinigung einer Droge vor und verweist auf die entsprechenden Monographien des Europäischen Arzneibuchs [27]. Diese Monographien setzen diese Forderungen in praktische Anweisungen um und beschreiben Methoden zur Prüfung von Identität, Reinheit und Gehalt einer pflanzlichen Arzneidroge. Wie üblich werden auch im Falle von *Cimicifugae rhizoma* makroskopische, mikroskopische und dünnschichtchromatografische Verfahren zur Prüfung von Identität und Reinheit herangezogen [28]. Aktuell finden Entwicklungen statt, die eine solche Prüfung präziser und sicherer machen sollen. Als Stichworte sind hier vor allem das DNA-Barcoding [29-33] und das Metabolomic-Fingerprinting [30,34,35] zu nennen. Doch welche Möglichkeiten gibt es, die Qualität einer pflanzlichen Arzneidroge von vornherein sicherzustellen?

Ein Anbau von Arzneipflanzen stellt für Hersteller eine solche Möglichkeit dar, trägt sie doch durch eine reproduzierbare Qualität der Arzneidroge zur Wirksamkeit und Sicherheit der

Produkte sowie zum Artenschutz bei. In den USA wurden im Jahr 2010 in den Wäldern von Nordamerika etwa 143 t an getrockneten Wurzeln und Rhizomen der Traubensilberkerze wild geerntet [36]. Nur etwa 3 % der Jahresgesamternte wurde durch Kultivierung erzeugt. Eine Wildernte in diesem Ausmaß verdeutlicht, warum die Art bereits im Jahr 1999 für die Aufnahme in den Appendix II der CITES empfohlen wurde [37]. Derzeit ist *Actaea racemosa* vom amerikanischen Landwirtschaftsministerium in einigen US-Bundesstaaten als gefährdet eingestuft [38]. Näheres ist im Abschnitt 1.3 beschrieben.

In den USA wird langfristig eine Kultivierung angestrebt und durch verschiedene Institutionen forciert [39,40]. Auch namhafte europäische Hersteller beschäftigen sich mit dem Anbau der Traubensilberkerze. Die Arbeit der Gruppe Popp *et al.* in 2003 führte in diesem Zusammenhang bereits zur Bereitstellung von Pflanzenmaterial aus Kultur [41]. Im Rahmen dieses Projekts wurden von Schenk *et al.* in Berlin Pflanzen unterschiedlicher Herkunft kultiviert und weiterhin durch vegetative Vermehrung genetisch einheitliches Pflanzenmaterial erzeugt [42]. Eine phytoanalytische Charakterisierung und Untersuchung der Homogenität dieses Pflanzenmaterials stand bisher noch aus und wurde im Rahmen dieser Arbeit in Angriff genommen.

Bis heute sind die meisten Hersteller auf Großhandelsware für die Herstellung ihrer Produkte angewiesen. Demnach kommt einer phytochemischen Prüfung der Ausgangsware immer noch eine besondere Bedeutung zu. Oben angesprochene innovative Prüfverfahren wie z. B. das DNA-Barcoding muss jedoch in der Regel von Herstellern an Auftragslabore abgegeben werden, da diese molekularbiologischen Methoden spezielle Expertise erfordern und klassische analytische Labore dafür üblicherweise nicht ausgestattet sind. Das Metabolic Fingerprinting nutzt in der Regel aufwändige und teure Methoden wie etwa NMR- und Massenspektrometrie, welche ebenfalls wenig geeignet sind für die Routine-Analyse von Ausgangsstoffen. Wie lassen sich also Methoden zur Prüfung von pflanzlichen Ausgangsstoffen bei gleichbleibendem finanziellem Aufwand verbessern?

1.1 Die Traubensilberkerze

Die Traubensilberkerze (*Actaea racemosa* L., Ranunculaceae) ist eine in den östlichen Waldgebieten von Nordamerika beheimatete ausdauernde krautige Pflanze. Sie wächst dort vor allem in beschatteten Standorten in Höhenlagen bis zu 1500 m und erreicht eine Wuchshöhe von bis zu 2,5 m [43]. Wie für die Familie der Ranunculaceae üblich, weist sie geteilte bzw. gefiederte, in diesem Fall auch gesägte Laubblätter auf. Zur Überwinterung dient das Rhizom. Während der Blütezeit in den Monaten Juni bis September fallen die Blütenstände (stehende Trauben) ins Auge (Abbildung 1). Die charakteristischen, radiärsymmetrischen Einzelblüten weisen bis zu etwa 100 Staubblätter auf [43]. Eine Bestäubung erfolgt durch Insekten. Aus den zwittrigen Blüten entstehen Balgfrüchte von etwa 5 mm Länge, welche zahlreiche halbkugelige, gerippte Samen enthalten [43] (Abbildung 2). Die getrockneten Fruchtstände bleiben den Winter über erhalten. Die darin lose enthaltenen Samen erzeugen im Wind ein rasselndes Geräusch (vgl. Trivialname „*rattleroot*“).



Abbildung 1: Blütenstand von *Actaea racemosa*.



Abbildung 2: Balgfrüchte von *Actaea racemosa*.

Bis heute ist die Arzneipflanze hauptsächlich unter dem wissenschaftlichen Namen *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT. bekannt. In den vergangenen Jahrhunderten änderte sich die botanische Bezeichnung der Art viele Male. In einer Übersichtsarbeit von Steven Foster aus dem Jahr 1999 findet sich die Bezeichnung *Christopheriana facie, Herba spicata, ex Provenicia Floridiana* von Plukenet (1705) als erste bekannte Klassifizierung der Art [44]. Später war die Art als *Actaea* bekannt, bis Linné sie im 18. Jahrhundert in eine eigene Gattung – *Cimici-*

fuga – überführte [45]. Begründet wurde dies durch morphologische Unterschiede der Früchte: die Gattung *Actaea* ist durch fleischige Beeren gekennzeichnet, während *Cimicifuga* trockene Balgfrüchte zeigt (Abbildung 2). Später wurde die Traubensilberkerze durch Rafinesque und Eton in *Macrotrys* bzw. *Macrotys* umbenannt, bis sie zu Beginn des 20. Jahrhunderts wieder unter *Cimicifuga* geführt wurde. Im Jahr 1998 schließlich wurde die Gattung *Cimicifuga* erneut durch James A. Compton evaluiert. Anhand von morphologischen Charakteristika und genetischen Untersuchungen (rDNA und cDNA) wurden im Rahmen dieser Studien die Gattungen *Cimicifuga* und *Souliea* erneut der Gattung *Actaea* zugeordnet [46-48].

Neben der großen Anzahl an historischen Bezeichnungen der Art existieren noch zahlreiche Trivialnamen im deutschen (z. B. Schlangenzwurz) und angloamerikanischen Sprachgebrauch (z. B. „*black cohosh*“, „*black snakeroot*“ oder „*rattleweed*“). Aktuell sind eine große Zahl von Synonymen für *Actaea racemosa* L. bekannt [49].



Abbildung 3: Illustration „*Cimicifuga racemosa*“ in *American Medicinal Plants* aus dem Jahr 1887 von C. F. Millspaugh [50].

Die Traubensilberkerze wird regelmäßig mit nah verwandten *Actaea* spp. verwechselt [51]. Die häufige Umbenennung der Gattung trägt hier zur Unübersichtlichkeit bei. Auch hier existieren zahlreiche synonyme Bezeichnungen der jeweiligen Arten. Relevant sind hier vor allem die *Actaea* spp., die dasselbe Habitat aufweisen, wie *A. podocarpa* DC. (syn. *C. americana* MICHX, *Thalictrodes cordifolia* (DC.) KUNTZE), *A. pachypoda* ELLIOTT oder *A. cordifolia* DC. (*A. rubifolia*, *C. rubifolia*), um nur einige wenige Arten und Bezeichnungen zu nennen. Diese Arten können absichtlich oder unabsichtlich während einer Wildernte als Untermi-

schung der Arzneibuchdroge *Cimicifugae rhizoma* auftreten. Zunehmend treten auch asiatische *Actaea* spp. als Untermischungen/Substitutionen auf [52]. Hier sind vor allem die Ausgangspflanzen der TCM-Droge „sheng ma“ *A. simplex* (DC.) WORMSK. EX PRANTL (syn. *C. simplex* (DC.) WORMSK. EX TURCZ.), *A. cimicifuga* L. (syn. *C. foetida* L.), *A. heracleifolia* (KOM.) J.COMPTON (syn. *C. heracleifolia* KOM.) und *A. dahurica* (TURCZ. EX FISCH. & C.A.MEY.) Franch. (syn. *C. dahurica* (TURCZ.) MAXIM von Bedeutung [53]. „Sheng ma“ befindet sich im Großhandelsmarkt und wird dort potentiell als *Cimicifugae rhizoma* gehandelt, um höhere Erlöse zu erzielen.

Die Arzneibuchdroge *Cimicifugae rhizoma* besteht aus den unterirdischen Teilen von *A. racemosa*, nämlich dem Rhizom und Wurzeln, wobei letztere während Nacherntebehandlungen in der Regel verloren gehen. Ihre phytochemischen Inhaltsstoffe sind sehr gut untersucht. In alkoholischen Extrakten des Rhizoms finden sich hauptsächlich Polyphenole [54] wie zum Beispiel die Fukinolsäure und Triterpenglykoside [55] wie das 23-*epi*-26-Deoxyactein. Als NebenkompONENTEN werden in der Literatur auch stickstoffhaltige Verbindungen, wie das *N*-Methylserotonin [9,54] und das Cimipronidin [56] beschrieben. Vor allem die Triterpenglykoside und die stickstoffhaltigen Verbindungen sind vermutlich maßgeblich an der Wirksamkeit der Droge beteiligt, aber auch Polyphenole und eventuelle Metaboliten könnten zur Wirkung beitragen.

Die Traubensilberkerze findet Anwendung bei der Therapie von menopausalen Beschwerden wie z. B. Hitzewallungen, Schweißausbrüche, Schlaflosigkeit und Nervosität. Sie wurde lange Zeit der Gruppe der phytoestrogen wirkenden Arzneipflanzen, gemeinsam mit *Trifolium*- und die *Rheum*-Spezies, zugeordnet. Studien sowie *in-vitro* Untersuchungen von *A. racemosa* Extrakten deuten jedoch auf eine nicht hormonähnliche Aktivität hin [2,3,5,7], eher zeichnet sich sogar ein anti-estrogenen Effekt ab [4]. Aus diesem Grund wird die Arzneipflanze zunehmend als Alternative zu Hormonersatztherapien (HRT) in Betracht gezogen, insbesondere bei Frauen mit estrogenabhängigen Tumoren in der Anamnese [12].

Die pharmakologische Wirkung von *A. racemosa* Extrakten scheint vielfältig zu sein, liegt aber im Schwerpunkt auf der Ebene des Zentralen Nervensystems. So konnte im Jahr 2015 durch Wang *et al.* gezeigt werden, dass ein Estrogenmangel in ovaextomierten Mäusen die Noradrenalin-Synthese verändert und dieser Effekt durch eine Behandlung mit einem *A. racemosa* Extrakt normalisiert werden kann [57]. Bereits im Jahr 2003 fanden Burdette *et al.* heraus, dass ein 40 % 2-propanolischer Extrakt Sekundärstoffe enthält, die an verschiedenen Serotoninrezeptoren binden und als Liganden mit partiellem Agonismus am 5-HT₇-Rezeptor fungieren können [7]. Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch den Nachweis von Cimipronidin und *N*-Methylserotonin in *A. racemosa* Extrakten, die ebenso eine serotonerge Aktivität zeigten [9,54,56,58]. Weiterhin scheinen die Triterpenglykoside zur Wirkung beizutragen. Für einige von ihnen, vor allem 23-*O*-Acetylshengmanol-3-*O*- β -D-xylopyranosid, konnte eine Modulation der GABA_A-Rezeptoraktivität gezeigt werden [8,10]. Jüngere *in-vitro*- und *in-vivo*- Untersuchungen deuten auch auf einen antidiabetischen Effekt von *A. racemosa* Extrakten hin [59]. Durch Moser *et al.* wurde im Jahr 2014 deren Aktivität an der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) demonstriert. In der gleichen Studie konnten durch Verabreichung eines *A. racemosa* Extrakts der Glukosemetabolismus und die Insulin-

sensitivität in ob/ob-Mäusen verbessert werden. Bereits im Jahr 2012 isolierte Findeis *et al.* 24-O-Acetyl-hydroshengmanol-3-O- β -D-xylopyranosid- $\Delta^{16,17}$ -enolether aus einem *A. racemosa*-Extrakt als potentielle neue Leitstruktur für Gamma-Sekretase-Modulatoren [60] (Abbildung 4).

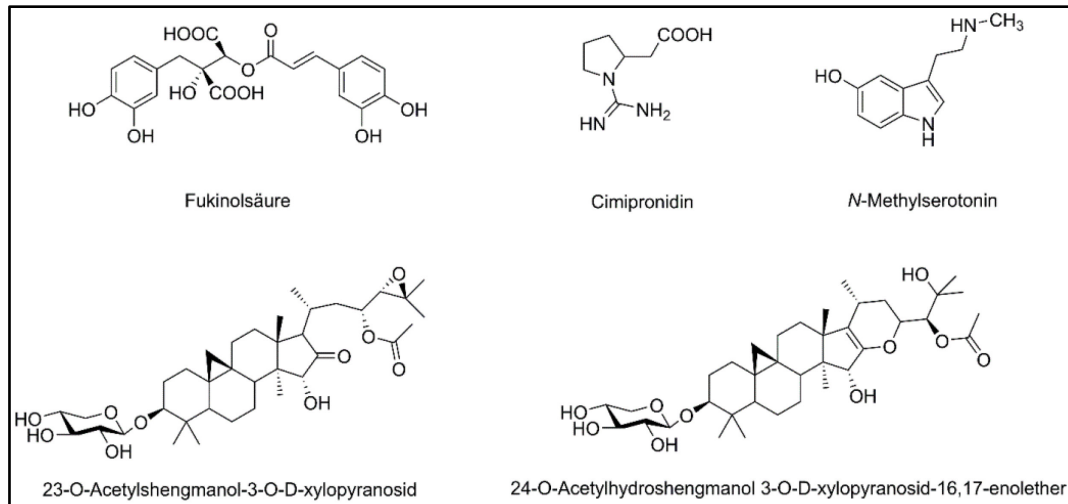


Abbildung 4: Pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe der Traubensilberkerze aus den Gruppen der Polyphenole, der stickstoffhaltigen Verbindungen und der Triterpennyglykoside.

Die klinische Evidenz zur Wirksamkeit von *A. racemosa* bei Wechseljahresbeschwerden ist bis heute umstritten. Ein systematischer Review der Cochrane Collaboration im Jahr 2012 kam zu der Schlussfolgerung, dass keine ausreichende Evidenz vorlag und eine Anwendung von „Black cohosh (*Cimicifuga* spp.)“ in dieser Indikation nicht empfohlen werden kann. Dieser Einschätzung stehen einige klinische Studien gegenüber, die erfolgreich eine Überlegenheit von Präparaten der Traubensilberkerze gegenüber Placebo demonstrieren konnten. So konnten für spezifische Extrakte wie die 2-propanolischen Extrakte iCR [14,17] und BNO-1055 [19,20] sowie die ethanolischen Extrakte Ze 450 [15,18] und Cr99 [16] in Studien positive Ergebnisse erzielt werden. All diesen Studien gemein ist die Zulassung oder Registrierung der verwendeten Produkte als pflanzliches Arzneimittel sowie die Anwendung von reproduzierbar hergestellten Extrakten pharmazeutischer Qualität [21,61]. Ob ein pflanzliches Heilmittel wirksam ist, scheint also nicht nur von der verwendeten Pflanzengattung („*Cimicifuga*“), sondern ebenso vom rechtlichen Status – Nahrungsergänzungsmittel oder Arzneimittel – und den damit einhergehenden Qualitätsunterschieden abzuhängen.

1.2 Pflanzliche Arzneimittel

Nach dem § 2 (1) des AMG sind Arzneimittel „Zubereitungen aus Stoffen, die ... als Mittel mit Eigenschaften zur Heilung oder Linderung ... menschlicher Krankheiten ... bestimmt sind“. Folglich sind auch pflanzliche Heilmittel Arzneimittel und bedürfen einer Zulassung. Die Anforderungen an Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit gelten entsprechend. Ein Wirksamkeitsnachweis kann auf Basis von klinischen Studien, durch eine Registrierung (vgl. § 39a AMG) als traditionelles pflanzliches Arzneimittel (*traditional use*) oder in Bezug auf Monografien des *Committee on Herbal Medicinal Products* (HMPC) der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) erfolgen. In diesen Monografien, ähnlich zu den früheren Institutionen Kommission E und ESCOP, stellt das HMPC auf der Basis von wissenschaftlicher Literatur und Sachverständigengutachten Belege über die traditionelle Anwendung und Wirksamkeit von Arzneipflanzen für eine bestimmte Indikation zusammen [62]. Ist die Datenlage ausreichend, werden der Arzneipflanze für eine bestimmte Indikation das Prädikat *well-established use* zugeordnet.

Die Qualität dieser pflanzlichen Arzneimittel wird im Rahmen der Zulassung (Qualitätsdossier) sowie durch eine Herstellung und Prüfung nach den Anforderungen der Guten Herstellungspraxis (*current Good Manufacturing Practices*, cGMP) gewährleistet. Findet sich eine Arzneidroge in einem Arzneibuch, sehen diese Richtlinien eine Prüfung der Ausgangsstoffe bzw. Arzneidrogen nach der entsprechenden Monografie vor [27]. Hierbei wird die entsprechende Droge nach Identität, Reinheit und Gehalt geprüft, um die pharmazeutische Qualität der Ausgangsware sicherzustellen. Auch für die Qualität von *C. rhizoma* sind hier makro- und mikroskopische Untersuchungen sowie entsprechende Prüfungen mittels TLC und LC/ELSD vorgeschrieben [28].

Die Unbedenklichkeit der pflanzlichen Arzneimittel wird wie o. g. durch präklinische und klinische Studien oder aber durch langjährige klinische Erfahrung/Anwendung der Arzneipflanze gewährleistet. Weiterhin unterhalten Zulassungsinhaber ein Pharmakovigilanzsystem, welches im Falle von unerwünschten Arzneimittelwirkungen greift. Werden unerwünschte Arzneimittelwirkungen registriert, so entscheiden Hersteller und Zulassungsbehörden je nach Schwere der Fälle gemeinsam über die zu treffenden Maßnahmen.

Die Abgrenzung pflanzlicher Arzneimittel zu den entsprechenden Nahrungsergänzungsmitteln ist schwer. Letztere, sogenannte *botanicals*, sind in zunehmendem, in je nach Mitgliedsstaat unterschiedlichem Umfang auf dem Europäischen Markt erhältlich, oft mit eindeutigen Angaben zu gesundheitsbezogenen Wirkungen [63]. Aufgrund ihres Status als Lebensmittel ist deren Regulierung und Überwachung nicht sehr stark ausgeprägt. Da Produkte zunehmend über das Internet bezogen werden, ergeben sich potentielle Risiken im Hinblick auf deren Qualität und Sicherheit. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den USA, wo pflanzliche Heilmittel in der Regel, mit wenigen Ausnahmen wie z. B. Fulyzaq oder Veregen, ebenfalls den Status des Nahrungsergänzungsmittels (*herbal dietary supplement*) haben. Im Jahr 1994 definierte der *Dietary Supplement Health and Education Act* (DSHEA) diese als „*a subset of food*“ mit entsprechenden regulatorischen Folgen [64]. *Herbal dietary supplements*, z. B. basierend auf *A. racemosa* (Black Cohosh), sind in den USA im Amerikanischen Arzneibuch (*United States Pharmacopoeia*, USP) monografiert. Anforderungen an die Qualität der Droge

sind dort definiert, eine Überwachung der Hersteller von „herbal products“ findet allerdings nur in geringem Umfang statt und der Qualitätsnachweis über eine Zulassung fehlt.

Pflanzliche Arzneimittel sind Unikate. Ihre Qualität wird maßgeblich durch die Qualität der Ausgangsware, die Nachernteprozesse, das Extraktionsverfahren und die Herstellung des Arzneimittels bestimmt. Diese Qualität wiederum ist entscheidend für die (reproduzierbare) Wirksamkeit des Arzneimittels. Es ist also plausibel, dass klinische Wirksamkeit an den regulatorischen Status gekoppelt ist (vgl. 1.1). Eine reproduzierbare Qualität ließe sich am besten durch einen Anbau gewährleisten.

1.3 Kultivierung der Traubensilberkerze

Die Traubensilberkerze gehört zu den am meisten genutzten Arzneipflanzen. In den USA belegte sie auf der Liste der meistverkauften *herbal dietary supplements* des *American Botanical Council* (ABC) im Jahr 2016 den Platz 5 mit über USD 36 Millionen Umsatz [65]. In den Mitgliedsländern der Europäischen Union waren bereits im Jahr 2010 über 60 pflanzliche Arzneimittel auf der Basis von *Actaea racemosa* L. zugelassen oder registriert [22]. Der Bedarf an der Arzneidroge *Cimicifugae rhizoma* ist hoch, wie sich beispielsweise im Tonnagegutachten der *American Herbal Product Assisiation* (AHPA) zeigt [36]. Laut diesem Dokument wurden in den Jahren 1999–2010 durchschnittlich 106 t pro Jahr wild geerntet, mit hohen Erntemengen in den Jahren 2003 ff. bis zuletzt 143 t im Jahr 2010 (vgl. Abbildung 5). Der Anteil an aus Kultur stammendem Material an der Gesamternte pro Jahr steigt tendenziell ebenfalls an, wenn auch nur schwach. In den Jahren 1999–2010 befand er sich im Mittel jedoch bei nur 1,3 %. In den USA ist demnach ein Anbau von *A. racemosa* L. noch nicht in großem Umfang etabliert und die Arzneidroge wird nach wie vor hauptsächlich aus Wildsammlungen bezogen [66].

Bei der Ernte des Rhizoms stirbt die Pflanze und steht somit für eine Reproduktion nicht mehr zur Verfügung. Ebenso dauert es Jahre, bis eine Pflanze ein kräftiges, ausdauerndes Rhizom gebildet hat. Eine mögliche Gefährdung der Art *A. racemosa* L. ist naheliegend. Bereits im Jahr 2001 resultierte diese Annahme durch Lyke *et al.* in einer Empfehlung zur Aufnahme der Art in die CITES Liste über gefährdete Arten, mit einhergehenden Wildsammlungs- und Handelsbeschränkungen [37]. Bis heute wurde die Art nicht aufgenommen, ist aber bereits in den US-Bundesstaaten Illinois und Massachusetts vom Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten (*United States Department of Agriculture*, USDA) als gefährdet (*endangered*) eingestuft [38]. Laut *NatureServe* stufen US-Amerikanische Organisationen wie die *United Plant Savers* und das *National Center 9acemos Preservation of Medicinal Herbs* (NCPMH) *A. racemosa* ebenfalls als gefährdet (*at risk*) ein [67], siehe auch Abbildung 6.

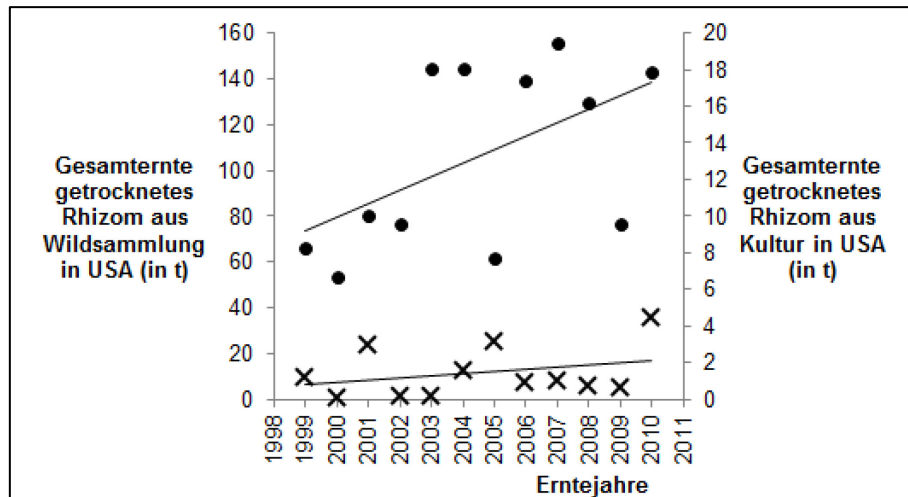


Abbildung 5: Entwicklungen der (Wild-)Ernte von *Actaea racemosa* Rhizom in den USA in den Jahren 1999 bis 2010. Entnommen aus *Tonnage Surveys of Select North American Wild-Harvested Plants* der *American Herbal Product Association* (AHPA) [36].

Ein Anbau von *A. racemosa* L. ist daher aus Gründen des Artenschutzes und der Versorgungssicherheit angebracht. In den letzten Jahren finden sich zunehmend Untersuchungen zu diesem Thema in der wissenschaftlichen Literatur. Im Jahr 2006 untersuchte Fischer *et al.* die Möglichkeit, *A. racemosa* vegetativ durch Teilung von Rhizomen zu vermehren und konnte zeigen, dass dies unter bestimmten Voraussetzungen möglich ist [68]. Gearbeitet wurde dabei mit einer Polypropylen-Beschattung von 80 %. Ebenfalls in 2006 untersuchte Thomas *et al.* die Empfindlichkeit von *A. racemosa* Rhizomen in Bezug auf Pilzbefall, verursacht durch schweren Boden und eine schlechte Drainage [69]. Dieselbe Gruppe fand später im Jahr 2011 heraus, dass der Abstand, die Beschattung und das Alter der Rhizome einen Einfluss auf die quantitative Verteilung von Inhaltsstoffen haben [70]. So zeigte sich beispielsweise der höchste Gehalt an 23-*epi*-26-Deoxyactein bei einer Beschattung von 40 %. Aufgrund dieser speziellen Anforderungen an die Kultivierung von *A. racemosa* wurde durch Naud *et al.* bereits im Jahr 2010 die Alternative des *forest farming*, also die Kultivierung in einer natürlichen Waldumgebung, propagiert [71]. Dieser Ansatz wurde im Jahr 2014 durch eine Gruppe um C. J. Small weiterverfolgt, es zeigten sich dabei jedoch Probleme beim Umpflanzen der Rhizome, da nur etwa 40 % der untersuchten Exemplare diese Behandlung überlebten [72]. Die Autoren empfehlen daher eine sorgfältige Standortauswahl sowie speziell gekalkte Böden mit guter Drainage und moderater Beschattung. Eine Erhöhung der Ausbeute von Inhaltsstoffen wie beispielsweise Actein kann durch eine Behandlung mit Salicylsäure erreicht werden [73].

dass die Inhaltsstoffe der entsprechenden Rhizome in einer komplexen Abhängigkeit zur Physiografie stehen [77].

Kommerzielle Großhandelsware aus Wildsammlungen stellt eine homogene Mischung aus sehr vielen individuellen Pflanzen – einen Populationsquerschnitt – dar. Mutmaßlich gleichen sich potentielle Unterschiede im Hinblick auf Inhaltsstoffmuster (Chemo- oder Genotypen, Physiografie) aus. Dies führt vermutlich zu einer reproduzierbaren Qualität der Chargen und damit zu einer konstanten Extraktqualität und Wirksamkeit. Aus Kultur stammendes Material bildet eine solche Diversität innerhalb einer Spezies nicht ab. Die Kultur erzeugt vermutlich homogeneres Material, kann das Inhaltsstoffmuster jedoch unter Umständen verschieben, da ein bestimmter Genotyp selektiert wird und die Physiografie konstant ist.

Im Vorfeld zur vorliegenden Arbeit wurden auch an der Humboldt-Universität zu Berlin Untersuchungen zur Kultur von *A. racemosa* durchgeführt. Diese fanden bereits im Jahr 2003, durch Popp et al. statt [41]. Dabei wurde erstmalig ein kontrollierter Anbau von *A. racemosa* unter Beachtung der Leitlinien zur guten Landwirtschaftlichen Praxis (*Good Agricultural Practices*, GAP) dokumentiert. Unter Einsatz von Gibberellinsäure konnte die Zeit bis zur Keimung deutlich reduziert werden. Ziel der Inkulturnahme war es, homogenes und standardisiertes Pflanzenmaterial für pflanzliche Arzneimittel zu erzeugen. Dieser Gedanke wurde in den darauffolgenden Jahren weiterentwickelt. Durch Klonierung, das heißt Erzeugung genetisch einheitlichen Pflanzenmaterials mittels vegetativer Vermehrung sowie durch somatische Embryogenese, sollte besonders homogenes Pflanzenmaterial erzeugt werden [42,78]. Die im Jahr 2014 geernteten Exemplare (*Cimicifugae rhizoma*) wurden im Rahmen dieser Arbeit analytisch untersucht (vgl. Tabelle 1, Seite 25).

1.4 (Pharmazeutische) Qualität von *Cimicifugae rhizoma*

Traditionell werden in den Monografien der Arzneibücher Prüfungen eines (pflanzlichen) Ausgangsstoffs zur Feststellung von Identität, Substitution, Reinheit und Gehalt beschrieben. Die Standardprüfungsverfahren für Arzneidrogen sind seit jeher organoleptische, mikroskopische (siehe Abbildung 7) und einfache dünnschichtchromatografische Methoden (TLC) für die Tests auf Identität, Substitution und Reinheit. Hinzu kommen UV/VIS-photometrische oder flüssigchromatografische Verfahren (LC) für die Quantifizierung wertbestimmender Inhaltsstoffe. Damit nutzen die Arzneibücher explizit sehr leicht zugängliche, kostengünstige und ohne sehr großen apparativen Aufwand realisierbare Methoden.

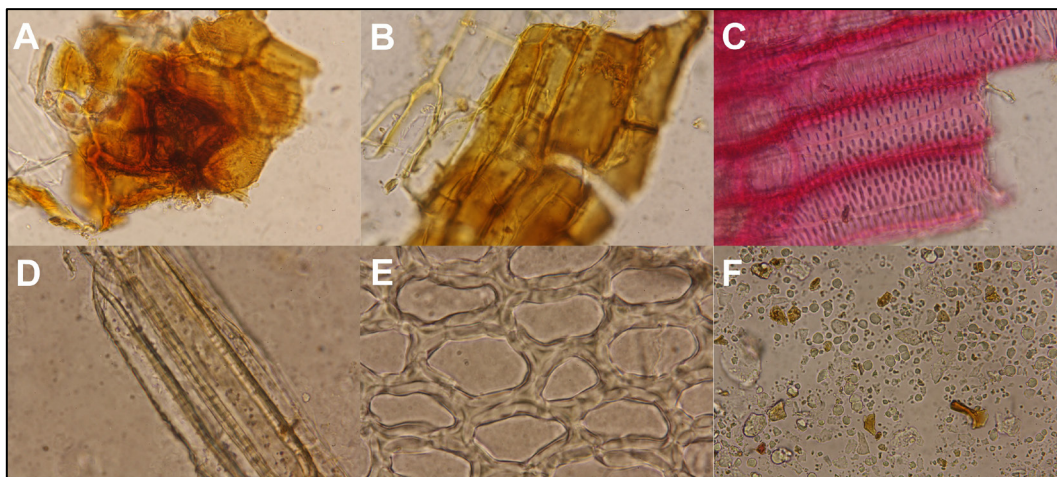


Abbildung 7: Beispiele für histologische Charakteristika von *C. rhizoma* zur Identifizierung gemäß Ph. Eur. Monografie 2069 „Black Cohosh“. Chloralhydratpräparate in 63facher Vergrößerung: Epidermisfragmente des Rhizoms (A), Dermalgewebe (B), Gefäße mit Hoftüpfeln (C), getüpfelte Fasern (D), Markparenchymfragmente © und Stärkekörner (F, Glycerol R 50 % (V/V) Präparat).

Die derzeitige HPTLC Methode der Ph. Eur. zu Prüfung von *Cimicifugae rhizoma* basiert maßgeblich auf Entwicklungen von Koll *et al.* 2004 [79]. Die zunächst entwickelte Methode basierte auf einer selektiven Detektion von Triterpenglykosiden durch ein Anisaldehyd-Sprühreagenz. Diese Derivatisierung zeigte jedoch Nachteile auf, wie eine mangelnde Reproduzierbarkeit, vor allem bei einem manuellen Auftragen des Reagenzes, und eine nur kurze Beständigkeit der farbigen Reaktionsprodukte, welche eine Detektion und Dokumentation erschwerte. Aus diesem Grund wurde die bestehende Methode (Festphase, Fließmittel) von Ankli *et al.* 2008 [80] weiterentwickelt und die Anisaldehyd-Derivatisierung durch eine Derivatisierung mit methanolischer Schwefelsäure ersetzt. Auf diesem Wege sind charakteristische TLC-Fingerprints im UV₃₆₆-Licht sichtbar, die zu einer Prüfung auf Identität und Substitution herangezogen werden. Die Prüfung auf Verunreinigung von *C. rhizoma* mit bis zu 5 % anderer *Actaea* spp. war durch eine Detektion der Markersubstanz Cimifugin in *A. cimicifuga* und *A. simplex* mit einem Boroxalsäurereagenz sowie durch eine Abgrenzung von *A. heracleifolia* und *A. dahurica* mittels eines Antimon-(III)-Reagenzes möglich. Für eine verbesserte Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Dokumentierung schlagen die Autoren eine videodensitometrische Auswertung der Chromatogramme vor. Eine solche wurde bisher nicht in die entsprechende Monografie bzw. die Ph. Eur. aufgenommen.

Als wertbestimmende Inhaltsstoffe gelten in *C. rhizoma* die Gruppe der Triterpenglykoside. Aus diesem Grund werden diese sowohl in der Ph. Eur. als auch in der USP im Rahmen der Gehaltsprüfung quantifiziert. Die *Actaea*-Triterpenglykoside sind nicht UV-aktiv, da sie keine Chromophore und nur wenige Doppelbindungen (z. B. 23-*epi*-26-Deoxyactein) aufweisen. Weiterhin stellen Sie ein komplexes Gemisch dar, welches in der Regel über einen „Summenfaktor“ berechnet wird. Nur der Gesamtgehalt ist maßgeblich für die Qualität der Arzneidroge. Der ursprüngliche Entwurf für die Monografie zu *C. rhizoma* im Ph. Eur. sah aus diesem Grund auch eine UV/VIS-photometrische Quantifizierung der Triterpenglykoside nach unspezifischer Derivatisierung und mit Aescin bzw. β -Sitosterol als externen Standard vor [81]. Im Jahr 2007 wurde erstmals eine LC-Methode zur Quantifizierung vorgestellt [82].

Aufgrund der geringen UV-Aktivität der Triterpenglykoside wurde eine Methode mit „universeller Massendetektion“ mittels ELSD entwickelt.

Bereits im Jahr 1978 stellte John M. Charlesworth seinen Prototypen eines ELSD als „*pure mass detector*“ vor [83]. Das Prinzip eines verdampfenden Lichtstreuendetektors macht eine Detektion von nur schwach UV/VIS-aktiven Analyten möglich. Nach einer Zerstäubung des Eluenten wird dieser verdampft und der zu detektierende Stoff bildet Partikel, die ein-gestrahltes Licht streuen, welches anschließend gemessen wird. Die Lichtstreuung beruht maßgeblich auf einer Reflexion und Refraktion, wobei bei kleinen Partikeln ($\leq 0,9 \mu\text{m}$) die Mie-Streuung der wahrscheinlichste Mechanismus ist [83]. Charlesworth konnte bereits im Jahr 1978 zeigen, dass die Lichtstreuung bei Detektion in einem bestimmten Winkel (z. B. 135°) nahezu unabhängig vom Refraktionsindex des Analyten ist. Die Response eines ELSD gilt aus diesem Grund als universal für verschiedene chemische Strukturen. Eine Voraussetzung für eine Detektion ist allerdings eine geringe Volatilität [84].

Trotzdem ist die Response eines ELSD abhängig von vielen Faktoren. Zum einen spielt die Partikelgrößenverteilung im Aerosol eine Rolle, welche, je nach Eluent, maßgeblich von der *Nebulizer*-Gasflussrate bestimmt wird [85]. Zum anderen steigt die Response mit zunehmendem Organikanteil im Eluenten, da die Transporteffizienz des *Nebulizers* gesteigert und die Partikelgrößenverteilung beeinflusst wird [85,86]. Dies ist vor allem für LC-Methoden mit einer (komplexen) Gradientenelution relevant. Mathews *et al.* schlugen in diesem Zusammenhang im Jahr 2004 die Erstellung einer „3D-Kalibration“ in Abhängigkeit von der Retentionszeit vor [87]. Im Jahr 2007 stellten de Villiers *et al.* ein Verfahren zur Kompensation der Änderung der Zusammensetzung des Eluenten vor (*mobile phase compensation*), eine Technik, die heute von Anbietern von ELSD genutzt wird [88].

Eine Einpunktkalibrierung ist nicht ohne weiteres möglich, die Responsekurve ist nicht-linear (exponentiell oder sigmoidal), da die ansteigende Konzentration die Partikelgrößenverteilung beeinflusst [86,89,90]. Aus diesem Grund zeigt die ELS-Detektion bei vor allem gering konzentrierten Analyten ein hohes Detektionslimit. Trotzdem wurde bereits im Jahr 2000 die ELS-Detektion für die *A. racemosa* Triterpenglykoside von Ganzera *et al.* eingesetzt und ist bis heute die Methode der Wahl für diesen Zweck [55,91-94].

Eine selektive Detektion, beispielsweise mittels LC/MS, ist bisher nicht weit verbreitet. Zum einen liegt dies sicherlich an den höheren Anschaffungskosten für die LC/MS-Systeme, zum anderen an der auf Grund von Matrixeffekten nicht ohne weiteres möglichen quantitativen Auslegung der Massenspektrometrie, besonders ohne authentischen (deuterierten) Standard. Triterpenglykoside zeigen außerdem geringe Ionisierungseffizienz in ESI. Molekülpeaks, Addukte und Fragmentationen treten in Abhängigkeit von der vorliegenden Konzentration in unterschiedlichen Verhältnissen auf. Dies führt zu Unsicherheiten bei der Quantifizierung. Ebenfalls ist LC/MS ungeeignet für die Bestimmung von Gesamtgehalten (Summenparameter) über nur einen Standard, der Fehler ist hier wegen sehr unterschiedlichen Ionisierungseffizienzen der einzelnen Glykoside größer als beispielsweise bei der ELS-Detektion. Aus den genannten Gründen tritt die LC/MS in den in der Literatur beschriebenen Quantifizierungsmethoden bisher meist nur als „Nebenmethode“ zur DAD und ELSD, zur Identifizierung von Peaks, auf [55,94-96].

Eine größere Bedeutung haben in der wissenschaftlichen Literatur Methoden zur Authentifizierung von *Cimicifugae rhizoma*, da eine korrekte Identität der Droge maßgeblich für deren Wirksamkeit und Unbedenklichkeit ist. Der bisherige „Goldstandard“ für eine Authentifizierung, die Beurteilung anhand morphologischer Charakteristika in makro- und mikroskopischen Untersuchungen, erfordert spezielle Expertise und ist abhängig von Belegexemplaren. Weiterhin sind diese Verfahren weniger gut geeignet für gepulvertes Pflanzenmaterial. Daher wird nach alternativen (phytochemischen) Verfahren zur Authentifizierung von Arzneidrogen im Allgemeinen und im Speziellen von *C. rhizoma* gesucht.

Wie bereits angedeutet, gibt es derzeit große Bestrebungen im Hinblick auf das DNA-Barcoding. Für *C. rhizoma* wurde eine solche Identifizierung mittels DNA-Sequenzierung erstmalig durch Zerega *et al.* 2002 beschrieben [33]. Diese Gruppe nutze AFLP-Muster (*amplified fragment length polymorphisms*) zur einwandfreien Identifizierung und Abgrenzung von *A. racemosa* zu den nordamerikanischen Arten *A. pachypoda*, *A. cordifolia* und *A. podocarpa*. Im gleichen Jahr zeigte Xu *et al.*, dass auch Muster zufällig vervielfältigter polymorpher DNA (*randomly amplified polymorphic DNA*, RAPD), erzeugt durch PCR unter Verwendung des unspezifischen Primers OPA-15, geeignet sind, um *A. racemosa* zu identifizieren [32]. Einige Zeit später im Jahr 2012 konnten Baker *et al.* zeigen, dass zwei matK Nukleotide zur Abgrenzung von *A. racemosa* zu asiatischen Arten *A. cimicifuga*, *A. dahurica* und *A. simplex* herangezogen werden können [29]. Die Gruppe um Pate, ebenfalls im Jahr 2012, identifizierten erfolgreich Mikrosatelliten-DNA (*single sequence repeats*, SSRs) im *Actaea*-Genom für eben diesen Zweck [31]. In ihrem Artikel um Harnly *et al.* 2015 untersuchte eine Gruppe zwei spezifische Gene (*nuklear ribosomal*, nrDNA: ITS; *chloroplast*, cpDNA: psbA-trnH), welche durch das National Institute of Standards and Technology (NIST) der USA für eine Identifizierung von *A. racemosa* validiert wurden [30].

Eine DNA-Sequenzierung ist wird zunehmend als zusätzliches Tool zur Identifizierung von Arzneidrogen diskutiert [97]. Eine Findung von eindeutigen Markern ist jedoch essentiell und schwierig. Bereits die Identität der Belegexemplare für die Entwicklung der Methode muss gesichert sein. Weiterhin lassen sich Genome verschiedener Arten nicht immer eindeutig voneinander abgrenzen, gerade im Fall von *A. racemosa* als Fremdbestäuber gibt es einen starken genetischen Drift innerhalb der Spezies und verschiedene Genotypen existieren [76]. Weiterhin beeinflussen genetische Verunreinigungen, z. B. durch Bodenpilze wie *Eurotium herbariorum*, das Testergebnis und können zu einer Fehlidentifizierung führen [30]. Klassische Qualitätskontrolllabore in der pharmazeutischen Industrie sind meist nicht für molekularbiologische Methoden ausgestattet, wodurch in der Regel eine Ausgliederung an Auftragslabore notwendig wird.

Aus den genannten Gründen ist das DNA-Barcoding, zumindest in Europa (Ph. Eur.), noch nicht in der Praxis angekommen, auch wenn im Britischen Arzneibuch (British Pharmacopoeia, BP) bereits eine allgemeine Monografie zum DNA-Barcoding existiert [98].

Eine vielversprechende Alternative zum DNA-Barcoding stellen die Methoden der Metabolomik (Metabolomic Fingerprinting) dar, in der moderne Methoden wie hochauflösende LC/MS, FIMS oder NMR-Spektroskopie genutzt werden, um komplexe chemische Fingerprints eines Arzneipflanzenextrakts zu erzeugen [99]. Durch eine Kopplung an multivariate

Analysemethoden (MVA) ist es anschließend möglich, verschiedene Spezies zu klassifizieren und entsprechende Vorhersagemodelle zu erstellen, die in der Lage sind, unbekannte Proben zu identifizieren. Bereits im Jahr 2011 zeigten Ma *et al.*, dass hochauflösende LC/ESI-QTOF-MS gekoppelt an eine Hauptkomponentenanalyse (*Principle Component Analysis*, PCA) dazu geeignet ist, *A. racemosa* von asiatischen und nordamerikanischen *Actaea* spp. abzugrenzen [100]. Weiterhin konnten hierbei spezifische Marker – einige Triterpenglykoside und Cimifugin – für verschiedene Arten gefunden werden. FIMS- und ¹H-NMR-Fingerprints von *A. racemosa* Extrakten sind ebenfalls zur Authentifizierung geeignet, wie von Harnly *et al.* gezeigt [30]. Basierend auf PCA und dem multivariaten Verfahren SIMCA konnten hier verschiedene *Actaea* spp. unterschieden bzw. klassifiziert werden. In diesem Jahr nutzten Geng *et al.* hochauflösende (*high-resolution accurate mass*, HRAM) UPLC/MS gekoppelt an PCA zur Entdeckung zweier weiterer Marker für *A. racemosa* – Feruoyldopamin-*O*-hexoside – um die Spezies von anderen amerikanischen und asiatischen Arten abzugrenzen [101].

Trotz alledem sind solche Verfahren wenig für eine Routinekontrolle in einem pharmazeutischen Labor geeignet. Die Anschaffungskosten für MS- und NMR-Geräte sind hoch und ihr Unterhalt teuer. Weiterhin sind die Methoden sehr komplex und bedürfen einer besonderen Expertise. Betrachtet man die Problematik realistisch und pragmatisch, kommt man zu der Idee, die Alaerts *et al.* im Jahr 2014 hatten [102]. Die Leistungsfähigkeit der LC/MS- und NMR-Methoden zur Authentifizierung kommt erst dadurch zustande, dass man sie an MVA koppelt. Alaerts *et al.* beschreiben die Nutzung von LC/DAD Fingerprints zur Identifizierung und Abgrenzung verschiedener *Artemisia*-Spezies. Unter Konstanthaltung der chromatografischen Bedingungen sowie Auswertung der Fingerprints mit PCA und SIMCA, konnten Klassifizierungsmodelle zur Identitätsprüfung entwickelt werden. Eine Kopplung von etablierten und robusten Analyseverfahren wie UV/VIS- oder NIR-Spektroskopie und LC/DAD an MVA scheint daher vielversprechend.

1.5 Chemometrie in der Phytoanalytik

Multivariate Analysemethoden (MVA) kommen dann zum Einsatz, wenn große Datenmengen vorliegen. Werden MVA zur Auswertung chemisch-analytischer Daten genutzt, spricht man von der Chemometrie. In der pharmazeutischen Analytik kennt man die Chemometrie vor allem im Zusammenhang mit schwingungsspektroskopischen Methoden wie der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS, vgl. 1.6). Zunehmend werden aber auch andere Methoden an eine multivariate Auswertung gekoppelt, z. B. UV/VIS- [103-109] und NMR-Spektroskopie [30,34,110], LC [102,111-117] sowie FIMS und GC/ bzw. LC/MS [30,35,100,118-120]. Einen sehr guten Überblick über die Literatur bietet der Review „*Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines*“ von Gad *et al.* aus dem Jahr 2013 [121]. Seit dem Jahr 2016 beschreibt auch die Ph. Eur. die Chemometrie in einem ihrer allgemeinen Kapitel [122].

MVA machen eine Auswertung von großen Datensätzen möglich und sind in der Lage, Muster zu erkennen und Informationen zu extrahieren. Die zu analysierenden Daten werden zunächst in einer Matrix $n \times m$ angelegt, wobei n Objekte in Reihen und m Variablen in Spalten angeordnet werden. Der vorliegende Datensatz wird anschließend der statistischen Auswertung unterzogen. Je nachdem, ob eine explorative Datenanalyse durchgeführt wird, ein in Gruppen eingeteilter Datensatz in Klassen eingeteilt werden soll (multivariate Klassifizierung zur qualitativen Analyse) oder die Daten mit Referenzdaten in Korrelation gebracht werden sollen (multivariate Kalibration zur quantitativen Analyse), werden unterschiedliche Verfahren angewandt.

Die grundlegendste aller MVA ist die PCA. Diese reduziert eine große Anzahl an Variablen zu einer geringeren Anzahl an Linearkombinationen (*principle components*) und ist dadurch in der Lage, Datensätze zu vereinfachen. Werden nun die durch das mathematische Verfahren erhaltenen Linearkombinationen gegeneinander aufgetragen, werden Strukturen im Datensatz sichtbar. Die PCA eignet sich daher besonders für eine explorative Datenanalyse. Da die PCA keine kategorischen Daten wie z. B. Zugehörigkeit zu einer Spezies nutzt, wird sie auch als *unsupervised pattern recognition method* bezeichnet.

Multivariate Klassifizierungsmethoden wie PLS-DA, LDA oder SIMCA werden als *supervised pattern recognition methods* bezeichnet, da sie die Zugehörigkeit eines Objektes zu einer bestimmten Gruppe berücksichtigen. Ziel einer solchen Methode ist es, ein mathematisches Modell zu finden, das in der Lage ist, die Zugehörigkeit eines jeden Objektes zu einer Klasse vorherzusagen [123]. Basierend auf einem Datensatz zur Modellbildung können nun unbekannte Objekte analysiert und klassifiziert werden. Diese Verfahren haben daher in der qualitativen Phytoanalytik zunehmend an Bedeutung gewonnen, da sie in der Lage sind, Daten verschiedenster Analysemethoden zu nutzen, um im allgemeinen Spezies zu klassifizieren und (Arznei-)Pflanzen bzw. Drogen zu authentifizieren [121].

Eine große Bedeutung bei der Anwendung von multivariaten Klassifizierungsmethoden hat die Validierung des entsprechenden Klassifizierungsmodells [123-126]. Eine Darstellung der Validierungsergebnisse kann durch eine Konfusionsmatrix $G \times G$ erfolgen, in der G die Anzahl der Klassen (Kategorien, z. B. Spezies) darstellt, wobei vorhergesagte Klassen gegen die wahren Klassen aufgetragen werden. Die diagonalen Elemente der Matrix stellen die korrekt klassifizierten Proben dar. Aus dieser Matrix werden nun eine Reihe von Parametern abgeleitet werden, z. B. die *non-error rate* (NER, auch Genauigkeit, z. B. 0,95) und die *error-rate* (ER, 1-NER).

Westerhuis *et al.* beschrieben anhand von PLS-DA im Jahr 2008, wie eine zu niedrige Anzahl an Proben und *overfitting* eines Modells zu Fehlklassifizierungen und zu optimistischen Ergebnissen führen können [124]. Empfohlen werden in diesem Zusammenhang eine *Cross-Model-Validierung* (auch Kreuzvalidierung, *cross-validation*) und ein *Permutation-Test*, ein Modell-Test mit zufällig verteilten Klassen und eine mehrfache Unterteilung des Prozentsatzes in Modellierungs- und Test-Sets. Ein Modell basierend auf zufällig zugeordneten Klassenzugehörigkeiten muss deutlich schlechter funktionieren als eines mit den „richtigen“. Dieses Validierungsverfahren lässt sich auch auf andere Klassifizierungsmethoden anwenden.

Eine weitere Anwendung der Chemometrie in der Phytoanalytik ist die multivariate Regression zur quantitativen Analyse. Sie kommt hauptsächlich dann zum Einsatz, wenn die analytische Response eines zu quantifizierenden Inhaltsstoffs mit einer gegebenen Analyse-methode nicht univariat, sondern multivariat ist. Die ist insbesondere bei den Methoden der Schwingungsspektroskopie (MIR-, NIR- und Raman-Spektroskopie) der Fall. Aus diesem Grund sind diese Methoden – insbesondere die NIRS – auch als relative Verfahren anzusehen, die nicht ohne Referenzdaten einer Primärmethode auskommen. Die Daten aus Referenzmethoden (z. B. LC oder GC) werden dabei mit den Spektren korreliert.

Es existiert eine Vielzahl von statistischen Methoden für eine multivariate Regression, z. B. die *principle component regression* (PCR), die *partial least squares regression* (PLSR) oder die *artificial neural networks* (ANN), wobei die PLS-Regression das am häufigsten angewandte Verfahren darstellt. Die Etablierung und Validierung der quantitativen Vorhersagemodelle stellt ähnlich wie bei den Klassifizierungsverfahren einen Schlüsselschritt in der Erstellung einer solchen Methode dar. Eine Probenauswahl sollte sorgfältig und eine Validierung unter Anwendung von Kreuzvalidierungsverfahren und Unterteilung des Prozentsatzes in Sets zur Kalibrierung und Validierung (Test-Set) erfolgen (siehe 1.6).

1.6 Nahinfrarotspektroskopie in der Phytoanalytik

Schwingungsspektroskopische Analysemethoden, allen voran die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS), gewinnen innerhalb der pharmazeutischen Industrie in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Als schnelle, nichtinvasive Analyse-methode macht sie Messungen an einer Vielzahl von Materialien und Materialzuständen möglich und dies nahezu ohne die Notwendigkeit einer Probenvorbereitung. Weiterhin ist es durch die rasche Messung (z. B. auch atline oder inline) möglich, eine größere Anzahl an Messungen durchzuführen und damit die Probennahme repräsentativer für die Grundgesamtheit zu gestalten. Zu den Anwendungs-bereichen gehören innerhalb der pharmazeutischen Industrie vor allem die Prüfung von Ausgangsstoffen (Identität, Reinheit und Gehalt) sowie die Prüfung von Zwischen- und Endprodukten. In jüngerer Zeit gewinnt die NIRS insbesondere Bedeutung in der Prozessvalidierung, hier ist sie ein wichtiges Werkzeug der Echtzeitprozess- und Echtzeitfreigabeanalytik [127].

Die NIRS unterscheidet sich allerdings von anderen Analysemethoden. So lässt die Komplexität von NIR-Spektren von Vielstoffgemischen, gekennzeichnet durch Überlagerungen von Kombinations- und Oberschwingungen von Atombindungen, meist keine direkte Auswertung in Form von Spektreninterpretation oder Bandenzuordnung zu. Auch ist die *Response* eines interessierenden Analyten in der Regel nicht univariat, sondern multivariat. Daher ist es nötig, unter der Verwendung multivariater Analysemethoden (Chemometrie, siehe Abschnitt 1.5) statistische Kalibrierungsmodelle zu erstellen. Für qualitative Fragestellungen (z. B. eine Prüfung auf Identität) ist daher ein repräsentativer Referenzprobensatz nötig, der idealer Weise das Spektrum aller zu erwartenden Proben abbildet. Zur Quantifizierung von relevanten Inhaltsstoffen benötigt man Referenzdaten aus einer primären Analyse-methode (z. B. GC oder LC). Entsprechende Kalibrierungsmodelle müssen erstellt und anschließend

validiert werden. Hierbei ist es obligat, dass Referenzmethoden ebenso validiert sein und zu genauen Referenzdaten führen müssen.

Institutionen im regulatorischen Umfeld der pharmazeutischen Industrie wie z. B. die EMA oder das EDQM beschreiben spezifische Anforderungen an Validierungen qualitativer und quantitativer NIRS-Methoden in entsprechenden Leitlinien und Arzneibuchkapiteln. Für qualitative Methoden werden Anforderungen an die Referenzprobenauswahl (das Probenet soll möglichst alle Probenvariationen abbilden), die Referenzspektrenbibliothek und die Validierungsparameter (Minimum: Spezifität und Robustheit) angegeben [127]. Die Modellvalidierung sollte innerhalb des Referenzprobensatzes sowie durch externe Validierung (Test-Set-Validierungen) erfolgen. Für quantitative NIRS-Methoden gilt die Richtlinie der ICH Q2(R1) mit ihren Anforderungen an Validierungsparameter [128]. Weiterhin muss der Fehler der Vorhersage angegeben werden (z. B. Standardvorhersagefehler, RMSEP), da in der Regel eine Kreuzvalidierung zu einer Referenzmethode erfolgt. Die Kreuzvalidierung wird in der Regel in einer Wiederfindungsfunktion dargestellt, in dem Referenzwerte („Wahre Werte“) gegen die Vorhersagewerte aufgetragen werden. Verschiedene statistische Parameter beschreiben die Güte der Vorhersage: Das Bestimmtheitsmaß (R^2 , Linearität), der y -Achsenabschnitt (Systematischer Fehler, *Bias*), der Fehler der Kreuzvalidierung (RMSECV) und der Quotient von RMSEP und SD der Validierungsproben (*ratio of performance to deviation*, RPD) [129-131]. Diese Validierung, ausschließlich basierend auf Parametern der Kreuzvalidierung, ist der Standard in der wissenschaftlichen Literatur, bildet allerdings andere essentielle Validierungsparameter, vgl. ICH Q2(R1), wie z. B. Linearität, Richtigkeit und Präzision (Genauigkeit) und den zulässigen Arbeitsbereich der Methode nicht bzw. nur indirekt ab [129].

Die Anwendung der NIRS als Prüfmethode für qualitative und quantitative Fragestellungen weitet sich zunehmend auch auf die Phytoanalytik aus [132]. Im Fokus stehen die Prüfungen auf Identität, Substitution und Gehalt an wertbestimmenden Inhaltsstoffen. Die generelle Eignung der NIRS für qualitative Fragestellungen in der Phytoanalytik wurde bereits gezeigt [133,134]. Typischerweise sind Methoden zur Identifizierung eines pflanzlichen Materials gefragt sowie für dessen Abgrenzung zu verwandten Spezies innerhalb derselben Gattung bzw. Subspezies/Varietäten und die Ermittlung der geographischen Herkunft einer Droge. Die NIRS in Kombination mit multivariater Klassifizierung wurde in diesem Hinblick sehr erfolgreich für eine Vielzahl von bedeutenden Arzneipflanzen angewandt, z. B. für die Gattungen *Digitalis*, *Ephedra*, *Panax*, *Chrysanthemum* und *Rheum*, jeweils mit Vorhersagegenauigkeiten von 84–100 % [135-139].

Ähnlich erfolgreich wurde die NIRS für die Quantifizierung von unterschiedlichen sekundären Metaboliten in Pflanzenmaterialien eingesetzt. Ausgehend von LC/DAD-Referenzdaten wurde bereits im Jahr 1999 von Schulz *et al.* gezeigt, dass eine Quantifizierung von Alkaloiden und phenolischen Verbindungen in Blättern von *Camellia sinensis* möglich ist (z. B. Epicatechin mit $R^2 = 0,97$ und $SD/SECV = 6,27$) [140]. In jüngeren Arbeiten fand die NIRS beispielsweise Anwendung zur Quantifizierung von phenolischen Verbindungen in *Trifolium* spp. (Gesamtgehalt Isoflavone mit $R^2 = 0,90$ und $RPD = 3,21$) [131], von Hypericin in *Hypericum perforatum* ($R^2 \leq 0,90$ und $RPD \leq 3,46$) [141], von Verbascosid in *Verbena officinalis* ($R^2 = 0,80$ und $RPD = 2,35$ für NIRS) [142] und von einem Triterpenglykosid

(P57) in *Hoodia gordonii* ($R^2 = 0,96$ und $RMSEP = 0,03 \%$) [143], jeweils basierend auf Referenzdaten aus quantitativen LC/DAD bzw. LC/MS. Von Frizon *et al.* wurde im Jahr 2015 gezeigt, dass auch der Gesamtgehalt an phenolischen Verbindungen in Mate (*Ilex paraguariensis*), ausgehend von einer UV/VIS-Referenzmethode mit einem Folin-Ciocalteu-Reagenz, mittels NIRS bestimmt werden kann ($R^2 = 0,81$ und $RMSEP = 12,12 \%$) [144].

Ob die NIRS geeignet ist, um nah verwandte *Actaea* spp. voneinander abzugrenzen oder sekundäre Metaboliten wie Polyphenole und Triterpenglykoside in *C. rhizoma* zu quantifizieren, wurde bisher nicht untersucht.

1.7 Metabolomik in der Phytoanalytik

Metaboliten sind die Endprodukte aller Stoffwechselfvorgänge innerhalb von Zellen. Sie sind das Resultat von Genom, Transkriptom und Proteom und ihre Gesamtheit wird analog als Metabolom bezeichnet [145]. Als Sekundärstoffe werden weiterhin Metaboliten bezeichnet, die keine unmittelbare Funktion im Zellstoffwechsel haben und nicht für das Wachstum und das Überleben eines Organismus notwendig zu sein scheinen. In der pharmazeutischen Phytoanalytik sind vor allem diese Sekundärstoffe von Bedeutung, da sie jene Stoffe sind, die wir letztendlich in arzneilich verwendeten Extrakten finden. Sie machen die pharmakologische Wirksamkeit eines Phytopharmakons aus. Ihre Ausprägung innerhalb einer Spezies ist abhängig von genetischen Faktoren und Umweltbedingungen während des Wachstums.

Im Gegensatz zur gezielten quantitativen Analyse von einzelnen Metaboliten bzw. Sekundärstoffen oder Stoffgruppen befasst sich der Forschungszweig der Metabolomik mit der gleichzeitigen Identifizierung und (relativen) Quantifizierung des gesamten Metaboloms eines Organismus. Bei dieser ungezielten Herangehensweise (Untargeted Analysis) werden somit zunächst alle Metaboliten abgebildet und anschließend einer statistischen Auswertung unterzogen, um signifikante Veränderungen/Unterschiedlichkeiten der untersuchten Proben zu ermitteln. Die Anwendungsmöglichkeiten sind vielfältig, möglich sind z. B. die Untersuchung von Proben unterschiedlicher Gruppen (behandelt/unbehandelt), eine generelle Metabolitenanalyse (Metabolite Profiling), oder eine Klassifizierung von Probentypen (Metabolic Fingerprinting) [146].

Die LC/MS stellt neben anderen Methoden wie GC/MS, NMR-Spektroskopie und Raman-Spektroskopie die wichtigste Grundlage für die Metabolomik dar: Sie ist zur Untersuchung nichtflüchtiger Verbindungen geeignet und im Gegensatz zu chemischen Fingerprintmethoden wie NMR- und Raman-Spektroskopie dazu in der Lage, einzelne Verbindungen getrennt zu detektieren [147]. Die LC/MS liefert umfassende massenspektrometrische Informationen zu Inhaltsstoffen und ermöglicht daher über die Auswertung von Molekül-, Fragmenten und Addukten eine Identifizierung von einzelnen Metaboliten.

Die größte Herausforderung in diesem Zusammenhang stellt die Analyse der komplexen Datensätze dar, die ohne unterstützende Algorithmen und Software nicht zu bewältigen ist. Die Daten müssen vorbehandelt und prozessiert werden, bevor sie einer multivariaten oder statistischen Auswertung, z. B. *t*-Tests oder einer PCA, unterzogen werden können. Unter anderem bestehen zwei Möglichkeiten (siehe auch Abbildung 8):

1. Die Detektion von einzelnen Verbindungen (Metabolic Features) durch Peakdetektionsalgorithmen.
2. Die Unterteilung des Signals in spektrale Klassen (Bins) und Erstellung eines Massenprofils einer Probe (Bin-Analyse).

Eine Bin-Analyse stellt einen reduktionistischen Ansatz dar, der dreidimensionale Daten aus LC/MS (Retentionszeit, Masse und Intensität) in einen zweidimensionalen Datensatz (Masse und Intensität) umwandelt. Sie lässt sich einfach z. B. mit Hilfe des web-basierten Tools Haystack aus verschiedenen LC/MS Datenformaten durchführen [148]. Eine Bin-Analyse ist von Vorteil, wenn chromatografische Bedingungen nicht gut reproduzierbar und Verbindungen nicht gut zu trennen sind oder Proben ausschließlich qualitativ klassifiziert werden sollen (z. B. beim Metabolic Fingerprinting). Der erzeugte zweidimensionale Datensatz kann unmittelbar einer multivariaten oder statistischen Auswertung unterzogen werden. Eine letztendliche Identifizierung von interessierenden Verbindungen ist hier allerdings nur „manuell“ möglich z. B. über extrahierte Ionenchromatogramme (EIC) und Auswertung der massenspektralen Daten. Ein weiterer Nachteil ist, dass das Signal eines bestimmten Analyten in der Regel auf mehrere Bins verteilt ist. Weiterhin kann die Intensität eines Bins aus unterschiedlichen Ionen (Molekül-, Fragmentionen und Addukten) bestehen. Diese Probleme bestehen bei einer Detektion von einzelnen Verbindungen nicht, da solche Signale einer Verbindung in der Regel durch Algorithmen gebündelt werden (Dekonvolution).

Bereits im Jahr 2006 stellten Smith *et al.* seinen quelloffenen Algorithmus (XCMS) zur automatischen Peakdetektion vor [147]. Der auf LC/MS basierende Ansatz beinhaltet einen Abgleich und Ausgleich der Retentionszeiten (Alignment), die eigentliche Peakdetektion und eine probenübergreifende Zuordnung von Peaks (Peak Matching). Ohne Verwendung von Standardsubstanzen werden so Verbindungen identifiziert, stehen zur relativen Quantifizierung zur Verfügung und können genutzt werden, um Änderungen in Proben und potentielle Biomarker zu identifizieren. Der ursprüngliche Algorithmus („Matched Filter“) basierte auf einer Fraktionierung der LC/MS Daten in Abschnitte ($0,1 m/z$) und einer Filterung unter Verwendung einer gaußschen Glockenkurve (2. Ableitung) als Peakform. Dieser Algorithmus wurde im Jahr 2008 von Tautenhahn *et al.* weiterentwickelt zum derzeitigen Detektionsalgorithmus von XCMS *centWave* [149]. Aktuelle Algorithmen beinhalten neben der Peakdetektion (Feature Detection) auch Schritte zur Zuordnung von Molekül-, Fragmentionen und Addukten zu einem Peak (Dekonvolution), gruppieren Isotopenpeaks (Isotope Grouping) und nutzen diese Informationen zur Bestimmung der neutralen Masse einer Verbindung. Die akkurate (molekulare) Masse einer Verbindung kann anschließend für eine Online-Datenbanksuche zur Identifizierung genutzt werden.

Heute existiert eine Vielzahl an weiteren Open-Source-Algorithmen wie z. B. GridMass [150] und Open-Source-Programmen zur Auswertung von GC/ oder LC/MS Daten wie z. B. MetAlign [151], Mzmine [152], MAVEN [153] oder MetaboAnalyst [154]. Im Jahr 2014 wurde eine benutzerfreundliche Onlineversion von XCMS eingeführt [155]. Zunehmend werden die Methoden der Metabolomik auch kommerzialisiert wie z. B. mit Progenesis QI (Waters), Metabolic Profiler (Bruker), Mass Profiler (Agilent) oder Compound Discoverer (Thermo). Firmen entwickeln die dargestellten Ideen weiter, Progenesis QI z. B. nutzt zusätzlich zur neutralen Masse Informationen zur Fragmentierung einer Verbindung aus LC/MS^E zur Identifizierung anhand einer Datenbanksuche z. B. in PubChem.

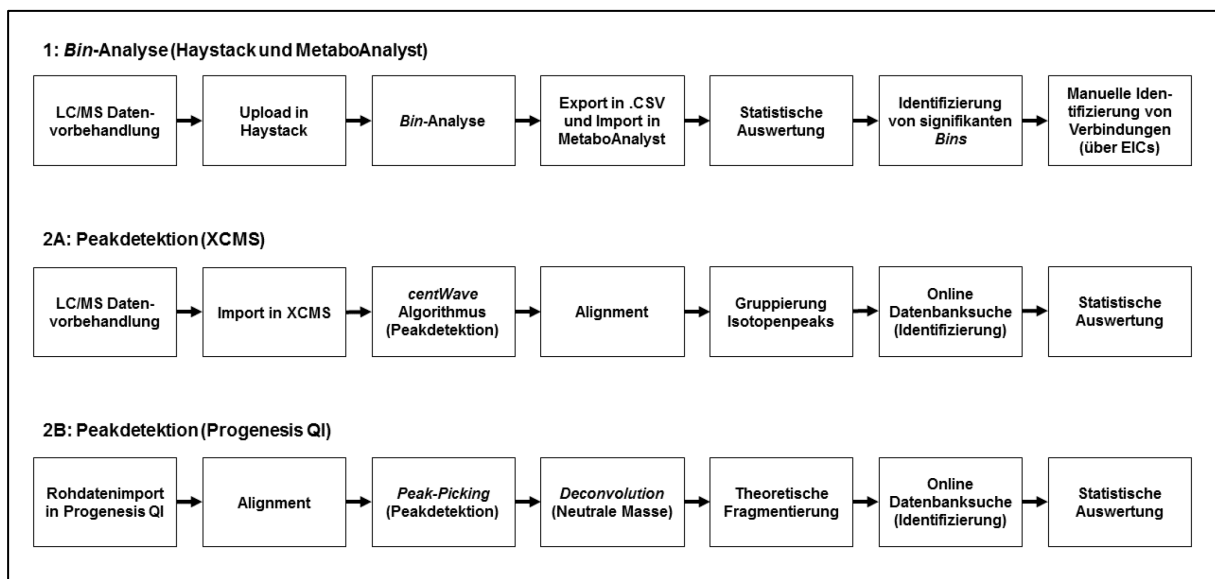


Abbildung 8: Prinzipielle Herangehensweise an die Auswertung eines umfassenden Datensatzes aus LC/MS, Bin-Analyse (1) und Verwendung von Peakdetectionsalgorithmen (2).

1.8 Zielsetzung

- Basis für die vorliegende Arbeit ist ein Probensatz bestehend aus in Berlin kultivierten Einzelexemplaren von *Actaea racemosa* (L.) bzw. deren Rhizome. Dieser besteht aus einer Sammlung von Pflanzen unterschiedlicher Herkunft sowie aus vegetativ vermehrten Pflanzen. Ziel dieser Arbeit ist es, diese Rhizome phytoanalytisch mittels chromatografischer Verfahren zu charakterisieren. Dies soll vor allem im Hinblick auf die Inhaltsstoffliche Homogenität von Kulturpflanzen und die Diversität innerhalb der Spezies *A. racemosa* (L.) geschehen.
 - Eine Identifizierung und ein Test auf Substitution sind essentielle Prüfungen im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle von Arzneidrogen. Im Falle von *C. rhizoma* erfordert eine Prüfung nach Ph. Eur. ebenfalls eine Abgrenzung zu anderen, nah verwandten *Actaea* spp. wie asiatischen oder nordamerikanischen. Bestehende Arzneibuchmethoden zu diesem Zweck stellen einfache, robuste Verfahren dar, sie werden aber zunehmend durch komplexere und aufwändige Verfahren wie MS, NMR oder molekularbiologischen Methoden ergänzt. Da diese Methoden aufwändig, teuer und oft nicht in Routinelaboren umsetzbar sind, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob es möglich ist, im Rahmen von Routineanalytik auch etablierte, preiswerte analytische Methoden wie die UV/VIS-Spektroskopie, die NIR-Spektroskopie oder die HPLC für eine solche Prüfung heranzuziehen. Zu diesem Zweck sollen sie an multivariate Analyseverfahren (Chemometrie) gekoppelt werden.
 - Eine Quantifizierung von wertbestimmenden Inhaltsstoffen in Arzneidrogen ist ebenfalls ein integraler Bestandteil der pharmazeutischen Qualitätskontrolle. Die NIR-Spektroskopie wird zunehmend neben Fragestellungen der qualitativen Analyse auch für die Quantifizierung von Analyten in zum Teil komplexen Matrices eingesetzt. Eine NIRS-Quantifizierung kommt ohne nasschemische Probenvorbereitung und Analyse aus. Messungen lassen sich innerhalb von Sekunden realisieren. Ob eine solche NIR-Spektroskopie-basierte Bestimmung von (wertbestimmenden) Inhaltsstoffen in *C. rhizoma* möglich ist, soll in dieser Arbeit untersucht werden.
-

2 Material und Methoden

2.1 Exemplare von *A. racemosa* (L.) und anderen *Actaea* spp.

Die Grundlage für die Untersuchungen dieser Arbeit bildete ein umfangreicher Proben-
satz an Rhizomen einzelner Exemplare von *A. racemosa* (L.) (*Cimicifuga* rhizoma). Dieser
Probenatz wurde in den Jahren 2001–2014 am Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und
Gartenbauwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin kultiviert (siehe Abbildung 9).
Der Probenatz ist in den Jahren kontinuierlich gewachsen und enthält Exemplare vornehm-
lich bezogen von Staudengärtnereien und Botanischen Gärten aus Europa und den USA (siehe
Tabelle 1). Insgesamt wurden 101 Rhizome einzelner Exemplare im Rahmen dieser Arbeit
untersucht. Der jeweiligen Herkunft einer Gruppe von Pflanzen wurde eine ID („Cx“ für die
Gattung *Cimicifuga*) zugeordnet (Tab/Abb). Die jeweils einzelnen Exemplare einer Herkunft
erhielten eine laufende Nummerierung („Cx.y“), z. B. die Exemplare vom Botanischen Garten
in Frankfurt a. M. mit C7.1–C7.7. Das Alter der Pflanzen war sehr unterschiedlich und lag im
Bereich von 3 Jahren (C3 und C4) bis 13 Jahren (C13). Weitere Einzelheiten in Bezug auf
diese Exemplare (z. B. ursprüngliche Herkunft) waren nicht bekannt. Die Exemplare ein und
derselben Herkunft sind unter Umständen nicht genetisch einheitlich.



Abbildung 9: Versuchsfeld zur Kultivierung von *A. racemosa* (L.) und anderen *Actaea* spp. am Albrecht-Thaer-Institut der Humboldt-Universität zu Berlin (Dahlem).

Diese Unterschiedlichkeit trifft nicht auf das Probenatz der vegetativ vermehrten
Exemplare zu („Kx“ für Klone). In diesem Fall wurden einzelne Pflanzen durch Wurzelstock-
teilung oder Somatische Embryogenese vermehrt. In den Jahren 2007–2012 wurden fünf ver-
schiedene Klontypen gepflanzt. Die Anzahl der Klonpflanzen innerhalb der Klontypen lag
zwischen 8 (K3, 2007) und 15 (K1, 2009). Das Alter der Klonpflanzen lag im Bereich von

2 Jahren (K4 und K5) bis 7 Jahren (K3) Jahren. Insgesamt wurden 56 Rhizome einzelner Klonpflanzen im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Neben den Pflanzen unterschiedlicher Herkunft und den Klonpflanzen wurden in Berlin (Dahlem) auch generative Nachkommen einzelner Pflanzen (sog. F1-Pflanzen) sowie Exemplare anderer *Actaea* spp. kultiviert (siehe Tabelle 2). Ebenso standen bei einigen Exemplaren feine Wurzeln als Proben – getrennt vom Rhizom – zur Verfügung. Von den Exemplaren C6.1, C9.7 und C11.8 wurden jeweils 7 Rhizome von generativen Nachkommen untersucht. Als andere *Actaea* spp. standen die Arten *A. cimicifuga* („Fx“ für das Synonym *C. foetida*), *A. cordifolia* („Rx“ für das Synonym *C. rubifolia*), *A. dahurica* („Dx“), *A. simplex* („Sx“) und eine unbekannte *Actaea* sp. zur Verfügung. Diese Exemplare wurden ebenfalls in Berlin kultiviert, bei der Ernte der Einzelexemplare einer jeweiligen Herkunft wurden Mischproben dieser Herkunft erzeugt. Ergänzt wurden die asiatischen *Actaea* spp. durch „Sheng Ma“-Handelsware, deklariert als *A. heracleifolia*. Alle in Berlin kultivierten Exemplare wurden im Herbst 2014 geerntet, für Details zur Ernte und Nacherntebehandlung siehe Abschnitt 2.4.1.

Erweitert wurde der Probensatz aus Berlin durch Einzelexemplare von *A. racemosa* (L.) aus Wildsammlungen in den USA (bereitgestellt von Maged Sharaf, PhD), verschiedene Mischchargen aus Wildsammlung (Handelsware, Abbildung 10) sowie einige Mischchargen aus kommerziellem Anbau in Deutschland (Tabelle 3).



Abbildung 10: Kommerzielle Mischcharge von *C. rhizoma* aus Wildsammlungen in den USA, feiner Zerkleinerungsgrad.

Verschiedene Probensubsets wurden in die unterschiedlichen Projekte der vorliegenden Arbeit einbezogen. Die jeweils verwendeten Methoden sind in den Tabellen zum gesamten Probenset zusammengefasst. In den einzelnen Abschnitten des Ergebnisteils sind die verwendeten Probensubsets noch einmal tabellarisch dargestellt.

Tabelle 1: Probenet der untersuchten Exemplare von *C. rhizoma* aus Kultur in Dahlem (Berlin).

ID	Typ	<i>Actaea</i> -Spezies*	Herkunft	Anzahl	Gepfl.	Teilprojekte
K1	Klone, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Staudengärtnerei Hagemann, Wurzelstockteilung	15	2009	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC
K2	Klone, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Staudengärtnerei Hagemann, Wurzelstockteilung	12	2009	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC
K3	Klone, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Somatische Embryogenese (SE) an Keimlingen	8	2007	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC, LCMS
K4	Klone, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	BG Uni Halle, SE von Stamen	11	2012	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC
K5	Klone, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Staudenkultur Stade, SE von Stamen	10	2012	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC
Summe				56		
C1	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Botanischer Garten Universität Tübingen	8	2010	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C2	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Botanischer Garten Universität Düsseldorf	10	2010	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC
C3	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Norton Arboretum, Jefferson National Forest	6	2011	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C4	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Longwood Gardens, Pennsylvania	7	2011	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C5	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Universität Marburg	1	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C6	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Staudengärtnerei Hermannshof	5	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C7	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Botanischer Garten Frankfurt am Main	7	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C8	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Medicinal Herb Garden, Washington	1	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C9	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Botanischer Garten Regensburg	7	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C10	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Botanischer Garten Halle	9	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC
C11	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Botanischer Garten Wroclaw, Rzepin	9	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C12	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Botanischer Garten Lublin	4	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C13	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Staudengärtnerei Baltin	6	2001	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC
C14	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Staudengärtnerei Tandemann	5	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC
C15	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Staudengärtnerei Friesland Stauden, Jever	5	2002	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC, LCMS
C16	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Massachusetts	7	2004	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC
C17	Kultur, Individuen	<i>A. racemosa</i> (L.)	Indiana	4	2006	LC/DAD/ELSD, UV, NIRS, TLC
Summe				101		
C6.1	F1-Generation	<i>A. racemosa</i> (L.)	Generative F1-Nachkommen von C6.1	7	-	LC/DAD
C9.7	F1-Generation	<i>A. racemosa</i> (L.)	Generative F1-Nachkommen von C9.7	7	-	LC/DAD
C11.8	F1-Generation	<i>A. racemosa</i> (L.)	Generative F1-Nachkommen von C11.8	7	-	LC/DAD
FW1	Feine Wurzeln	<i>A. racemosa</i> (L.)	C9.7 (F1.6)	1	-	LC/DAD, TLC, LCMS
FW2	Feine Wurzeln	<i>A. racemosa</i> (L.)	C15.2	1	-	LC/DAD, TLC, LCMS
FW3	Feine Wurzeln	<i>A. racemosa</i> (L.)	C17.2	1	-	LC/DAD, TLC, LCMS

**Actaea racemosa* (L.) (syn. *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.)

Tabelle 2: Probenaset der verschiedenen *Actaea* spp. kultiviert in Dahlem (Berlin) bzw. Handelsware („Sheng Ma“ – *A. heracleifolia*).

ID	Typ	<i>Actaea</i> -Spezies*	Herkunft	Anzahl	Gepfl.	Teilprojekte
F1	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cimicifuga</i>	Arboretum Berlin	1	-	LC/DAD, NIRS, TLC
F2	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cimicifuga</i>	Botanischer Garten Universität Ulm	4 ^A	-	LC/DAD, NIRS
F3	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cimicifuga</i>	Bot. Garten Poznan, Polen	4 ^A	-	LC/DAD, NIRS
F4	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cimicifuga</i>	Bot. Garten Tartu, Estland	3 ^A	-	LC/DAD, NIRS
F5	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cimicifuga</i>	Bot. Garten Lublin, Polen	3 ^A	-	LC/DAD, NIRS
R1	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cordifolia</i>	Bot. Garten Uni Frankfurt, Main	1	-	LC/DAD, NIRS, TLC
R2	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cordifolia</i>	Bot. Garten Brno, Czech Republik	3 ^A	-	LC/DAD, NIRS
R3	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cordifolia</i>	Bot. Garten Universität Tübingen	4 ^A	-	LC/DAD, NIRS
R4	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. cordifolia</i>	Bot. Garten Lublin, Polen	2 ^A	-	LC/DAD, NIRS
S1	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. simplex</i>	Staudengärtnerei Baltin	1	-	LC/DAD, NIRS, TLC
S2	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. simplex</i>	Staudengärtnerei Baltin	3 ^A	-	LC/DAD, NIRS
S3	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. simplex</i>	Staudengärtnerei Gaismayer	4 ^A	-	LC/DAD, NIRS
S4	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. simplex</i>	Staudengärtnerei Sarastro-Stauden	2 ^A	-	LC/DAD, NIRS
D1	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. dahurica</i>	Bot. Garten Moskau (als Pflanze)	1	-	LC/DAD, NIRS, TLC
D2	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>Actaea</i> sp. (n/a)	Staudengärtnerei Friesland-Stauden	3 ^A	-	LC/DAD, NIRS, TLC
J1	<i>Actaea</i> spp, Individuen	<i>A. japonica</i>	Unbekannt	1	-	TLC
H1	<i>Actaea</i> spp, Charge	<i>A. heracleifolia</i>	Apotheke, München	1 ^B	-	LC/DAD, NIRS, TLC
H2	<i>Actaea</i> spp, Charge	<i>A. heracleifolia</i>	HerbaSinica Hilsdorf GmbH Ch. B. 14101H010	10 ^{B, D}	-	LC/DAD, NIRS
H3	<i>Actaea</i> spp, Charge	<i>A. heracleifolia</i>	Apotheke, Berlin	1 ^B	-	LC/DAD, NIRS

**A. dahurica* (Turcz. ex. Fisch. & C. A. Mey.) Franch. (Syn. *Cimicifuga dahurica*, *Actinospora dahurica*, *Thalictrodes dahurica*), *A. cimicifuga* L. (syn. *C. foetida*), *A. heracleifolia* (Kom.) J. Compton (syn. *C. heracleifolia*) and *A. simplex* Wormsk. ex. Prantl (syn. *A. cimicifuga* var. *simplex*, *C. simplex*, *C. foetida* var. *simplex*) und *A. cordifolia* DC. (syn. *A. rubifolia*, *C. rubifolia*, *C. cordifolia*, *C. racemosa* var. *cordifolia*); ^A Mischprobe von Einzelpflanzen; ^B Mischcharge (Großhändler, Anbau); ^D jeweils 100 g separat abgefüllt, Anbau in Heilongjiang, China

Tabelle 3: Andere Proben von *C. rhizoma*, Einzelexemplare und Handelsware aus Wildsammlungen in den USA sowie Chargen aus kommerziellem Anbau in Deutschland.

ID	Typ	<i>Actaea</i> -Spezies	Herkunft	Anzahl	Gepfl.	Teilprojekte
WE1	Wildernte, Individuen	<i>A. racemosa</i> L.	S2475	1	-	LC/DAD/ELSD, LCMS
WE2	Wildernte, Individuen	<i>A. racemosa</i> L.	S8290	1	-	LC/DAD/ELSD, LCMS
WE3	Wildernte, Individuen	<i>A. racemosa</i> L.	S8293	1	-	LC/DAD/ELSD, LCMS
WE4	Wildernte, Individuen	<i>A. racemosa</i> L.	S12514	1	-	LC/DAD/ELSD, LCMS
WE5	Wildernte, Individuen	<i>A. racemosa</i> L.	S13664, certified organic, Harvest May 2013, USA	1	-	LC/DAD/ELSD, LCMS
WE6	Wildernte, Individuen	<i>A. racemosa</i> L.	S6535	1	-	LC/DAD/ELSD, LCMS
WE7	Wildernte, Individuen	<i>A. racemosa</i> L.	S2537	1	-	LC/DAD/ELSD, LCMS
WE8	Wildernte, Individuen	<i>A. racemosa</i> L.	S2607	1	-	LC/DAD/ELSD, LCMS
WC1	Wildernte, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Kräutermix Ch. B. B 149288 (09.03.2010)	1 ^A	-	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC
WC2	Wildernte, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Kräutermix Ch. B.: P 280703 (27.05.2016)	1 ^A	-	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC, LCMS
WC3	Wildernte, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Caelo Ch. B.: 15312703 (22.10.2015)	1 ^A	-	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC, LCMS
WC4	Wildernte, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Galke Ch. B.: 26453 (26.05.2016)	1 ^A	-	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC, LCMS
WC5	Wildernte, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Galke Ch. B.: 26730 (26.05.2016)	1 ^A	-	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC,
WC6	Wildernte, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Kräuter Schulte Ch.B.: 71127 (MHD 5/18)	1 ^A	-	LC/DAD/ELSD, NIRS, TLC,
B2	Wildernte, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Wildsammlung 2009 Ch. B. 66277 / PL 118003	1 ^A	-	LC/DAD/ELSD
B6	Wildernte, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Wildsammlung 2011 Ch. B. 66279 / PL 118009	1 ^A	-	LC/DAD/ELSD
B1	Anbau, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Ch. B. 80562 / PL 117998, Ernte 2009	1 ^B	2006	LC/DAD/ELSD
B3	Anbau, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Ch. B. 66269 / PL 118004, Ernte 2011	1 ^B	2009	LC/DAD/ELSD
B4	Anbau, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Ch. B. 66267 / PL 118005, Ernte 2010	1 ^B	2008	LC/DAD/ELSD
B5	Anbau, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Ch. B. 66264 / PL 118008, Ernte 2009	1 ^B	2005	LC/DAD/ELSD
B7	Anbau, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Ch. B. 24393 / PL 118010, Ernte 2008	1 ^B	2006	LC/DAD/ELSD
B8	Anbau, Charge	<i>A. racemosa</i> L.	Ch. B. 66266 / PL 118027, Ernte 2009	1 ^B	2007	LC/DAD/ELSD

^A Mischcharge (Großhändler, Wildsammlungen); ^B Mischcharge (Großhändler, Anbau in Deutschland)

2.2 Anlagen, Geräte und Software

2.2.1 Mahlen und Extraktion

- Hackmühle SM 2000 (Retsch Technology GmbH, Haan)
- Universalmühle M20 (IKA, Staufen)
- Universalmühle A10 (IKA, Staufen)
- Analysensieb ID377192 200 μm (Linker Industrietechnik, Kassel)
- Rüttler MS1 Minishaker (IKA, Staufen)
- Ultraschallbad Sonorex RK100H (Bandelin, Berlin)
- Zentrifuge Megafuge 1.0 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- Kühlzentrifuge Allegra X-30R (Beckman Coulter, Krefeld)
- Rotavapor-R mit Wasserbad B-480 (Büchi, Essen)
- Vakuumpumpe MZ 2C mit Controller CVC2 (Vacuubrand, Wertheim)

2.2.2 Dünnschichtchromatografie

- HPTLC Silica Gel F₂₅₄ GLP Glassplatten 20 x 10 cm (Merck, Darmstadt)
- HPTLC Silica Gel F₂₅₄ Glassplatten 10 x 10 cm (Merck, Darmstadt)
- Vakuumentrockenschrank APT.line VDI E2.1 (Binder, Tuttlingen)
- TLC Probensprüngerät Linomat IV (CAMAG, Berlin)
- Spritze 100 μL für Linomat Part. No. 2606702 (ILS Syringes, Stützerbach)
- Doppeltrogkammer für 10 x 10 cm Platten (CAMAG, Berlin)
- Doppeltrogkammer für 10 x 20 cm Platten (CAMAG, Berlin)
- Diverse Flachbodenkammern (DESAGA, Heidelberg)
- TLC Heizplatte H22 electronic (Gerhardt, Bonn)
- UV-Lampe mit Kabinett (CAMAG, Berlin)
- Kamera TLC Visualizer 2 (CAMAG, Berlin)

2.2.3 Flüssigchromatografie

- (U)HPLC-Säule Kinetex C18 (5,0 μm , 4,6 x 250 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg)
- (U)HPLC-Säule Poroshell 20 EC-C18 (2,7 μm , 4,6 x 100 mm) (Agilent, Waldbronn)
- Diverse HPLC Säulen zur Methodenentwicklung
- HPLC-System 1100 mit Degasser (G1322A), binärer Pumpe (G1312A), temperiertem Säulenofen (G1316A), temperiertem Autosampler (G1329A mit G1330A) und Photodiodendetektor (G1315A) (Agilent, Waldbronn)
- HPLC-System mit Degasser (Degasys DG-1210), zwei Pumpen (LC-10AD), temperiertem Autoinjektor (SIL-10A), temperiertem Säulenofen (CTO-10AC), Controlereinheit (CBM-20A) (alle Shimadzu, Duisburg), UV-VIS-Detektor (SPD-10AV) und verdampfendem Lichtstreuendetektor PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, Shropshire)

- HPLC-System mit Degasser (DGU-14 A), Pumpe (LC-10AT), temperiertem Säulenofen (CTO-10AS), UV/Vis-Detektor (SPD-10 A *vp*) und Controllereinheit (CBM-10A) und Software (CLASS-LC10) (Shimadzu, Duisburg)
- UPLC-Säule Acquity BEH C18 (1.7 μm , 2.1 \times 50 mm) (Waters, Eschborn)
- UPLC-Säule Acquity HSS T3 C18 (1.8 μm , 2.1 \times 100 mm) (Waters, Eschborn)
- UPLC-System Acquity (Waters, Eschborn)
- Vorsäulenhalter SecurityGuard (Phenomenex, Aschaffenburg)
- Vorsäulenkartuschen SecurityGuard C18 4 \times 3.0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)

2.2.4 Spektroskopie und Massenspektrometrie

- FT-NIR Spektrometer Multi Purpose Analyzer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen)
- FT-Raman-Spektrometer RFS 100/S (Bruker Optik GmbH, Ettlingen)
- Massenspektrometer Synapt G2-S HDMS (Waters, Eschborn)
- UV-VIS Spektrometer BioSpectrometer (Eppendorf, Hamburg)

2.2.5 Software

- ChemStation (Agilent, Waldbronn)
- CLASS-LC10 (Shimadzu, Duisburg)
- Compression, Noise Removal and Archival Tool SCN 968 (Waters, Eschborn)
- Excel Freeware-Add-In Multibase (Numerical Dynamics, Tokyo)
- HayStack web-based Metabolomics Tool (University of Arcansas)
- LabSolutions (Shimadzu, Duisburg)
- MassLynx 4.1 (Waters, Eschborn)
- MetaboAnalyst 3.0 (Xia Lab at McGill Univeristy, Quebec)
- OPUS 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen)
- OriginPro 9.1G (OriginLab Corporation, Friedrichsdorf)
- Progenesis QI (nonlinear DYNAMICS, Waters, Eschborn)
- Unscrambler 10.0 (CAMO, Oslo)
- visionCATS (CAMAG, Muttenz)

2.2.6 Sonstige Geräte

- Analysenwaage MSE125P-1CE-DU (Sartorius, Göttingen)
 - Manuelle Hydraulikpresse (Resultec, Illerkirchberg)
 - KBr-Presswerkzeug für 13 mm Presslinge (Specac, Kent)
 - Präzisionswaage PT 1200 (Sartorius, Göttingen)
 - Reinstwassersystem LaboStar (Siemens, Berlin)
 - Verschiedene Eppendorf-Kolbenhubpipetten (Eppendorf, Hamburg)
-

2.3 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Standards

- Diverse Pipettenspitzen für Eppendorf-Kolbenhubpipetten
 - Einmalspritzen, 2-teilig, 5 mL (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
 - HPLC Braunglasvials 1,5 mL mit Schriftfeld (VWR, Darmstadt)
 - Pasteurpipetten 150 mm mit Sauger (Carl Roth, Karlsruhe)
 - Schraubkappen 8 mm für HPLC Vials mit PTFE Septen (VWR, Darmstadt)
 - Spritzenfilter Rotilabo PVDF 0,22 µm (Carl Roth, Karlsruhe)
 - Uvette Einmalküvetten (Eppendorf, Hamburg)
 - Zentrifugenröhrchen 15 mL (VWR, Darmstadt)
 - 23-*epi*-26-Deoxyactein #89183, Charge 10632 (PhytoLab, Vestenbergsgreuth)
 - 2-Propanol p. a. (KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar)
 - Acetonitril „Super Gradient“ (VWR, Darmstadt)
 - Acetonitrile ULC/MS-grade (BioSolve BV, Valkenswaard)
 - ALPHAGAZ N₂ 99,999% (Air Liquide, Berlin)
 - Ameisensäure p. a. 98-100% (KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar)
 - Ameisensäure ULC/MS-grade (BioSolve BV, Valkenswaard)
 - Ameisensäureethylester (Schuchardt, Hohenbrunn)
 - Ammoniumglycyrrhizat (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt)
 - Ethylacetat (Fisher Scientific, Schwerte)
 - Kaffeesäure #C0625-5G, Charge SLBL7069V (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt)
 - Leucine Enkephalin (LeuEnk, Waters, Eschborn)
 - Methanol „Gradient Grade“ (VWR, Darmstadt)
 - R/S-Actein #89154, Charge 9596 (PhytoLab, Vestenbergsgreuth)
 - Schwefelsäure 96% Ph. Eur. (VWR, Darmstadt)
 - Stickstoff, tiefgekühlt, flüssig, UN 1977 (Linde, Pullach)
 - Toluol (VWR, Darmstadt)
 - Wasser ULC/MS-grade (BioSolve BV, Valkenswaard)
-

2.4 Probenvorbereitung

2.4.1 Vorbereitung und Mahlen der Proben

Ein großer Teil der untersuchten Exemplare von verschiedenen *Actaea* spp. wurde auf dem Versuchsgelände des Albrecht Daniel Thaer-Instituts für Agrar- und Gartenbauwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin kultiviert (siehe 2.1 und Tabelle 1). Die unterschiedlich alten Pflanzen wurden im Zeitraum Mitte September bis Anfang November 2014 geerntet. Dabei wurden die Rhizome (siehe Abbildung 11) gewaschen, grob zerkleinert und anschließend getrocknet (30 °C für 48 h, siehe Abbildung 12) und verpackt. Eine Grobmahlung und die Feinmahlung (Pulverisierung, siehe 2.2.1) erfolgte am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin.



Abbildung 11: Ein gereinigtes Rhizom mit feinen Wurzeln von *Actaea racemosa* (L.) nach Ernte und Reinigung, unmittelbar vor Grobzerkleinerung und Trocknung.



Abbildung 12: Grob zerkleinertes und getrocknetes Rhizom eines Exemplars von *C. rhizoma* aus Kultur in Dahlem (Berlin).

Die Pflanzen sollten im Hinblick auf Ihre Homogenität untersucht werden, daher war es wichtig, aus jeder Pflanze jeweils eine homogene Mischprobe herzustellen. Die Rhizome wiesen jedoch eine teilweise sehr unterschiedliche Gesamtmasse auf, die Spanne reichte von wenigen Gramm bis hin zu über einem Kilogramm. Eine Pulverisierung des Rhizoms konnte nur mittels der Pulvermühle (IKA M20) erreicht werden, diese konnte aber in einem Mahlgang nur etwa 50–100 g Droge mahlen. Das Mahlen großer Rhizome (über 1 kg) hätte dementsprechend portionsweise erfolgen müssen. Die einzelnen Mahlgänge hätten im Nachgang erneut einer Mischung unterzogen werden müssen. Eine Homogenität konnte auf diesem Wege nicht gewährleistet werden. Um dennoch homogene Mischproben zu erzielen, wurden daher sehr große Rhizome ggfs. mit einer Hackmühle (Retsch SM 2000) grob zerkleinert (≤ 5 mm) und anschließend nur ein Teil der resultierenden Mischprobe gepulvert. Kleinere Proben (unter 1,25 kg) wurden vollständig, bei größeren Proben (über 1,25 kg) entsprechend Ph. Eur. 2.8.20. mindestens ca. 125 g gemahlen [156].

Die Rhizome der Klonpflanzen wurden vollständig zu homogenen Mischproben gepulvert. Bei vorzerkleinerten kommerziellen Mischproben (*A. racemosa* und andere *Actaea* spp.) wurde jeweils ein Teil gemahlen, etwa 125 g. Die Exemplare der verschiedenen kultivierten *Actaea* spp. wurden bei der Ernte zu Mischproben verarbeitet. Um für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit eine höhere Probenmenge zu erhalten, wurden von diesen Mischproben unterschiedliche Teile der nur sehr grob zerkleinerten Rhizome individuell gemahlen und als individuelle Proben analysiert.

Alle Proben wurden nach der Pulverisierung durch ein Analysensieb (200 μ m Maschenweite) gegeben und anschließend in gekennzeichnete PE-Schraubfläschchen oder Probengläser zur Lagerung bis zur jeweiligen Verwendung abgefüllt.

2.4.2 Extraktion der Proben

Zur Extraktion der *Actaea*-Rhizome wurden je nach Analysemethode und interessierenden Analyten drei unterschiedliche Extraktionsverfahren angewandt. In allen Fällen erfolgte die Extraktion von etwa 400,0 mg gepulverten Pflanzenmaterials (200 μ m) mittels Ultraschall, in 15-mL-Falcon-Tubes und bei einer Temperatur von 60 °C. Das optimale Verhältnis von Pflanzenmaterial und Volumen des Extraktionsmittels wurde aus der Literatur übernommen [157]. Daher wurde jeweils mit 5,0 mL Extraktionsmittel extrahiert.

Die auf Kaffeesäure aufgebauten Polyphenole **4–9** sind oxidationsempfindlich und werden schnell hydrolysiert, vor allem bei Tageslicht (siehe 3.1.1). Aus diesen Gründen wurde für die Quantifizierung mittels LC/DAD eine möglichst kurze Extraktion durchgeführt (5 min) und anschließend bei 4 °C zentrifugiert, rasch in Braunglas-Vials filtriert (0,22 μ m) und bei 2–8 °C bis zur Analyse am selben Tag gelagert. Diese Ausbeute wurde bestimmt durch vierfach Extraktion desselben Pflanzenmaterials ($n = 10$) und separater Analyse der resultierenden Extrakte mittels LC/DAD. Eine dreifache Extraktion erwies sich dabei als quantitativ, da hierbei über 99,0 % der untersuchten Polyphenole extrahiert wurden.

Für die Aufnahme von UV-Spektren der Extrakte wurde quantitativ (dreifach) extrahiert. Da eine Vermessung der Extrakte im gewünschten Absorptionsbereich etwa 0,2–1,0 eine Verdünnung erforderlich machte, konnten die resultierenden Extrakte in einem 50,0-mL-

Maßkolben vereint, rasch verdünnt und vermessen werden. Dazu wurden erneut 2,5 mL auf 50,0 mL in einem weiteren Maßkolben überführt und auf Volumen gebracht. Die Extrakte belastende Verdampfungs- und Wiederauflöseschritte konnten hier vermieden werden.

Für die Quantifizierung der Triterpenglykoside **10–21** mittels LC/ELSD wurde eine Extraktionsmethode angelehnt an die USP Monographie *Black Cohosh* verwendet (siehe 3.1.1). Hierbei wurde das Pflanzenmaterial dreifach mit jeweils 5,0 mL Methanol bei einer Temperatur von 40 °C extrahiert, die resultierenden Extrakte in einem 50-mL-Rundkolben vereint und anschließend das Extraktionsmittel bei etwa 50 °C und ca. 300 mbar (Startwert) bis zur Trockne eingedampft. Der Trockenrückstand wurde erneut in 5,0 mL Methanol gelöst und zur LC/ELSD-Analyse in Braunglasvials filtriert (0,22 µm). Letztere quantitative Extraktionsmethode wurde auch für das Chemical Profiling mittels hochauflösender UPLC/ESI-QTOF-MS/MS^E verwendet. Vor der Filtration wurden die Extrakte in diesem Fall noch in einem 25,0-mL-Maßkolben im Verhältnis 1/25 (V/V) verdünnt.

2.5 Instrumentell-analytische Methoden

2.5.1 Dünnschichtchromatografie (HPTLC)

Zur dünnschichtchromatografischen Untersuchung der *Actaea*-Proben wurde eine TLC Methode aus der Literatur herangezogen [80]. Die HPTLC-Platten (200 × 100 mm) wurden in einer Flachbodenkammer mit einem Gemisch von 50% (V/V) Methanol in Ethylacetat gereinigt und anschließend bei 120 °C für 30 min getrocknet. Die Laufstrecke betrug 6 cm. Etwa 400,0 mg der pulverisierten Droge wurden in ein 15-mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen, 5,0 mL 70% (V/V) Methanol hinzugegeben, geschüttelt und anschließend bei 60 °C für 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde geschüttelt und bei 4 °C zentrifugiert. Nach Filtration durch einen Spritzenfilter (0,22 µm Porenweite) wurde bei 2–8 °C gelagert. Je Extrakt wurden 2 µL aufgetragen und dabei folgende Parameter eingestellt: Startpunkt 13 mm, Bandenbreite 8 mm und Abstand 3 mm. Um nur ganze Banden aufzutragen wurde eine Auftrage-Geschwindigkeit von 14 s/µL verwendet.

Die Entwicklung der Platten erfolgte in einer Doppeltrogkammer. Das Fließmittel bestand aus einer Mischung aus 20 % (V/V) Ameisensäure, 30 % (V/V) Ameisensäureethylester und 50 % (V/V) Toluol. Zur Equilibrierung der Platten wurde in einen der Tröge Fließmittel gegeben. Nach etwa 15 min erfolgte die Entwicklung der Platte durch vorsichtige Zugabe (unter Vermeidung einer Öffnung der Kammer) von Fließmittel auch in den zweiten Trog. Eine Derivatisierung der entwickelten Platten erfolgte durch Tauchen in 10 % (V/V) Schwefelsäure in Methanol für etwa 1 s und 10 min Erhitzen auf 100 °C. Die abgekühlten Platten wurden anschließend zeitnah dokumentiert (CAMAG TLC Visualizer 2).

2.5.2 Quantifizierung der Polyphenole mittels LC/DAD

Die Quantifizierung der Polyphenole erfolgte mittels LC/DAD. Die entsprechende Methode wurde an einer Shimadzu-Anlage mit Probenschleife entwickelt und dann zur Routinequantifizierung auf eine Agilent- bzw. Shimadzu-Anlage mit Auto-Sampler übertragen. Die einzelnen Pflanzen wurden jeweils dreifach (Extrakte A, B und C) bestimmt, dies erfolgte in Sequenzen zu jeweils acht Pflanzen pro Tag, wobei erst Standardinjektionen, dann acht A-Extrakte, Standardinjektion zur Testung der Systemstabilität, acht B-Extrakte usw. erfolgten. Die automatische Injektionsnadelwaschfunktion des Autosamplers (Agilent) wurde dabei genutzt und die Proben während der Analyse auf 8 °C (Agilent/Shimadzu) gekühlt.

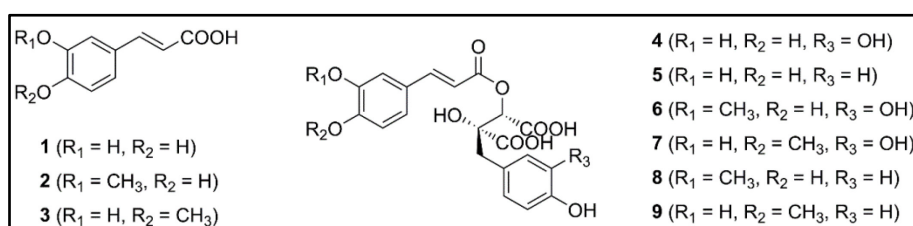


Abbildung 13: Untersuchte Polyphenole in *Actaea*-Rhizomen, Kaffeesäure (**1**), Ferulasäure (**2**), Isoferulasäure (**3**), Fukinolsäure (**4**) sowie Cimicifugasäuren D (**5**) und A bis F (**6–9**).

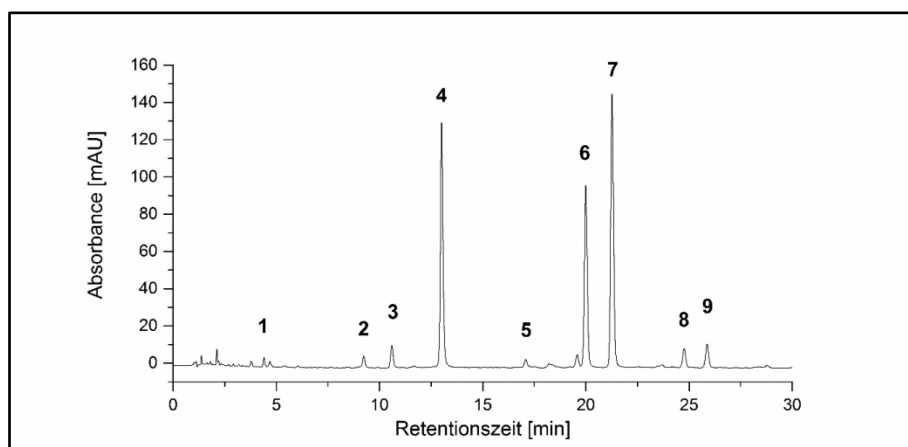


Abbildung 14: Chromatogramm eines *C. rhizoma* Extrakts bei UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 327 ± 4 nm und einer Referenzwellenlänge von 395 ± 4 nm. (t_R Kaffeesäure (**1**) 4,35 min); Polyphenole **1–9**.

Das Injektionsvolumen betrug 2,0 μL des unverdünnten Extraktes. Die Mobilen Phasen waren dabei 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Wasser (Mobile Phase A) und 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Acetonitril (Mobile Phase B) mit einer Flussrate von 1,0 mL/min. Die Säulofentemperatur betrug 25,0 °C. Zur Trennung der Polyphenole wurde eine Poroshell 20 EC-C18 (2,7 μm , $4,6 \times 100$ mm) Säule (Agilent) mit einem Gradienten von 14–26 % Mobile Phase B in 28 min genutzt und anschließend mit 100 % Mobile Phase B gespült und rekonditioniert (Gesamtlaufzeit: 45 min). Zur Erstellung einer jeweiligen Kalibriergeraden wurden Kaffeesäurestandardlösungen in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet. Dazu wurden etwa 50,0 mg Kaffeesäure in einen 50-mL-Maßkolben eingewogen und mit 70 % (V/V) auf das Eichvolumen aufgefüllt (Stammlösung 1,0 mg/mL Kaffeesäure). Durch Verdünnung

wurden dann Standardlösungen S1 bis S3 hergestellt (5,0 µg/mL, 100,0 µg/mL und 200,0 µg/mL Kaffeesäure). Die Detektionswellenlänge betrug 327 nm mit einer Referenzwellenlänge bei 395 nm und jeweiliger Bandbreite von 8 nm (*slit* 4 nm, *response-time* 2,0 s). Die Peak-Integration wurde automatisch durchgeführt (*slope sensitivity* 1, *peak width* 0.01, *area reject* 20, *baseline to valleys*). Der Gehalt aller Polyphenole wurde über die für Kaffeesäure erhaltene Kalibrierfunktion berechnet.

2.5.3 Quantifizierung der Triterpenglykoside mittels LC/ELSD

Die Quantifizierung der Triterpenglykoside erfolgte durch RP-HPLC und Detektion mittels eines verdampfenden Lichtstreuendetektors (ELSD). Die Quantifizierung der Proben erfolgte in Triplikaten. Die chromatografische Trennung der Triterpenglykoside (Injektionsvolumen 20 µL) erfolgte mit einer Kinetex RP18 (5 µm, 4,6 × 125 mm) Säule (Phenomenex) und einer Mobilphase bestehend aus Wasser (Mobile Phase A) und Acetonitril (Mobile Phase B). Ein linearer Gradient von 35–55 % Mobiler Phase B in 30 min gefolgt von einem 15 minütigen Spül- und Rekonditionierungsschritt wurde angewandt. Die Flussrate betrug 0,9 mL/min. Die Proben wurden während der Analyse auf 20 °C, die Säule auf 35 °C temperiert. Der ELSD wurde auf eine maximale Response für 23-*epi*-26-Deoxyactein (**16**) eingestellt: Die optimale Gasflussrate betrug 1,0 mL/min, die Nebulisierertemperatur 40 °C und die Verdampferemperatur 100 °C. Stickstoff wurde dem ELSD mit einem Druck von etwa 6 bar zugeführt.

Zur Kalibrierung wurden Standardlösungen des 23-*epi*-26-Deoxyacteins (**16**) in fünf Konzentrationen verwendet. Dazu wurden etwa 5,0 mg Standardsubstanz in einen 10,0-mL-Maßkolben exakt eingewogen und auf die Eichmarke aufgefüllt (S5 500,0 µg/mL). Durch entsprechende Verdünnung wurden weitere Standardlösungen in den Konzentrationen 200,0 µg/mL (S4), 100,0 µg/mL (S3), 50,0 µg/mL (S2) und 20,0 µg/mL (S1) hergestellt, in Braunglasvials aliquotiert und anschließend bei –20 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Kalibriergerade wurde durch Auftragung der log₁₀-Werte der Standardkonzentrationen c gegen die log₁₀-Werte der dazugehörigen Peakflächen A entsprechend der Gleichung $\log(A) = m \log(c) + n$ erstellt. Der Gehalt der einzelnen Triterpenglykoside und der Gesamtgehalt wurden über die Kalibrierfunktion für 23-*epi*-26-Deoxyactein berechnet.

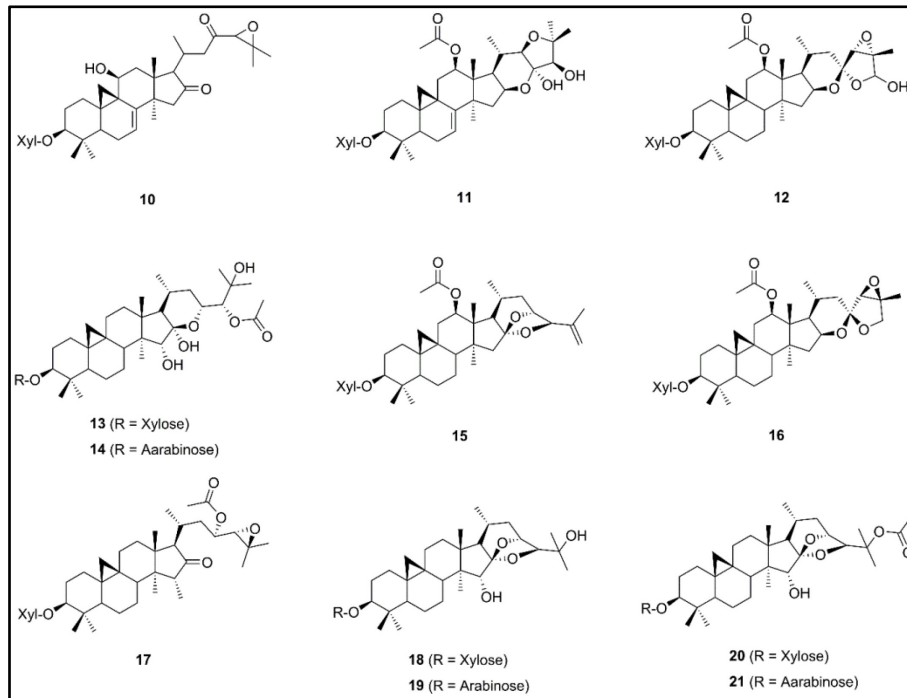


Abbildung 15: Untersuchte Triterpenglykoside in *Actaea racemosa* L. Rhizomen (*C. rhizoma*), Cimifugosid H1 (**10**), Cimiracemosid A (**11**), Actein (**12**), Acetylhydroshengmanolarabinosid (**13**), Acetylhydroshengmanolxylopyranosid (**14**), Cimiracemosid J (**15**), 23-*epi*-26-Deoxyactein (**16**), Acetylshengmanolxylosid (**17**), Cimigenolarabinosid (**18**), Cimigenolxylosid (**19**), Acetylcimigenolarabinosid (**20**) und Acetylcimigenolxylosid (**21**).

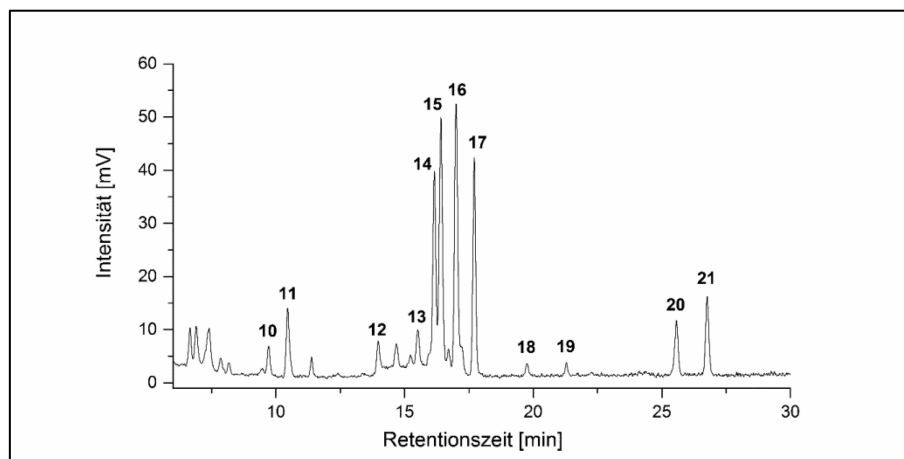


Abbildung 16: Chromatogramm eines *Actaea racemosa* Extrakts, Detektion der Triterpenglykoside **10–21** mittels ELSD.

2.5.4 Identifizierung von Metaboliten mittels LC/MS

Im Rahmen der Validierung und Verifizierung der LC/DAD und LC/ELSD Methoden zur Quantifizierung von Polyphenolen und Triterpenglykosiden in Cimicifugae rhizoma wurden zu bestimmende Verbindungen (Peaks) mittels LC/MS identifiziert.

Beide Methoden wurden dazu inklusive der verwendeten Trennsäulen auf ein Waters UPLC/ESI-QTOF-MS-System übertragen (siehe Abschnitte 2.2.3 und 2.2.4). Für die Metho-

de der Polyphenole musste die Flussrate des LC-Systems reduziert werden, um optimale Spray-Bedingungen zu erhalten (hoher Wasseranteil der Mobilphase). Daher wurde die Laufzeit verlängert. Zur Kalibrierung der akkuraten Masse wurde während aller Experimente LockSpray (LeuEnk, m/z 554,27 (+)-ESI bzw. 554,26 (-)-ESI) mit einer Scan-Frequenz von 0,1 Hz durchgeführt. Die Ionisierung der Analyten erfolgte für Polyphenole in (+)-ESI und für Triterpenglykoside in (-)-ESI mit einer Kapillarspannung von 3 kV und einer Ionenquellentemperatur von 90 °C. Die Desolvatationstemperatur und Gasflussrate wurden auf 250 °C und 650,0 L/h (Polyphenole) bzw. 300 °C und 700,0 L/h (Triterpenglykoside) eingestellt. Die Samplekonus- und Source-Offsetspannungen waren 40 V bzw. 80 V.

2.5.5 Chemical Profiling mittels UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS/MS^E

Für das Chemical Profiling mittels Haystack und Progenesis QI wurden hochauflösende MS und MS^E Daten am o. g. Waters UPLC/MS-System generiert. Zur analytischen Auftrennung der *Cimicifugae rhizoma* Extrakte wurde eine Waters Acquity UPLC Säule (HSS T3 1,8 µm 100 mm) verwendet. Mobile Phasen waren 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Wasser (A) bzw. Acetonitril (B). Die analytische Laufzeit betrug 18 min, inklusive Rekonditionierung der Trennsäule insgesamt 27 min. Das Injektionsvolumen betrug 3,5 µL. Zur Prüfung der Systemstabilität erfolgten während der LC-Sequenz in regelmäßigen Abständen Injektionen einer 23-*epi*-26-Deoxyactein Standardlösung (0,1 µg/mL). Ein Pool-Sample, bestehend aus Aliquoten aller Proben, wurde als Alignment-Referenz (QA/QC-Sample) für die Auswertung mit Progenesis QI ebenfalls in der Sequenz mitgeführt und mehrfach injiziert.

Massenspektrometrische Daten wurden im Massenbereich von 50–1200 Da mit einer Scanrate von 0,3 s aufgenommen. Die Kapillarspannung und Spannung des Samplekonus lagen bei 3,2 kV bzw. 40 V. Die Kollisionsenergien für (+)-ESI-MS^E lagen bei 4 eV (niedrig) und einem Gradienten von 15–50 eV (hoch). Die Ionenquellentemperatur betrug 90 °C und die Desolvatationstemperatur 300 °C.

2.5.6 UV-Spektroskopie

Für die qualitative Analyse der *Actaea*-Extrakte wurde die bestehende Extraktionsmethode für die Quantifizierung der Polyphenole mittels LC/DAD modifiziert. Unmittelbar nach der Herstellung und Verdünnung des Extraktes wurden anschließend UV-Spektren im Wellenlängenbereich 220–400 nm in 1-nm-Schritten gegen 70% (V/V) Methanol als Blank-Spektrum aufgenommen. Für jeden Extrakt wurden Spektren in fünffacher Wiederholung aufgenommen. Alle Proben, die in dieses Teilprojekt einbezogen waren, wurden jeweils dreifach extrahiert und vermessen.

2.5.7 FT-NIR-Spektroskopie

NIRS-Analysen wurden an einem FT-NIR-Spektrometer mit Indiumgalliumarsenid-(InGaAs)-Detektor (Multi-Purpose Analyser, MPA, Bruker) durchgeführt. Unmittelbar vor der LC-Analyse der Proben wurden Spektren des gepulverten Pflanzenmaterials im Wellen-

zahlbereich 3.600–12.000 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 8 cm^{-1} in Transflexion aufgenommen. Dazu wurden etwa 10 g des homogenen Pulvers gleichmäßig auf fünf Glasküvetten verteilt und mit je 32 Scans Spektren gemessen. Die aus den fünf wiederholten Messungen resultierenden Spektren wurden anschließend gemittelt. Um Streuungseffekte und Basislinien-Drifts zu korrigieren wurde der gewichtete multiplikative Streukorrektur-Algorithmus (*weighted multiplicative scatter correction*, WMSC) der OPUS 6.5 Software (Bruker) angewandt. Diese vorbehandelten Mittelwertspektren wurden dann für die Quantifizierungsmodellbildung mittels PLS-Regression mit den jeweiligen Referenzdaten und für qualitative Analysen genutzt.

2.5.8 FT-Raman-Spektroskopie

Die Analyse der Proben wurde an einem FT-Raman-Spektrometer (RFS 100/S, Bruker) ausgestattet mit einem Nd:YAG Laser (emittiertes Licht bei 1.064 nm bzw. 9.398,5 cm^{-1}) und in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gekühlten Detektor durchgeführt. Zur Messung der Proben am FT-Raman-Spektrometer wurden Presslinge hergestellt. Dazu wurden 200 mg Pflanzenmaterial mit einer manuellen Hydraulikpresse und einem 13-mm-KBr-Presswerkzeug verpresst (Druck: 10 bar). Anschließend wurden mit zwei Laserlicht-Intensitäten (Stufe I [5 mW] und Stufe II [50 mW]) und mit je mit 64 Scans Spektren in einer Auflösung von 4 cm^{-1} und im Wellenzahlbereich von 4.000–200 cm^{-1} aufgenommen.

2.6 Multivariate Analysemethoden und Statistik

2.6.1 Explorative Analyse der quantitativen Daten aus LC/DAD/ELSD

Zur explorativen Analyse der Daten aus LC/DAD/ELSD für den jeweiligen Probensatz an *A. racemosa* bzw. *Actaea* spp. Exemplaren wurden Hauptkomponentenanalysen (PCA) durchgeführt. Für eine PCA der quantitativen Daten für Polyphenole und Triterpenglykoside wurde in Microsoft Excel eine Datenmatrix $m \times n$ aus m Proben in Reihen und n quantifizierte Verbindungen (Variablen) in Spalten erstellt. Zur Unterscheidung der verschiedenen *Actaea* spp. anhand ihrer Polyphenolgehalte (**4–9**) wurde die Matrix in Origin Pro exportiert. Der Datensatz wurde normalisiert ([0,1]-Normalisierung) und anschließend eine PCA unter Verwendung der Kovarianzmatrix durchgeführt (Abschnitt 3.2.2).

Die PCAs zur Auswertung der quantitativen Daten zu allen Verbindungen (**4–21**) und zur Untersuchung der verschiedenen Proben innerhalb des Satzes an *A. racemosa* Exemplaren aus Kultur und Wildsammlungen wurde mittels MetaboAnalyst 3.0 durchgeführt. Dazu wurde eine nach o. g. Muster erstellte Matrix in eine Textdatei (.TXT, Tab getrennt) exportiert und anschließend auf die online-Plattform hochgeladen [158]. Vor statistischer Auswertung wurden die Daten standardisiert (Auto-Scaling $Y = (X - \mu)/\sigma$) und anschließend multivariate und statistische Auswertung durchgeführt (Abschnitt 3.1.3.1).

2.6.2 Chemical Profiling mittels UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS/MS^E

Für die nicht gezielte Analyse (*non-targeted analysis*) der verschiedenen Exemplare von *Cimicifugae rhizoma* wurden hochauflösende massenspektrometrische Daten mittels LC/MS bzw. /MS^E erzeugt (siehe Abschnitt 2.5.5, S. 38). Unmittelbar nach der Analyse wurden die Datensätze von einigen GB auf einige MB mithilfe eines Kompressionstools (Waters Compression, Noise Removal and Archival Tool SCN 968) reduziert. Anschließend erfolgte eine Re-Kalibrierung auf die akkurate Masse mit MassLynx (Waters). Für eine Auswertung (Bin-Analysen) mit dem online-Tool Haystack [148] wurden die Rohdaten in das .CDF-Format exportiert (Data Bridge, Waters) und anschließend dort hochgeladen.

In Haystack wurden Bin-Analysen der Datensätze der verschiedenen Exemplare von *C. rhizoma* durchgeführt und die resultierenden zweidimensionalen Datensätze (Datenmatrizen $m \times n$ aus m Proben in Reihen und n Intensitätswerten für die massenspektralen Bins) in Form von .CSV-Dateien exportiert. Als Tab getrennte .TXT-Dateien wurden die Datensätze in MetaboAnalyst überführt und dort ausgewertet. Als Datenvorbehandlung erfolgte ein Auto-Scaling und nur der Interquartilsabstand (IQR, Q25–Q75) wurde verwendet.

Für die Auswertung mit Progenesis QI wurde die wie oben beschriebenen Rohdaten (LC/MS^E) verwendet (nach Reduzierung und Re-Kalibrierung). Das Run-Alignment erfolgte zu am besten passender Pool-Probe (QC/QA-Sample). Das Peak-Picking wurde im Retentionszeitbereich von 2–17 min durchgeführt (Sensitivität: Automatik). Die Online-Datenbanksuche nach Identifizierungen erfolgte in PubChem (Precursor-Toleranz 22 ppm, theoretische Fragmentierung (Toleranz 25 ppm) und der elementaren Komposition C, H und O. Die statistische zur Filterung der Verbindungen in den definierten Gruppen vor der PCA erfolgte mittels ANOVA und Fold-Change ($p \leq 0,05$, $FC \geq 2$).

2.6.3 Multivariate Klassifizierung für qualitative Analyse (UVS/LDA)

Die Rohdaten des UV/VIS-Spektrometers wurden in Microsoft Excel exportiert und anschließend die fünf repetitiven Messungen gemittelt. Die Daten für die verschiedenen *Actaea*-Proben, extrahiert und gemessen in Triplikaten, wurden in eine Datenmatrix $m \times n$ aus m Proben in Reihen und n Werten für die UV-Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge in Spalten übertragen. Die statistische Auswertung wurde mit Origin Pro durchgeführt. Es wurde im Wellenlängenbereich von 250–360 nm normalisiert ([0,1]-Normalisierung) und für die Klassifizierung der verschiedenen *Actaea* spp. mittels LDA eine Spalte mit kategorischen Werten (Spezieszugehörigkeit/Klasse) ergänzt. Es ergaben sich demnach fünf Klassen für die verschiedenen *Actaea* spp. *A. 40acemose*, *A. cimicfuga*, *A. cordifolia*, *A. heracleifolia* und *A. simplex*. Für die LDA wurden Absorptionswerte im Bereich von 260–348 nm in 4 nm Schritten verwendet, resultierend in einer Datenmatrix von 192×23 Werten. Da in die PCA die Spezies *A. dahurica* und eine unbekannte *Actaea* sp. miteinbezogen wurden ergab sich hier eine abweichende Matrix von 198×23 Werten. Zur Validierung des LDA-Klassifizierungsmodells wurde eine fünffache Test-Set-Validierung durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 20 % einer Klasse (Spezies) als Test-Set verwendet, während die übrigen 80 % zur Modellbildung genutzt wurden (Training-Sets). Die Modellbildung erfolgte mittels *leave-one-*

out-Kreuzvalidierung. Die Prozedur wurde viermal wiederholt, bis jedes Proben-Triplikat einmal in einem Test-Set war. Um zu überprüfen, ob ein Klassifizierungsmodell basierend auf zufällig zugeordneten Klassenzugehörigkeiten (Spezies) schlechter funktioniert als eines auf wahren, wurde ein Permutationstest durchgeführt (Abbildung 56A). Zur Beurteilung der Vorhersagegenauigkeit des UVS/LDA-Klassifizierungsmodells, wurden die Anzahl der Fehlklassifizierungen und die jeweilige Fehlerrate (%) berechnet.

2.6.4 Multivariate Regression für quantitative Analyse (NIRS)

Die multivariate Kalibrierung zwischen quantitativen Referenzdaten aus LC/DAD und LC/ELSD für Polyphenole und Triterpenglykoside und den NIR-Spektren der Proben erfolgte mit dem PLS-Regressions-Algorithmus der OPUS 6.5 Software (Quant 2). Die Validierung der Vorhersagemodelle erfolgte mittels 10-%-Kreuzvalidierung, resultierend in zehn Kombinationen aus Test- und Training-Set, die im endgültigen Modell vereint wurden. Mithilfe des Optimierungstools der OPUS Software wurden die optimalen Wellenzahlbereiche und Vorbehandlungen der Spektren z. B. Min/Max-Normalisierung (MMN), multiplikative Streukorrektur (MSC), Ableitungen und Standardvektornormalisierung (SVN) ausgewählt, die in möglichst geringen Kreuzvalidierungsfehlern (*root mean square error of cross-validation*, RMSECV) resultierten. Die Vorhersagequalität der Quantifizierungsmodelle wurden mithilfe des Bestimmtheitsmaßes (R^2), des RPD-Wertes (*ratio of performance to deviation*, Standardvorhersagefehler durch die Standardabweichung [SEP/SD] der Proben), RMSECV, Standardfehler der Kalibrierung (SEC) und dem y -Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion (Bias) beurteilt (siehe Tabelle 14, S. 98).

Die explorativen Untersuchungen des Probensatzes mittels PCA und HCA erfolgten ebenfalls mit OPUS 6.5 sowie mit Unscrambler 10. Die stärksten PCA-Loadings (Wellenzahlen) repräsentieren die größte Variabilität im Probensatz und wurden daher dazu verwendet, die zum bestmöglichen Clustern der verschiedenen *Actaea* spp. führenden Datenvorbehandlungen und Wellenzahlenbereiche auszuwählen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Kulturpflanzen

3.1.1 Validierung und Verifizierung der quantitativen LC-Methoden

3.1.1.1 Extraktion der Polyphenole

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polyphenole wie Fukinolsäure und Cimicifugasäuren in der Arzneibuchdroge *C. rhizoma* mittels LC/DAD quantifiziert. Voraussetzung für eine valide Gehaltsbestimmungsmethode (siehe 2.5.2 und 3.1.1.2) ist eine reproduzierbare Extraktion der Analyten aus der Probenmatrix, in diesem Fall dem gepulverten ($\leq 200 \mu\text{m}$) Rhizom. Neben der Reproduzierbarkeit ist ebenso eine hohe Praktikabilität von Bedeutung. Soll, wie in dem Fall dieser Arbeit, ein großer Probensatz mit hoher statistischer Sicherheit (Triplikate) analysiert werden, verbieten sich zeitraubende und fehleranfällige Extraktionsschritte. Für die Analyse von über 150 Exemplaren von *C. rhizoma* in Triplikaten würde eine wie in der Literatur beschriebene Extraktion, z. B. ein dreifach-Mazerat (je 12 h) [95] oder eine dreifach-Extraktion (je 30 min) mittels Ultraschall [94,159] – plus Verdampfungs- und Gefriertrocknungsschritten – nicht in einem angemessenen Zeitrahmen realisierbar sein. Weiterhin sind die interessierenden Analyten Phenole und Ester, die unter Umständen oxidationsempfindlich und anfällig für eine Hydrolyse sind. Aus den genannten Gründen kommt eine lange, die Probe belastende Extraktionsprozedur nicht in Frage. Deshalb wurde die Extraktion hinsichtlich Extraktionsmittel, Extraktionstemperatur und –dauer im Hinblick auf die Ausbeute an Polyphenolen untersucht und optimiert.

Ein Methanol-Wasser-Gemisch war im Vergleich zu anderen gängigen Extraktionsmedien wie 2-Propanol und Ethanol am besten geeignet und zeigte die höchsten Ausbeuten an Polyphenolen. Dies steht im Einklang mit der entsprechenden Monografie des Ph. Eur., der USP und der Primärliteratur. Weiterhin zeigte sich eine höhere Reproduzierbarkeit der dreifach-Bestimmung für Fukinolsäure (**4**), Cimicifugasäure A (**6**) und B (**7**) bei höheren Methanol-Anteilen (Abbildung 17). Dies ließ vermuten, dass dem eine besondere Hydrolyseempfindlichkeit dieser Verbindungen zugrunde liegt. Die Ausbeute war bei einem Methanol-Anteil von 70 % (V/V) am höchsten.

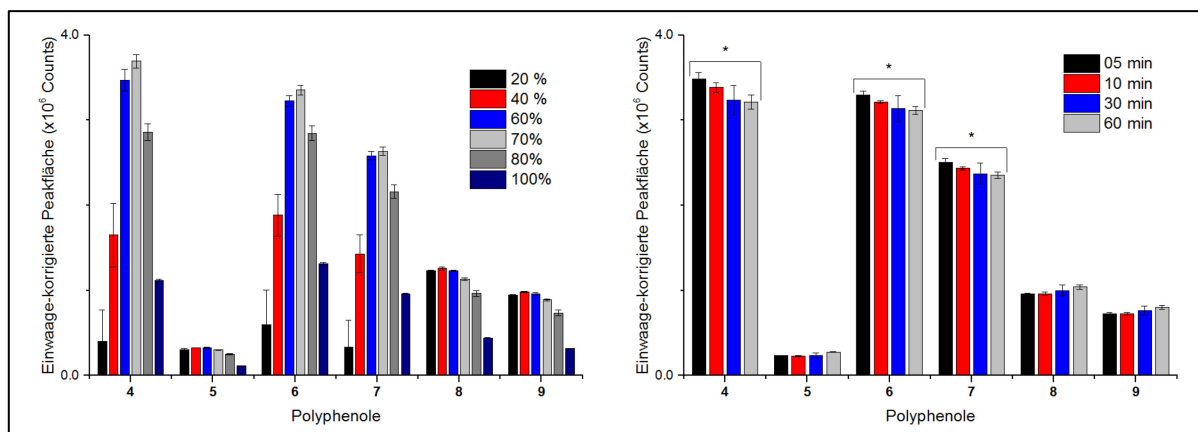


Abbildung 17: Ermittlung der optimalen Parameter für die Extraktion der Polyphenole **4–9** aus *C. rhizoma*: Extraktionsdauer im Ultraschallbad (rechts) und Methanolanteil (links). Die höchste Ausbeute ergab sich bei 70 % (V/V) Methanol. Die Reproduzierbarkeit der Extraktion verbessert sich mit steigendem Methanol-Anteil im Medium ($n = 3$, SD). * $p \leq 0,05$, t -Test.

Die Vermutung der Hydrolyseempfindlichkeit bestätigte sich während der Untersuchung der Extraktionsdauer (Abbildung 17 rechts). Da sich die Temperatur des Mediums im Ultraschallbad aufgrund des Energieeintrags mit der Dauer der Extraktion kontinuierlich erhöhte und dies zu falsch höheren Ausbeuten bei längerer Extraktionsdauer führen würde, wurde dieser Versuch unter Kühlung mit Eis, das heißt bei konstanter Temperatur (0 °C), durchgeführt. Die Ausbeuten an Fukinolsäure sowie Cimicifugasäure A und B (**4**, **6** und **7**) waren schon nach 60 min Ultraschallbehandlung unter Eiskühlung signifikant reduziert. Die Ausbeuten anderer Polyphenole stiegen hingegen im Lauf der Extraktion an. Daher musste die Extraktionsdauer möglichst kurz sein, um eine maximale Ausbeute an **4**, **6** und **7** zu erzielen. Generell führte eine Erhöhung der Temperatur während der Extraktion im Ultraschallbad zu einer Erhöhung der Ausbeute an den zu untersuchenden Polyphenolen. Eine Extraktionstemperatur höher als 60 °C wurde aus Gründen der Praktikabilität jedoch nicht in Betracht gezogen.

Eine kurze Extraktion von 5 min bei 60 °C in 70 % (V/V) Methanol erwies sich aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit hinsichtlich der Ausbeute und Reproduzierbarkeit als optimal. Eine solche Extraktion ist jedoch nicht quantitativ. Daher wurde ermittelt, wie häufig die oben genannte Extraktion wiederholt werden müsste, um nahezu den gesamten Analyten aus der Probe herauszulösen. Dazu wurde eine Probe vierfach in zehnfacher Wiederholung extrahiert (siehe Tabelle 4). Mit der vierten Extraktion desselben Pflanzenmaterials wurden nur noch weit unter 1,0 % der Gesamtausbeute aller vier Extraktionsschritte gelöst, sodass eine dreifach-Extraktion als quantitativ ($\geq 99,0$ %) angesehen werden kann. Im ersten Extraktionsschritt wurden im Mittel $76,3 \pm 0,69$ % (Fukinolsäure, **4**) bis $84,6 \pm 0,47$ % (Cimicifugasäure E, **8**) der Gesamtmenge aller vier Extraktionsschritte extrahiert. Die Ausbeute des ersten Extraktionsschritts erwies sich mit einer mittleren RSD der ermittelten Massengehalte für die sechs polyphenolischen Ester von 0,67 % ($n = 10$) als konstant.

Tabelle 4: Ermittlung der mittleren Ausbeute des ersten Extraktionsschritts durch zehnfache Extraktion der gleichen Probe von *C. rhizoma*, Ausbeute in % des durch vierfache Extraktion des gleichen Materials ermittelten Gesamtgehalts (Aufsummierung).

Ausbeute des ersten Extraktionsschrittes (vierfach Extraktion) in %										\bar{x}	SD	RSD
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
76,6	76,7	76,1	77,0	75,6	75,2	75,4	76,0	77,1	76,8	76,3	0,69	0,90
80,5	80,5	80,2	80,9	79,8	79,7	79,6	80,0	80,9	80,6	80,3	0,48	0,60
82,2	82,3	81,9	82,5	81,5	81,5	81,1	81,8	82,6	82,4	82,0	0,50	0,61
81,3	81,2	80,8	81,6	80,3	80,3	80,2	80,9	81,7	81,5	81,0	0,57	0,71
85,0	84,8	84,5	85,0	84,1	84,1	83,7	84,4	85,0	84,9	84,6	0,47	0,56
84,0	84,1	83,6	84,2	83,4	83,1	82,9	83,7	84,4	84,2	83,7	0,51	0,61
Mittel										81,3	0,54	

3.1.1.2 Quantifizierung der Polyphenole

Zur Quantifizierung der Polyphenole **4–9** in *C. rhizoma* wurde eine LC/DAD Methode entwickelt. Diese wurde entsprechend den Anforderungen der ICH Guideline Q2(R1) *Validation of analytical procedures: Text and methodology* als quantitative Gehaltsbestimmungsmethode (Assay) validiert. Die Validierung beinhaltete die Parameter Selektivität, Linearität im Arbeitsbereich, Systempräzision (*precision*), Methodenpräzision (*repeatability*), Reproduzierbarkeit (*reproducibility*), Genauigkeit (*accuracy*) und die Bestimmungsgrenze (*sensitivity*, LOQ). Ebenfalls im Rahmen der Validierung wurde die Reproduzierbarkeit der Extraktion (siehe 3.1.1.1) sowie die Stabilität der Standardlösungen und Extrakte untersucht. Alle Anforderungen der Guideline wurden erfüllt.

Die Selektivität der angewandten Methode wurde zum einen über die einwandfreie Identifizierung der jeweiligen Peaks durch LC/MS-Untersuchungen, zum anderen über die Ermittlung der jeweiligen Peak-Reinheit anhand des UV-Spektrums nachgewiesen. Die Prüfung der Genauigkeit (Richtigkeit) wurde durch Hinzuwaage von Kaffeesäurestandard zur zu extrahierenden pulverisierten Droge realisiert. Dazu wurde ein entsprechender Blindwert der Droge ermittelt, um die Wiederfindung an zugegebenem Standard berechnen zu können. Die Richtigkeit gilt dabei als Genauigkeit des Mittelwertes. Die Präzision des LC-Systems (Systempräzision) wurde durch sechsfach-Injektion einer Standardlösung im mittleren Konzentrationsbereich und durch Berechnung der entsprechenden RSD ermittelt. Zur Bestimmung der Präzision der Methode (Methodenpräzision) inklusive Extraktion wurde eine Droge sechsfach analysiert und hier ebenfalls die RSD berechnet. Analog dazu wurde die intermediäre Präzision unter Nutzung anderen Equipments an einem anderen Tag bestimmt. Zum Nachweis der Linearität im Arbeitsbereich wurden fünf Standardlösungen äquidistanter Konzentration je dreifach injiziert und anschließend der Korrelationskoeffizient berechnet. Die Bestimmungsgrenze wurde zum einen über die Berechnung des Signal/Rausch-Verhältnisses ermittelt, zum anderen über die Bestimmung der Konzentration einer Standardlösung, bei der die Wiederholpräzision noch einen akzeptablen Wert (unter 2 %) aufweist, festgelegt. Die Stabilität der Extrakte und Standardlösung wurde sowohl bei Raumtemperatur und Tageslicht als auch bei einer Lagerung im Kühlschrank (2–8 °C) für eine Dauer von 7 Tagen untersucht.

Selektivität: Eine UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 327 nm ist nicht spezifisch. In Verbindung mit einer chromatografischen Auftrennung der Probe, ist es allerdings möglich, Analyten voneinander zu trennen und isoliert zu detektieren. Die Identität der im Chro-

matogramm auftretenden Peaks wurde mittels LC/MS-Untersuchungen gewährleistet (Abbildung 20, Details in Abbildungen und Tabelle 16 im Anhang). Um eine eventuelle Koelution von UV-aktiven Verbindungen aufzudecken, wurde für die sechs quantifizierten Polyphenole **4–9** eine Untersuchung zur Peak-Reinheit durchgeführt. Dazu wurden im Verlauf des jeweiligen Peaks DAD-Spektren in einem Wellenlängenbereich von 210–400 nm aufgenommen und mit dem Spektrum am Peak-Maximum (Peak-Apex-Spektrum) verglichen. Anschließend wurde ein Peak-Reinheits-Faktor berechnet (Agilent ChemStation: *match factor*, bei einem Wert von 1000 ist das Spektrum identisch, Werte über 990 bedeuten, dass Spektren als gleich anzusehen sind [160]). Die mittlere Peak-Reinheit für Polyphenole **4–9** lag bei $\bar{x} = 990,3$ und für die Polyphenole **4** und **6–9** über 998 (Abbildung 18).

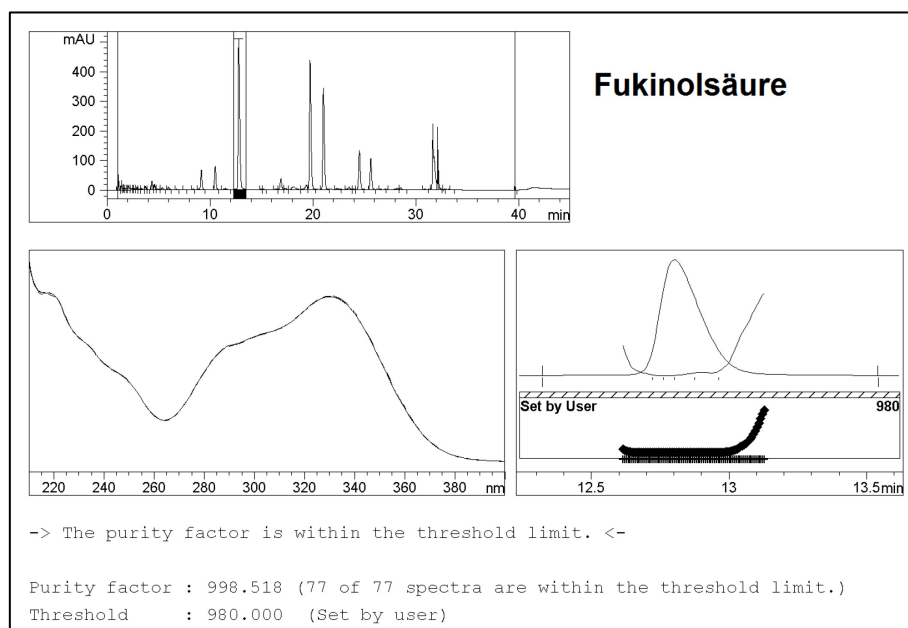


Abbildung 18: Untersuchung der Peak-Reinheit (*peak purity*) exemplarisch für Fukinolsäure (**4**) mittels DAD-Spektrum im Bereich 210–400 nm, Peak-Reinheit für alle Polyphenole über 998, außer niedrig konzentrierte Cimicifugasäure D (946,1), berechnet mit dem Peak-Apex-Spektrum.

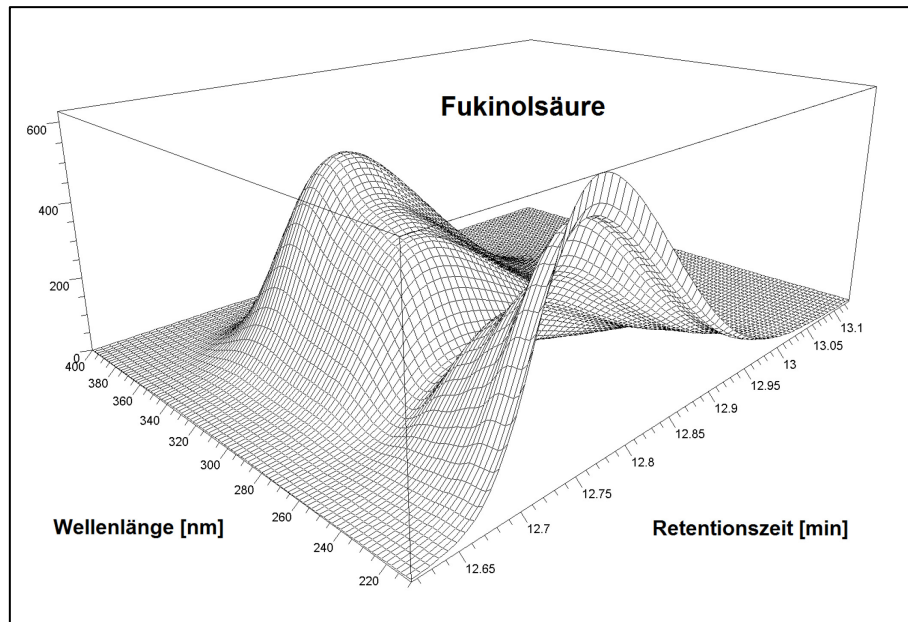


Abbildung 19: Dreidimensionale Darstellung der Peak-Reinheit exemplarisch für Fukinolsäure (**4**) (Retentionszeit/Wellenlänge/Intensität), siehe auch Abbildung 18.

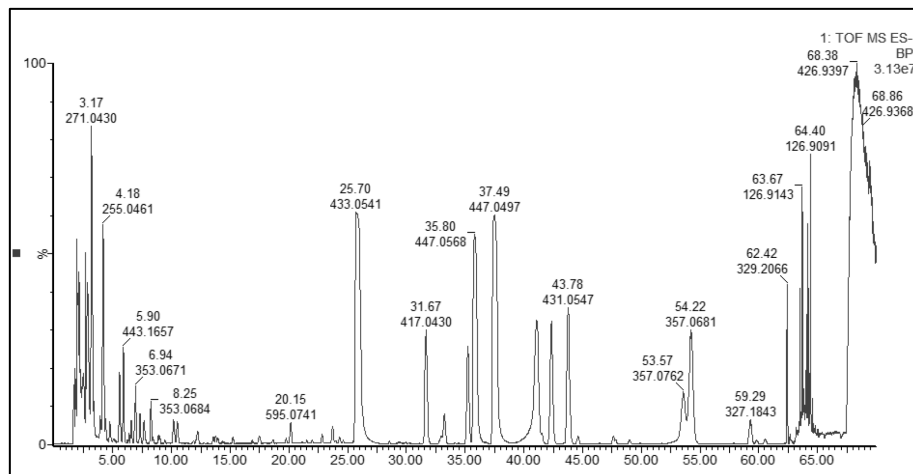


Abbildung 20: Base Peak Chromatogramm (BPC) eines *C. rhizoma* Extrakts aus LC/(-)-ESI-QTOF-MS im Rahmen der Validierung der LC/DAD Methode zur Quantifizierung der Polyphenole (**4–9**). Identifizierung von Peaks entsprechend der Retentionszeit, akkurater Massen und Fragmentionen zur Sicherstellung der Selektivität der Quantifizierungsmethode. Beispielsweise Fukinolsäure (**4**) mit m/z 433,05 $[M-H]^-$ und $t_R = 25,7$ min.

Präzision: Die Systempräzision lag bei einer RSD der Peakflächen von 0,41 % ($n = 6$) und die Methodenpräzision (Agilent LC-System) bei einer mittleren RSD für den ermittelten Massengehalt in der untersuchte Probe für die Polyphenole **4–9** von 1,21 % ($n = 6$). Die intermediäre Präzision (inkl. Shimadzu LC-System) lag bei einer RSD von 1,77 % ($n = 12$).

Linearität im Arbeitsbereich: Zur Prüfung der Linearität wurden fünf äquidistante Kaffeesäurestandardlösungen im Konzentrationsbereich von 1,0–800,0 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt und jeweils in Triplikaten mit der entwickelten Methode analysiert. Die in Abbildung 21 (A) oben dargestellte Ausgleichsgerade durch die entsprechenden Messpunkte wies einen Korrelationskoeffizienten von 1,000 auf. Der Residuenplot in Abbildung 21 (B) zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Residuen im gesamten Konzentrationsbereich. Der Wert des Achsenabschnitts von $-11,4$ Counts entsprach etwa 0,4 % der Peakfläche der Standardlösung im mittleren Konzentrationsbereich (400,0 $\mu\text{g/mL}$). Sein $\text{CI}_{95\%}$ lag zwischen $-23,7$ und $0,8$ Counts, sodass angenommen werden konnte, dass der Achsenabschnitt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % gleich Null war. Somit liegt Proportionalität vor und eine Einpunktkalibrierung wäre für den untersuchten Arbeitsbereich zulässig.

Genauigkeit: Zur Bestimmung der Genauigkeit wurden zu drei Einwaagen (je ca. 400 mg) einer Probe von *C. rhizoma* jeweils etwa 1,0 mg Kaffeesäurestandard hinzugewogen und anschließend quantifiziert. Ein Blindwert ($n = 6$) wurde bestimmt. Die Wiederfindung lag im Ergebnis bei 96,7–101,9 % (Genauigkeit) und im Mittel bei 99,5 % (Richtigkeit). In Abbildung 21 © links unten ist die Wiederfindungsfunktion dargestellt, der Anstieg ist nahe dem Wert Eins und der Achsenabschnitt nahe dem Wert Null, sodass eine Abwesenheit von proportionalen und systematischen Fehlern angenommen werden kann.

Bestimmungsgrenze: Die Bestimmungsgrenze wurde anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses und der Systempräzision bei niedrigen Konzentrationen festgelegt. Wie in Abbildung 21 (D) dargestellt, liegt die Systempräzision bei sechsfach-Injektion bis zu einer Kaffeesäure-Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ unterhalb eines kritischen Wertes von 2,0 %. Die Bestimmungsgrenze wurde daher auf diesen Wert festgelegt. Dies entspricht einem Kaffeesäuregehalt in *C. rhizoma* von $1,3 \cdot 10^{-3}$ % (13 ppm).

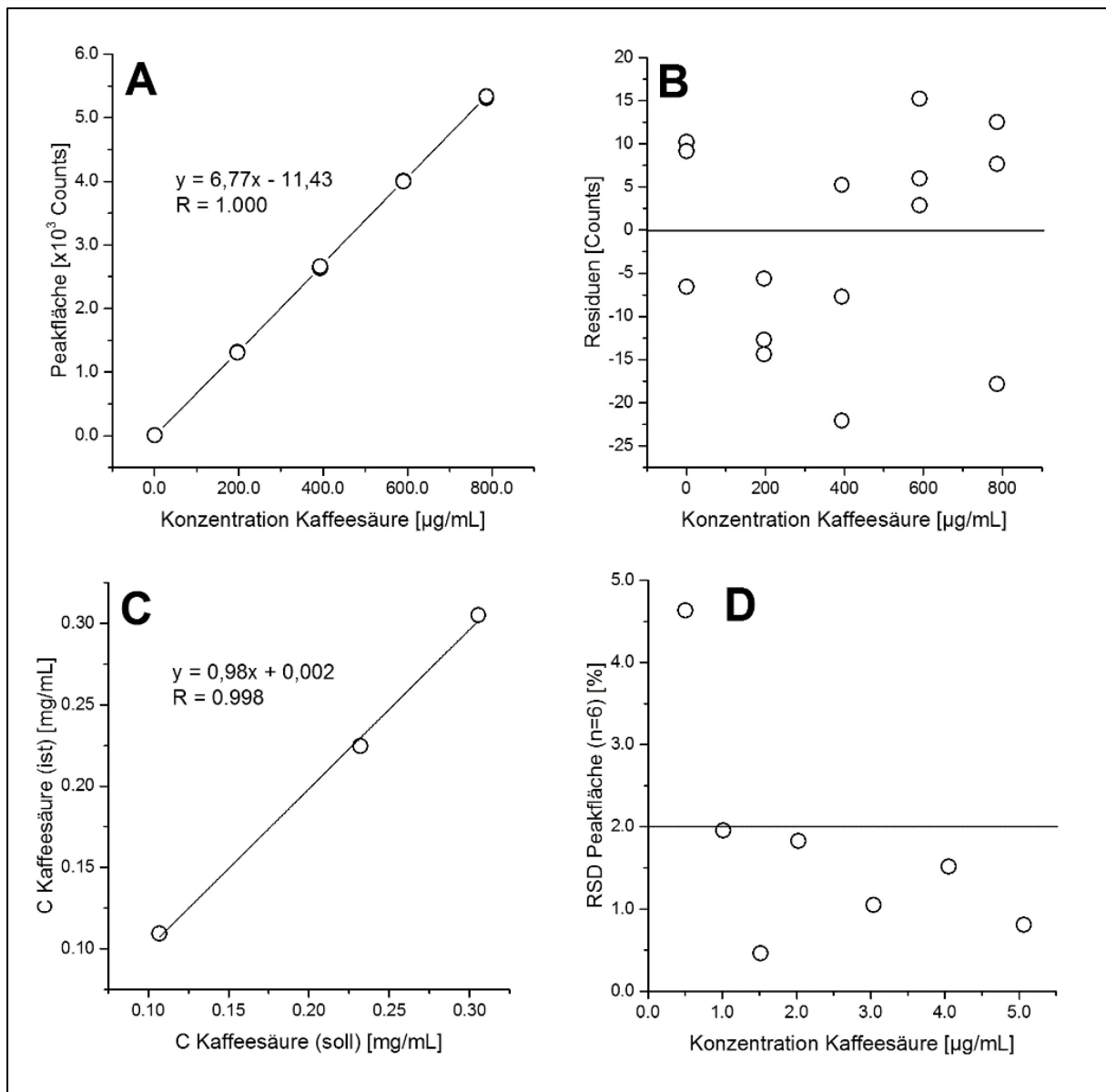


Abbildung 21: Ausgewählte Ergebnisse aus der Validierung der LC/DAD Methode: Linearität im Arbeitsbereich 1,0–800,0 $\mu\text{g/mL}$, Wiederfindung und Bestimmung LOQ. Der $CI_{95\%}$ des y -Achsenabschnitts der Kaffeesäure Kalibrierfunktion (5-Level je dreifach-Injektion, **A**) liegt im Bereich von $-23,7$ bis $0,8$ Counts und schließt damit die Null ein, daher ist ein proportionaler Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration anzunehmen. Die Residuen der Kalibrierfunktion sind gleichmäßig über den gesamten Arbeitsbereich verteilt, daher liegt Homoskedastizität vor (**B**). Der Anstieg der Wiederfunktion ist nahezu Eins und der y -Achsenabschnitt nahezu Null, somit liegen keine proportionalen und systematischen Fehler in der Quantifizierung vor (**C**). Das LOQ wurde festgelegt auf eine Systempräzision (sechsfach-Injektion) von unter 2,0 % und einem $S/N \geq 10$, zutreffend für Konzentrationen $\geq 1,0 \mu\text{g/mL}$ (**D**).

Stabilität der Standardlösungen und Extrakte: Bei der Stabilitätsuntersuchung von Standardlösung und Extrakt über sieben Tage wurde festgestellt, dass die Lösungen in diesem Zeitraum im Kühlschrank, das heißt unter Ausschluss von Tageslicht und bei 2–8 °C, stabil sind (Tabelle 5). Bei Tageslicht und Raumtemperatur ist diese Stabilität nicht gegeben (Lagerung in verschlossenen Klarglasvials freistehend im Labor, siehe Abbildung 22). Die Wiederfindung für eine Kaffeesäurestandardlösung nach sieben Tagen Lagerung bei Raumtemperatur und Tageslicht lag bei ≤ 20 %.

Tabelle 5: Stabilität eines *C. rhizoma* Extrakts^A und Standardlösung über 7 Tage bei Lagerung in Braunglasvials bei 2–8 °C am Beispiel von Fukinolsäure (**4**) und Kaffeesäure^B (**1**).

LD ^C [Tage]	Injektion ^D Nr.	Extrakt, Fukinolsäure			Standard, Kaffeesäure		
		Vial	Peakfläche [Counts]	Wiederfindung [%]	Vial	Peakfläche [Counts]	Wiederfindung [%]
0	1	EKS0	11114696	-	SKS0	1510686	-
0	2	EKS0	11115992	-	SKS0	1508399	-
1	1	EKS1	11127446	100,1	SKS1	1505723	99,7
1	2	EKS1	11151405	100,3	SKS1	1511140	100,1
2	1	EKS2	11148955	100,3	SKS2	1506490	99,8
2	2	EKS2	11132584	100,2	SKS2	1510495	100,1
3	1	EKS3	11108762	99,9	SKS3	1506161	99,8
3	2	EKS3	11170793	100,5	SKS3	1510192	100,0
4	1	EKS4	11124881	100,1	SKS4	1510964	100,1
4	2	EKS4	11041429	99,3	SKS4	1501204	99,4
7	1	EKS5	11156201	100,4	SKS5	1508957	100,0
7	2	EKS5	11065302	99,5	SKS5	1508982	100,0
RSD / Mittel [%]			0,33	100,1		0,19	99,9

^A Einwaage 1,99260 g / 25,0 mL 70 % (v/v) Methanol, Extraktionsdauer 60 min (Ultraschallbad)

^B Konzentration Kaffeesäure 9,34 µg/mL in 70 % (v/v) Methanol

^C Lagerungsdauer in Tagen bei 2–8 °C

^D Injektionsvolumen mit Probenschleife: 2 µL

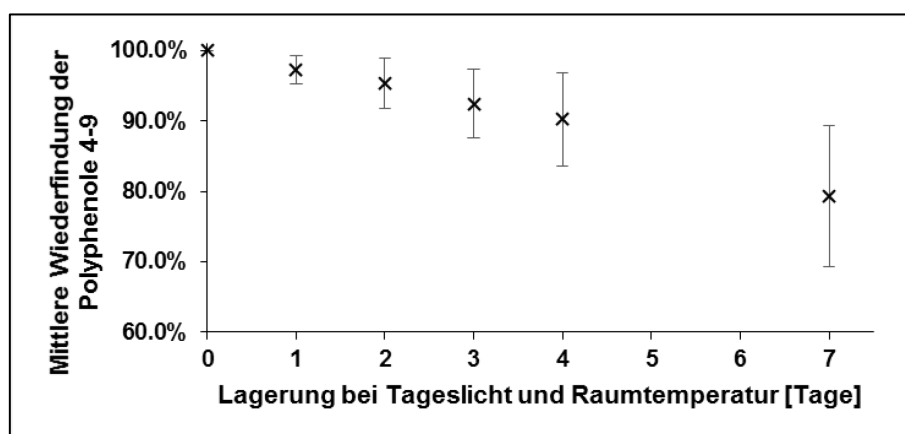


Abbildung 22: Stabilität eines *C. rhizoma* Extrakts (siehe Tabelle 5) bei Lagerung bei Raumtemperatur und in Klarglasvials über sieben Tage: Mittlere Wiederfindung \pm SD der Gehalte an Polyphenolen **4–9**.

3.1.1.3 Quantifizierung der Triterpenglykoside

Da im späteren Verlauf der Arbeit untersucht werden sollte, ob es möglich ist, eine Prüfung auf Gehalt (Assay) der Triterpenglykoside in *C. rhizoma* nach entsprechenden Arzneibuchanforderungen mittels NIR Spektroskopie durchzuführen, wurden im Hinblick auf die Quantifizierung der Triterpenglykoside die entsprechenden Arzneibuchmonografien berücksichtigt. Beide, sowohl die USP als auch die Ph. Eur., beschreiben für den genannten Zweck LC/ELSD Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurde sich an der Monografie der USP orientiert, da diese einige Vorteile zeigt (siehe Abschnitt 4.1).

Die USP Gehaltsbestimmungsmethode wurde hinsichtlich der Laufzeit (USP: 85 min) leicht modifiziert und anschließend verifiziert. Die Identifizierung der Triterpenglykoside **10–21** erfolgte durch Übertragung der LC/ELSD Methode (inkl. Säule) auf ein LC/MS-System (für BPC siehe Abbildung 23). Details finden sich in Abbildung 72 (Massenspektren) und Tabelle 16 (Ionen) im Anhang dieser Arbeit. Die Flussrate sowie die Parameter des ELSD wurden auf das Optimum zwischen Laufzeit und maximaler Response für 23-*epi*-26-Deoxyactein (**16**) hin eingestellt. Weiterhin wurden die Linearität im Arbeitsbereich (Abbildung 24) und die Präzision untersucht. Die Systemeignung wurde mittels Systemeignungstests (*system suitability tests*, SST) sichergestellt (Abbildung 25).

Die Systempräzision wurde durch sechsfach-Injektion der SST-Lösung nach USP (R/S-Actein und 23-*epi*-26-Deoxyactein je 100 µg/mL) bestimmt (siehe Tabelle 6) und lag bei 0,89 %. Im unteren Messbereich (20,0 µg/mL 23-*epi*-26-Deoxyactein) wies die Systempräzision einen Wert von 7,21 % ($n = 3$, $RSD \log_{10}(A) = 0,73 \%$) auf. Das mit dieser Lösung bestimmte LOD und LOQ für 23-*epi*-26-Deoxyactein lagen bei 17,8 µg/mL bzw. 36,6 µg/mL im Extrakt. Dies entspricht einer Massenkonzentration im Rhizom von $2,2 \cdot 10^{-2} \%$ bzw. $4,6 \cdot 10^{-2} \%$ (220 ppm bzw. 460 ppm).

Die Methodenpräzision wurde durch sechsfach-Extraktion und Analyse der Probe C13.1 bestimmt. Sie lag bei 3,84 %. Die Routineanalyse erfolgte in Triplikaten (Extrakte A bis C). In einer Sequenz wurden zunächst alle A-Extrakte, dann alle B-Extrakte usw. injiziert. Die mittlere $RSD \pm SD$ aller Triplikate (hier: $n = 163$, 23-*epi*-26-Deoxyactein) lag bei $4,95 \pm 2,33 \%$. Die Wiederfindung des Standards S3 am Ende der Sequenzen zur Prüfung auf Systemstabilität lag im Mittel bei $95,3 \pm 10,3 \%$. Die Detektorresponse zeigte damit eine Tendenz zu erheblichen Schwankungen (Gesamtlaufzeit einer Sequenz ca. 22 h). Die *inter-day system precision* (RSD Peakfläche von S3) zwischen den einzelnen Sequenzen (hier: $n = 21$) lag bei 21,5 %.

Tabelle 6: Systemparameter und SST nach USP mittels SST-Lösung (R/S-Actein und 23-*epi*-26-Deoxyactein, je 100 µg/mL), Peakfläche für 23-*epi*-26-Deoxyactein; S/N – Signal/Rausch-Verhältnis für 100 µg/mL 23-*epi*-Deoxyactein, Auflösung zwischen den benachbarten Peaks Actein und 23-*epi*-26-Deoxyactein.

Injektion	Peakfläche	Log A	Auflösung (USP)	S/N
1	815644	5,91150	1,928	203,90
2	801227	5,90376	1,979	183,48
3	797048	5,90148	1,970	176,30
4	795949	5,90089	1,978	170,10
5	805127	5,90586	1,956	187,25
6	801132	5,90370	1,931	194,44
RSD	0,89 %	0,07 %		
Mittelwert			1,957 (Soll: ≥ 1)	185,91

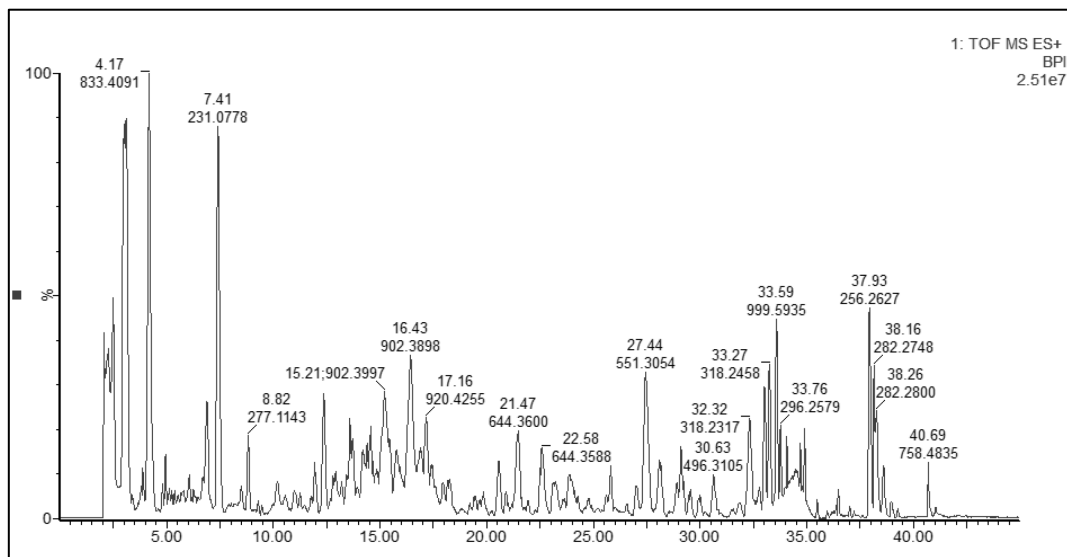


Abbildung 23: Base Peak Chromatogramm (BPC) eines *C. rhizoma* Extrakts aus LC/(-)-ESI-QTOF-MS im Rahmen der Validierung der LC/ELSD Methode zur Quantifizierung der Triterpenglykoside (**10–21**). Identifizierung von Peaks entsprechend der Retentionszeit, akkurater Massen und Fragmentionen zur Sicherstellung der Selektivität der Quantifizierungsmethode.

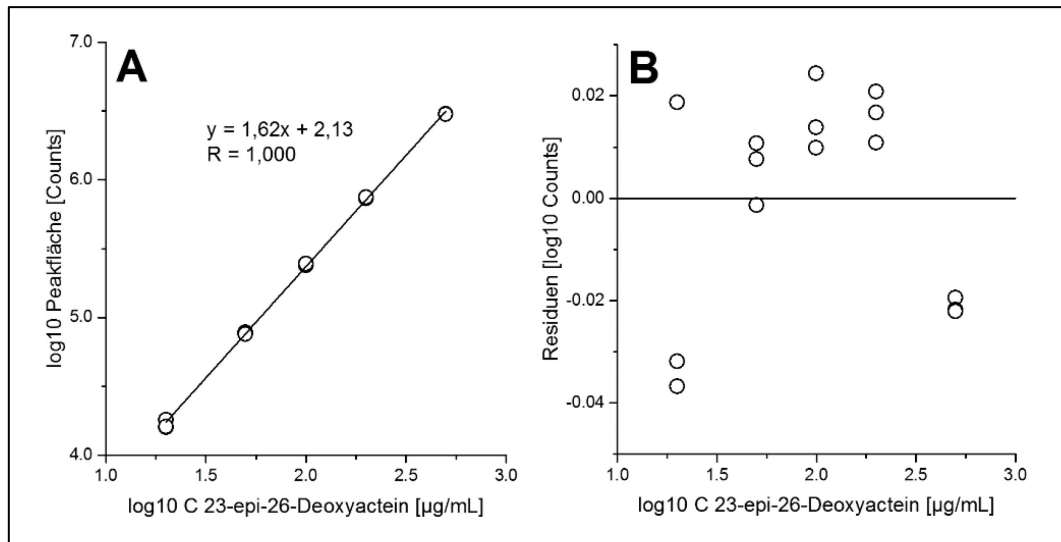


Abbildung 24: Linearität der LC/ELSD Methode zur Quantifizierung der Triterpenglykoside in *C. rhizoma*. Doppelt logarithmische Kalibrierfunktion im Arbeitsbereich 20,0–500,0 $\mu\text{g/mL}$ (5 Level je dreifache Injektion) der 23-*epi*-26-Deoxyactein Standardlösung (A). Residuen der linearen Regression sind gleichmäßig im Arbeitsbereich verteilt, demnach liegt Homoskedastizität vor (B).

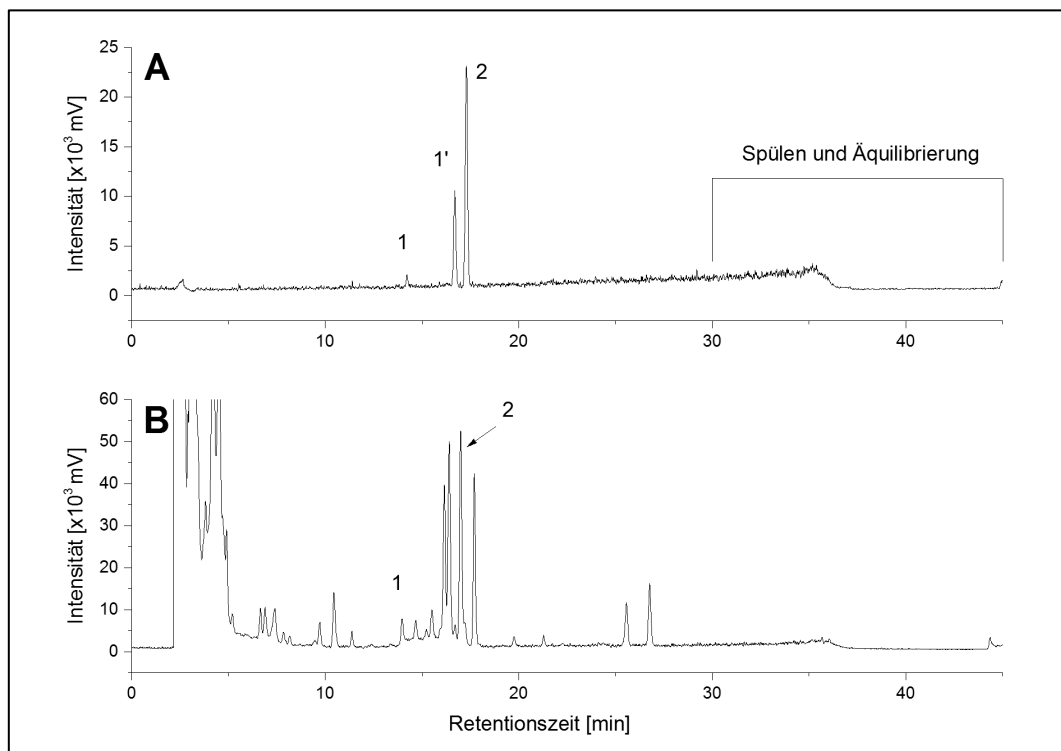


Abbildung 25: Systemeignungstest nach USP: SST-Lösung, eine Mischung aus S/R-Actein (1 und 1') und 23-*epi*-26-Deoxyactein (2) zu jeweils 100,0 $\mu\text{g/mL}$ (A), Anforderungen nach sechsfach Injektion (Auflösung ≥ 1 , Tailing-Faktor ≤ 2 und RSD ≤ 2) wurden erfüllt (siehe Tabelle 6). Im Vergleich ist ein Chromatogramm eines *C. rhizoma* Extrakts gezeigt (B).

3.1.2 Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatografie

TLC-basierte Prüfungen von Arzneidrogen sind integraler Bestandteil von Monografien des Europäischen Arzneibuchs. Anhand von HPTLC-Fingerprints können Drogen identifiziert werden. Aufgrund der großen Unterschiede bei Fingerprints verschiedener, zum Teil nahverwandter Spezies, sind diese auch hervorragend für die Abgrenzung dieser voneinander geeignet. Die erhaltenen Chromatogramme werden in der Regel visuell ausgewertet und mit einem Referenzstandard (z. B. *Actaea racemosa* HRS [161]) verglichen. In dieser Arbeit wurden Einzelexemplare von *A. racemosa* aus Kultur (Klonpflanzen und Pflanzen unterschiedlicher Herkunft) sowie Handelsware aus Wildsammlungen nach entsprechender Ph. Eur. Monografie (Identität) untersucht.

Tabelle 7: HPTLC, Set untersuchter Proben von *C. rhizoma* – Einzelpflanzen und Handelsware aus Wildsammlungen – sowie andere *Actaea* spp.

ID	Typ	Anzahl	Herkunft	Abbildung
K5	Klone, Individuen	8	Staudenkultur Stade, SE von Stamen	Abbildung 27
C1	Kultur, Individuen	1	Botanischer Garten Universität Tübingen	Abbildung 28
C2	Kultur, Individuen	1	Botanischer Garten Universität Düsseldorf	
C3	Kultur, Individuen	1	Norton Arboretum, Jefferson National Forest	
C4	Kultur, Individuen	1	Longwood Gardens, Pennsylvania	
C5	Kultur, Individuen	1	Universität Marburg	
C6	Kultur, Individuen	1	Staudengärtnerei Hermannshof	
C7	Kultur, Individuen	1	Botanischer Garten Frankfurt	
C8	Kultur, Individuen	1	Medicinal Herb Garden, Washington	
C9	Kultur, Individuen	1	Botanischer Garten Regensburg	
C10	Kultur, Individuen	1	Botanischer Garten Halle	
C11	Kultur, Individuen	1	Botanischer Garten Wroclaw, Rzepin	
C12	Kultur, Individuen	1	Botanischer Garten Lublin	
C13	Kultur, Individuen	1	Staudengärtnerei Baltin	
C14	Kultur, Individuen	1	Staudengärtnerei Tandemann	
C15	Kultur, Individuen	1	Staudengärtnerei Friesland Stauden, Jever	
C16	Kultur, Individuen	1	Massachusetts	
C17	Kultur, Individuen	1	Indiana	
W1	Wildernte, Charge	1	Kräutermix Ch. B. B 149288 (09.03.2010)	Abbildung 29
W2	Wildernte, Charge	1	Kräutermix Ch. B.: P 280703 (27.05.2016)	
W3	Wildernte, Charge	1	Caelo Ch. B.: 15312703 (22.10.2015)	
W4	Wildernte, Charge	1	Galke Ch. B.: 26453 (26.05.2016)	
W5	Wildernte, Charge	1	Galke Ch. B.: 26730 (26.05.2016)	
W6	Wildernte, Charge	1	Kräuter Schulte Ch.B.: 71127 (MHD 5/18)	
A1	<i>Actaea cimicifuga</i>	1	Arboretum Berlin	Abbildung 30
A2	<i>A. cordifolia</i>	1	Bot. Garten Uni Frankfurt, Main	
A3	<i>A. simplex</i>	1	Staudengärtnerei Baltin	
A4	<i>A. dahurica</i>	1	Bot. Garten Moskau (als Pflanze)	
A5	unknown <i>Actaea</i> sp.	1	Staudengärtnerei Friesland-Stauden	
A6	<i>A. heracleifolia</i>	1	Apotheke, München; Handelsware (Charge)	
A7	<i>A. japonica</i>	1	Unbekannt	

Die Detektion der nicht UV-aktiven Triterpenglykoside erfolgte unspezifisch durch eine Derivatisierung mittels Schwefelsäure (Abbildung 26). Die Behandlung mit Schwefelsäure führt vermutlich zu Oxidationsreaktionen und Dehydratationen im Triterpenglykosidgrundgerüst, wodurch die einzelnen Strukturen im Weißlicht und im UV₃₆₆-Licht durch eine deutliche Fluoreszenz sichtbar werden. Neben den Triterpenglykosiden zeigen die Polyphenole im Extrakt eine Reaktion. Letztere zeigen eine blaue Fluoreszenz, während die Triterpenglykoside generell orangefarben fluoreszieren (vgl. Standardlösungen von Kaffeesäure, Actein und 23-*epi*-26-Deoxyactein, absolut jeweils 0,4 µg (Konzentration 0,1 mg/mL und Auftragevolumen 4 µL), auf Bahn 16 in Abbildung 26). Die polyphenolischen Ester zeigen aufgrund ihrer höheren Hydrophilie niedrige R_f-Werte (R_f ~ 0,1–0,2), während die Hydrolyseprodukte bzw. Vorläuferstrukturen wie Kaffeesäure und Ferulasäure höhere R_f-Werte zeigen (R_f ~ 0,4–0,5). Die komplexe Gruppe der Triterpenglykoside zeigt sich in breiteren, sich überlagernden Banden im mittleren R_f-Bereich (v. a. R_f ~ 0,2–0,5).

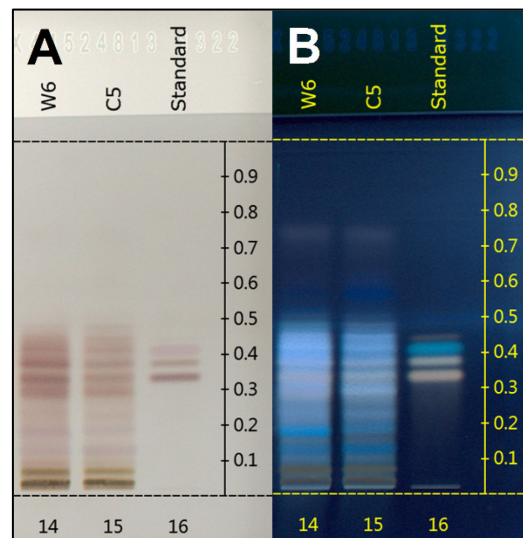


Abbildung 26: HPTLC-Untersuchung von *C. rhizoma* Extrakten; Platten nach Derivatisierung mittels Schwefelsäure im Weißlicht (A) und UV₃₆₆-Licht (B); Standard = Mischung von je 4 µg R/S-Actein, 23-*epi*-26-Deoxyactein und Kaffeesäure (R_f ~ 0,4).

Klonpflanzen zeigte eine starke Homogenität (Abbildung 27) im Vergleich zu den Pflanzen verschiedener Herkunft (Abbildung 28). Gerade in diesem Set der Pflanzen verschiedener Herkunft zeigt sich trotz gleicher Wachstumsbedingungen eine deutliche Variabilität der HPTLC-Fingerprints. Diese Variabilität beschränkt sich allerdings ausschließlich auf quantitative Unterschiede einzelner Banden. Ein ungleichmäßiger Probenauftrag kann zum anderen diese Variabilität noch künstlich verstärken wie z. B. C6 (Bahn 5) oder C10 (Bahn 9). Der Klon K5 zeigte vor allem einen hohen Gehalt an Polyphenolen im Vergleich anderen *C. rhizoma* Proben (vgl. Abschnitt 3.1.3.1). Diese Pflanzen waren sehr jung, gepflanzt im Jahr 2012 und geerntet 2014.

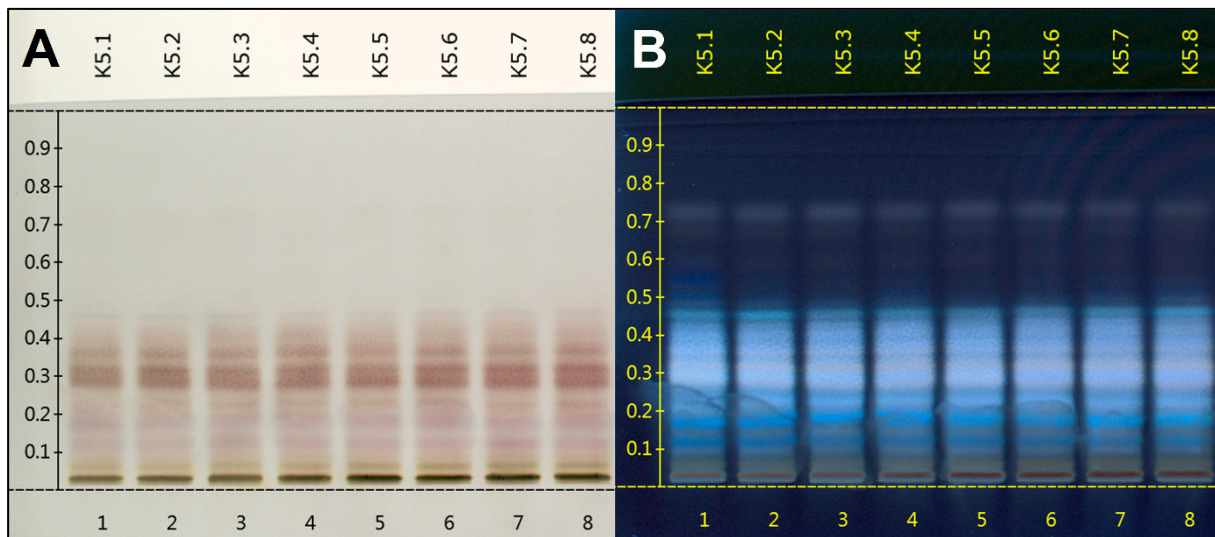


Abbildung 27: HPTLC-Fingerprints von Klonpflanzen K5.1 bis K5.8 nach Derivatisierung mittels Schwefelsäure in Weißlicht (A) und in UV₃₆₆-Licht (B).

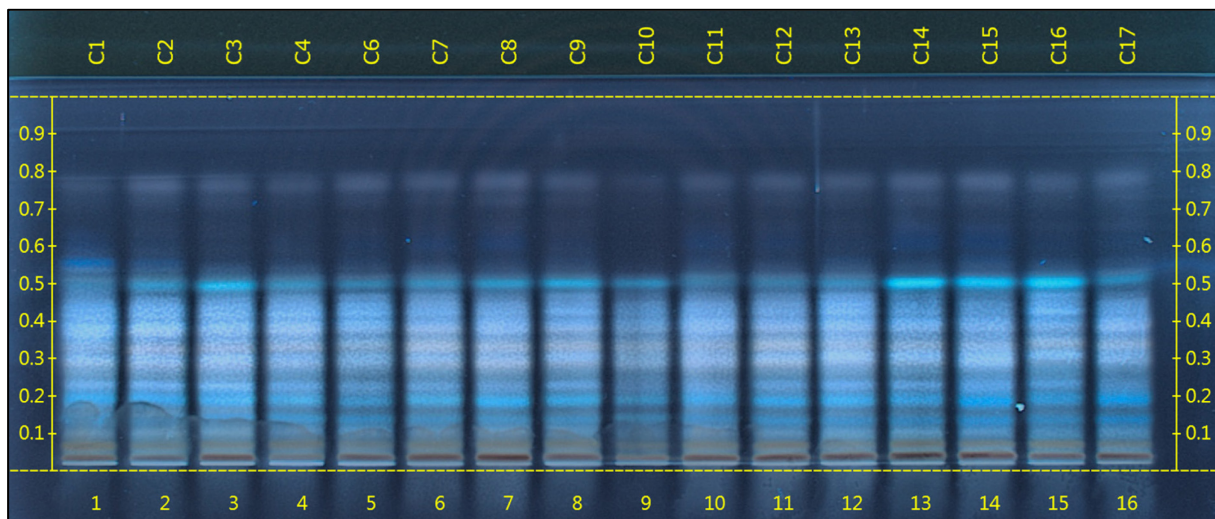


Abbildung 28: HPTLC-Fingerprints von Einzel-exemplaren von *C. rhizoma* aus Kultur in Berlin, Herkünfte C1 bis C17 (jeweils das erste Exemplar einer Herkunft, z. B. C1.1 usw.) nach Derivatisierung mittels Schwefelsäure in UV₃₆₆-Licht.

Die Chargen aus Wildsammlung zeigen ebenfalls sehr homogene Fingerprints, welche aber deutliche quantitative Unterschiede zu dem aus Kultur stammenden Material aufweisen (Abbildung 29). Die blau fluoreszierenden Banden der Polyphenole sind hier schwächer, wogegen die orangefarbenen Banden der Triterpenglykoside stärker und intensiver auftreten. Vor allem die Banden der Polyphenole – Ester sowie z. B. Kaffeesäure – sind schwächer im Vergleich zu dem Material aus Kultur in Berlin. Diese Unterschiede können in verschiedenen Nacherntebehandlungen z. B. Trocknungsbedingungen begründet liegen oder mit dem Alter der Proben zusammenhängen, besonders vor dem Hintergrund der Hydrolyse- und Oxidationsempfindlichkeit dieser Gruppe von Verbindungen.

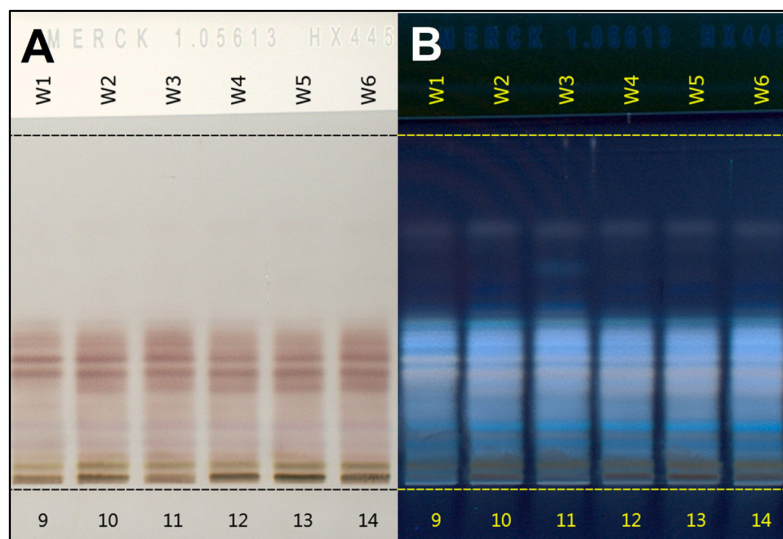


Abbildung 29: HPTLC-Fingerprints von Handelsware aus Wildsammlungen (Mischchargen) nach Derivatisierung mittels Schwefelsäure in Weißlicht (A) und in UV₃₆₆-Licht (B).

Insgesamt waren alle Exemplare bzw. Proben von *A. racemosa* einwandfrei zu identifizieren und zeigten deutliche Gemeinsamkeiten in ihren HPTLC-Fingerprints, wenn auch mit den dargelegten leichten quantitativen Unterschieden. Die Unterschiede zu den anderen Arten der Gattung *Actaea* waren sehr deutlich (Abbildung 30). Lediglich einige der nahverwandten nordamerikanischen Arten wie z. B. *A. cordifolia* zeigten zu *A. racemosa* ähnliche Fingerprints. Eine potentielle Ursache für diese Ähnlichkeit könnte der Gendrift innerhalb der Gattung sein, der potentiell in Gebieten mit Mischpopulationen auftritt. Die Monografie des Ph. Eur. zu *C. rhizoma* untersucht u. a. weiterhin auch eine potentielle Verschneidung der Droge mit der nordamerikanischen *Actaea podocarpa* DC. (syn. *Cimicifuga americana* MI-CHX.) und begrenzt diese auf maximal 10 %. Dies soll durch eine dunkle Zone (Fluoreszenzlöschung) im UV₂₅₆-Licht zu erkennen sein. Diese Spezies lag im Rahmen dieser Arbeit nicht vor und konnte daher nicht untersucht werden.

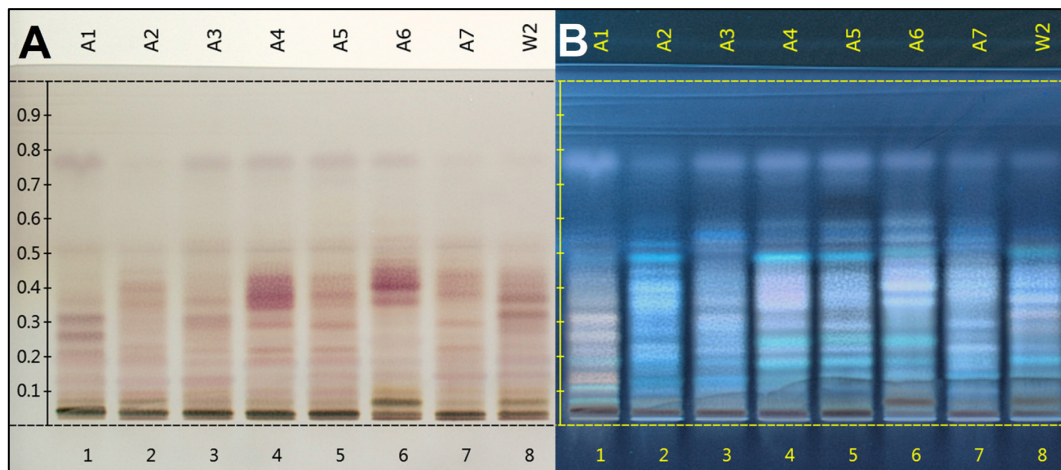


Abbildung 30: HPTLC-Fingerprints verschiedener *Actaea* spp. – *A. cimicifuga* (A1), *A. cordifolia* (A2), *A. simplex* (A3), *A. dahurica* (A4), unbekannte *Actaea* sp (A5), *A. heracleifolia* (A6) und *A. japonica* (A7) – im Vergleich zu Handelsware (W2) nach Derivatisierung mittels Schwefelsäure in Weißlicht (A) und in UV₃₆₆-Licht (B).

3.1.3 Polyphenole und Triterpenglykoside in *Cimicifugae rhizoma*

3.1.3.1 Gehalte an Polyphenolen und Triterpenglykosiden

Von insgesamt 179 Exemplaren von *Cimicifugae rhizoma* wurden die Gehalte an Polyphenolen **4–9** (LC/DAD) und Triterpenglykosiden **10–21** (LC/ELSD) bestimmt. Innerhalb dieses Probensatzes befanden sich vegetativ vermehrte Klonpflanzen (K1 bis K5), Pflanzen verschiedener Herkunft aus Kultur in Berlin (C1 bis C17) und Einzelpflanzen aus Wildsammlung in den USA (WE). Weiterhin wurden acht marktübliche Mischchargen aus Wildsammlung in den USA (WC, B2, B6) und sechs Mischchargen aus kommerziellem Anbau in Deutschland (andere B) mit in die Untersuchungen einbezogen (Tabelle 8). Für detaillierte Ergebnisse der Quantifizierung siehe Tabelle 15 im Anhang dieser Arbeit.

Tabelle 8: Übersicht über die mittels LC/DAD und LC/ELSD quantifizierten Exemplare von *C. rhizoma* (*Actaea racemosa* L.), Klonpflanzen (K), Kulturpflanzen aus Berlin ©, Einzelpflanzen aus Wildsammlungen in den USA (WE), Großhandelsware aus Wildsammlungen (WC, B2, B6) und Chargen aus Anbau (andere B).

ID	Typ	Herkunft	Gepflanzt	Anzahl
K1	Klone, Individuen	Staudengärtnerei Hagemann, Wurzelstockteilung	2009	15
K2	Klone, Individuen	Staudengärtnerei Hagemann, Wurzelstockteilung	2009	12
K3	Klone, Individuen	Somatische Embryogenese (SE) an Keimlingen	2007	8
K4	Klone, Individuen	BG Uni Halle, SE von Stamen	2012	11
K5	Klone, Individuen	Staudenkultur Stade, SE von Stamen	2012	10
		Summe		56
C1	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Universität Tübingen	2010	8
C2	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Universität Düsseldorf	2010	10
C3	Kultur, Individuen	Norton Arboretum, Jefferson National Forest	2011	5
C4	Kultur, Individuen	Longwood Gardens, Pennsylvania	2011	6
C5	Kultur, Individuen	Universität Marburg	2002	1
C6	Kultur, Individuen	Staudengärtnerei Hermannshof	2002	5
C7	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Frankfurt	2002	7
C8	Kultur, Individuen	Medicinal Herb Garden, Washington	2002	1
C9	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Regensburg	2002	7
C10	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Halle	2002	9
C11	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Wroclaw, Rzepin	2002	9
C12	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Lublin	2002	4
C13	Kultur, Individuen	Staudengärtnerei Baltin	2001	6
C14	Kultur, Individuen	Staudengärtnerei Tandemann	2002	5
C15	Kultur, Individuen	Staudengärtnerei Friesland Stauden, Jever	2002	5
C16	Kultur, Individuen	Massachusetts	2004	7
C17	Kultur, Individuen	Indiana	2006	4
		Summe		101

Tabelle 8: Fortgesetzt.

ID	Typ	Herkunft/Probe	Gepflanzt	Anzahl
WE1	Wildernte, Individuen	S2475	-	1
WE2	Wildernte, Individuen	S8290	-	1
WE3	Wildernte, Individuen	S8293	-	1
WE4	Wildernte, Individuen	S12514	-	1
WE5	Wildernte, Individuen	S13664, Harvest May 2013, USA	-	1
WE6	Wildernte, Individuen	S6535	-	1
WE7	Wildernte, Individuen	S2537	-	1
WE8	Wildernte, Individuen	S2607	-	1
Summe				8
WC1	Wildernte, Charge	Kräutermix Ch. B. B 149288 (09.03.2010)	-	1
WC2	Wildernte, Charge	Kräutermix Ch. B.: P 280703 (27.05.2016)	-	1
WC3	Wildernte, Charge	Caelo Ch. B.: 15312703 (22.10.2015)	-	1
WC4	Wildernte, Charge	Galke Ch. B.: 26453 (26.05.2016)	-	1
WC5	Wildernte, Charge	Galke Ch. B.: 26730 (26.05.2016)	-	1
WC6	Wildernte, Charge	Kräuter Schulte Ch.B.: 71127 (MHD 5/18)	-	1
B2	Wildernte, Charge	Wildsammlung 2009 Ch. B. 66277 / PL 118003	-	1
B6	Wildernte, Charge	Wildsammlung 2011 Ch. B. 66279 / PL 118009	-	1
Summe				8
B1	Anbau, Charge	Ch. B. 80562 / PL 117998, Ernte 2009	2006	1
B3	Anbau, Charge	Ch. B. 66269 / PL 118004, Ernte 2011	2009	1
B4	Anbau, Charge	Ch. B. 66267 / PL 118005, Ernte 2010	2008	1
B5	Anbau, Charge	Ch. B. 66264 / PL 118008, Ernte 2009	2005	1
B7	Anbau, Charge	Ch. B. 24393 / PL 118010, Ernte 2008	2006	1
B8	Anbau, Charge	Ch. B. 66266 / PL 118027, Ernte 2009	2007	1
Summe				6

Die Gehalte von sechs einzelnen Polyphenolen (**4–9**), sowie von zwölf Triterpenglykosiden (**10–21**) wurden mittels LC/DAD und LC/ELSD ermittelt (Abbildung 31). Die prominenteste Einzelverbindung in *C. rhizoma* war die Fukinolsäure (**4**) mit einem Gehalt von bis zu über 0,72 % (Exemplar C3.3 gepflanzt 2011, Norton Arboretum, USA), gefolgt von den Cimicifugasäuren A und B (**6, 7**) mit jeweils bis zu 0,36 % und 0,57 %. Bei den Triterpenglykosiden zeigte das Acetylshengmanolxylosid (**17**) den höchsten Gehalt mit bis zu 0,33 %. Die Gesamtgehalte an Polyphenolen (**4–9**) und Triterpenglykosiden (**10–21**) lagen im Gesamten Probenstet ($n = 179$) in einer beidseitig sehr ähnlichen Größenordnung von bis zu 1,60 % bzw. 1,56 %, wobei in den aus Berlin stammenden Exemplaren ($n = 157$) letzterer bei maximal 0,94 % lag (Abbildung 33). Der Mittelwert für den Triterpenglykosidgesamtgehalt in diesen kultivierten Exemplaren lag mit $\bar{x} = 0,46$ % nur knapp über der Anforderung der USP ($\geq 0,4$ %), wobei 36,9 % der Einzelexemplare einen Gesamtgehalt von weniger als 0,4 % zeigten.

Im Probenatz der in Berlin kultivierten Exemplare (K und C) lagen die Gehalte vieler einzelner Triterpenglykoside unter dem LOQ. So konnten z. B. die Verbindungen **12**, **18** und **19** nur in 4 %, 5 % und 1 % der Proben quantifiziert werden, wogegen z. B. das Acetylshengmanolxylosid (**17**) in 92 % der Proben nachgewiesen werden konnte. In den insgesamt 16 Proben aus den USA waren genannte drei Verbindungen in 88 %, 63 % und 56 % mittels LC/ELSD detektierbar. Die größte Variabilität im Gehalt zeigten die Fukinolsäure (**4**) mit 0,06–0,72 %, die Cimicifugasäuren A (**6**) und B (**7**) mit 0,02–0,15 % bzw. \leq LOQ–0,57 % und das Acetylshengmanolxylosid mit Gehalten im Bereich von \leq QL–0,33 % im getrockneten Rhizom.

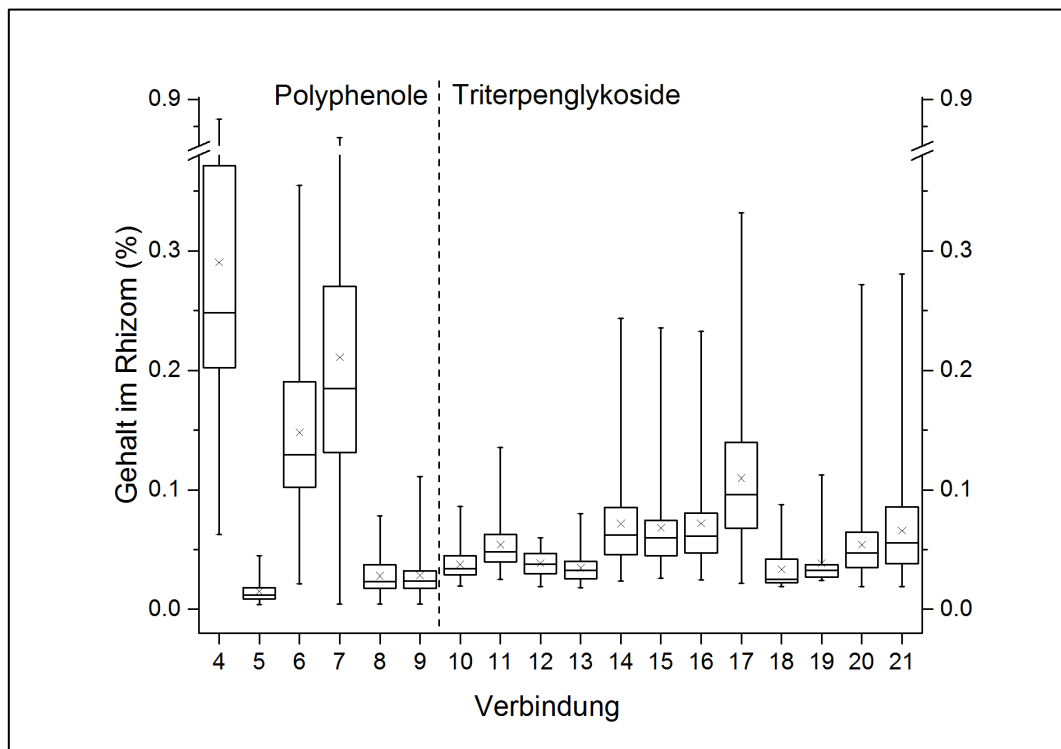


Abbildung 31: Gehalt (%) an Polyphenolen (**4–9**) und Triterpenglykosiden (**10–21**) im gesamten Probenatz von *C. rhizoma* ($n = 179$), für Polyphenole und Triterpenglykoside Werte \geq LOQ bzw. \geq LOD ($1,3 \cdot 10^{-3}$ % bzw. $2,2 \cdot 10^{-2}$ % im getrockneten Rhizom).

Betrachtet man die Gehalte an untersuchten Inhaltsstoffen in den verschiedenen Gruppen von *C. rhizoma* wie Klone, Pflanzen verschiedener Herkunft kultiviert in Berlin und Pflanzen aus Wildsammlung, so ergeben sich deutliche Unterschiede (Abbildung 32 sowie Abbildung 33). Die besonders jungen (Alter 2 Jahre) Klontypen K4 und K5 grenzen sich mit ihren hohen Polyphenolgehalten deutlich vom übrigen Teil des Probensets ab (Abbildung 33 **1** und **2**). Ebenso zeigten sie einen besonders hohen Fukinolsäuregehalt (Abbildung 32). Abgesehen von diesen beiden Gruppen zeigte sich weiterhin ein leichter Unterschied im Polyphenolgehalt zwischen den Pflanzen verschiedener Herkunft „C“ und denen aus Wildsammlung „WE“. Im Hinblick auf den Triterpenglykosidgesamtgehalt jedoch ergeben sich wie bereits angedeutet stärkere Unterschiede (Abbildung 33 **3**). Die Gehalte an Acetylshengmanolxylosid schwankten stark in den einzelnen Gruppen. In den Chargen aus kommerziellem Anbau zeigten sich bei einigen Proben hohe Gehalte dieses Glykosids. Für statistische Details (Fold-Change-Analyse und *t*-Tests zwischen den verschiedenen Gruppen) siehe folgende Seiten.

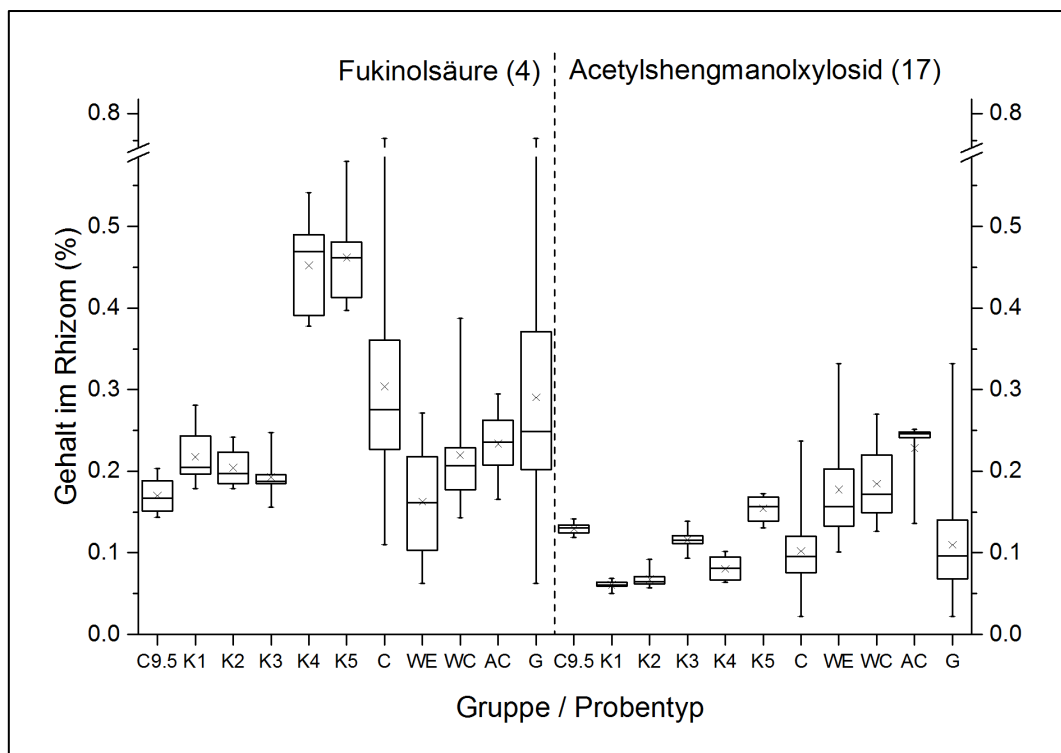


Abbildung 32: Quartile der Gehalte in % an Fukinolsäure (**4**) und Acetylshengmanolxylosid (**17**) im untersuchten Proben-Set von *C. rhizoma*. Mittelwert (×). Gesamtes Proben-set (G, $n = 179$), Klone (K1 $n = 15$, K2 $n = 12$, K3 $n = 8$, K4 $n = 11$ und K5 $n = 10$), Einzelexemplare aus Kultur in Berlin (C $n = 101$) und aus Wildsammlung (WE $n = 8$) sowie Großhandelsware aus Wildsammlungen (WC $n = 8$) und Mischchargen aus Anbau (AC $n = 6$). C9.5 zeigt die Gehaltsschwankung innerhalb eines Rhizoms (Quantifizierung verschiedener Teile eines Rhizoms, $n_{\text{Teile}} = 8$).

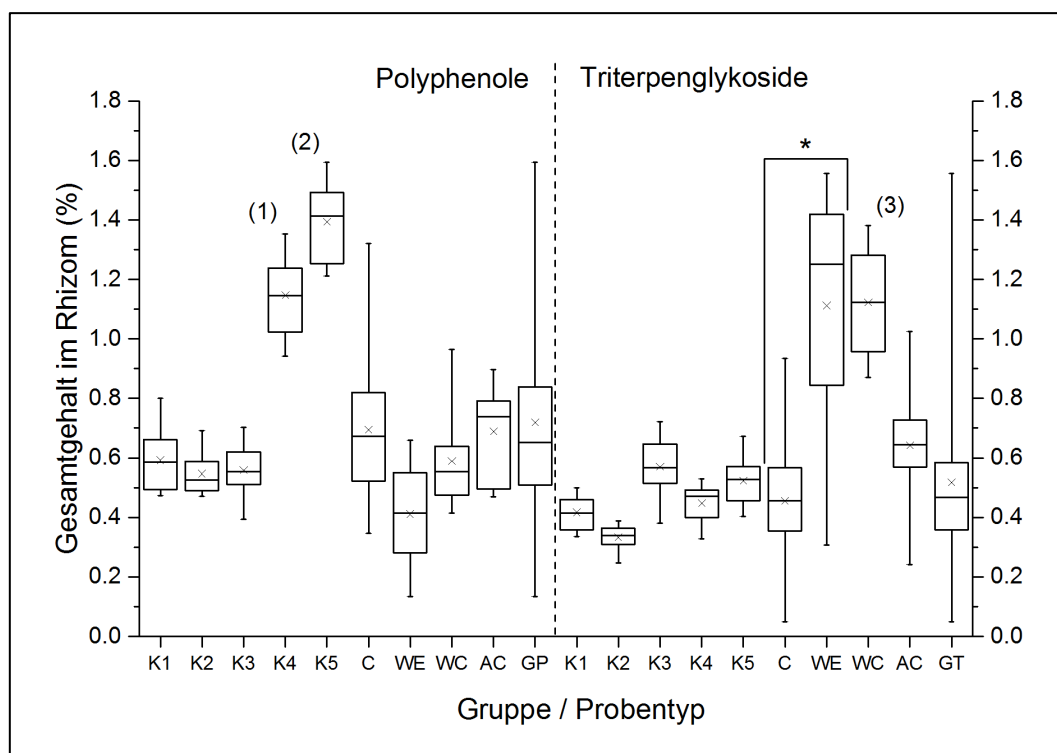


Abbildung 33: Quartile der Gesamtgehalte in % an Polyphenolen und Triterpennyglykosiden in den verschiedenen Gruppen von *C. rhizoma*. Mittelwert (×). GP/GT: Gesamtes Probenstet. Klone (K1 bis K5, insgesamt $n = 56$, siehe Abbildung 32), Pflanzen verschiedener Herkunft, kultiviert in Berlin (C, $n = 101$), Handelsware/Chargen aus Wildsammlung (WC, $n = 8$), Einzelpflanzen aus Wildsammlung (WE, $n = 8$) und Chargen aus kommerziellem Anbau (AC, $n = 6$) ($*p = 1,6 \cdot 10^{-15}$, t -Test; FC = 2,44).

Unterschiede innerhalb der in Berlin kultivierten Exemplare zeigten sich vor allem bei einer multivariaten Auswertung der quantitativen Daten mittels PCA (Abbildung 34). In der Abbildung sind die Loadings (Gehalte an Verbindungen **4–21**) und die dazugehörigen Scores der Einzelexemplare dargestellt. Die Exemplare streuen in der PCA je nach Ausprägung der jeweiligen Gehalte. Die Exemplare der Herkunft C3 (Norton Aboretum, USA, 2011) z. B. waren durch besonders hohe Gehalte an Fukinolsäure (**4**) gekennzeichnet (Siehe auch Boxplots in Abbildung 35). Ebenso zeigte diese Herkunft einen außergewöhnlich hohen Gehalt an Acetylshengmanolxylosid (**17**) während andere Triterpennyglykoside weniger ausgeprägt waren wie z. B. Cimircemosid A (**11**). Die Herkunft C4 (Longwood Gardens, USA, 2011) zeigte zum Teil auffallend hohe Gehalte an den Polyphenolen Fukinolsäure, Cimircifugasäure D (**5**) sowie Cimircifugasäure B (**7**). Besonders mit Ihrem hohen Gehalt an Cimircifugasäure D heben sich diese Exemplare von den anderen ab. Die Gehalte an Cimircifugasäure B schwankten stark und waren beispielsweise auch hoch in den Herkünften C11 (Wroclaw, 2002), C15 (Jever, 2002) und C16 (Massachusetts, 2004) und niedrig in C01 (Tübingen 2010), C06 (2002) und C14 (2002) (siehe Abbildung 35). Das 23-*epi*-26-Deoxyactein (**16**) schwankte im Gehalt innerhalb der kultivierten Pflanzen nicht sehr stark und lag im Mittel bei ca. 0,07 %. Nur die Gruppen C11, C12 (Lublin) und C15 wichen stark vom Mittelwert ab. Deutlichere Unterschiede ergaben sich z. B. für Cimircemosid A und Acetylshengmanolxylosid. Cimircemosid A war wenig zu finden in den Herkünften C03, C04, C15 und C17 (Indiana, USA). Die Herkünfte C15 und C17 zeigten stark erniedrigte Gehalte an Acetylsheng-

manolxylosid. Innerhalb der verschiedenen Herkünfte waren die Unterschiede zum Teil deutlich signifikant (Abbildung 36). Am deutlichsten war der Unterschied im Gehalt an Acetylshengmanolxylosid mit $-\log_{10}(p) \geq 10$. Außer für Actein (**12**), welches nur in 4 % der Exemplare detektiert werden konnte, und Acetylcimigenolarabinosid (**20**) waren mit $p \leq 0,01$ alle Verbindungen unterschiedlich in den verschiedenen Herkünften.

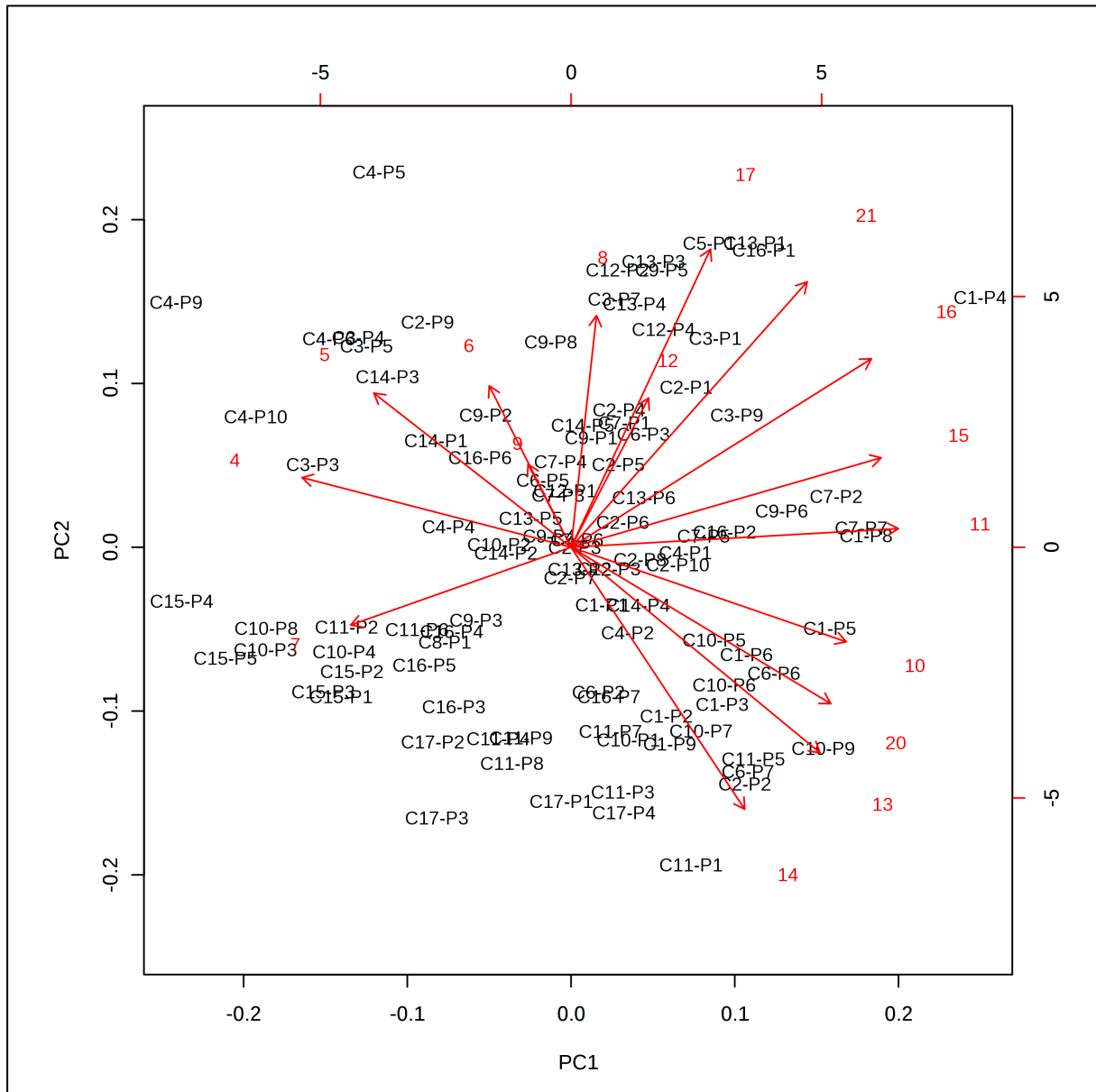


Abbildung 34: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der quantitativen Daten aus LC/DAD/ELSD der untersuchten Verbindungen **4–21** für die Rhizome der *Actaea racemosa* Exemplare aus Kultur in Berlin ($n = 101$). Daten nach Auto-Scaling. PCA-Scores der einzelnen Proben und dazugehörige Loadings (Verbindungen **4–21**) in Rot.

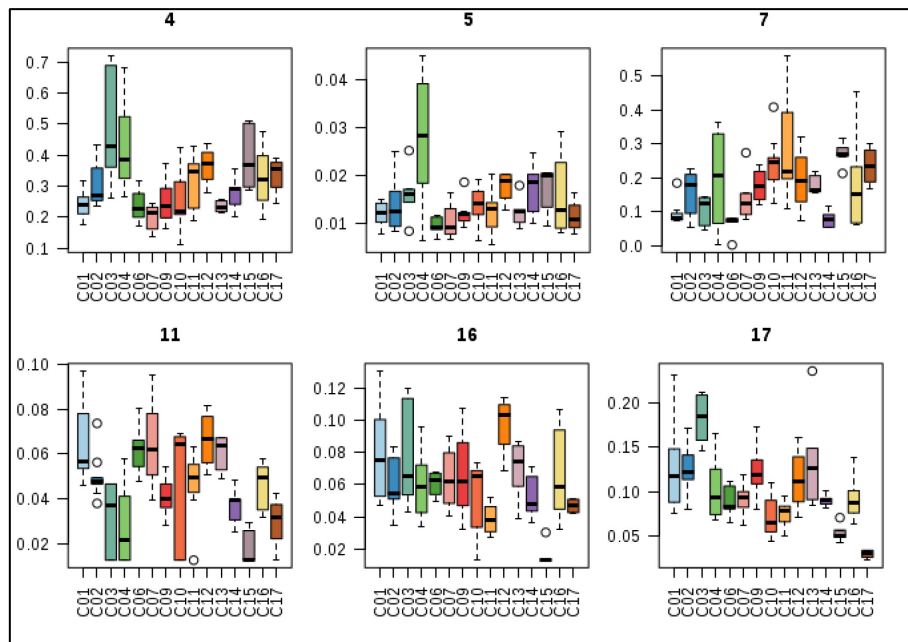


Abbildung 35: Quartile (Q1/Q3 und Median) der Gehalte von Fukinolsäure (**4**), Cimicifugasäuren D (**5**) und B (**6**) sowie Triterpenglykosiden Cimiracemosid A (**11**), 23-*epi*-26-Deoxyactein (**16**) und Acetylshengmanolxylosid (**17**) in den Exemplaren aus Kultur in Berlin in den verschiedenen Herkünften C01 bis C17. Whiskers beim zweitgrößten Wert und $Q3 + 1,5 \text{ IQR}$ bzw. beim zweitniedrigsten Wert und $Q1 - 1,5 \text{ IQR}$.

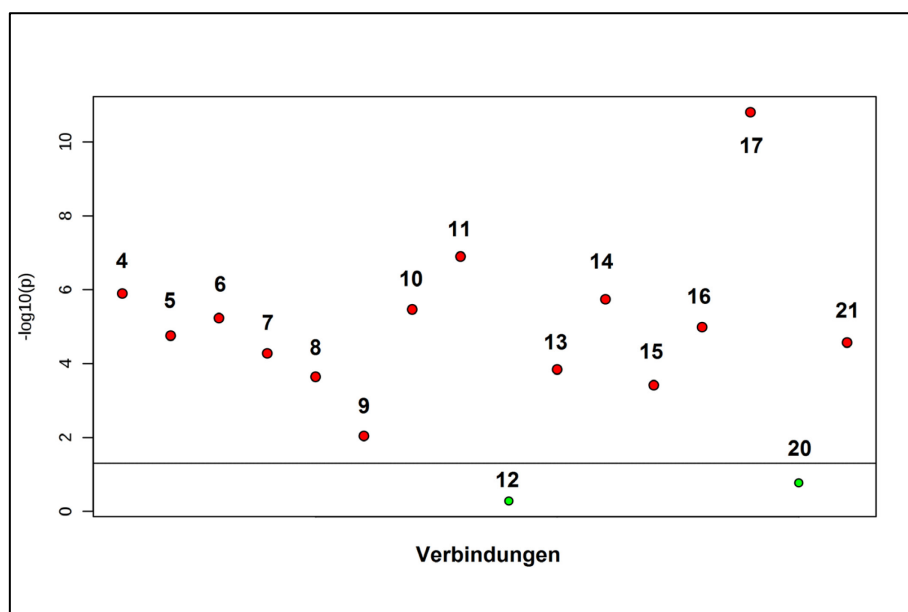


Abbildung 36: Varianzanalyse (ANOVA, $-\log_{10}(p)$ -Werte) für die Gehalte der Polyphenole (**4–9**) und Triterpenglykoside (**10–17**, **20**, **21**) innerhalb der verschiedenen Herkünfte C01 bis C17, kultiviert in Berlin, insgesamt 101 Einzelpflanzen, quantifiziert in Triplikaten ($n = 3$) mittels LC/DAD bzw. /ELSD. Linie $p = 0,05$, rote Punkte sind Verbindungen mit $p \leq 0,05$.

Für die Untersuchung der Homogenität und Streuung der Gehalte in den verschiedenen Exemplaren wurden der Gehalt an den individuellen Verbindungen Fukinolsäure und Acetylshengmanolxylosid (Abbildung 32) sowie die entsprechenden Gesamtgehalte an Polyphenolen und Triterpenglykosiden herangezogen (Abbildung 33). Weiterhin wurde unterschiedliche Teile ($n = 8$) des Rhizoms des Exemplars C9.5 individuell gemahlen und vermessen, um die Schwankung innerhalb eines Rhizoms abzubilden.

Die Schwankungen der Gehalte der einzelnen Verbindungen waren in derselben Probe zum Teil unterschiedlich (Tabelle 9). So schwankten die weniger stabilen Polyphenole **4**, **6** und **7** (siehe Abschnitt 3.1.1.1) innerhalb eines Rhizoms (C9.5) zwischen 10,8 % und 13,5 %, während die stabilen Cimicifugasäuren E und F (**8**, **9**) hier nur um 5,8 % bzw. 9,0 % schwankten. Das gleiche Bild zeigte sich bei den Triterpenglykosiden mit z. B. Acetylshengmanolxylosid (**17**) und einer Schwankung von nur 5,7 %. Der Gesamtgehalt an Triterpenglykosiden schwankte hier um 12,7 %, diese verhältnismäßig hohe Schwankung ist aber auf Ungenauigkeit im unteren Messbereich zurückzuführen, da für die Berechnung des Gesamtgehaltes alle Werte über dem LOD miteinbezogen wurden.

Die niedrigsten Schwankungen (RSD \pm SD) im Gehalt der ausgewählten Metaboliten fanden sich in den fünf Typen von Klonpflanzen K1 bis K5 mit im Mittel $12,4 \pm 0,7$ % für Fukinolsäure (**4**), $12,0 \pm 3,5$ % für Acetylshengmanolxylosid (**17**) sowie $13,5 \pm 3,4$ % und $15,2 \pm 2,5$ % für die Gesamtgehalte an Polyphenolen und Triterpenglykosiden. Die niedrigsten Schwankungen einzelner Verbindungen ergaben sich z. B. in K1 ($n = 15$) für Acetylshengmanolxylosid (**17**, 8,0 %), in K2 ($n = 12$) für Cimicifugasäure F (**9**, 7,2 %) oder in K4 ($n = 11$) für Cimicifugasäure E (**8**, 5,4 %). Im gesamten Set der Pflanzen verschiedener Herkunft (C1 bis C17, $n = 101$) lagen die Schwankungen (RSD) der Gehalte deutlich höher mit 37,8 % für Fukinolsäure (**4**), 42,4 % für Acetylshengmanolxylosid (**17**) sowie für die Gesamtgehalte mit 30,0 % (Polyphenole) und 35,8 % (Triterpenglykoside).

Die größten Schwankungen ergaben sich innerhalb der wildgesammelten Einzelexemplare ($n = 8$). Hier lag die Schwankung der Gehalte an Fukinolsäure (**4**) und Acetylshengmanolxylosid (**17**) bei 47,7 % bzw. 41,2 % sowie die Schwankung der Gesamtgehalte bei 44,6 % (Polyphenole) und 38,2 % (Triterpenglykoside). Die maximale Schwankungsbreite zeigten hier die Verbindungen Cimicifugasäure A und F (**6**, **9**) mit jeweils 71,9 % und 82,4 %. Innerhalb der kommerziellen Mischchargen aus Wildsammlungen scheinen sich die Schwankungen der Gehalte von Individuen jedoch auszugleichen. So lagen innerhalb dieser Chargen die Schwankungen der Gehalte der stabilen Verbindungen **8**, **9**, **14**, **16** und **17** im Bereich von 16,3 % bis 26,3 % (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Schwankung und Mittelwerte der Gehalte ausgewählter Verbindungen (Polyphenole und Triterpenglykoside) bzw. Gesamtgehalte in *C. rhizoma* der verschiedenen Proben-Typen Klone (K), Pflanzen unterschiedlicher Herkunft kultiviert in Berlin ©, Einzelpflanzen aus Wildernte (WE), Mischchargen aus Wildernte (WC) und Mischchargen aus Anbau (AC).

Gruppe // Verbindung	Polyphenole (RSD %)						Triterpenglykoside (RSD %)			
	4	6	7	8	9	GP ^A	14	16	17	GT ^B
C9.5 (n=008) ^C	13,3	10,8	13,5	5,8	9,0	10,3	5,9	4,4	5,7	12,7 ^D
K1 (n=015)	12,9	21,2	23,0	16,4	13,0	16,3	7,3	12,7	8,0	12,1
K2 (n=012)	11,5	18,1	18,8	9,3	7,2	14,2	12,2	14,9	14,0	13,6
K3 (n=008)	13,3	20,4	23,4	28,0	26,5	17,0	17,1	19,9	11,1	18,5
K4 (n=011)	12,2	12,0	14,0	5,4	15,6	10,4	11,9	15,5	17,0	15,0
K5 (n=010)	12,3	18,7	12,1	17,5	13,0	9,4	23,8	16,8	10,0	16,8
C (n=101)	37,8	42,5	59,4	47,7	58,1	30,0	49,2	45,3	42,4	35,8
WE (n=008)	47,7	71,9	56,2	36,8	82,4	44,6	45,8	37,6	41,2	38,2
WC (n=008)	33,9	34,1	42,2	16,3	21,6	29,7	16,7	17,2	26,3	16,4
AC (n=006)	19,1	21,3	35,4	22,1	43,9	24,8	49,6	38,1	19,8	39,5
Gruppe // Verbindung	Polyphenole (Gehalt %)						Triterpenglykoside (Gehalt %)			
	4	6	7	8	9	GP ^A	14	16	17	GT ^B
Alle (min.)	0,063	0,022	< QL	0,005	< QL	0,134	< QL	< QL	0,022	0,048
Alle (max.)	0,720	0,355	0,569	0,078	0,111	1,595	0,243	0,233	0,332	1,556
Alle (\bar{x})	0,290	0,148	0,210	0,028	0,028	0,715	0,069	0,070	0,110	0,518
K4 (\bar{x})	0,452	0,032	0,212	0,362	0,046	1,126				
K5 (\bar{x})	0,462	0,034	0,264	0,488	0,057	1,393				
WE (\bar{x})	0,162	0,009	0,076	0,124	0,016	0,411				
C (\bar{x})							0,058	0,059	0,102	0,455
WE (\bar{x})							0,160	0,162	0,177	1,111
WC (\bar{x})							0,163	0,181	0,185	1,121

^A Gesamtgehalt Polyphenole **4–9** als Summe von Einzelwerten \geq LOQ

^B Gesamtgehalt Triterpenglykoside **10–21** als Summe von Einzelwerten \geq LOD (siehe ^D)

^C Schwankungen innerhalb einer Pflanze ermittelt durch Quantifizierung verschiedener Teile des Rhizoms

^D Höhere Schwankung aufgrund Ungenauigkeit im unteren Messbereich bei LC/ELSD

Wie bereits in den oberen Absätzen beschrieben ergaben sich quantitative Unterschiede im Hinblick auf die Gehalte einzelner Verbindungen in den Proben-Gruppen Mischchargen und Einzelpflanzen, jeweils aus Anbau bzw. Kultur (AC und C) und Wildsammlungen (WC und WE). Im Folgenden wurden diese Gruppen in einem Two-Group-Vergleich (Fold-Change-Analyse und *t*-Tests) miteinander statistisch verglichen.

Zunächst wurden die Einzelpflanzen aus Kultur in Berlin (C, $n = 101$) mit den Exemplaren aus Wildsammlungen verglichen (WE, $n = 8$), siehe Abbildung 37. Die Polyphenole (**4–9**) traten hier vermehrt in den Pflanzen aus Kultur auf wie z. B. Fukinolsäure (**4**) mit FC = 1,87 und $p = 0,9 \cdot 10^{-3}$ oder Camicifugasäure A (**6**) mit FC = 1,99 und $p = 1,7 \cdot 10^{-3}$. Alle Polyphenole zeigten aber ein $FC \leq 2$. Anders war dies bei den Triterpenglykosiden, die vermehrt in den Exemplaren aus Wildsammlung auftraten. Für die Hauptkomponenten 23-*epi*-26-Deoxyactein (**16**) und Acetylshengmanoxylosid (**17**) ergaben sich hochsignifikante Unterschiede mit FC = 2,72 und $p = 2,4 \cdot 10^{-15}$ bzw. FC = 1,74 und $p = 2,0 \cdot 10^{-5}$.

Ein ähnliches, wenn auch weniger extremes Bild zeichnete sich beim Vergleich der Mischchargen ab, siehe Abbildung 38. Die Polyphenole (**4–9**) zeigten auch hier tendenziell einen leicht höheren Gehalt in Mischchargen aus Anbau (AC $n = 6$), jedoch alle mit $FC \leq 2$ und $p \geq 0,01$. Die Triterpenglykoside (**10–16**) waren signifikant mehr in den Mischchargen aus Wildsammlungen (WC $n = 8$) zu finden mit $p \leq 0,001$, beispielsweise 23-*epi*-26-Deoxyactein (**16**) mit $FC = 2,93$ und $p = 4,8 \cdot 10^{-6}$. Acetylshengmanolxylosid (**17**) und Acetylcimigenolxylosid (**21**) waren im Mittel mit $FC = 1,24$ und $FC = 1,37$ leicht erhöht in AC, jedoch aufgrund der starken Schwankungen innerhalb der Gruppen nicht signifikant ($p \geq 0,1$).

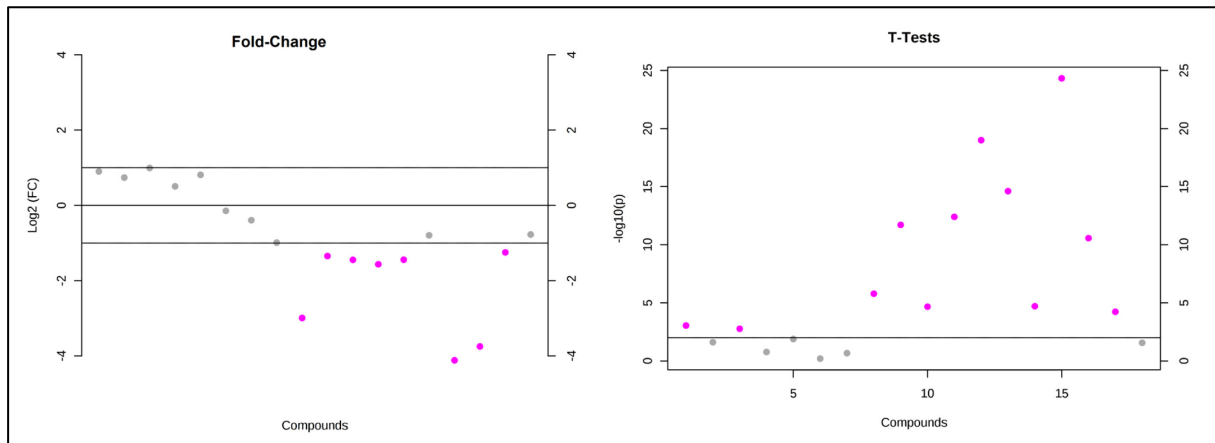


Abbildung 37: Ergebnisse des Two-Group-Vergleichs (C/WE) mit Fold-Change-Analyse und t -Tests für Einzelpflanzen aus Kultur in Berlin (C, $n = 101$) und aus Wildsammlungen (WE, $n = 8$); Punkte stellen von links nach rechts Werte für quantifizierte Verbindungen **4–21** dar, markierte Punkte (Magenta) mit $FC \geq 2$ und $p \leq 0,01$ (horizontale Linien). Polyphenole **4–9** leicht erhöht in C, nur Fukinolsäure (**4**) und Cimicifugasäure A (**6**) signifikant ($p < 0,01$); Triterpenglykoside **10–20** signifikant erhöht in WE ($p < 0,001$).

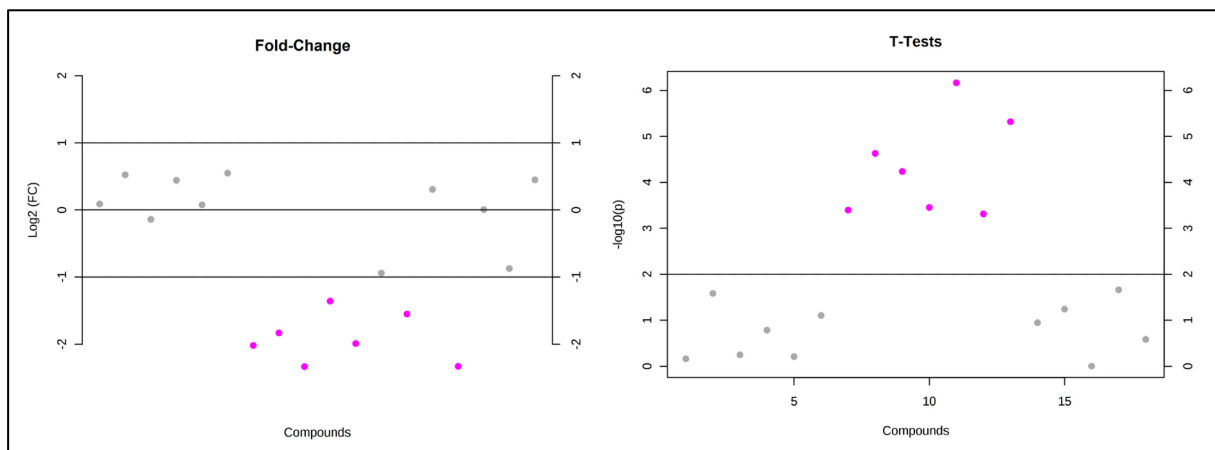


Abbildung 38: Ergebnisse des Two-Group-Vergleichs (AC/WC) mit Fold-Change-Analyse und t -Tests für Mischchargen aus Anbau (AC, $n = 6$) und aus Wildsammlungen (WC, $n = 8$); Punkte stellen von links nach rechts Werte für quantifizierte Verbindungen **4–21** dar, markierte Punkte (Magenta) mit $FC \geq 2$ und $p \leq 0,01$ (horizontale Linien). Polyphenole **4–9** leicht erhöht in AC, aber nicht signifikant ($p > 0,01$); Triterpenglykoside **10–16** signifikant erhöht in WC ($p < 0,001$).

3.1.3.2 Triterpenglykosid-Fingerprints aus LC/ELSD

Während der Quantifizierung der Polyphenole und Triterpenglykoside im Probenet von *Cimicifugae rhizoma* ($n = 179$) ergaben sich Unterschiede zwischen dem Material aus Kultur bzw. Anbau und dem Material aus Wildsammlungen (z. B. in Abbildung 33, S. 62). Einige der Einzelexemplare aus Wildsammlungen (S-Proben) zeigten allerdings ein sehr ähnliches Inhaltsstoffmuster, wie die Pflanzen aus Kultur in Berlin (C-Proben). Dies resultierte in einem gemeinsamen Clustern dieser Proben in HCA basierend auf den Gehalten der Verbindungen **4–21** (Abbildung 39) oder PCA basierend auf entsprechenden Daten für die Triterpenglykoside **10–21** allein (Abbildung 40).

Die Probe S2475 gruppierte sich in HCA zusammen mit der Charge B4 aus kommerziellem Anbau und einigen C-Proben (Abbildung 39). Die Probe S2607 bildete hier eine Gruppe mit z. B. den Exemplaren C6.2 und C5.1 aus Berlin. Die anderen Einzelexemplare aus den USA bildeten einen gemeinsamen Cluster mit der Handelsware aus Wildsammlungen (W-Proben). Einige Exemplare von *C. rhizoma* zeigten also ähnliche Inhaltsstoffmuster, unabhängig von der Herkunft und den Wachstumsbedingungen.

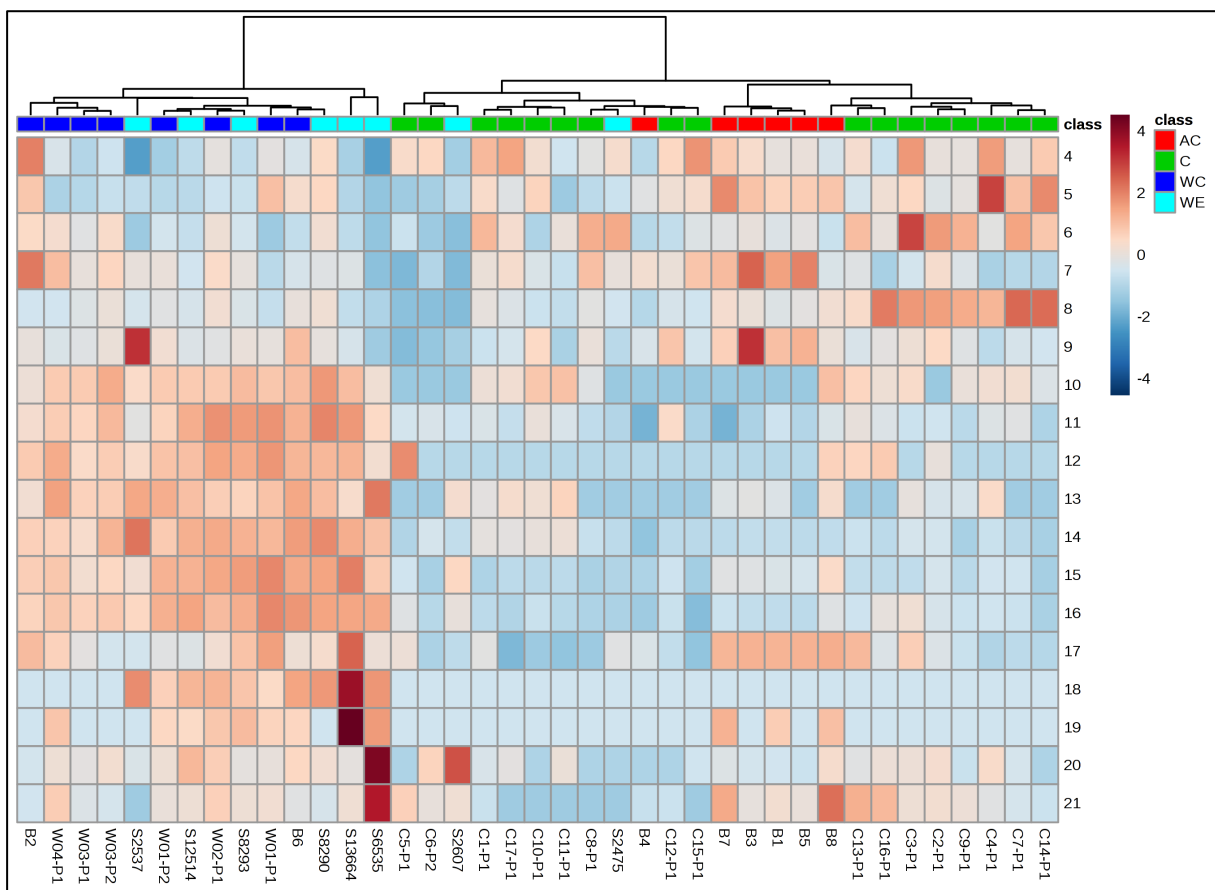


Abbildung 39: Heatmap über die Verteilung der Gehalte der Verbindungen **4–21** aus LC/DAD/ELSD in ausgewählten Proben (C; WE = S; WC = W, B2 und B6; AC = andere B), relativer Gehalt nach Auto-Scaling, Clustern der Proben (HCA) unter Anwendung von Wards-Algorithmus und quadratisch Euklidische Distanzen.

Betrachtet man nur das Inhaltsstoffmuster der Triterpenglykoside allein mittels PCA, liegen die wildgesammelten Exemplare S2475 und S2607 klar im bzw. nahe des Clusters der in Berlin kultivierten Exemplare. Die Einzelexemplare aus Kultur © in Berlin liegen am Rand des Clusters von WE, welcher die größte Variabilität aufzeigt. Die Mischchargen aus Anbau (B1, B3, B4, B5, B7 und B8) wiederum liegen gemeinsam am Rand des C-Clusters. Ebenso zeigt der entsprechende CI_{95%} deutlich die Homogenität der Mischchargen aus Wildsammlungen im Vergleich zu den acht Einzelexemplaren.

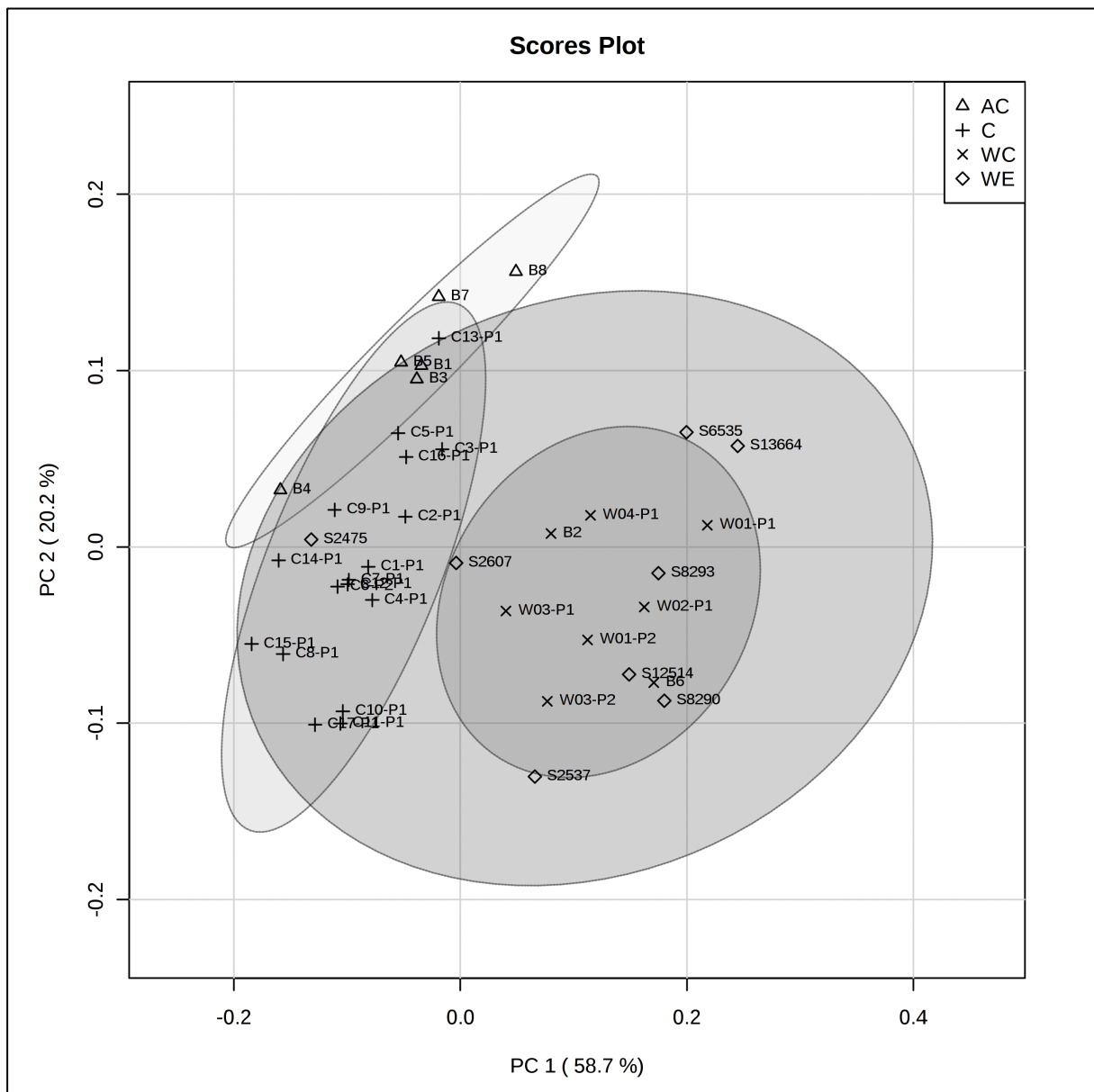


Abbildung 40: PCA basierend auf quantitativen Daten für Triterpenglykoside **10–21** für zufällig ausgewählte C-Proben, sowie Chargen aus kommerziellem Anbau (AC: B1, B3, B4, B5, B7 und B8), Handelsware (WC: B2, B6 und W) und Einzelexemplare aus Wildsammlungen (WE: S), Kreise geben die 95%-Konfidenzintervalle für die jeweiligen Cluster an.

Die Proben S2475, B4 und C4.9 zeigten einen bemerkenswert ähnlichen Triterpenglykosid-Fingerprint in LC/ELSD (Abbildung 41). Dieser war gekennzeichnet durch einen dominierenden Acetylshengmanolxylosid-Peak (**17**) und einem sehr geringen Gehalt an anderen Triterpenglykosiden (**10–21**). Weiterhin zeigten diese Exemplare bzw. Proben eine nahezu identische Menge an (**17**), unabhängig davon, ob die Mischcharge aus kommerziellem Anbau (B3, B4 oder B5), das Einzelexemplar aus Kultur in Berlin (C4.9) oder die Probe aus einer Wildsammlung in den USA (S2475) stammt.

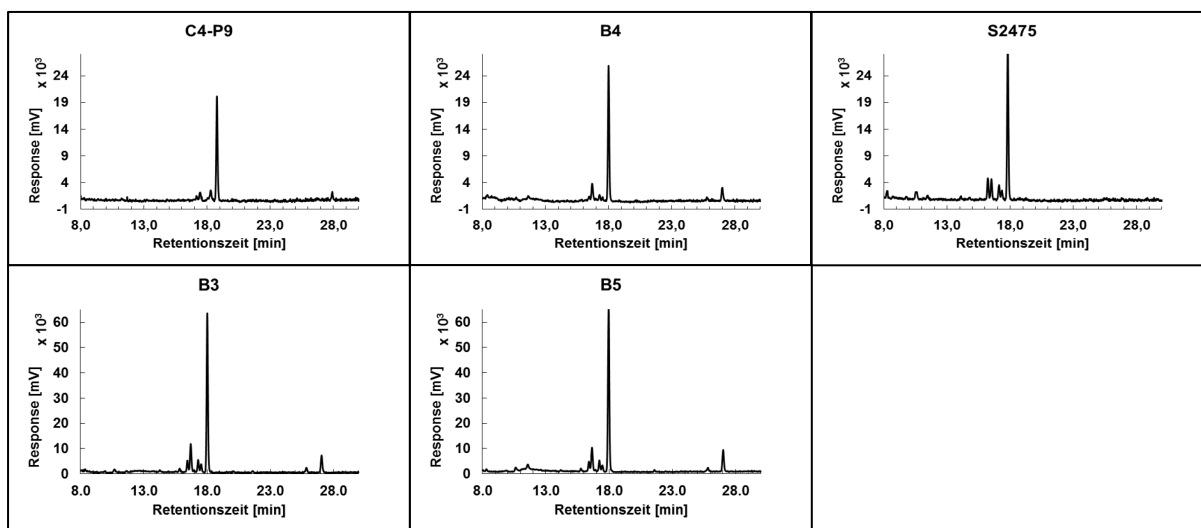


Abbildung 41: Potentieller ASX-Chemotyp in einem Einzelexemplar aus Kultur in Berlin (C4.9), in Mischchargen aus Anbau (B3, B4 und B5) sowie einem Einzelexemplar aus Wildsammlung (S2475).

Das Auftreten dieses Triterpenglykosid-Fingerprints in den verschiedenen Proben von *C. rhizoma* lässt darauf schließen, dass den grundlegenden starken Unterschieden im Hinblick auf die Herkunft bzw. die Wachstumsbedingungen der Pflanzen auch eine Unterteilung in Chemotypen zugrunde liegt. Eine Untersuchung von Chemotypen in *A. racemosa* L. ist nur möglich, wenn man andere Einflussfaktoren wie Erntezeit, Nacherntebehandlung und generelle Wachstumsbedingungen (nahezu) ausschließt. Diese Voraussetzung ist nur bei den Einzelpflanzen (C-Proben) aus Kultur in Berlin gegeben. Aufgrund dessen wurde dieses Probenet anhand des Auftretens von Triterpenglykosiden (**10–21**) intensiver betrachtet.

Die kommerziellen Mischchargen aus Wildsammlungen (Handelsware, exemplarisch in Abbildung 42) zeigten einen sehr reproduzierbaren Triterpenglykosid-Fingerprint, wenn auch mit leichten quantitativen Unterschieden. Alle Triterpenglykoside **10–21** kommen in einem bestimmten Verhältnis vor (im folgenden 23-*epi*-26-Deoxyactein(DOA)-Chemotyp genannt). Die potentiellen Unterschiede einzelner Pflanzen aufgrund von Chemotypen scheinen sich in Mischchargen auszugleichen. Nur in der Mischcharge B2 lässt sich eine leichte Tendenz zu einem höheren Acetylshengmanolxylosidgehalt (**17**) erkennen.

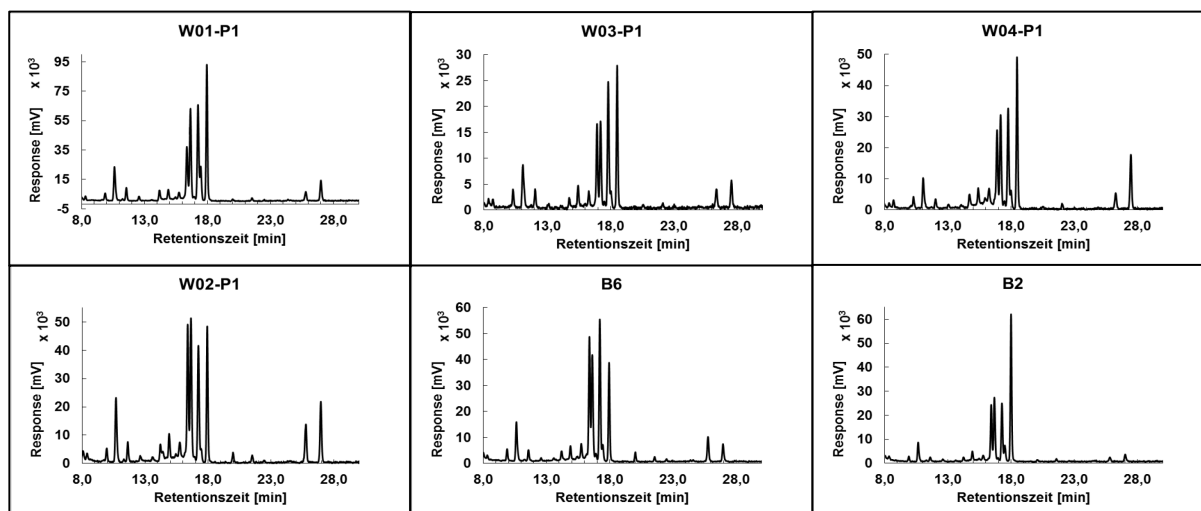


Abbildung 42: Beispielhafte Triterpenglykosid-Fingerprints aus LC/ELSD in kommerziellen Mischchargen (Handelsware) aus Wildsammlungen mit charakteristischer Verteilung von Triterpenglykosiden **10–21** wenn auch mit quantitativen Unterschieden (DOA-Chemotyp). Die Charge B2 weicht leicht vom Muster ab, mit einer Tendenz zu hohem Acetylshengmanolxylosid-Gehalt ($t_R = 18$ min).

Die starke Unterschiedlichkeit der Triterpenglykosidmuster in Einzelpflanzen zeigte sich besonders bei den acht Exemplaren aus Wildsammlungen in den USA (WE/S-Proben, siehe Abbildung 43). Der überwiegende Teil der Proben zeigte einen Fingerprint mit Verteilungen vergleichbar zu denen der Mischchargen aus Wildsammlungen (S8290, S8293, S12514 und S13664). Andere wiederum waren durch eine Tendenz zu den Acetylcimigenol-Triterpenglykosiden (**20** und **21**, ACX/ACA) gekennzeichnet, wie beispielsweise die Proben S2607 und S6535. Am stärksten wichen die Proben S2537 und S2475 von dem ausgehend von Handelsware erwarteten Fingerprint mit ihren besonders hohen Gehalten an Acetylhydroshengmanolxylosid (**14**, AHSX) bzw. Acetylshengmanolxylosid (**17**, ASX) ab. Die Einzelpflanzen aus Wildsammlungen ließen sich daher in potentielle Chemotypen z. B. DOA-, ACX/ACA-, AHSX-, ASX-Typ oder ASX/ACX-Typ unterteilen.

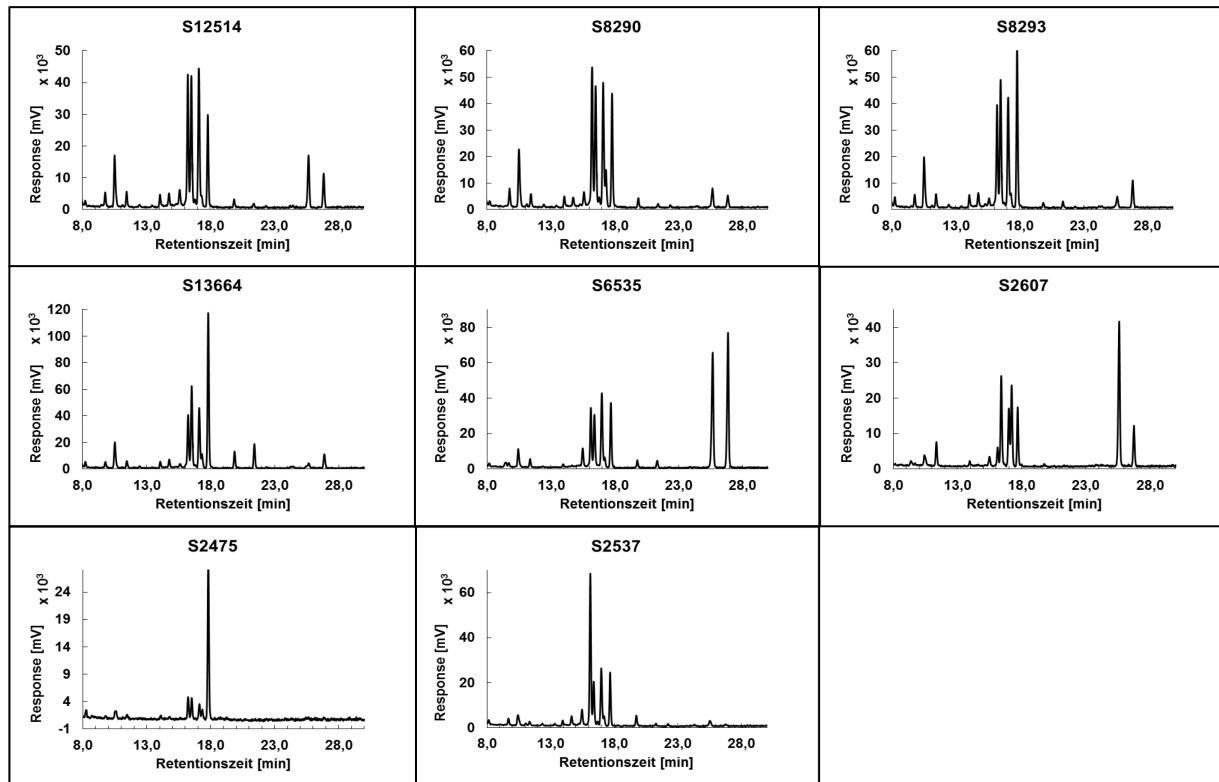


Abbildung 43: Triterpenglykosid-Fingerprints in acht Einzelexemplaren von *C. rhizoma* aus Wildsammlungen in den USA.

Aufgrund des generell geringeren Gehalts an Triterpenglykosiden (viele unter LOQ) in den Pflanzen bzw. Rhizomen aus Berlin, war eine Fingerprint-Analyse, v. a. mit chemometrischen Verfahren, nur unter vergleichsweise schweren Bedingungen möglich. Nichtsdestotrotz ergab sich innerhalb dieses Probesets ein Clustern in HCA anhand von Triterpenglykosidgehalten zumindest für die sehr deutlich unterschiedlichen potentiellen Chemotypen ASX-Typ, AHSX-Typ und dem DOA-Typ (siehe Diskussion). Unter manueller Auswertung der Fingerprints ließ sich in einigen der Pflanzen ebenfalls Tendenzen zu o. g. Chemotypen erkennen (siehe Abbildung 45 und folgende). Ein überwiegender Anteil der Proben zeigte den DOA-Typ-Fingerprint wie exemplarisch in Abbildung 44 dargestellt, wenn auch in deutlich geringerem quantitativen Umfang im Vergleich zur Handelsware oder den Einzelexemplaren aus Wildsammlungen.

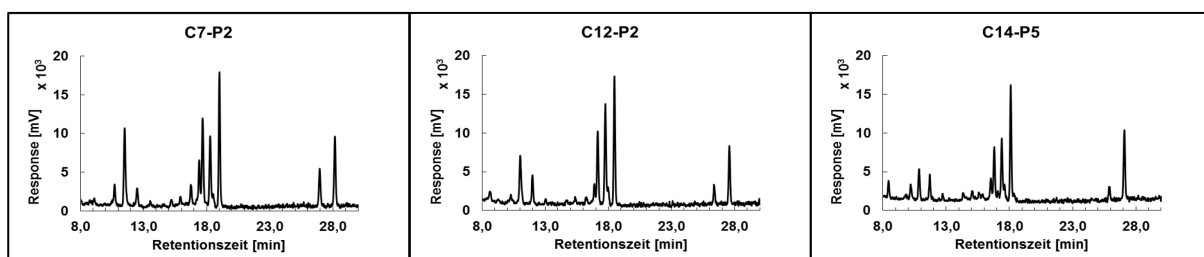


Abbildung 44: DOA-Chemotyp-Fingerprints in ausgewählten Exemplaren aus Kultur in Berlin mit gleichem Muster, jedoch geringerem Triterpenglykosidgehalt im Vergleich zu Handelsware.

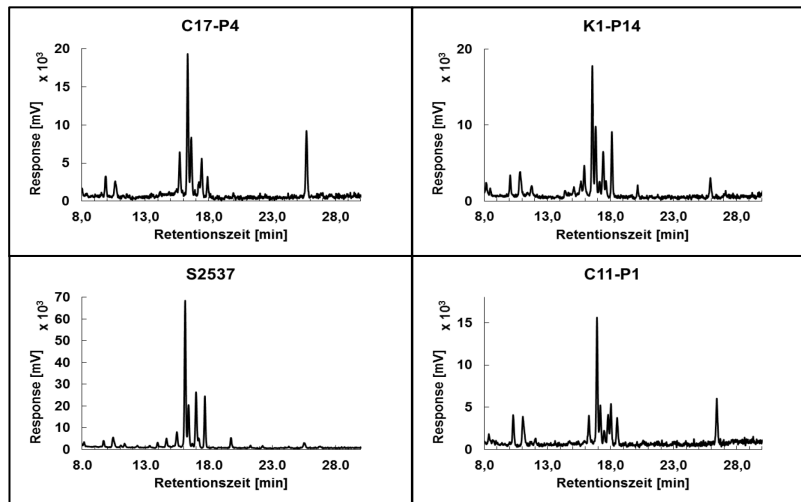


Abbildung 45: AHSX-Chemotyp in Einzelexemplaren aus Kultur, beispielhaft an C17.4, C11.1 und K1.14 bzw. einem Einzelexemplar aus Wildsammlung (S2537).

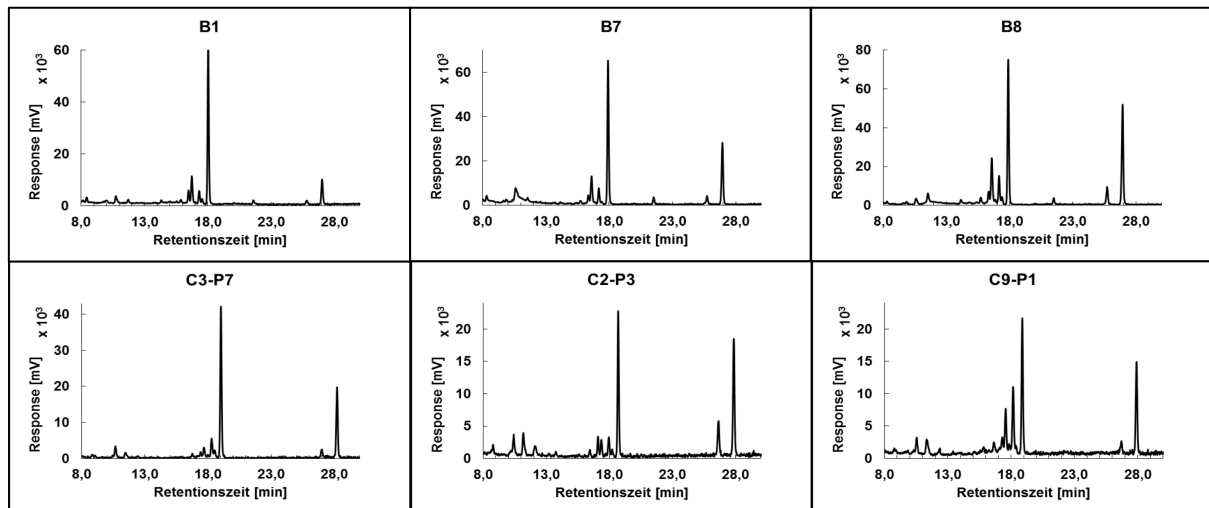


Abbildung 46: ASX/ACX-Chemotyp in kommerziellen Anbauchargen aus Deutschland (B) und Einzelpflanzen aus Kultur in Berlin (C).

3.1.3.3 Untersuchung generativer Nachkommen von Mutterpflanzen

Aus der Perspektive eines Züchters ist die Frage interessant, wie sich der Gehalt an Sekundärstoffen zwischen Generationen verändert. Wird eine Pflanze aufgrund ihres spezifischen Gehaltes an bestimmten Substanzen ausgewählt und anschließend generativ vermehrt, wie verhält sich dieser Gehalt in den Nachkommen (F1-Generation) dieser Mutterpflanze? Bleibt er, mit einer natürlichen Schwankungsbreite (z. B. 10 % siehe Abschnitt 3.1.3.1), auf dem Niveau der Mutterpflanze?

Um dieser Frage nachzugehen wurden mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten LC/DAD Methode die Gehalte an Polyphenolen **4–9** in den drei Mutterpflanzen C6.1, C9.7 und C11.8 und jeweils ihren Nachkommen der F1-Generation (je $n = 7$) bestimmt. Alle 32 Exemplare wurden in Triplikaten quantifiziert, eine Mutterpflanzen mit den dazugehörigen F1-Pflanzen innerhalb einer LC-Sequenz.

Innerhalb der F1-Nachkommen ($n = 7$) einer Pflanze schwankten die Gehalte an Polyphenolen im Mittel 26,8 % (C6.1), 33,7 % (C9.7) und 33,2 % (C11.8), siehe Tabelle 10. Diese Streuung lag allerdings nicht wie erwartet um den Ausgangswert der Mutterpflanze herum, sondern teilweise deutlich darunter oder darüber (vgl. z. B. Fukinolsäure in Abbildung 47). So lag der mittlere Polyphenolgehalt in den Nachkommen von C6.1 um den Faktor $1,5 \pm 0,24$ höher als in der Mutterpflanze. Insgesamt verhalten sich individuelle Polyphenole jedoch unterschiedlich, es ist kein klares Muster zu erkennen (siehe Abbildung 47).

Tabelle 10: Gehalte an Polyphenolen in Nachkommen einer Mutterpflanze (F1-Generation).

Pflanze	C6.1	Mittel F1 ($n = 7$)	RSD F1 ($n = 7$)	Faktor F1 ($n = 7$)
Funkinolsäure	0,299 %	0,377 %	24,6 %	1,26
Cimicifugasäure D	0,009 %	0,015 %	21,6 %	1,65
Cimicifugasäure A	0,047 %	0,083 %	18,3 %	1,76
Cimicifugasäure B	0,100 %	0,124 %	39,9 %	1,24
Cimicifugasäure E	0,009 %	0,015 %	18,9 %	1,72
Cimicifugasäure F	0,009 %	0,012 %	37,4 %	1,34
		Mittel±SD	26,8±9,5%	1,50±0,24
Pflanze	C9.7	Mittel F1 ($n = 7$)	RSD F1 ($n = 7$)	Faktor F1 ($n = 7$)
Funkinolsäure	0,277 %	0,276 %	27,6 %	1,00
Cimicifugasäure D	0,011 %	0,013 %	31,6 %	1,18
Cimicifugasäure A	0,105 %	0,156 %	50,1 %	1,48
Cimicifugasäure B	0,111 %	0,313 %	12,4 %	2,83
Cimicifugasäure E	0,016 %	0,031 %	55,0 %	1,88
Cimicifugasäure F	0,012 %	0,039 %	25,6 %	3,15
		Mittel±SD	33,7 ± 16,0 %	1,92 ± 0,89
Pflanze	C11.8	Mittel F1 ($n = 7$)	RSD F1 ($n = 7$)	Faktor F1 ($n = 7$)
Funkinolsäure	0,459 %	0,229 %	49,5 %	0,50
Cimicifugasäure D	0,016 %	0,009 %	53,4 %	0,57
Cimicifugasäure A	0,137 %	0,126 %	30,0 %	0,92
Cimicifugasäure B	0,216 %	0,204 %	30,2 %	0,95
Cimicifugasäure E	0,018 %	0,017 %	18,2 %	0,96
Cimicifugasäure F	0,015 %	0,017 %	17,6 %	1,09
		Mittel ± SD	33,2 ± 15,3 %	0,83 ± 0,24

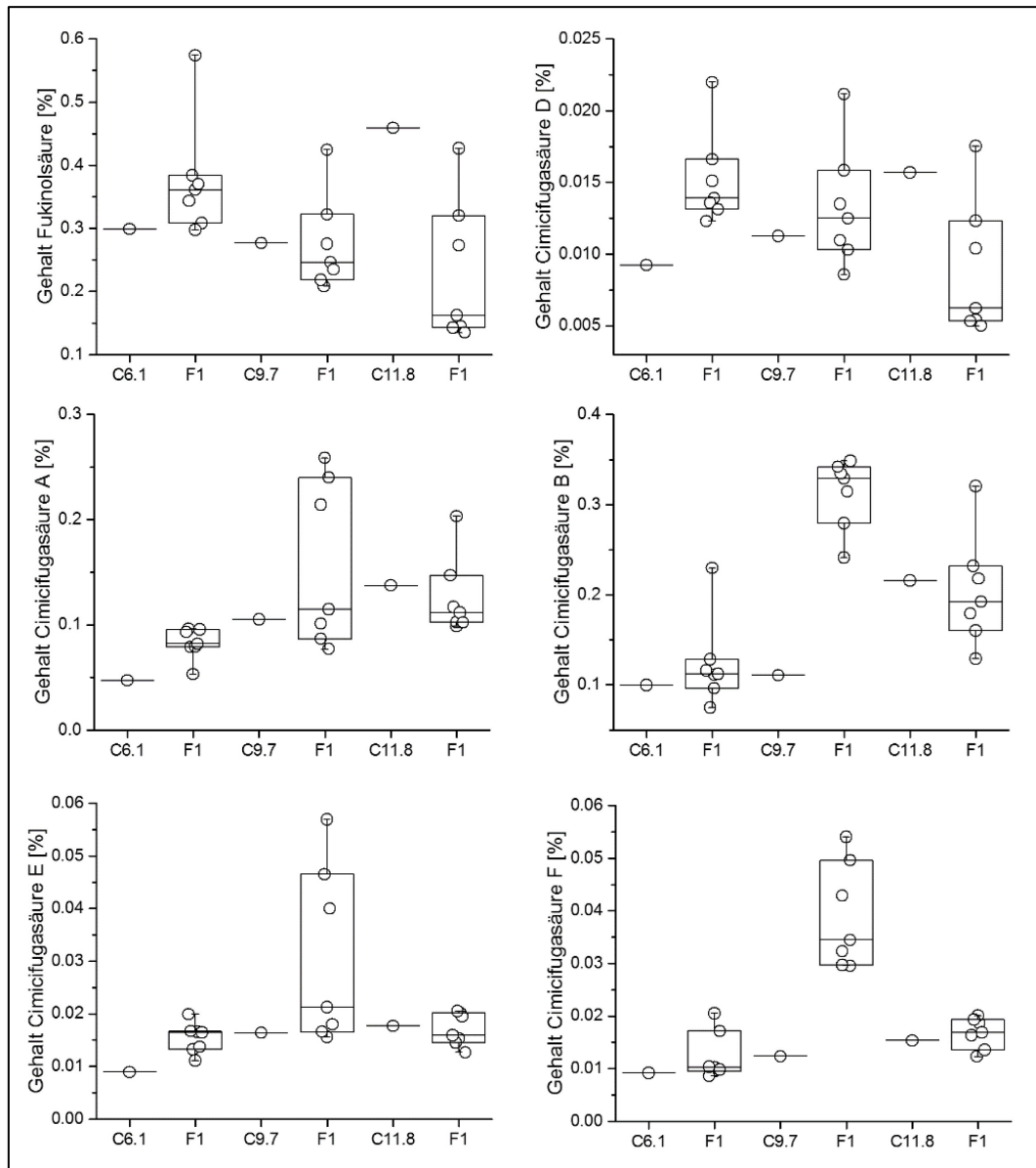


Abbildung 47: Quartile der Massengehalte an Polyphenolen **4–9** in Rhizomen von *Actaea racemosa* Exemplaren, jeweils Mutterpflanze und die F1-Generation. Zu sehen sind die Schwankungen der entsprechenden Gehalte in Nachkommen (je $n = 7$) einer Mutterpflanze (C6.1, C9.7 und C11.8). Die Lage der Einzelwerte der Pflanzen ist mit Kreisen dargestellt.

3.1.4 Non-targeted Chemical Profiling via UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS/MS^E

Zur weiteren Charakterisierung der Einzelexemplare von *C. rhizoma* aus Kultur in Berlin und anderen Exemplaren, z. B. aus Wildsammlungen, wurde mittels LC/MS ein Chemical Profiling von methanolischen (100 % V/V) Extrakten durchgeführt [162]. Insgesamt 48 ausgewählte Exemplare bzw. Proben von *C. rhizoma* wurden in dieses Projekt mit einbezogen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Mittels UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS/MS^E untersuchte Exemplare und Proben von *C. rhizoma* (*Actaea racemosa* L.).

ID	Typ	Herkunft	Anzahl	Gepflanzt
K3	Klone, Individuen	Somatische Embryogenese an Keimlingen	8	2007
C1	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Universität Tübingen	3	2010
C3	Kultur, Individuen	Norton Arboretum, Jefferson National Forest	3	2011
C4	Kultur, Individuen	Longwood Gardens, Pennsylvania	3	2011
C5	Kultur, Individuen	Universität Marburg	1	2002
C6	Kultur, Individuen	Staudengärtnerei Hermannshof	3	2002
C7	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Frankfurt	3	2002
C8	Kultur, Individuen	Medicinal Herb Garden, Washington	1	2002
C9	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Regensburg	3	2002
C11	Kultur, Individuen	Botanischer Garten Wroclaw, Rzepin	3	2002
C15	Kultur, Individuen	Staudengärtnerei Friesland Stauden, Jever	3	2002
WE1	Wildernte, Individuen	S2475	1	-
WE2	Wildernte, Individuen	S8290	1	-
WE3	Wildernte, Individuen	S8293	1	-
WE4	Wildernte, Individuen	S12514	1	-
WE5	Wildernte, Individuen	S13664	1	-
WE6	Wildernte, Individuen	S6535	1	-
WE7	Wildernte, Individuen	S2537	1	-
WE8	Wildernte, Individuen	S2607	1	-
WC1	Wildernte, Charge	Ch. B.: P 280703	1	-
WC2	Wildernte, Charge	Ch. B.: 15312703	1	-
WC3	Wildernte, Charge	Ch. B.: 26453	1	-
FW1	Feine Wurzeln	C9.7 (F1.6)	1	2003
FW2	Feine Wurzeln	C15.2	1	2003
FW3	Feine Wurzeln	C17.2	1	2007
		Summe	48	

Der mittels LC/MS erhaltene dreidimensionale Datensatz (Retentionszeit, Masse und Intensität) wurde mittels Haystack zur einem zweidimensionalen Massenfingerprint (Massenbereiche und deren aufsummierte Intensität) der jeweiligen Proben reduziert (beispielhaft für C1.1 in Abbildung 48). Anschließend wurde dieser Datensatz einer multivariaten, explorativen Auswertung unterzogen, um Muster innerhalb des Probensets zu erkennen.

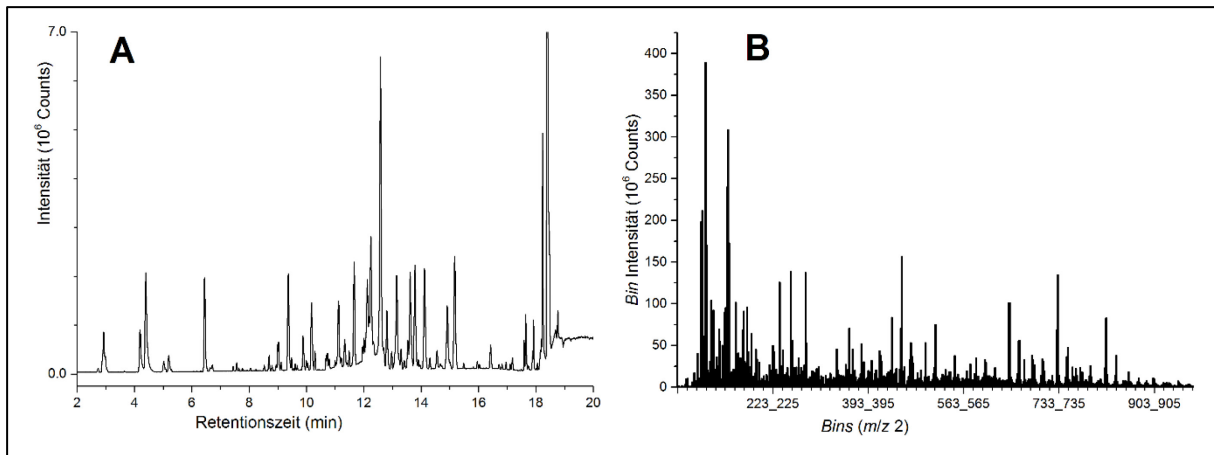


Abbildung 48: Beispiel für eine Bin-Analyse (**B**) eines Datensatzes eines *C. rhizoma* Extrakts (Exemplar C1.1) aus UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS Daten (**A**) im m/z -Bereich 55–1200 Da, Klassenbreite (*bin size*) m/z 2, charakteristischer Fingerabdruck der Massenverteilung im Extrakt (Metabolic Fingerprint) als zweidimensionaler Datensatz für unmittelbare multivariate und statistische Auswertung.

Zunächst wurde das gesamte Probenstet betrachtet (Abbildung 49). Generell war eine deutliche Gruppierung innerhalb des sehr heterogenen Probenstets erkennbar. Die Einzelexemplare aus Wildsammlungen (WH1 bis WH7) bildeten einen separaten Cluster, lediglich WH8 (S2607) gruppierte sich gemeinsam mit dem Klon K3 und dem Exemplar C6.3. Die Gruppe der Einzelexemplare aus Wildsammlungen zeigte die größte Streuung in der PCA. Die geringste Streuung zeigte hier der Klon K3, auch wenn drei der Pflanzen etwas von diesem Cluster abwichen. Die Exemplare aus Kultur in Berlin bildeten ebenfalls eine relativ homogene Gruppe in der PCA, lediglich C3 und C4 wichen hiervon ab und bildeten einen separaten Cluster in der HCA, siehe auch Abbildung 50. Deutlich von den anderen Proben grenzten sich ebenfalls die kommerzielle Handelsware (WC1 bis WC3) und die feinen Wurzeln der in Berlin kultivierten Exemplare C9.7 (F1.6), C15.2 und C17.2 ab.

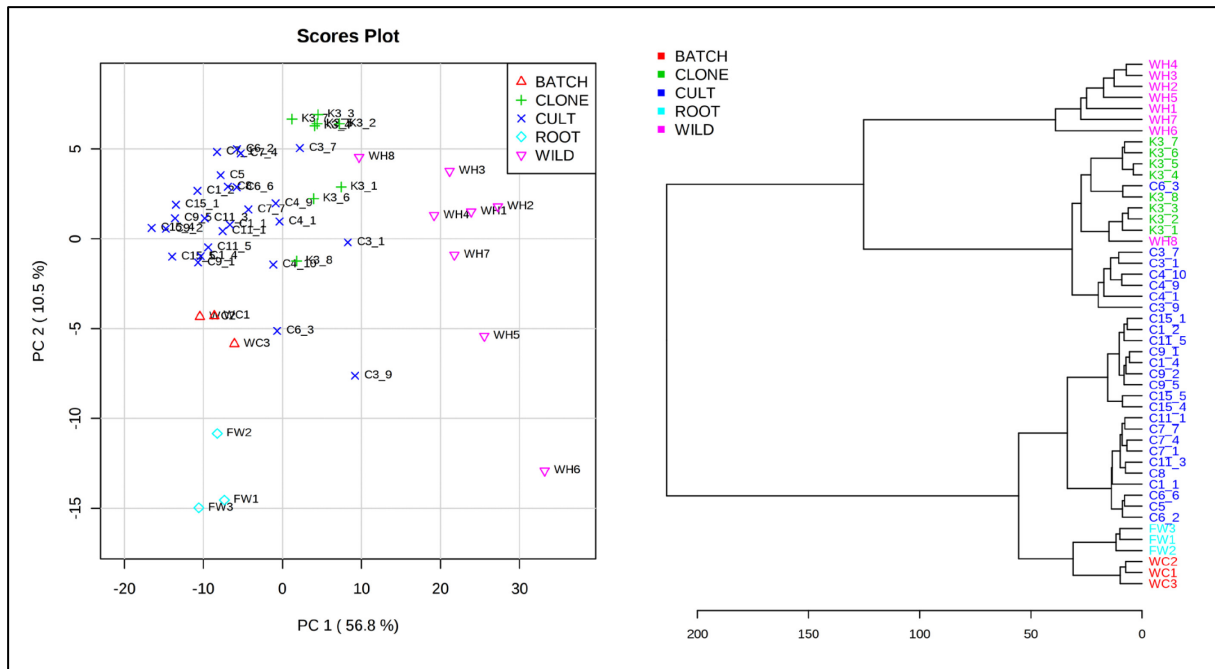


Abbildung 49: Überblick über die mittels LC/MS untersuchten Exemplare von *C. rhizoma*. Dargestellt sind PCA und HCA basierend auf Bin-Daten im Massenbereich von m/z 200–800. Einzelpflanzen aus Wildsammlung (WH) bilden einen separaten Cluster in PCA und HCA, nur WH8 (= S2607) gruppiert sich gemeinsam mit den Exemplaren aus Kultur in Berlin und K3. Die Mischchargen aus Wildsammlung (WC) bilden ebenfalls eine separate Gruppe, abweichend von Einzelpflanzen aus Wildsammlungen, die drei Proben feiner Wurzeln grenzen sich von den übrigen *C. rhizoma*-Proben ab.

Weiterhin wurde das Set der in Berlin kultivierten Exemplare einzeln betrachtet. Die Daten der LC/MS Untersuchungen wurden ebenfalls explorativ mittels PCA und HCA untersucht und durch eine Heatmap dargestellt. Anschließend mittels ANOVA auf signifikante Unterschiede hin untersucht.

Die Heatmap der normierten (Auto-Scaling) massenspektrometrischen Daten der 26 Extrakte von *A. racemosa* Exemplaren aus Berlin (C-Proben) visualisiert anschaulich die Gruppierung in drei große Sub-Cluster (Abbildung 50, links). Dargestellt sind hier die 100 Features (Massenbereiche), die sich innerhalb des Probensatzes am signifikantesten unterscheiden (ANOVA). Die sechs jüngeren Exemplare aus den USA C3 und C4 (gepflanzt 2011) bildeten einen deutlichen Cluster und grenzten sich von den älteren Exemplaren ab. Einige ältere Exemplare aus 2002 (C5 bis C8) bildeten ebenfalls einen separaten Cluster in HCA. Die auch im Jahr 2002 gepflanzten Exemplare C9, C11 und C15 formten hier einen separaten Cluster mit C1 (gepflanzt 2010) und grenzten sich so von den gleichaltrigen Exemplaren ab.

Unter Berücksichtigung des gesamten massenspektrometrischen Fingerprints der Rhizome in einer explorativen Datenanalyse mittels PCA (Abbildung 50, rechts), ohne einer vorherigen Filterung und selektive Auswertung der signifikant unterschiedlichen Bins, bildeten die drei Gruppen keine separaten Cluster.

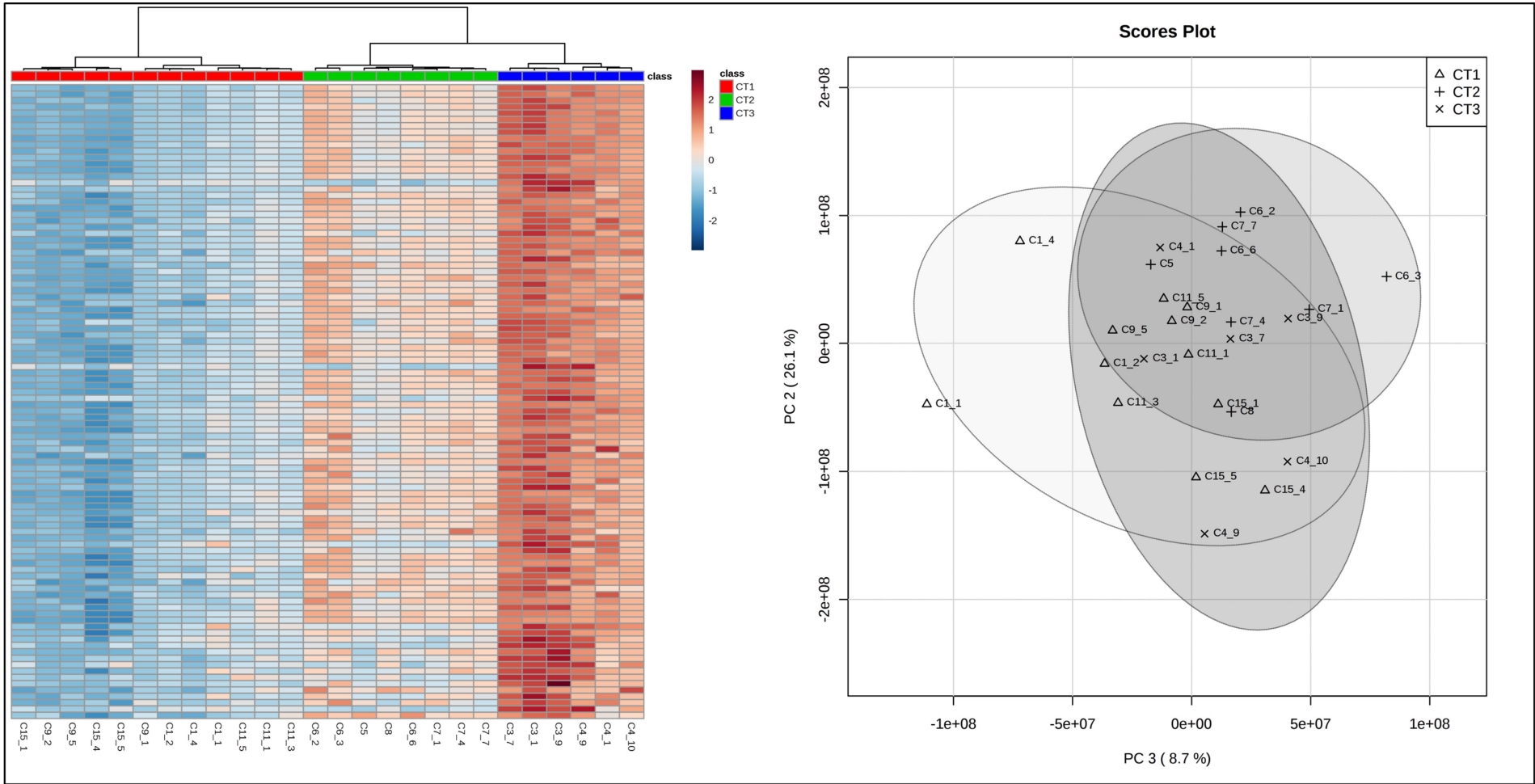


Abbildung 50: Heatmap mit hierarchischer Clusteranalyse (HCA) für potentielle Chemotypen aus Daten einer Bin-Analyse. Die Heatmap und HCA (Wards Algorithmus/quadratisch Euklidische Distanzen) basierend auf den 100 signifikantesten massenspektralen Bins (ANOVA). PCA durchgeführt basierend auf allen Bins im Massenbereich m/z 55–1200 nach Filterung (IQR) mit 95%-CI für die Gruppierung nach HCA. In HCA (links) zeigen sich drei Hauptgruppen, in PCA basierend auf allen Bins ist dieses Clustern nicht reproduzierbar in z.B. PC2 vs. PC3 (rechts).

Für einen Teil der *C. rhizoma* Exemplare aus Berlin, die Klonpflanzen K3 und die aus Wildsammlungen in den USA stammenden Einzelexemplare wurden hochauflösende UPLC/MS^E Analysen durchgeführt. Die Proben wurden für eine Multi-Group-Auswertung in Gruppen unterteilt. Zum einen wurden die drei aus den Bin-Analysen (HCA) resultierten Gruppen untersucht (Abbildung 52). Zum anderen wurden Klonpflanzen, Pflanzen aus Wildsammlung und die Pflanzen aus Berlin gegenübergestellt (Abbildung 53).

In der Abbildung 51 (**A**) ist exemplarisch eine *ion intensity map* des Exemplars C1.1 gezeigt. Hier sind die dreidimensionalen Daten aus LC/MS, Retentionszeit, Masse und Intensität sowie der entsprechende Ladungszustand des Ions dargestellt. Nach dem Alignment der UPLC/MS^E Daten wurden den Peaks (Features), die mindestens zwei Addukte (z. B. [M+Na]⁺ und [M+K]⁺) aufwiesen, neutrale Massen zugeordnet (siehe Abbildung 51 **B**). Anhand der Daten zur Fragmentierung eines Precursor-Ions aus MS^E wurden anschließend potentielle Identifizierungen für das jeweilige Feature mittels online-Datenbanksuche (z. B. PubChem) ermittelt (Daten nicht gezeigt). Alle Features wurden anschließend einer statistischen Auswertung anhand ihrer relativen Veränderung (Fold-Change, FC) in den Gruppen und der Signifikanz (ANOVA) unterzogen. Features mit $FC \geq 2$ und $p \leq 0,05$ wurden dann über eine Softwarefunktion gefiltert, sie repräsentierten die Verbindungen in den Extrakten, die für eine Unterscheidung der jeweiligen Gruppen am hilfreichsten waren. Die relative Intensität dieser Features wurde anschließend für eine explorative Auswertung mittels PCA verwendet.

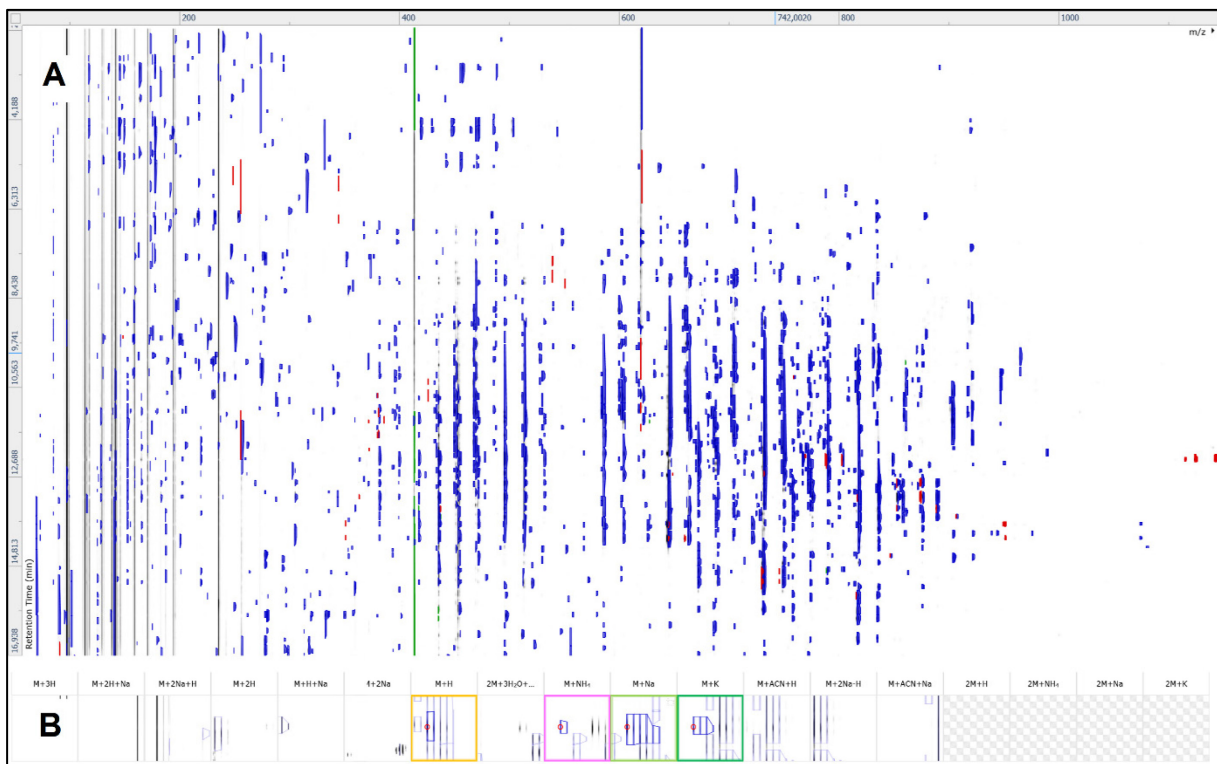


Abbildung 51: *Ion intensity map* (Masse gegen Retentionszeit) eines Extraktes von *C. rhizoma* (**A**), Ladungszustände 1+ (Blau), 2+ (Rot) und 3+ (Grün); sowie Dekonvolution eines Peaks, Zuordnung von Addukten (**B**).

Für die mittels Bin-Analyse gefundenen Gruppen innerhalb der in Berlin kultivierten Exemplare © ergaben sich auch in diesem Fall Cluster. Besonders abzugrenzen waren die Exemplare der Herkünfte C4 und C3 von allen anderen. Die in den Bin-Analysen separat gruppierten Exemplare C11 und C6 lagen in der PCA anhand der UPLC/MS^E Daten mit entsprechender Auswertung nah beieinander. Dennoch ist eine Abgrenzungstendenz zwischen diesen Exemplaren zu erkennen (Abbildung 52).

In der PCA des Multi-Group-Vergleichs von den Klonpflanzen (K3), den Exemplaren aus Wildsammlung (WH) und den Herkünften © ergab sich ebenfalls eine deutliche Gruppierung. Die enge Gruppe der Klonpflanzen zeigt deutlich ihre Homogenität im Vergleich zu den wilden Exemplaren und den Herkünften. Die aus Wildsammlungen stammenden Exemplare ($n = 8$) streuten am stärksten, gefolgt von der größeren Gruppe der in Berlin kultivierten Pflanzen. Anhand der vorher durch ANOVA und FC gefilterten Features lassen sich die drei Gruppen klar voneinander abgrenzen. Dies deutet auf eine prinzipielle Unterschiedlichkeit der Extrakte der Proben hin (Abbildung 53).

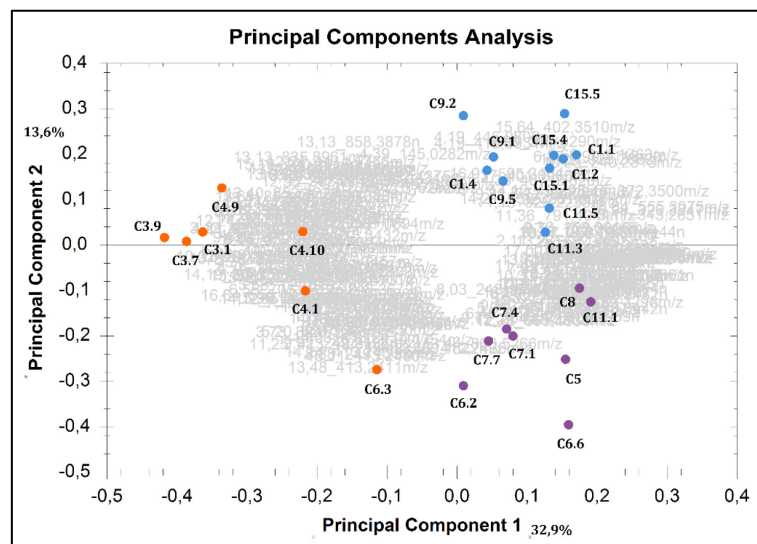


Abbildung 52: Dual-Plot der Hauptkomponentenanalyse (Loadings, grau und Scores), generiert aus hochauflösenden LC/MS^E Daten basierend auf Features, die in den potentiellen Chemotypen in signifikant unterschiedlichen Mengen auftreten (*relative abundance*; $p \leq 0,05$, ANOVA; Fold-Change FC ≥ 2).

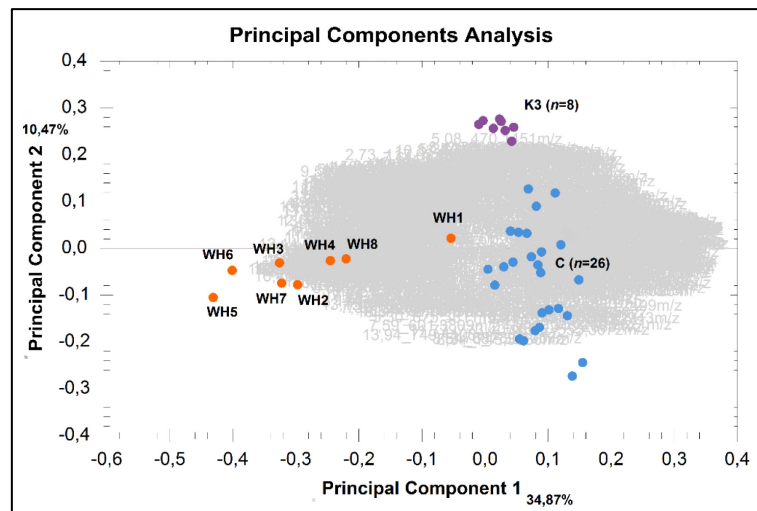


Abbildung 53: Dual-Plot (Loadings, grau und Scores) der Hauptkomponentenanalyse von 42 Exemplaren von *C. rhizoma* basierend auf UPLC/MS^E Daten ausgehend von Features/Peaks ($n = 938$), welche signifikant unterschiedlich in den Gruppen auftreten (*relative abundance*; $p \leq 0,05$, ANOVA; Fold-Change $FC \geq 2$).

3.2 Identifizierung von *Cimicifugae rhizoma*

Wie bereits in der Einleitung im Abschnitt 1.4 beschrieben, stellt im Bereich der Qualitätskontrolle von pflanzlichen Arzneimitteln die Identifizierung und Authentifizierung von Arzneidrogen eine besondere analytische Herausforderung dar. Besonders die dabei auftretende Vielfalt der verschiedenen Formen von pflanzlichen Materialien, wie beispielsweise die Rohdroge, zerkleinertes oder gemahlenes Pflanzenmaterial und verschiedenste Extrakte, erzeugen eine hohe Komplexität.

Im Europäischen Rahmen (Arzneibuchanalytik) jedoch, wird in der Regel von der jeweiligen Rohdroge ausgegangen und eine Identifizierung mittels makroskopischer, mikroskopischer und gut etablierten, instrumentell-analytischen Methoden wie der TLC ist möglich. Trotzdem sind solche Prüfungen meist zeit- und personalaufwändig und bedürfen, vor allem in Bezug auf die mikroskopische Identifizierung, spezielle Fähigkeiten und Fachwissen. Man strebt daher nach Methoden, die schnell, einfach und ohne großen technischen Aufwand den vorgesehenen Zweck erfüllen können. Wie bereits unter den Abschnitten der Einleitung 1.4 und 1.5 beschrieben, ist dabei besonders die Kopplung von etablierten analytischen Verfahren wie UVS, LC oder NIRS mit multivariaten Modellen interessant, mit denen nach entsprechender Kalibrierung unbekannte Proben charakterisiert werden können. Die vielversprechendste Variante ist sicherlich die NIRS, da diese nach einem Mahlen der Droge ohne weitere Probenvorbereitung auskommt und daher besonders ressourcen- und zeitsparend ist. Die LC und die UVS sind klassische, robuste Verfahren, die ohnehin in jedem analytischen Labor zu finden und im Hinblick auf ihre Komplexität und Anschaffungs-, sowie Unterhaltungskosten überschaubar sind.

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich eine Prüfung auf Identität und Substitution von *C. rhizoma* analog zu den Monografien in Arzneibüchern mit diesen alternativen Methoden realisieren lässt. Als potentielle (siehe Abschnitt 1.1) Verfälschungen werden in der Literatur nah verwandte *Actaea* spp. beschrieben. Vor allem sind hier die nordamerikanischen Arten relevant, da sie zum Teil dasselbe Habitat haben. *C. rhizoma* wird aber zunehmend auch mit den asiatischen Arten substituiert, da sie aufgrund ihrer Verwendung in der TCM („Sheng Ma“) ebenfalls gehandelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Spezies *A. cordifolia*, *A. simplex*, *A. dahurica*, *A. cimicifuga* und *A. racoleifolia* untersucht (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Probenliste für die Versuche zur Identifizierung von *C. rhizoma* und zur Abgrenzung anderer *Actaea* spp. Nur verwendet in Versuchen zu LC/DAD (^A) bzw. nur in LC/DAD und NIRS (^B) Mischung mehrerer Pflanzen (^C) und Handelsware (^D). Ggfs. wurden Teile einiger Mischproben getrennt gemahlen, um die Probenzahl zu erhöhen. Für die verschiedenen Versuche zu UV/LDA, LC/DAD und NIRS wurden u. U. abweichende Probenzahlen berücksichtigt.

ID	<i>Actaea</i> sp.	Herkunft	Anzahl
C1 bis 17	<i>A. racemosa</i>	Kultur in Berlin, je 1 Probe pro Herkunft (Tabelle 1)	17
WH1 bis 8	<i>A. racemosa</i>	Einzelpflanzen, Wildsammlungen USA	8 ^A
WC1 bis 6	<i>A. racemosa</i>	Großhandelsware, Wildsammlungen USA	6 ^{B, D}
F1	<i>A. cimicifuga</i>	Arboretum Berlin	1
F2	<i>A. cimicifuga</i>	Botanischer Garten Universität Ulm	4 ^C
F3	<i>A. cimicifuga</i>	Bot. Garten Poznan, Polen	4 ^C
F4	<i>A. cimicifuga</i>	Bot. Garten Tartu, Estland	3 ^C
F5	<i>A. cimicifuga</i>	Bot. Garten Lublin, Polen	3 ^C
R1	<i>A. cordifolia</i>	Bot. Garten Uni Frankfurt, Main	1
R2	<i>A. cordifolia</i>	Bot. Garten Brno, Czech Republik	3 ^C
R3	<i>A. cordifolia</i>	Bot. Garten Universität Tübingen	4 ^C
R4	<i>A. cordifolia</i>	Bot. Garten Lublin, Polen	2 ^C
S1	<i>A. simplex</i>	Staudengärtnerei Baltin	1
S2	<i>A. simplex</i>	Staudengärtnerei Baltin	3 ^C
S3	<i>A. simplex</i>	Staudengärtnerei Gaismayer	4 ^C
S4	<i>A. simplex</i>	Staudengärtnerei Sarastro-Stauden	2 ^C
D1	<i>A. dahurica</i>	Bot. Garten Moskau (als Pflanze)	1
D2	Unbek. <i>Actaea</i> sp.	Staudengärtnerei Friesland-Stauden	1 ^C
H1	<i>A. heracleifolia</i>	Apotheke, München	1 ^D
H2	<i>A. heracleifolia</i>	HerbaSinica Hilsdorf GmbH Ch. B. 14101H010	10 ^D
H3	<i>A. heracleifolia</i>	Apotheke, Berlin	1 ^D
		Summe	66

3.2.1 Identifizierung mittels UVS/LDA

Die Eignung der UV/VIS-Spektroskopie als alternative Methode zur Identitätsprüfung und als Test auf Substitution von *Cimicifugae rhizoma* wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dazu insgesamt 66 Proben verschiedener *Actaea* spp. je dreifach extrahiert ($n = 3$) und UV-Spektren der resultierenden Extrakte im Bereich von 220–400 nm aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Erstellung von Klassifizierungsmodellen mittels einer Linearen Diskriminanzanalyse (LDA). Diese Modelle zur Vorhersage der Spezies-Zugehörigkeit von *Actaea*-Extrakten wurden anschließend durch einen Permutation-Test und eine fünffache Test-Set-Validierung überprüft.

Die UV-Absorptionsspektren der *Actaea*-Spezies sind durch ein Maximum bei 325–330 nm mit einer Schulter bei 285–290 nm *et vice versa* charakterisiert (Abbildung 54). Verantwortlich für die Absorption sind vor allem die Polyphenole in den Extrakten. Die Gestalt der Spektren wird durch den unterschiedlichen Gehalt der individuellen Verbindungen beeinflusst. Diese Muster an Polyphenolen sind speziesspezifisch und wurden bereits für eine Unterscheidung der verschiedenen *Actaea* spp. verwendet [94,163].

Die insgesamt höchste UV-Absorption zeigte *A. cimicifuga*, während die Spektren der untersuchten Exemplare von *A. simplex* die stärkste Variabilität im Hinblick auf die Quantität der Absorption aufwiesen. Die UV-Spektren von *A. cordifolia*, *A. heracleifolia* und *A. racemosa* waren sich sehr ähnlich, *A. heracleifolia* weist allerdings ein Absorptionsmaximum bei 285–290 nm auf wie oben beschrieben.

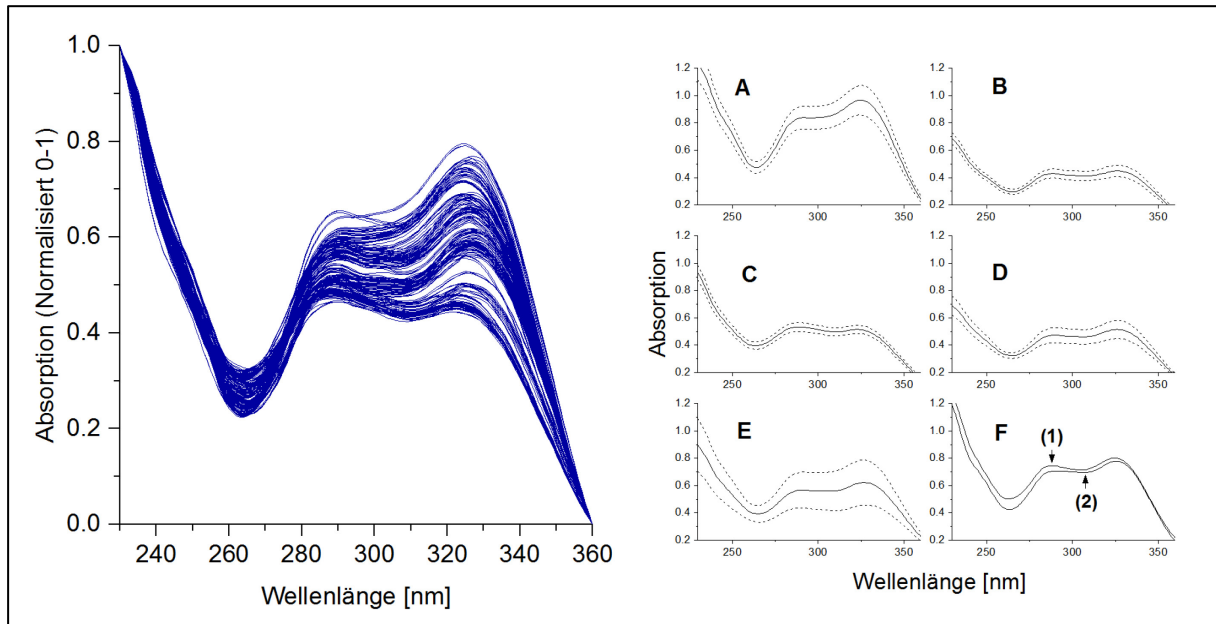


Abbildung 54: UV-Absorptionsspektren der Proben verschiedener *Actaea* spp. ($n = 66$), min-max-normalisierte Spektren aller Exemplare (links) und unbearbeitete Mittelwertspektren (\pm SD, gestrichelte Linien) der einzelnen untersuchten *Actaea* spp. im Absorptionsbereich 0,2–1,2; *A. cimicifuga* (A), *A. cordifolia* (B), *A. heracleifolia* (C), *A. racemosa* (D), *A. simplex* (E) und Beispielspektren für eine unbekannte *Actaea* sp. (F1) und *A. dahurica* (F2). Modifiziert nach Bittner *et al.* 2016 [164].

Zur explorativen Datenanalyse der dreifach extrahierten und gemessenen Proben ($n = 66$) wurde eine PCA durchgeführt. Hier waren eindeutig Cluster der verschiedenen Spezies zu erkennen, zum Teil jedoch mit Überlappungen. Besonders die sehr ähnliche UV-Spektren aufweisenden Spezies *A. racemosa*, *A. cordifolia* und *A. simplex* waren in der PCA nicht vollständig zu unterscheiden, insgesamt sind die Unterschiede in den verschiedenen Spezies jedoch klar zu erkennen. Die Triplikate der unbekanntes *Actaea* sp. und von *A. dahurica* wurden ebenfalls mit in die PCA einbezogen und zeigten deutliche Abweichungen vom *A. racemosa*-Cluster. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch diese Arten erfolgreich in ein zukünftiges Klassifizierungsmodell miteinbezogen werden können.

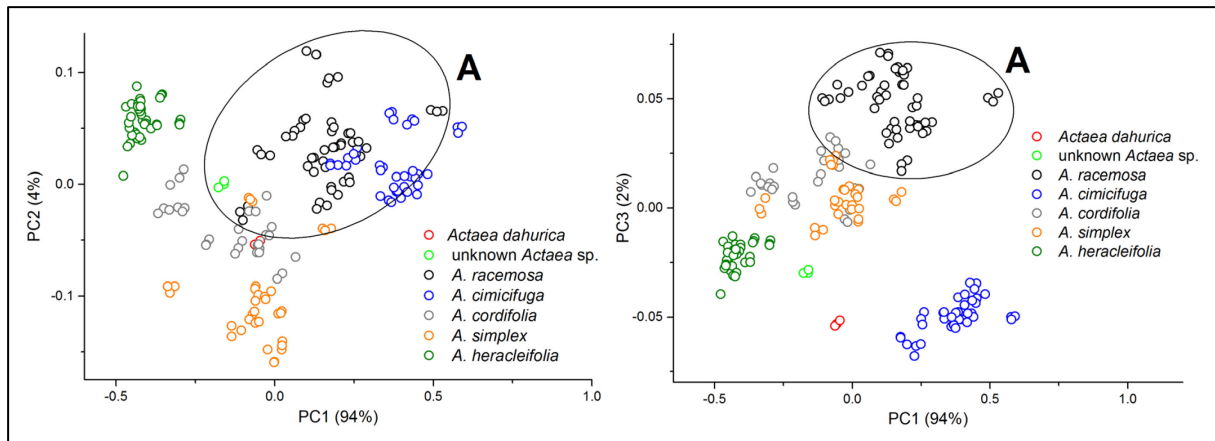


Abbildung 55: PCA der UV-Absorptionsspektren verschiedener *Actaea* spp.; PC1 vs. PC2 (links) und PC1 vs. PC3 (rechts), Clusterbildung der unterschiedlichen Arten.

Zur Prüfung der Validität eines LDA-Modells zur Vorhersage der Spezieszugehörigkeit einer unbekannt Probe wurden eine fünffache Test-Set-Validierung und ein Permutation-Test durchgeführt (Abbildung 56 **A**). Letzterer Test führte zu einer Fehlerrate (*leave-one-out*-Kreuzvalidierung) von 0,800 (80,0 %). Dies zeigte, dass ein Modell basierend auf zufällig zugeordneten Gruppenzugehörigkeiten (*Actaea* spp.) deutlich schlechter funktionierte, als jene mit korrekt zugeordneten Daten. Innerhalb der fünffachen Test-Set-Validierung wurde keine der 192 Proben (64 Triplikate der *Actaea* spp.) falsch klassifiziert (*canonical score plot* exemplarisch für Test-Set 01 in Abbildung 56 **B**). Die entsprechende Konfusionsmatrix ist in Tabelle 13 dargestellt. Hier wurden die Ergebnisse der fünf Test-Sets aufsummiert und im Gesamten dargestellt. Damit zeigte das UV/LDA Klassifizierungsmodell eine Fehlerrate von 0,000 (0,0 %).

Tabelle 13: Konfusionsmatrix für Ergebnisse der fünffachen Test-Set-Validierung (UVS/LDA); jede Probe (Triplikate) war genau einmal in einem Test-Set, die Vorhersagen der LDA für die jeweilige Spezieszugehörigkeit wurden aufsummiert und in der Matrix im Gesamten dargestellt.

Test-Sets 01 bis 05		Vorhergesagte Spezies					Gesamt	Fehlerrate
		<i>A. racemosa</i>	<i>A. cimicifuga</i>	<i>A. cordifolia</i>	<i>A. simplex</i>	<i>A. heracleifolia</i>		
Wahre Spezies	<i>A. racemosa</i>	51	0	0	0	0	51	0.0%
	<i>A. cimicifuga</i>	0	39	0	0	0	39	0.0%
	<i>A. cordifolia</i>	0	0	30	0	0	30	0.0%
	<i>A. simplex</i>	0	0	0	33	0	33	0.0%
	<i>A. heracleifolia</i>	0	0	0	0	39	39	0.0%
Gesamt		51	39	30	33	39	192	0.0%

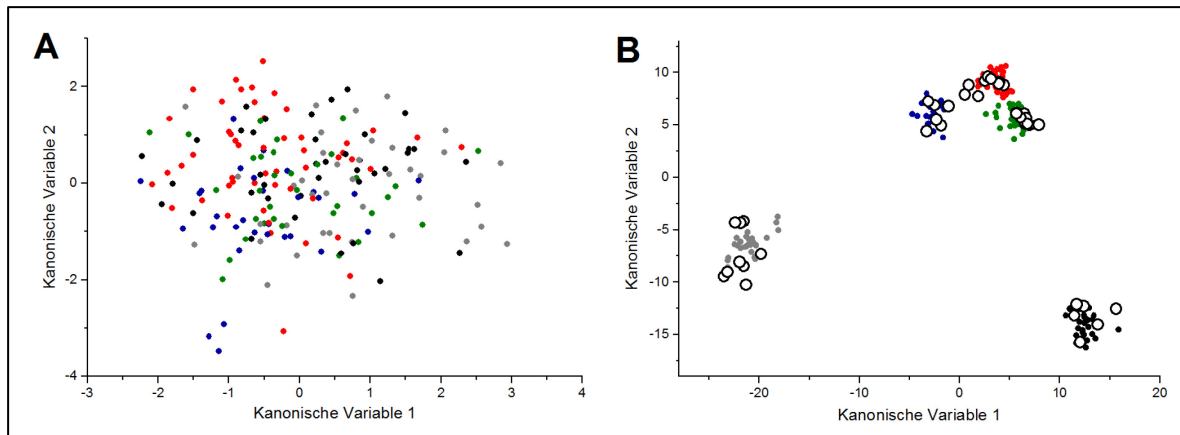


Abbildung 56: Ergebnisse für Validierung der Vorhersagemodelle (Lineare Diskriminanzanalyse, LDA) für die Spezieszugehörigkeit, Permutationstest (**A**) und exemplarische Darstellung der Test-Set-Validierung (*canonical score plot* von Test-Set 01, **B**). Jeweils 20% der Proben wurden als Test-Set verwendet bis alle Proben (Triplikate) einmal im Test-Set waren (fünffache Test-Set-Validierung); *A. racemosa* (Rot), *A. heracleifolia* (Schwarz), *A. cimicifuga* (Grau), *A. simplex* (Grün) und *A. cordifolia* (Blau), Test-Set 01 schwarze Kreise.

3.2.2 Identifizierung anhand von Polyphenol-Mustern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine LC/DAD Methode zur Quantifizierung von Polyphenolen in *C. rhizoma* entwickelt. Ob diese Methode auch geeignet ist, um verschiedene andere *Actaea* spp. von *A. racemosa* abzugrenzen, wurde ebenfalls untersucht [163]. Die LC/DAD Fingerprints der verschiedenen *Actaea* spp. unterschieden sich deutlich. Die polyphenolischen Ester Fukinolsäure (**4**) und die Cimicifugasäuren A–F (**5–9**) sowie ihre Vorläufer/Hydrolyseprodukte Kaffeesäure (**1**) und (Iso-)Ferulasäure (**2** und **3**) treten in *Actaea*-Rhizomen in bestimmten Verhältnissen auf. Diese Verhältnisse erwiesen sich im Rahmen des untersuchten Probensatzes als charakteristisch für die jeweilige Art.

Die Arten *Actaea cimicifuga*, *A. cordifolia* und *A. simplex* zeigten sehr geringe Gehalte an Isoferulasäure (**3**) und den daraus abgeleiteten Polyphenolen Cimicifugasäure B (**7**) und Cimicifugasäure F (**9**), siehe Abbildung 57 **E**, **F** und **G**. Im Gegensatz dazu waren die asiatischen Spezies *A. dahurica* und *A. heracleifolia* durch besonders hohe Gehalte an Polyphenolen **3**, **7** und **9** gekennzeichnet. Die Cimicifugasäure D (**5**) – kaum zu finden in *A. racemosa* – wurde in größeren Mengen in *A. cordifolia* und den asiatischen *Actaea* spp. zu gefunden. Die Fukinolsäure (**4**) – eine der Hauptkomponenten von *A. racemosa* – kam in verhältnismäßig deutlich geringerem Umfang in *A. dahurica* und *A. heracleifolia* vor.

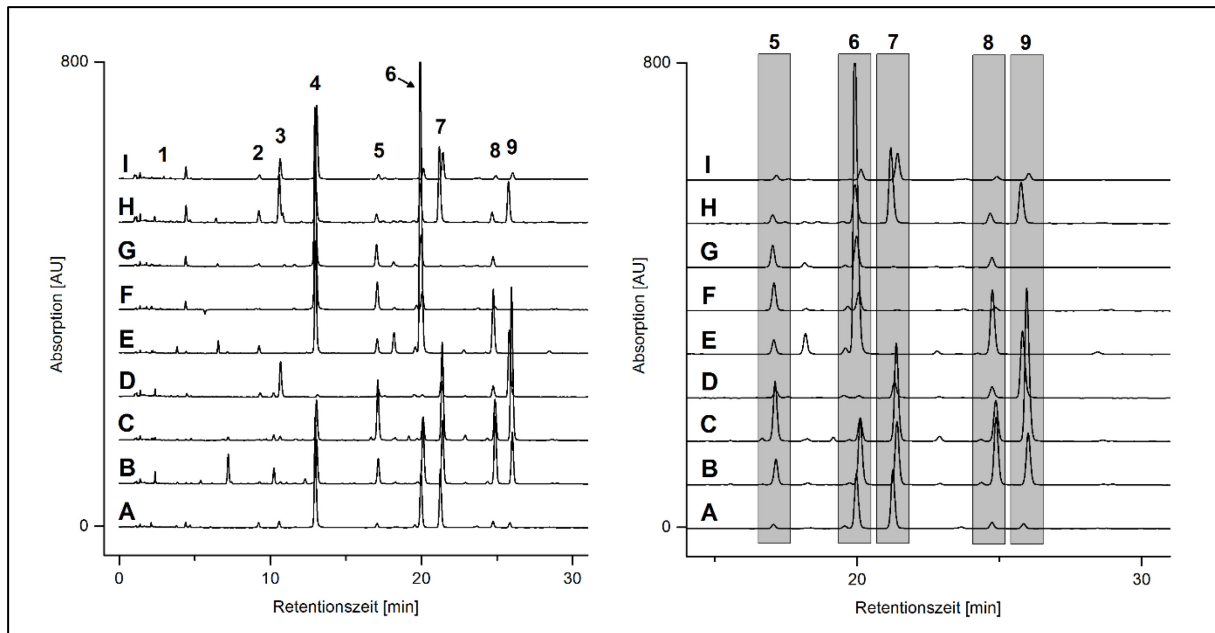


Abbildung 57: Charakteristische Chromatogramme aus LC/DAD (UV 327±4 nm) für verschiedene *Actaea* spp., *A. racemosa* aus Berlin (**A**) und aus Wildsammlung (**I**), unbekannte *Actaea* sp. (**B**), *A. dahurica* (**C**), *A. heracleifolia* (**D**, **H**), *A. cimicifuga* ©, *A. simplex* (**F**) und *A. cordifolia* (**G**).

Das charakteristische Muster der Polyphenole in *A. racemosa* ist gekennzeichnet durch ein spezifisches quantitatives und relatives Verhältnis zueinander. Dieses Verhältnis war konstant, unabhängig von der Herkunft einer Pflanze bzw. einer Probe. Deutlich wurde dies in einer PCA (PC1 vs. PC3, Abbildung 58) unter Verwendung der Daten für Polyphenole (**5–9**). Hier bildeten die Einzelexemplare aus Wildsammlungen und Kultur jeweils einen gemeinsamen Cluster mit der Handelsware aus Wildsammlungen (Mischchargen). Die anderen *Actaea* spp. grenzten sich hier deutlich von *A. racemosa* ab. Im Loadingsplot (Abbildung 58 links) wird deutlich, dass vor allem Unterschiede in Cimicifugasäure A, D und F zur Unterscheidung beitragen, aber auch besonders geringe Gehalte an Cimicifugasäuren B und F.

Die Hauptkomponente 2 (PC2) trug vor allem zur Trennung von *A. heracleifolia* („Sheng Ma“) und *A. racemosa* bei. In einem entsprechenden Scoresplot sind beide Spezies deutlich separiert (Abbildung 59). Je nach Herkunft der „Sheng Ma“-Probe bildeten sich allerdings zwei getrennte Cluster. Dem dazugehörigen Loadingsplot ist zu entnehmen, dass hier vor allem der Gehalt an Cimicifugasäure F (**9**) zur Unterscheidung beiträgt.

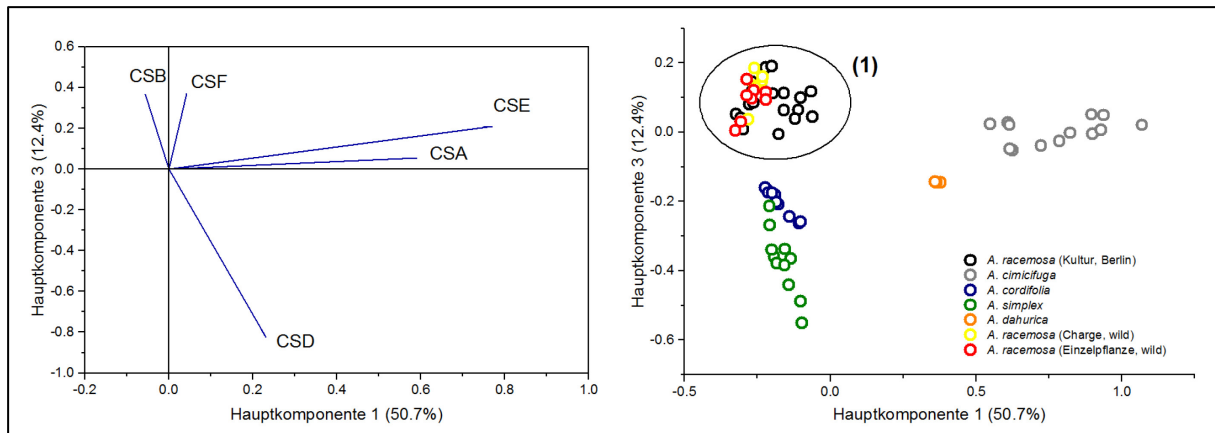


Abbildung 58: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der quantitativen Daten aus LC/DAD für verschiedene *Actaea* spp. nach Normalisierung, PC1 und PC3. Loadings der Cimicifugasäuren A–F (**5–9**, links) und Lage der *Actaea* spp. gemäß ihren Gehalten der verschiedenen Polyphenole. Cluster verschiedener *C. rhizoma* Proben (**1**), davon abweichend die anderen *Actaea* spp.

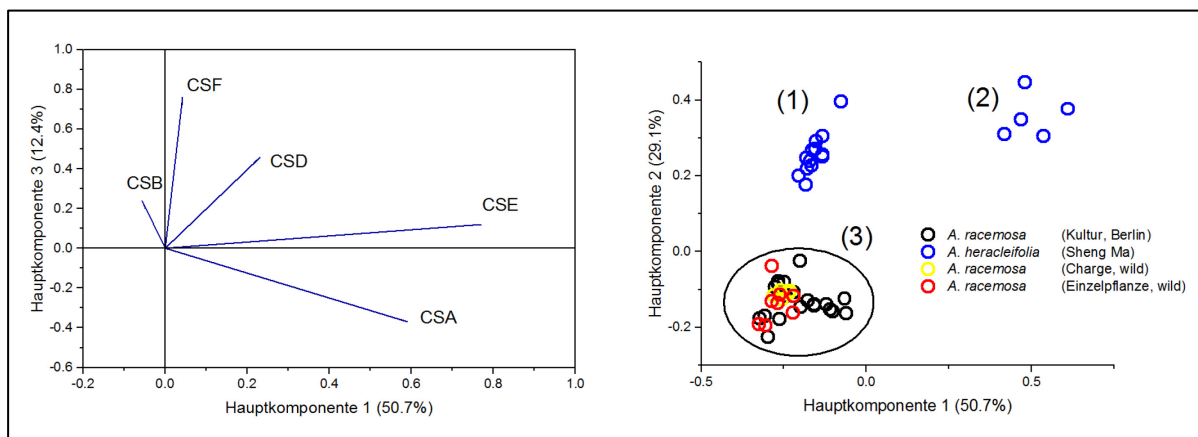


Abbildung 59. Hauptkomponentenanalyse (PCA) der quantitativen Daten aus LC/DAD für *A. racemosa* und *A. heracleifolia* nach Normalisierung, PC1 und PC2. Loadings der Cimicifugasäuren A–F (**5–9**, links) und Lage der *Actaea* spp. gemäß ihren Gehalten der verschiedenen Polyphenole. Cluster verschiedener *C. rhizoma* Proben (**3**), davon abweichend *A. heracleifolia* (Sheng Ma) aus einer Apotheke in München (**2**) bzw. in Berlin und von HerbaSinica (**1**).

3.2.3 Identifizierung mittels NIR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Prüfung von *C. rhizoma* auf Identität und Substitution mit anderen *Actaea* spp. mittels NIR-Spektroskopie prinzipiell möglich ist. Dazu wurden NIR-Spektren von Rhizomproben von fünf verschiedenen *Actaea* spp. aufgenommen und mittels PCA untersucht ($n = 78$). Zu den in Berlin kultivierten Exemplaren von Einzelpflanzen kamen noch Mischchargen von *A. heracleifolia* („Sheng Ma“) und fünf Mischchargen von *C. rhizoma* aus Wildsammlung hinzu.

Die NIR-Rohspektren der verschiedenen *Actaea* spp. zeigten große Ähnlichkeit und waren visuell nicht voneinander zu unterscheiden (Abbildung 60). Die Spektren zeigten eine Absorption in verschiedenen Wellenzahlbereichen wie beispielsweise der ersten O-H-Oberschwingung (6.900 cm^{-1}) oder der ersten Aryl-C-H-Oberschwingung (6.300 cm^{-1}). Zu beiden können potentiell die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polyphenole beitragen, aber auch u. a. Lignin oder Cellulosen (nur O-H-Oberschwingung). Den Polyphenolen und dem Lignin ist auch die zweite Oberschwingung der C-O-Doppelbindung zuzuordnen. Ebenso werden die Kombinationsschwingungen wie beispielsweise von C-H-Bindungen (4.300 cm^{-1}) oder O-H-Bindungen (4.700 cm^{-1}) beobachtet.

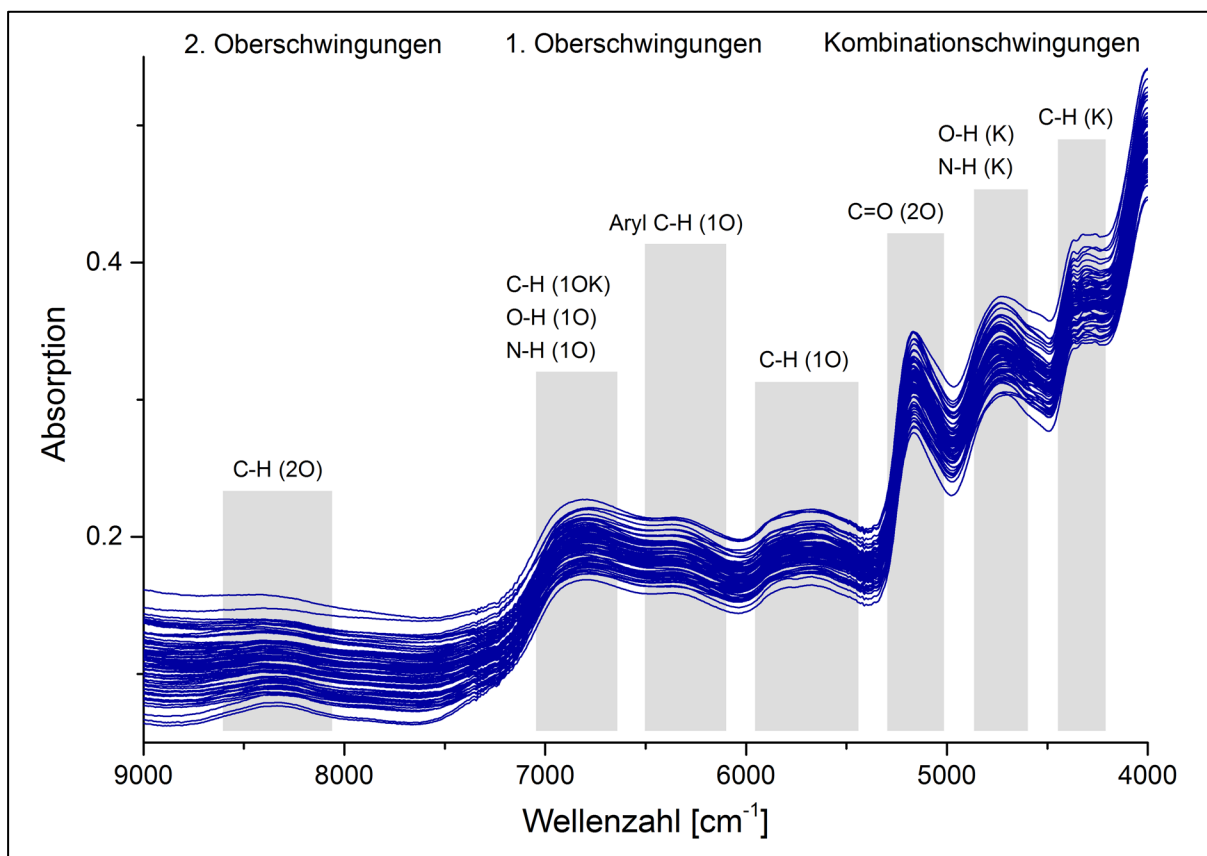


Abbildung 60: NIR-Rohspektren von Rhizomen (gepulvert $\leq 200\ \mu\text{m}$) der verschiedenen *Actaea* spp. im Wellenzahlbereich $4.000\text{--}9.000\text{ cm}^{-1}$ ($n = 78$). Charakteristische Bereiche von Ober- und Kombinationsschwingungen sind grau hinterlegt (K = Kombinationsschwingung, 1O, 2O = 1. und 2. Oberschwingung, 1OK = 1. Oberschwingung der Kombinationsschwingung).

Zur Abgrenzung der verschiedenen Arten wurde eine multivariate Auswertung der NIR-Spektren mittels PCA und HCA (letztere gezeigt in Bittner *et al.* 2017. [165]) vorgenommen. Verschiedene Datenvorbehandlungen und Wellenzahlbereiche wurden getestet, wobei sich die 1. Ableitung der Spektren in Verbindung mit einer Standardvektornormalisierung (SVN) im Wellenzahlbereich $3.870\text{--}7.330\text{ cm}^{-1}$ als geeignet für eine Unterscheidung der Arten und eine Abgrenzung von *A. racemosa* von anderen *Actaea* spp. erwies. In Abbildung 61 sind entsprechende Mittelwertspektren der verschiedenen Arten dargestellt. Die Ableitungsspektren zeigen noch immer eine große Ähnlichkeit, Unterschiede sind jedoch zu erkennen. Diese sind beispielhaft mit Pfeilen dargestellt.

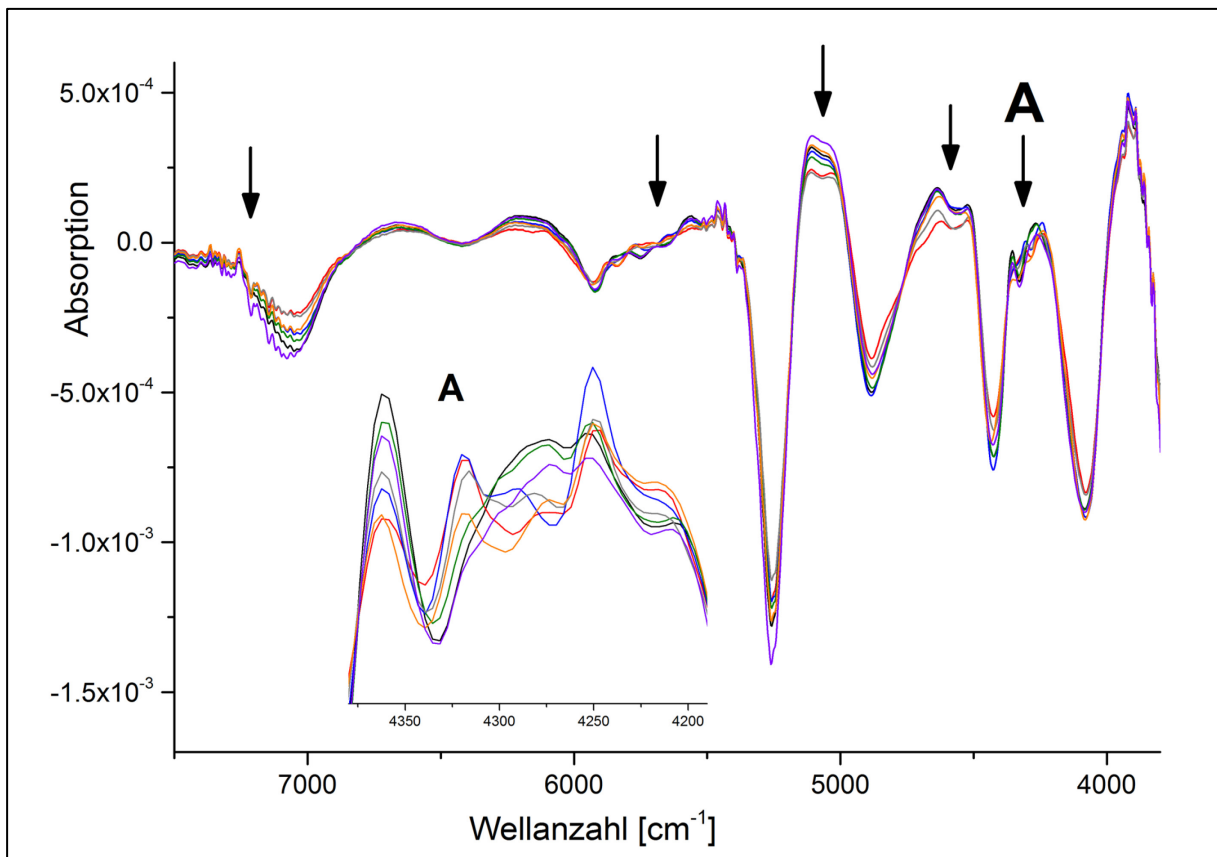


Abbildung 61: NIR-Mittelwertspektren (1. Ableitung, Savitzky-Golay-Algorithmus mit elf Glättungspunkten) der verschiedenen *Actaea* spp. im Wellenzahlbereich von $3.870\text{--}7.330\text{ cm}^{-1}$. *A. racemosa* aus Kultur (schwarz), *A. racemosa* aus Wildsammlungen (violett), *A. dahurica* (rot), *A. cimicifuga* (blau), *A. cordifolia* (grün) und *A. simplex* (grau), sowie *A. heracleifolia* (orange). Charakteristische Bereiche im Ableitungsspektrum, die potentiell zur Unterscheidung der Spezies beitragen, sind mit Pfeilen markiert. Der Ausschnitt $4.180\text{--}4.380\text{ cm}^{-1}$ ist exemplarisch vergrößert dargestellt (**A**).

Vor allem die asiatischen *Actaea* spp. *A. cimicifuga*, *A. dahurica*, *A. heracleifolia* und *A. simplex* ließen sich anhand ihrer NIR-Spektren in der PCA eindeutig von *C. rhizoma* unterscheiden (Abbildung 62). Die Art *A. cordifolia*, wie *A. racemosa* aus Nordamerika stammend, ließ sich im Rahmen dieser Untersuchungen nicht einwandfrei von letzterer abgrenzen und bildete einen gemeinsamen Cluster in der PCA (PC1 vs. PC2).

Die fünf mit einbezogenen Chargen von *C. rhizoma* aus Wildsammlungen clustern deutlich separat von allen anderen *Actaea*-Proben. Ebenfalls grenzen sich Ihre NIR-Spektren deutlich von denen der in Berlin kultivierten Exemplare ab. Vermutlich führen die bereits in den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3.1 gezeigten quantitativen Unterschiede im Inhaltsstoffmuster dieser beiden Gruppen zur hier beobachteten Clusterung.

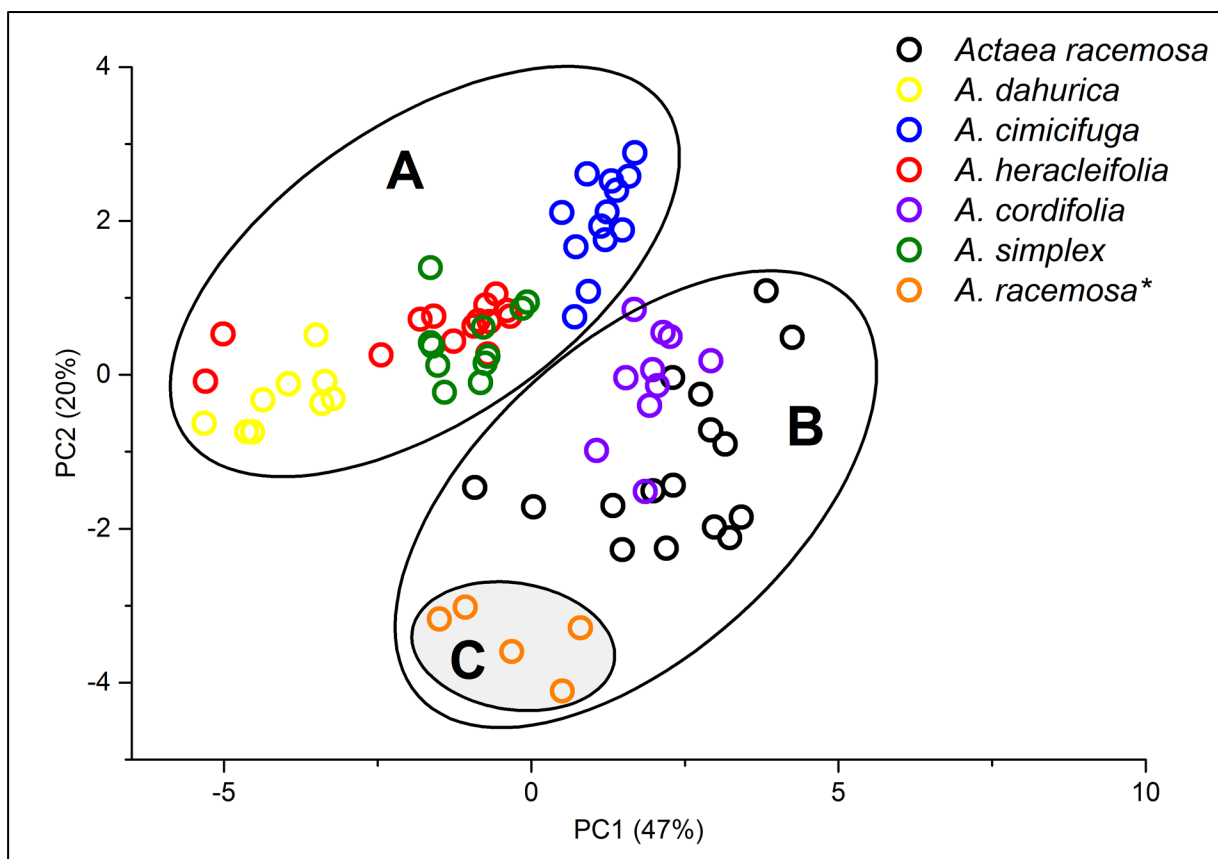


Abbildung 62: PCA der NIR-Spektren ($n = 78$) verschiedener *Actaea* spp., die Exemplare von *A. racemosa* clustern gemeinsam mit den Exemplaren der nordamerikanischen Art *A. cordifolia* (B), die kommerziellen Mischchargen (*) aus Wildsammlung grenzen sich dabei deutlich ab (C), alle asiatischen *Actaea* spp. (A) sind klar von den nordamerikanischen abzugrenzen (1. Ableitung, Savitzky-Golay-Algorithmus mit elf Glättungspunkten, SNV, Wellenzahlbereich $3.870\text{--}7.330\text{ cm}^{-1}$).

3.3 Quantitative Schwingungsspektroskopie

3.3.1 FT-Raman-Spektroskopie

Von aus pulverisiertem Pflanzenmaterial (*C. rhizoma*, $\leq 200 \mu\text{m}$) hergestellten Presslingen wurden testweise am FT-Raman-Spektrometer Spektren aufgenommen. In diesen Spektren traten keine oder nur sehr schwach erkennbare Raman-Banden auf. Begründet liegt dies vor allem in der Verholzung des Wurzelmaterials. Das enthaltene Lignin weist eine starke Eigenfluoreszenz auf. Diese Fluoreszenz unterdrückt bzw. überdeckt alle anderen Signale, besonders auch die der strukturell auf Kaffeesäure aufgebauten Polyphenole. Bei einer geringen Laserenergie von etwa 5 mW konnten Raman-Spektren aufgenommen werden, die genannte Eigenfluoreszenz des Materials ließ aber keine Deutung von Raman-Banden zu (Abbildung 63 rechts).

Eine Möglichkeit die auftretenden Raman-Banden zu verstärken, ist eine Erhöhung der Anregungslaser-Intensität. Dies hat allerdings einen sehr hohen Energieeintrag in die Probe zur Folge und besonders farbige Materialien (starke Lichtabsorption) neigen dann zur Verbrennung. Auch im Falle von *C. rhizoma* führte eine Erhöhung der Laserenergie auf etwa 50 mW zu einer Verbrennung der Probe (Abbildung 63 links). Daher konnte eine Analyse des Probensatzes mit FT-Raman-Spektroskopie nicht weiter verfolgt werden.

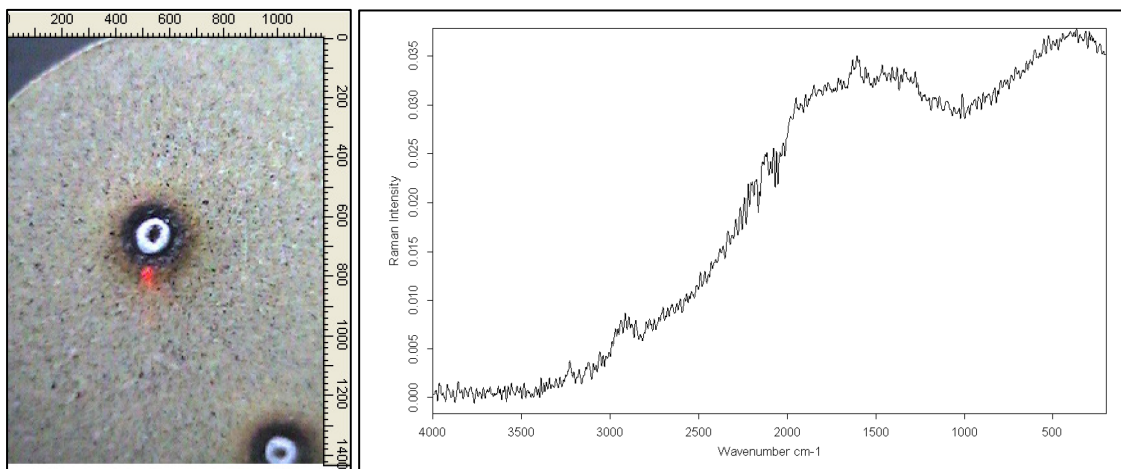


Abbildung 63: Kameraaufnahme des Presslings aus pulverisiertem Pflanzenmaterial nach Anregung mit Laserlicht (1.064 nm, 50 mW Energie) zur Aufnahme von Raman-Spektren (links) und Raman-Spektrum eines Presslings aus pulverisiertem Pflanzenmaterial, gemessen nach Anregung mit Laserlicht (1.064 nm, 5 mW, rechts).

3.3.2 FT-NIR-Spektroskopie

Eine Prüfung auf pharmazeutische Qualität von Arzneidrogen beinhaltet stets auch eine Quantifizierung (Assay) von wertbestimmenden Inhaltsstoffen, meist mittels chromatografischen Verfahren wie LC oder GC. In den Monografien zu *C. rhizoma* der Arzneibücher Ph. Eur. und USP werden Triterpenglykoside bestimmt, aber auch die zweite Hauptinhaltsstoffgruppe der Polyphenole kann von analytischer Bedeutung sein. Gerade für die Routineanalytik im Rahmen industrieller Arzneimittelherstellung stellen diese quantitativen Prüfungen mittels LC zeit- und kostenintensive Schritte dar. So ist die entsprechende Laufzeit der LC sehr lang und beträgt zwischen 85 min (USP) und über 44 min (Ph. Eur.).

Wäre es möglich, Inhaltsstoffe direkt am gepulverten Rhizom zu bestimmen, würde dies den präparativen Aufwand der Probenvorbereitung erheblich verringern. Darüber hinaus beträgt die Messzeit in der NIR-Spektroskopie üblicherweise weniger als eine Minute. Damit stellt sie eine relativ schnelle Analysemethode dar. Nichtsdestotrotz ist für die Entwicklung von quantitativen Vorhersagemodellen zunächst eine Kalibrierung und Validierung mit Referenzdaten nötig. Demnach ist es unerlässlich, zumindest einen Teil der Proben auch mittels nasschemischer Analyseverfahren zu untersuchen.

Ob eine solche Quantifizierung von Inhaltsstoffen in *C. rhizoma* mittels NIR-Spektroskopie generell möglich ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Es wurden zu diesem Zweck FT-NIR-Spektren für einen Probensatz von *C. rhizoma* ($n = 163$) aufgenommen (Abbildung 64). Der Gehalt an Polyphenolen (**4–9**) und Triterpenglykosiden (**10–21**) wurde im Probensatz bestehend aus Klonpflanzen ($n = 56$), Pflanzen verschiedener Herkunft ($n = 101$, kultiviert in Berlin) sowie kommerziellen Chargen aus Wildsammlung (Handelsware, $n = 6$) mit den in Abschnitten 2.5.2, 2.5.3 und 3.1.1 beschriebenen LC/DAD- und LC/ELSD-Methoden bestimmt. Die entsprechenden Referenzdaten wurden durch PLS-Regression mit den dazugehörigen Spektren in Korrelation gebracht. Die Vorhersagequalität der resultierenden multivariaten Regressionsmodelle wurde anschließend durch zehnfache Kreuzvalidierungen ermittelt.

Unterschiede in der NIRS-Vorhersagequalität ergaben sich je nach Teilmenge des Probensatzes und untersuchten Inhaltsstoffen. Generell waren die Korrelationen (Bestimmtheitsmaß, R^2) von Referenz- zu Vorhersagedaten und Modellqualitäten (RMSECV, RPD) besser, wenn das untersuchte Pflanzenmaterial homogen (z. B. Klonpflanzen), der Gehalt einer Einzelverbindung oder der Gesamtgehalt einer Inhaltsstoffgruppe hoch (z. B. Polyphenole) oder die Referenzdaten besonders solide (z. B. LC/DAD) waren (siehe Abschnitt 4.4).

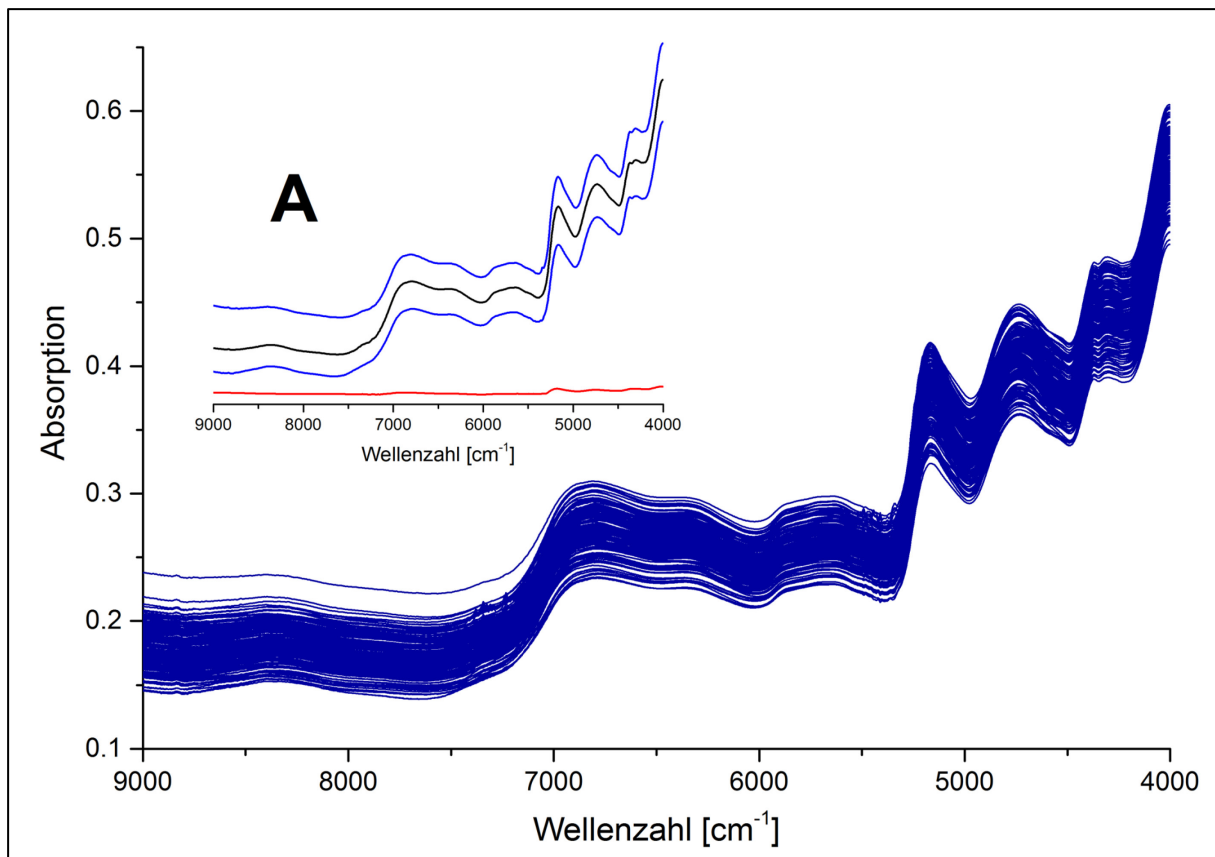


Abbildung 64: NIR-Spektren aller analysierten Exemplare von *C. rhizoma* ($n = 163$), sowie Mittelwert- (schwarz), Min- und Max-Spektrum (blau) und Standardabweichungsspektrum (rot) in (A).

3.3.2.1 Proben-Heterogenität

Im Rahmen der Versuche zur NIRS wurden insgesamt 163 Exemplare von *C. rhizoma* untersucht. Bereits aus den quantitativen Ergebnissen (3.1.3.1, S. 58) ist ersichtlich, dass die einzelnen Gruppen von *C. rhizoma* zum Teil deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Gehalte an Polyphenolen und Triterpenglykosiden sowie auf die Schwankung dieser Gehalte (Homogenität) aufweisen. Vom Probenatz heben sich vor allem die Klone K4 und K5 mit einem besonders hohen Polyphenolgehalt sowie die kommerziellen Mischchargen aus Wildsammlung mit deutlich höheren Triterpenglykosidgehalten ab.

Die NIR-Spektren der untersuchten Proben zeigen teilweise ein separate Clustering in einer PCA (Abbildung 65). So zeigt die PCA der ausschließlich kultivierten Exemplare (links) eine gewisse Clustering der Klonpflanzen (blau bzw. grün für K4 und K5) und der verschiedenen Herkünfte (rot). Auch hier treten die Klone K4 und K5 durch deutliche Abtrennung von den Herkünften hervor. Die Mischchargen aus Wildsammlung (ebenfalls grün) liegen in der PCA des gesamten Probenatzes (rechts) deutlich isoliert von allen anderen *C. rhizoma* Proben aus Kultur. Eine solche qualitative Auswertung der NIR-Spektren stellt bereits einen ersten Ansatz zur semiquantitativen Abschätzung der Drogenqualität in Bezug auf die Gehalte wertbestimmender Inhaltsstoffe dar.

Wie im Abschnitt 3.1.3.1 beschrieben, waren die Klonpflanzen besonders homogen im Hinblick auf die untersuchten Inhaltsstoffe, beispielsweise schwankten die Gehalte an Fukinolsäure (**4**) und Acetylshengmanolxylosid (**17**) in den Klonpflanzen K5 ($n = 10$) nur um 12,3 % bzw. 10,0 % und die Gesamtgehalte an Polyphenolen und Triterpenglykosiden um 9,4 % bzw. 16,8 % (RSD). Im Gegensatz dazu schwankten die entsprechenden Gehalte in der Gruppe der Exemplare von verschiedener Herkunft ($n = 101$) um 37,8 %, 42,4 %, 30,0 % bzw. 35,8 % (RSD, Abbildung 33, S. 62).

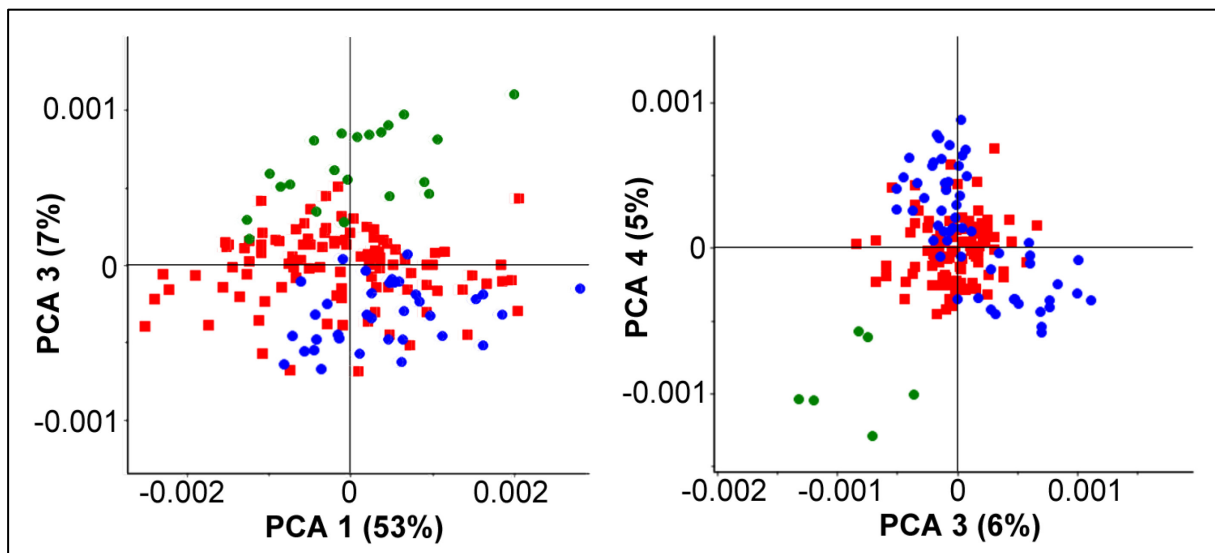


Abbildung 65: Hauptkomponentenanalysen (PCA) für das Probenstet von den für die NIRS Quantifizierung verwendeten *C. rhizoma* Exemplare. Klonpflanzen ($n = 56$, blau bzw. grün für K4 und K5) und Pflanzen verschiedener Herkunft ($n = 101$, rot) in linker PCA und gemeinsam mit den sechs kommerziellen Chargen aus Wildsammlungen (grün, rechte PCA), nach Spektrenvorbehandlung (1. Ableitung) im Wellenzahlbereich $5.446\text{--}9.403\text{ cm}^{-1}$ (Grafik aus Bittner *et al.* 2017 [165]).

3.3.2.2 Quantifizierung von Polyphenolen mittels NIR-Spektroskopie

Unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die Vorhersagequalität für Polyphenole ergaben sich in Abhängigkeit vom betrachteten Probenstet. Im Einzelnen wurden das gesamte Set ($n = 163$), nur kultivierte Exemplare ($n = 157$), nur die Klonpflanzen ($n = 56$), die Pflanzen verschiedener Herkunft ($n = 101$) und die kommerziellen Mischchargen aus Wildsammlung ($n = 6$) jeweils getrennt betrachtet. Alle Validierungsergebnisse (Parameter z. B. RPD, RMSECV) sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

Im Hinblick auf das gesamte Probenstet von *C. rhizoma* ergab sich eine sehr gute Korrelation für die Bestimmung des Gesamtgehalts an Polyphenolen (**4–9**) mit $R^2 = 0,95$ und $RPD = 4,62$. Innerhalb des Sets der in Berlin kultivierten Exemplaren war die NIRS-Vorhersagequalität sogar leicht besser ($R^2 = 0,96$ und $RPD = 4,95$). Hier konnten auch für die Gehalte einzelner Polyphenole wie Fukinolsäure (**4**, $R^2 = 0,80$) und Cimicifugasäuren A+B (**6+7**, $R^2 = 0,85$) Modelle entwickelt werden. Bei Betrachtung des gesamten Probenstets wiederum konnten für individuelle Polyphenole keine oder nur unzureichende Ergebnisse erzielt werden. Die heterogene Gruppe der in Berlin kultivierten Exemplare unterschiedlicher Her-

kunft zeigte $R^2 = 0,93$ für den Gesamtgehalt und $R^2 = 0,71$ für Fukinolsäure, aber nur $R^2 \leq 0,63$ für einzelne Cimicifugasäuren.

Hervorragende Validierungsergebnisse ergaben sich, wenn nur die Klonpflanzen in die Modellentwicklung einbezogen wurden. Hier konnten sehr gute Vorhersagemodelle für den Gesamtgehalt an Polyphenolen ($R^2 = 0,98$ und $RPD = 7,61$) genauso wie für einzelne Polyphenole entwickelt werden, beispielsweise Fukinolsäure mit $R^2 = 0,96$ und $RPD = 4,91$. Wurden die sechs Mischchargen aus Wildsammlungen einzeln betrachtet, führte dies zu sehr guten Vorhersagequalitäten für den Gesamtgehalt an Polyphenolen ($R^2 = 0,93$ und $RPD = 3,73$) und z. B. Fukinolsäure ($R^2 = 1,00$ und $RPD = 28,4$). Diese Ergebnisse zeigen aufgrund des kleinen Probenumfangs generell das Potential der NIR-Spektroskopie, sind nicht aber als einsetzfähiges Modell zu betrachten.

3.3.2.3 Quantifizierung von Triterpenglykosiden mittels NIRS

Für die Triterpenglykoside (**10–21**) konnten unter Betrachtung des vorliegenden Probensatzes, der wie im Abschnitt 3.1.3.1 beschrieben durch sehr niedrige Gehalte dieser Inhaltsstoffgruppe gekennzeichnet war, generell keine validen Modelle entwickelt werden (siehe Tabelle 14). Auch konnten, außer im Fall von Acetylshengmanolxylosid (**17**, $R^2 \leq 0,86$ und $RPD \leq 2,68$), individuelle Gehalte von Triterpenglykosiden nicht zuverlässig bestimmt und damit keine Modelle entwickelt werden, da für einen Großteil der untersuchten Proben diese unterhalb des LOQ der verwendeten LC/ELSD Methode lagen.

Betrachtete man ausschließlich die sechs kommerziellen Chargen aus Wildsammlungen ($n = 6$) mit ihren höheren Gehalten an Triterpenglykosiden, konnte zumindest für den Gesamtgehalt ein erster Modellansatz entwickelt werden ($R^2 = 0,93$ und $RPD = 3,73$). Der Gehalt an individuellen Triterpenglykosiden erlaubte keine Modellentwicklung, z. B. Acetylshengmanolxylosid (**17**, $R^2 = 0,75$ und $RPD = 2,00$). Hier ist die Ursache auch in dem wenig aussagekräftigen Probensatz zu sehen.

Darüber hinaus ergaben sich Unterschiede im Hinblick auf die Qualität der Referenzdaten aus LC. Wie bereits beschrieben (für Details siehe 3.1.1), wiesen beide zur Ermittlung der Referenzdaten verwendeten LC-Methoden andere Werte für Sensitivität und Präzision auf. Die für die Bestimmung der Polyphenole verwendete LC Methode mit DAD zeigte ein LOQ für Fukinolsäure (**4**) von 13 ppm (Rhizom) und eine Methodenpräzision von nur 0,80 % (RSD, $n = 8$). Im Gegensatz dazu wies der ELSD unter den verwendeten chromatografischen Bedingungen ein LOQ für die Standardsubstanz 23-*epi*-26-Deoxyactein von 460 ppm (Rhizom) und eine Methodenpräzision von 3,84 % (RSD, $n = 6$) auf. Der Gehalt an Polyphenolen wurde also mit einer deutlich höheren analytischen Sicherheit (Präzision) bestimmt.

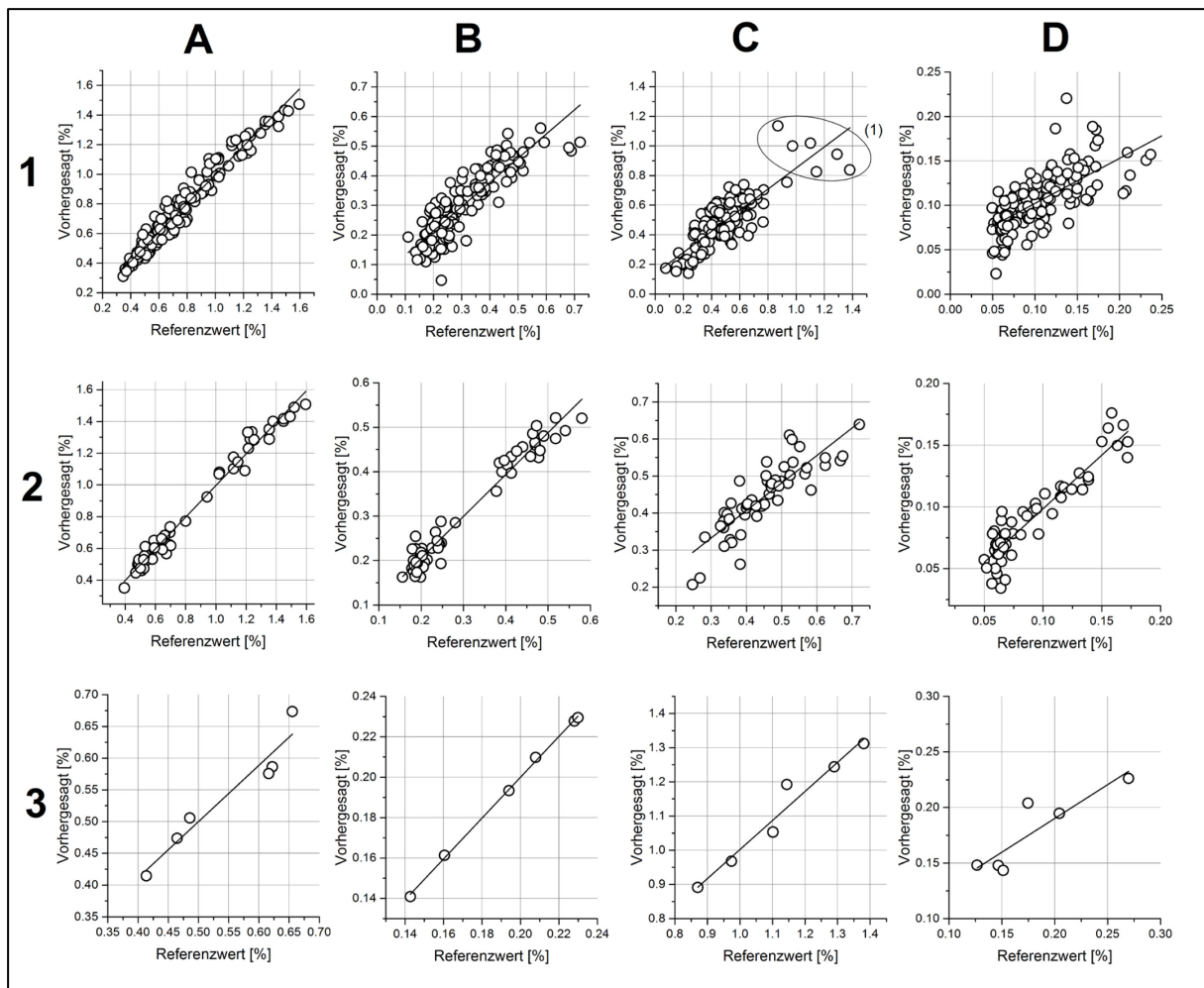


Abbildung 66: Ausgewählte Wiederfindungsplots für die zehnfache Kreuzvalidierung der NIRS Vorhersagemodelle für Polyphenole und Triterpenglykoside. „Wahre“ Werte aus der Referenzanalyse mittels LC wurden gegen die vorhergesagten Werte aufgetragen. Dargestellt für den Gesamtgehalt an Polyphenolen in Spalte **A**, den Gehalt an Fukinolsäure (**4**) in Spalte **B**, den Gesamtgehalt an Triterpenglykosiden in Spalte **C** und an Acetylshengmanolxylosid (**17**) in Spalte **D**. Jeweils für das gesamte Probenset (Reihe **1**, $n = 163$), für Klonpflanzen (Reihe **2**, $n = 56$) und für die kommerziellen Mischchargen aus Wildsammlungen (Reihe **3**, $n = 6$ sowie **(1)** in **C**, hier nur L1out-Kreuzvalidierung). Modifiziert nach Bittner *et al.* 2017 [165].

Tabelle 14: Validierungsergebnisse für NIRS-Quantifizierung von Polyphenolen und Triterpenglykosiden in *C. rhizoma*, nach Bittner *et al.* 2017 [165].

Komplettes Probenset	Validierungsergebnisse						Vorbehandlung	Wellenzahl-Bereich (cm ⁻¹)	SEC	n
	R ²	RMSECV	Bias	RPD	Rang	KV				
Gesamtgehalt Polyphenole (4-9)	0,95	0,0601	-0,00451	4,62	10	L10%out	1D, MSC	4.247-6.102	0,0488	163
Fukinolsäure (4)	0,77	0,0568	0,00363	2,10	10	L10%out	1D, SNV	4.247-4.601, 5.446-6.102	0,0469	163
Cimicifugasäure D (5)	0,72	0,0051	0,00017	1,68	9	L10%out	2D	4.247-4.424, 5.446-6.102	0,0040	163
Cimicifugasäure A (6)	0,48	0,0468	0,00004	1,38	3	L10%out	MSC	5.446-6.102, 7.498-9.404	0,0449	163
Cimicifugasäure B (7)	0,73	0,0629	-0,00233	1,93	9	L10%out	2D	4.247-4.602, 5.446-6.102	0,0466	163
Cimicifugasäure E (8)	0,41	0,0110	0,00003	1,30	9	L10%out	1D, MSC	5.446-5.774	0,0096	163
Cimicifugasäure F (9)	0,73	0,0103	-0,00117	1,92	8	L10%out	1D, MSC	5.446-6.102, 7.498-9.403	0,0066	163
Summe von CSA and CSB	0,84	0,0648	-0,00242	2,49	9	L10%out	1D, MSC	5.446-7.425	0,0515	163
Summe von CSE and CSF	0,72	0,0165	-0,00189	1,90	10	L10%out	1D, MSC	5.446-9.404	0,0102	163
Gesamtgehalt Triterpenglykoside (10-21)	0,67	0,1110	-0,00186	1,74	9	L10%out	1D, MSC	3.780-4.004, 4.945-7.259	0,0963	163
Acetylshengmanolxylosid (17)	0,45	0,0319	-0,00053	1,35	8	L10%out	1D, MSC	3.780-4.227, 5.450-7.259	0,0251	157*
Probenset ohne Mischchargen										
Gesamtgehalt Polyphenole	0,96	0,0570	-0,00368	4,95	10	L10%out	2D	4.247-6.102	0,0446	157
Fukinolsäure (4)	0,80	0,0530	0,00187	2,24	9	L10%out	1D, SNV	4.246-4.602, 5.774-6.102	0,0456	157
Cimicifugasäure D (5)	0,74	0,0050	0,00003	1,95	9	L10%out	1D, SNV	4.246-4.602, 5.774-6.102	0,0040	157
Cimicifugasäure A (6)	0,47	0,0470	-0,00104	1,37	2	L10%out	MSC	5.446-5.774, 7.498-9.404	0,0449	157
Cimicifugasäure B (7)	0,75	0,0610	-0,00327	2,01	9	L10%out	1D, SNV	4.246-4.424, 5.446-6.102	0,0489	157
Cimicifugasäure E (8)	0,44	0,0110	-0,00021	1,33	9	L10%out	1D, MSC	4.246-4.424, 5.446-5.774	0,0092	157
Cimicifugasäure F (9)	0,71	0,0110	-0,00124	1,87	9	L10%out	MSC	5.446-6.104, 7.498-9.404	0,0072	157
Summe von CSA and CSB	0,85	0,0640	-0,00453	2,56	8	L10%out	1D, MSC	4.246-4.424, 5.446-7.502	0,0513	157
Summe von CSE and CSF	0,72	0,0170	-0,00108	1,88	7	L10%out	1D, MSC	5.446-6.102, 7.498-9.404	0,0115	157
Gesamtgehalt Triterpenglykoside (10-21)	0,68	0,0811	,0,00018	1,78	9	L10%out	1D, MSC	3.780-5.454	0,0687	157
Acetylshengmanolxylosid (17)	0,55	0,0267	0,00082	1,46	9	L10%out	1D, MSC	4.224-4.964	0,0238	151*
Klonpflanzen										
Gesamtgehalt Polyphenole	0,98	0,0470	0,0031	7,61	9	L10%out	1D, MSC	4.246-4.424, 7.498-8.451	0,0205	56
Fukinolsäure (4)	0,96	0,0260	0,0005	4,91	3	L10%out	1D, MSC	4.246-4.424, 7.498-9.404	0,0227	56
Cimicifugasäure D (5)	0,97	0,0020	0,0001	5,63	7	L10%out	1D, MSC	4.246-4.602, 5.546-6.102, 7.498-8.451	0,0018	56
Cimicifugasäure A (6)	0,92	0,0190	-0,0003	3,53	10	L10%out	1D, SVN	4.246-6.102	0,0123	56
Cimicifugasäure B (7)	0,96	0,0250	0,0017	5,29	8	L10%out	1D, MSC	4.246-4.602, 5.774-6.102, 7.498-8.451	0,0144	56
Cimicifugasäure E (8)	0,92	0,0050	-0,0003	3,45	10	L10%out	1D	4.246-5.450	0,0040	56
Cimicifugasäure F (9)	0,95	0,0060	0,00002	4,38	9	L10%out	MMN	4.424-4.602, 5.774-6.102	0,0037	56
Summe von CSA and CSB	0,97	0,0310	-0,0012	6,09	8	L10%out	1D, MSC	4.424-4.602, 5.774-6.102	0,0224	56
Summe von CSE and CSF	0,97	0,0070	0,0004	5,36	9	L10%out	MMN	4.246-4.424, 5.774-6.102, 7.498-9.404	0,0049	56
Gesamtgehalt Triterpenglykoside (10-21)	0,73	0,0539	0,0047	1,90	9	L10%out	MMN	3.780-4.964, 7.263-8.922	0,0419	56
Acetylshengmanolxylosid (17)	0,86	0,0135	0,0002	2,68	8	L10%out	MMN	5.450-8.922	0,0117	56

Tabelle 14: Fortgesetzt.

Komplettes Probenset	Validierungsergebnisse				Rang	KV	Vorbehandlung	Wellenzahl-Bereich (cm ⁻¹)	SEC	n
	R ²	RMSECV	Bias	RPD						
Gesamtgehalt Polyphenole	0,93	0,0562	-0,0020	3,69	9	L10%out	1D, MSC	4.247-4.602, 5.446-7.525	0,0475	101
Fukinolsäure (4)	0,71	0,0620	-0,0004	1,84	8	L10%out	1D, MSC	4.247-4.424, 5.446-6.102	0,0522	101
Cimicifugasäure D (5)	0,41	0,0055	0,0002	1,31	6	L10%out	1D, MSC	4.247-6.102	0,0047	101
Cimicifugasäure A (6)	0,15	0,0590	-0,0037	1,09	8	L10%out	1D, MSC	5.446-6.102	0,0435	101
Cimicifugasäure B (7)	0,63	0,0632	-0,0012	1,65	9	L10%out	1D, MSC	4.247-4.601, 6.098-7.502	0,0515	101
Cimicifugasäure E (8)	0,21	0,0115	-0,0001	1,13	4	L10%out	1D, MSC	4.247-4.601, 5.774-6.102	0,0107	101
Cimicifugasäure F (9)	0,37	0,0099	-0,0006	1,26	8	L10%out	SNV	4.247-4.601, 5.774-6.102	0,0083	101
Summe von CSA and CSB	0,71	0,0706	0,0006	1,84	6	L10%out	1D, SNV	5.774-6.102	0,0640	101
Summe von CSE and CSF	0,27	0,0187	-0,0010	1,17	9	L10%out	1D, MSC	4.424-4.602, 5.446-9.404	0,0104	101
Gesamtgehalt Triterpenglykoside (10-21)	0,69	0,0902	-0,0035	1,80	10	L10%out	1D, MSC	3.780-4.964	0,0690	101
Acetylshengmanolxylosid (17)	0,38	0,0320	-0,0008	1,27	6	L10%out	2D	4.224-4.964	0,0262	95*
Kommerzielle Chargen										
Gesamtgehalt Polyphenole	0,93	0,0250	0,0048	3,73	3	L1out	MMN	5.446-6.102, 8.451-9.404	0,0126	6
Fukinolsäure (4)	0,999	0,0010	0,0001	28,4	3	L1out	keine	4.424-4.601, 5.446-5.774	0,0004	6
Cimicifugasäure D (5)	0,93	0,0008	0,00002	3,87	4	L1out	MMN	6.800-7.502	0,0001	6
Cimicifugasäure A (6)	0,85	0,1210	-0,0042	2,78	3	L1out	MMN	5.446-6.102, 8.451-9.403	0,0031	6
Cimicifugasäure B (7)	0,83	0,0235	-0,0033	2,48	2	L1out	2D	5.774-6.102	0,0136	6
Cimicifugasäure E (8)	-0,49	0,0039	-0,0006	0,83	1	L1out	MMN	4.598-5.450, 6.800-7.502	0,0029	6
Cimicifugasäure F (9)	0,45	0,0019	0,0004	1,38	3	L1out	keine	4.247-4.424	0,0005	6
Summe von CSA and CSB	0,68	0,0499	-0,0064	1,78	2	L1out	2D	5.774-6.102	0,0290	6
Summe von CSE and CSF	0,03	0,0043	-0,0005	1,02	1	L1out	2D	8.451-9.403	0,0015	6
Gesamtgehalt Triterpenglykoside (10-21)	0,93	0,0445	0,0169	4,22	4	L1out	keine	3.780-4.227, 4.945-5.454	0,0082	6
Acetylshengmanolxylosid (17)	0,75	0,0238	0,0015	2,00	4	L1out	MSC	3.780-4.227, 7.263-8.092	0,0036	6

* Einige Exemplare mit Werten < LOQ wurden nicht miteinbezogen

4 Diskussion

4.1 Quantifizierung mittels Flüssigchromatografie

Für die Quantifizierung der wichtigsten Inhaltsstoffgruppen in *C. rhizoma* wurden zwei unterschiedliche LC-Methoden angewandt. Diese Methoden unterschieden sich vor allem maßgeblich durch den verwendeten Detektor (DAD bzw. ELSD) und das Extraktionsverfahren. Die Polyphenole (**1–9**) zeigten eine deutliche UV-Aktivität ($\lambda_{\max} \sim 327$ nm) und waren daher leicht und verhältnismäßig spezifisch mittels gängigen UV-Detektoren zu bestimmen. Aufgrund der Instabilität der polyphenolischen Ester, wurde eine Extraktion angewandt, die nicht quantitativ war (Ausbeute ca. 80 %). Dennoch erwies sich das genutzte Verfahren als sehr reproduzierbar und führte zu einer mittleren RSD aller Triplikate von nur 1 %.

Für die Bestimmung der Triterpenglykoside (**10–21**) sollte eine Methode entwickelt werden, die an die Arzneibücher angelehnt sein sollte. Gerade vor dem Hintergrund der industriellen Qualitätskontrolle von Arzneidrogen und der geplanten Verwendung der Daten als Referenz für eine NIRS-Korrelation war dieser Bezug zu den Arzneibuchmonografien für *C. rhizoma* wichtig. Die entsprechenden Monografien des Ph. Eur. und der USP wurden hierbei in Betracht gezogen. Da die USP im Vergleich zur Ph. Eur. einige Vorteile bot, z. B. eine quantitative dreifach-Extraktion und die Verwendung von authentischem Standard (23-*epi*-26-Deoxyactein, **16**), wurde eine Methode in Anlehnung an die entsprechende Monografie zu *C. rhizoma* der USP etabliert.

In der Ph. Eur. kommt der Charakter einer Konventionsmethode mehr zur Geltung. Hier wird das Drogenmaterial *C. rhizoma* nur einfach extrahiert und über eine alternative Referenzsubstanz (Ammoniumglycyrrhizinat) kalibriert. Die Glycyrrhizinsäure wies am verwendeten Lichtstreuendetektor (PLS-ELS 1000) eine deutlich unterschiedliche Response im Vergleich zu 23-*epi*-26-Deoxyactein auf (Daten nicht gezeigt). Vor dem Hintergrund der geplanten NIRS-Korrelation wurde aus diesen Gründen in dieser Arbeit quantitativ extrahiert und über den authentischen Standard kalibriert, um dem wahren Wert für die Triterpenglykoside näher zu kommen. Diese quantitative Extraktion mit Verdampfungsschritt führte allerdings zu einer geringeren Methodenpräzision insgesamt. Die mittlere RSD aller Triplikate lag hier bei 5 %. Dem zugrunde liegt auch die Schwankung der Detektorresponse, die sich in Schwankungen der Systemstabilität (Standardlösung 100 µg/mL 23-*epi*-26-Deoxyactein) von ± 10 % zeigte. Die *inter-day system precision* zwischen den einzelnen Sequenzen ($n = 21$) lag bei 21,5 %. Generell zeigte die Detektion mittels ELSD also einige Nachteile im direkten Vergleich zu einer UV-Detektion.

Der ELSD gilt zwar als „massenuniverseller“ Detektor (siehe 1.4), die Detektorresponse ist allerdings abhängig von verschiedenen Faktoren. Zum einen von der Substanz selbst, sogar strukturell sehr ähnliche Verbindungen können deutlich unterschiedliche Responsefaktoren aufzeigen. Zum anderen ist die Response konzentrationsabhängig, was eine logarithmische Kalibrierung notwendig macht. Umgekehrt führt dies zu hohen LOD/LOQs für Triterpenglykoside, da der Detektor nicht sehr empfindlich ist. Das im Rahmen dieser Arbeit gefundene LOQ von 36,6 µg/mL für 23-*epi*-26-Deoxyactein entspricht in der Größenordnung ungefähr dem, was auch bei einer UV-Detektion erreicht werden kann mit z. B. einem LOQ von 10 µg/mL bei 203 nm in [94]. Aus diesem Grund wäre eine Aufkonzentrierung nach der Extraktion hilfreich z. B. durch eine Verringerung des Wiederauflösevolumens nach Evaporation. Hierbei kommt es aber zu Problemen mit der Löslichkeit des Extrakts, da nicht nur die Triterpenglykoside selektiv extrahiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre eine Anreicherung der Analyten mittels Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE). Da im Rahmen dieser Arbeit aber über 170 Proben in Triplikaten untersucht werden sollten, wurde diese Option aus finanziellen und arbeitspraktischen Gründen nicht näher in Betracht gezogen. Eine Optimierung der Ausbeute und Extraktion wäre allerdings mittels einer automatisierten Extraktion mit entsprechenden Geräten möglich (z. B. ASE 100, Thermo) [55]. Eine selektivere Extraktion und Anreicherung der eher lipophilen Triterpenglykoside könnte man potentiell durch die Anwendung eines *cloud-point-extraction*-Verfahrens erreichen [166,167].

Des Weiteren hat die Zusammensetzung der Mobilien Phase einen Einfluss auf die ELSD-Response. Sie steigt mit Zunahme des organischen Anteils, also in der Regel im Lauf einer RP-Chromatografie mittels Gradientenelution wie am Beispiel einer Glukoselösung in Abbildung 67 gezeigt. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls für 23-*epi*-26-Deoxyactein. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein linearer Gradient mit niedrigem Anstieg verwendet, um diesen Einfluss der Mobilien Phase möglichst gering zu halten. Die ELSD-Detektion weist also einige analytische Nachteile auf, trotz vermeintlich universeller Response für verschiedene Verbindungen. Neuere ELSD-Detektoren zeigen jedoch eine höhere Empfindlichkeit und wurden häufig verbessert, z. B. durch eine *mobile-phase-compensation*, die o. g. Einflüsse ausgleichen kann. Aus diesen Gründen ist die ELSD nach wie vor als gut geeignet für die *Actaea*-Triterpenglykoside anzusehen.

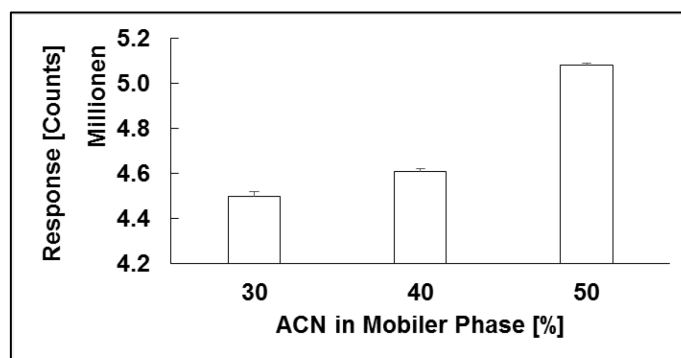


Abbildung 67: Einfluss der Mobilien Phase auf die Response in ELSD am Beispiel einer Glukoselösung (500 µg/mL, je $n = 3$).

4.2 *Cimicifugae rhizoma* aus Kultur

Die Traubensilberkerze ist eine der am meisten genutzten Arzneipflanzen. Für die Herstellung entsprechender Phytopharmaka werden alkoholische Extrakte verwendet, die aus dem Rhizom der Pflanze gewonnen werden. Da eine Kultivierung der Traubensilberkerze schwierig und die notwendige Wachstumsdauer bis zur Ernte eines ausreichend großen Rhizoms lang ist, wird die Pflanze bis heute hauptsächlich aus Wildsammlungen bezogen. Die Wildernte geht allerdings mit dem Tod des Exemplars einher. Hierdurch wird die natürliche Population in den Wäldern Nordamerikas zunehmend gefährdet. Aus diesem Grund wird in naher Zukunft eine Kultivierung der Traubensilberkerze unerlässlich sein. Wird eine Arzneidroge aus kontrolliertem Anbau bezogen, lässt sich auch das Risiko von Verfälschungen, wie sie auf dem Großhandelsmarkt auftreten können, vermindern bzw. ganz ausschließen. Vor allem die Schwankungen im Hinblick auf das Inhaltsstoffmuster in Abhängigkeit von Genotyp, Chemotyp und der unterschiedlichen Physiographie spielen bei aus Kultur/Anbau stammendem Material nur eine untergeordnete Rolle. Durch vegetative Vermehrung kann mutmaßlich sehr homogenes Pflanzenmaterial mit konstanter Qualität erzeugt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diese Zusammenhänge zu untersuchen. Bis zu 179 Exemplare von *C. rhizoma* wurden qualitativ mittels HPTLC und LC/MS sowie quantitativ im Hinblick auf Polyphenole (LC/DAD) und Triterpenglykoside (LC/ELSD) charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass die Rhizome einzelner, vegetativ vermehrter Pflanzen (Klone) nur sehr geringe Schwankungen im Gehalt verschiedener sekundärer Metaboliten von circa 10 % zeigen (Tabelle 9, S. 66). Diese Schwankung liegt auf dem Niveau der Schwankung innerhalb ein und desselben Rhizoms und ist als Grundschwankung anzusehen. Die Homogenität der vegetativ vermehrten Pflanzen zeigte sich auch in den engen Clustern in PCA basierend auf LC/MS-Daten (Abbildung 53, S. 82).

Vergleicht man die in Berlin kultivierten Einzelpflanzen unterschiedlicher Herkunft mit den Klonen, so ist deren größere Heterogenität deutlich erkennbar. Die Gehalte an Polyphenolen und Triterpenglykosiden innerhalb dieser Gruppe schwankten stark um bis zu 59 % (RSD, Cimicifugasäure B, **7**) bzw. 42 % (RSD, Acetylshengmanolxylosid, **17**). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Einzelexemplare aus Wildsammlungen schwankten in den entsprechenden Gehalten sogar um bis zu 82 % (RSD; Cimicifugasäure F, **9**). Eine Kultur von vegetativ vermehrten Pflanzen führte also eindeutig zu Material von größerer Inhaltsstofflicher Homogenität.

Bisher werden für die Herstellung von entsprechenden Phytopharmaka hauptsächlich homogene Mischchargen aus Wildsammlungen verwendet. Da solche Chargen Mischungen vieler Pflanzen darstellen, fallen hier Schwankungen von Individuen nicht so sehr ins Gewicht. Die Großhandelsware stellt einen Populationsquerschnitt der entsprechenden Region dar, in der geerntet wurde. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Mischchargen wiesen eine sehr konstante Qualität auf, mit Schwankungen im Gehalt an unterschiedlichen Metaboliten von maximal 30 % (Polyphenole, gesamt) bzw. 16 % (Triterpenglykoside, gesamt). Im industriellen Umfeld kann mit solchen Chargen, unterstützt durch z. B. Mischen von Chargen, eine sehr konstante Qualität eines Phytopharmakons sichergestellt werden.

Besonders fällt allerdings die starke Unterschiedlichkeit von Einzelexemplaren bzw. Chargen aus Wildsammlungen zu denen verschiedener Herkunft aus Kultur in Berlin bzw. den kommerziellen Anbauchargen auf. Im Rahmen des in dieser Arbeit untersuchten Probenatzes zeigte sich ein deutlicher Trend zu höheren Triterpenglykosidgehalten in Material aus Wildsammlungen. Im gesamten Probenatz aus Kultur lag der Gesamtgehalt an Triterpenglykosiden im Mittel bei nur unter 0,5 %, während in Mischchargen die Gehalte im Mittel bei über 1,1 % lagen (Abbildung 33, S. 62). Legt man die Anforderungen der USP zugrunde ($\geq 0,4$ %), würden viele Einzelpflanzen nicht der Monografie entsprechen. Diese Unterschiede im Gehalt zeigten sich ebenfalls sehr deutlich bei einer explorativen Analyse von LC/MS-Fingerprints ausgewählter Proben mittels PCA und HCA (Abbildung 49, S. 78). Hier bildeten Einzelpflanzen aus Kultur in Berlin und aus Wildsammlungen klare separate Cluster, nur WH8 (S2607) wurde gemeinsam mit einigen Exemplaren aus Kultur in Berlin gruppiert. Auch die Einzelexemplare aus den USA zeigten solch einen hohen Gehalt an Triterpenglykosiden (mittlerer Gesamtgehalt über 1,1 %) wie die Mischchargen von Großhändlern, wenn auch mit einer deutlich größeren Schwankung von 38 %. Im Hinblick auf den Gehalt an Polyphenolen ergaben sich allerdings nur kleine Unterschiede im gesamten Probenatz, mit einer leichten Tendenz zu höheren Gehalten im Material aus Kultur, z.B. + 87 % Fukinolsäure ($FC = 1,87, p = 0,001$). Aus dem gesamten Probenatz stachen hier nur die Klone K4 und K5 mit ihren besonders hohen mittleren Gesamtgehalten an Polyphenolen von $> 1,0$ % bzw. $> 1,3$ % (Abbildung 33, S. 62) heraus. Diese Pflanzen waren sehr jung, sie wurden erst im Jahr 2012 gepflanzt. Vermutlich führte hier ein geringerer Verholungsgrad zu den hohen Polyphenolgehalten.

Da das aus Berlin stammende Material besonders schonend getrocknet wurde (30 °C, 24 h), können die beschriebenen Unterschiede, vor allem die zwischen den Mischchargen und den Pflanzen aus Kultur, zum Teil mutmaßlich durch verschiedene Nachernteprozesse oder Lagerungsbedingungen erklärt werden. Vermutlich liegt die Begründung allerdings auch in den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und einem möglicherweise schnelleren Wachstum der kultivierten Pflanzen.

Die in Berlin kultivierten Exemplare unterschiedlicher Herkunft zeigen eine Clusterung in der PCA basierend auf den Gehalten der wertbestimmenden Triterpenglykoside **10–21** (Abbildung 68). Aufgrund der niedrigen Konzentration dieser Glykoside in den Pflanzen aus Kultur war die Gruppierung allerdings nicht sehr eindeutig und bedurfte einer späteren manuellen Auswertung der LC/ELSD-Fingerprints. Diese Gruppierung deutete aber bereits auf eine potentielle Existenz unterschiedlicher Chemotypen in *Actaea racemosa* L. hin. Vor allem das gemeinsame Clustern der Exemplare S2475 und S2607 (= WH8 s. o.) aus Wildsammlungen mit den Einzelpflanzen aus Kultur und den Chargen aus Anbau in HCA basierend auf Gehalten aller untersuchter Verbindungen **4–21** unterstützte diese These (Abbildung 39, S. 68).

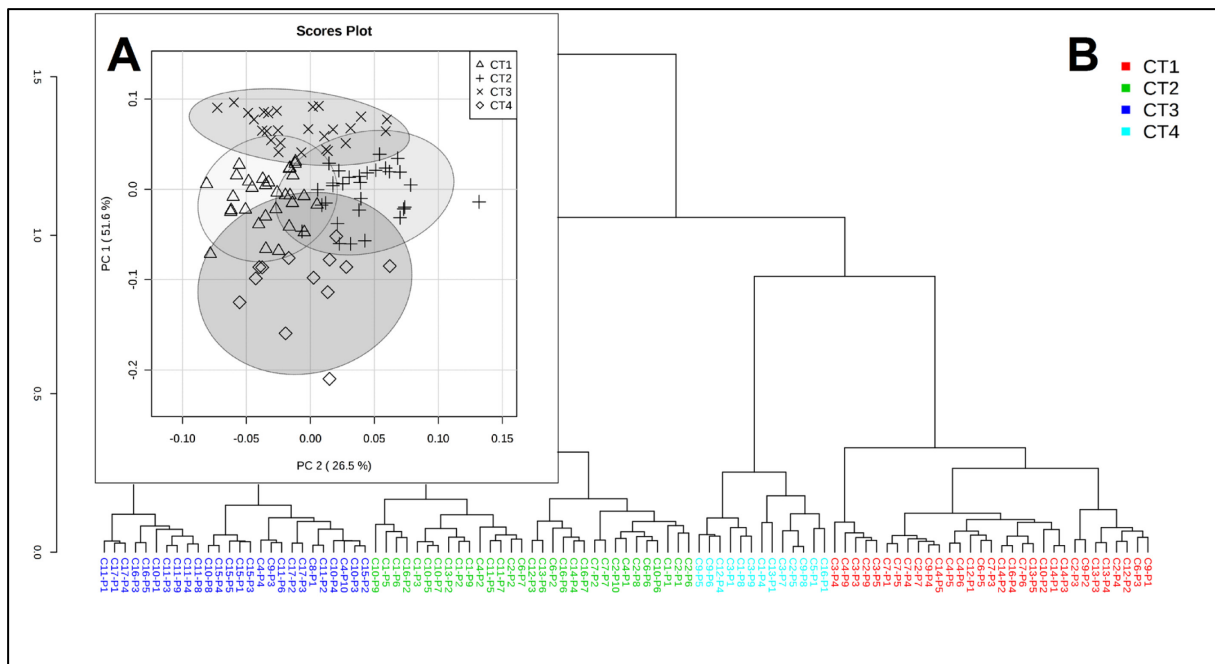


Abbildung 68: Clusterung der 101 Einzelexemplare von *C. rhizoma* aus Kultur in Berlin in PCA (**A**) und HCA (**B**) basierend auf quantitativen Daten für Triterpenglykoside **10–21**. Aufgrund der Gehalte vieler Triterpenglykoside \leq LOQ ist die Gruppierung in PCA nicht sehr deutlich. Das Clustern in potentielle Chemotypen (CT) ist nicht eindeutig, da neben den unterschiedlichen Verhältnissen von Triterpenglykosiden auch quantitative Unterschiede überlagern und Werte unter dem LOQ nicht mit einbezogen wurden.

Die große Diversität im Hinblick auf den Triterpenglykosid-Fingerprint zeigte sich vor allem auch innerhalb der Gruppe der Einzelpflanzen aus Wildsammlung (Abbildung 43, S. 72). Der überwiegende Teil dieser Proben zeigte einen Fingerprint ähnlich zu dem der kommerziellen Mischchargen (23-*epi*-26-Deoxyactein, **16**, DOA-Typ). Bei einigen Exemplaren zeigten sich aber auch höhere Gehalte an Acetylhydroshengmanolxylosid (AHSX-Typ, **14**), Acetylshengmanolxylosid (ASX-Typ, **17**) oder Acetylcimigenol-Derivaten (ACA/ACX-Typ, **20** und **21**).

Diese potentiellen Chemotypen zeigten sich auch in den in Berlin angebauten Pflanzen, wenn auch mit quantitativen Unterschieden. Auch die aus kommerziellem Anbau stammenden Mischchargen zeigten spezielle, vom DOA-Typ abweichende Muster, z.B. den ASX-Typ (Charge B3, B4 und B5) oder den ASX/ACX-Typ (Chargen B1, B7 und B8). Dennoch zeigten einige der in Berlin kultivierten Einzelexemplare einen Triterpenglykosid-Fingerprint ähnlich zum DOA-Typ der Handelsware aus Wildsammlungen, wenn auch wieder mit einem deutlich niedrigerem Gesamtgehalt (Abbildung 69).

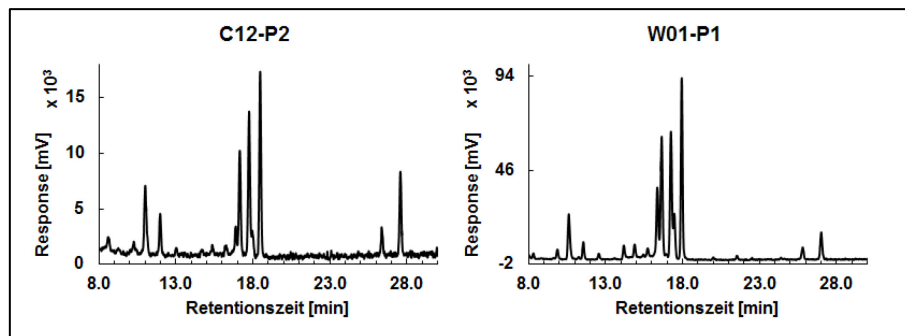


Abbildung 69: Vergleich eines DOA-Typ Triterpenglykosid-Fingerprints aus Kultur (links) mit einem einer Mischcharge aus Wildsammlung (rechts), sehr ähnliche Verteilung der Triterpenglykoside **10–21**, aber starke quantitative Unterschiede zwischen Kultur und Wildsammlung.

Diese mutmaßlichen Chemotypen von *A. racemosa* wurden vor dem Hintergrund der von Motley *et al.* (2004) postulierten Genotypen näher mittels LC/MS untersucht [76]. In den Versuchen mittels *nontargeted analysis* bestätigte sich diese Gruppierung. Die verschiedenen Exemplare wiesen zum Teil deutlich unterschiedliche massenspektrometrische Fingerprints auf (Abbildung 50, S. 79). Die im Rahmen dieser Versuche untersuchten Exemplare bildeten deutliche Cluster in der HCA (Abbildung 50, S. 79). Da es sich aber bei den Exemplaren C3 und C4 um sehr junge Pflanzen handelte (gepflanzt 2011), stand hier der Einfluss des Alters zur Diskussion. Die Unterschiedlichkeit kann aber nicht nur im Alter begründet sein, da beispielsweise in derselben Analyse die Exemplare der Herkunft C1 (gepflanzt 2010) gemeinsam mit denen der Herkunft C11 (gepflanzt 2002) clustern.

Die Gruppierung innerhalb dieses Subsets von Einzelexemplaren stimmte allerdings nicht überein mit dem Clustern aller Einzelexemplare aus Kultur in Berlin, basierend auf den quantitativen Daten für Triterpenglykoside **10–21** (Abbildung 68). Dies ist erklärbar durch die Verwendung des komplexeren gesamten massenspektrometrischen Fingerprints. Weiterhin wurden die jeweiligen Proben nur einfach vermessen. Auch wenn die Systemstabilität während der Analyse gewährleistet wurde und die Extraktion als reproduzierbar anzusehen ist, sollten hier noch weitere, umfangreichere Untersuchungen durchgeführt werden.

In den Mischchargen aus kommerziellem Anbau deutete sich eine Selektion bestimmter Chemotypen an, z. B. dem ASX-Typ in B4 oder dem ASX/ACX-Typ in B8. Gemeinsam mit den im Vergleich zu Material aus Wildsammlungen unterschiedlichen Umgebungsbedingungen führt dies zu einem deutlich anderen Triterpenglykosid-Fingerprint und –gehalt dieser Chargen. Potentiell entspricht solches Material dann nicht mehr den Anforderungen der Ph. Eur. Monografie für *C. rhizoma* und kann nicht für die Herstellung von entsprechenden Phytopharmaka eingesetzt werden. Weiterhin zeigte sich in der LC/MS ein deutlicher Unterschied zwischen feinen Wurzeln und Rhizom. Dieser Aspekt ist ebenfalls zu berücksichtigen, will man z. B. relativ junge Pflanzen/Chargen mit hohem Anteil feiner Wurzeln einsetzen.

Durch eine Selektion von Geno- oder Chemotypen während einer Kultivierung, ergeben sich möglicherweise quantitative Unterschiede im Muster der sekundären Metaboliten in Extrakten von *C. rhizoma*. Ebenso scheint es einen Zusammenhang zwischen Wachstumsbedingungen (Wachstumsgeschwindigkeit) sowie dem Inhaltsstoffmuster innerhalb der Rhizome der Traubensilberkerze zu geben [70,77]. Um einen Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Inhaltsstoffe allein hin zu untersuchen, müsste aber genetisch einheitliches Material in verschiedener Umgebung unter kontrollierten Bedingungen, z. B. im Wald (*forest farming*) und in Kultur durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde genetisch sehr heterogenes Material untersucht. Daher ist eine stichhaltige Schlussfolgerung auf einen Einfluss der Wachstumsbedingungen nicht ohne weiteres möglich. Trotzdem waren die Unterschiede zwischen den heterogenen Gruppen „Wild“ und „Kultur“ sehr deutlich. Besonders der Gehalt vieler Triterpenglykoside \leq LOQ in LC/ELSD ist nicht von der Hand zu weisen.

Die Kultivierung der Traubensilberkerze führt zu Material von besonderer Homogenität, insbesondere wenn Pflanzen vegetativ vermehrt werden. Dies kann zu einer reproduzierbaren Qualität eines Phytopharmakons beitragen. Ebenso trägt sie naturgemäß zur Sicherheit der Produkte bei, da Verschneidungen/Untermischungen verhindert werden. Bei der Auswahl der Kandidaten für eine Kultur sind jedoch Geno- und Chemotypen zu berücksichtigen, die, besonders im Vergleich zu den ausgeglichenen Mischchargen aus Wildsammlungen, zu einer Verschiebung des Inhaltsstoffmusters der Extrakte führen können.

4.3 Identifizierung von *Cimicifugae rhizoma*

Im Falle von *C. rhizoma* ist der kommerzielle Anbau der Arzneipflanze für die industrielle Herstellung von Phytopharmaka noch nicht sehr weit verbreitet. Aus diesem Grund kommt der Sicherstellung der korrekten Identität der Spezies *Actaea racemosa* (L.) eine besondere Bedeutung zu, da bei einem Bezug von Arzneidroge von Großhändlern und aus Wildsammlungen eine Verwechslung bzw. kommerziell motivierte Substitution mit anderen *Actaea* spp. möglich ist. Eine Prüfung auf Identität oder Substitution ist daher neben den Reinheitsprüfungen und Gehaltsbestimmungen integraler Bestandteil von Arzneibuchmonografien, z. B. des Europäischen Arzneibuchs. Ebenso schreiben cGMP-Leitlinien eine solche Prüfung für Arzneidroge vor [27]. Aus bereits in der Einleitung beschriebenen Gründen will man eine solche Prüfung möglichst preiswert und ohne unverhältnismäßig großen Aufwand realisieren. Eine Verwendung von bereits in Routinelaboren der pharmazeutischen Qualitätskontrolle gut etablierten analytischen Methoden ist daher eine interessante Alternative zu komplexeren Methoden, wie LC/MS, $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie oder dem DNA-Barcoding.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Prüfung von *C. rhizoma* auf Identität und Substitution mittels gängigen Verfahren wie UV-Spektroskopie, LC/DAD oder der NIR-Spektroskopie möglich ist. Alle drei Methoden, jeweils gekoppelt an eine multivariate Auswertung der resultierenden analytischen Daten, waren im Rahmen des in dieser Arbeit zur Verfügung gestandenen Probenumfangs in der Lage, *C. rhizoma* bzw. *Actaea racemosa* L. von anderen nah verwandten Arten abzugrenzen.

Durch ihren Gehalt an Polyphenolen zeigten die Rhizomextrakte verschiedener *Actaea* spp. eine deutliche UV-Absorption. Die jeweiligen UV-Spektren der verschiedenen Arten zeigten subtile qualitative und quantitative Unterschiede. Insgesamt waren die Spektren reproduzierbar innerhalb einer Art. Durch ein validiertes multivariates Klassifizierungsmodell, erstellt mittels LDA, war eine Vorhersage der Zugehörigkeit einer Probe zu einer Gruppe der verschiedenen *Actaea* spp. möglich. War es nicht möglich, eine Probe anhand ihres UV-Spektrums zuzuordnen, wurde sie vom Modell als nicht klassifiziert eingestuft. Eine Identifizierung von *C. rhizoma* mittels UV/LDA war möglich. Eine unbekannte *Actaea* sp. und *A. dahurica*, die aufgrund ihres kleinen Probenumfangs nicht in die LDA miteinbezogen werden konnten, zeigten vielversprechende Abweichungen vom *A. racemosa* Cluster in der PCA. Daher ist es wahrscheinlich möglich, auch diese Arten in das Modell zu integrieren.

Weiterhin zeigte sich, dass die Polyphenole **4–9** in allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *Actaea* spp. in unterschiedlichen Verhältnissen vorkamen. Diese Unterschiede im Muster der Polyphenole, z. B. dem Gehalt an Cimicifugasäure D (**5**), A (**6**) oder F (**9**), konnten zur Unterscheidung der jeweiligen Arten herangezogen werden. In der multivariaten Auswertung der Muster mittels PCA zeigten sich deutliche Cluster der verschiedenen Arten. Da in dieses Teilprojekt nur Proben anderer *Actaea* spp. aus Kultur in Berlin einbezogen wurden, wird deutlich, dass diese unterschiedlichen Muster im Polyphenolgehalt nicht ausschließlich von Umweltbedingungen abhängig sind, sondern tatsächlich typisch für die eine oder andere Art sind.

Neben den *C. rhizoma* Proben aus Kultur in Berlin wurden auch die jeweiligen Proben aus Wildsammlungen, Mischchargen und Einzelpflanzen mit in die Auswertung einbezogen. Sie bildeten aufgrund ihres Polyphenol-Musters einen gemeinsamen Cluster (Abbildung 58, S. 89). Alle Exemplare von *A. racemosa*, egal welcher Herkunft, waren also anhand dieses Musters eindeutig von den anderen Arten abzugrenzen. Die einfache Auswertung des Gehalts an Polyphenolen **4–9** reichte im Rahmen der zur Verfügung stehenden Exemplare bzw. Proben aus, um die Art korrekt zu identifizieren. Um die Aussage allerdings noch sicherer treffen zu können, sollten noch weitere Proben, auch von anderen *Actaea* spp. und von unterschiedlicher Herkunft untersucht werden.

Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes stellt die Verwendung des gesamten LC-Fingerprints zur Identifizierung dar [102]. Für eine Vorbereitung der LC-Rohdaten zur multivariaten Auswertung, z. B. Offset-Korrektur oder Alignment der Läufe, ist allerdings spezielle Software nötig, wie z. B. Unscrambler oder SIMCA. Durch eine UV-Detektion bei niedrigerer Wellenlänge ist es auch möglich, deutlich komplexere Fingerprints zu erhalten, als mit einer UV-Detektion bei 327 nm. In Zukunft könnte es sogar möglich sein, mithilfe von nur

einem LC-Fingerprint, z. B. aus LC/ELSD, alle Prüfungen einer Arzneibuchmonografie, das heißt die Prüfungen auf Identität, Substitution, Reinheit und Gehalt, zu realisieren. Lediglich die Mitführung eines Referenzstandards und eine multivariate Auswertung wären nötig.

Die vielversprechendste Alternative zu herkömmlichen Methoden zur Identifizierung von *C. rhizoma* ist die NIR-Spektroskopie. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich in einer PCA der NIR-Spektren eine klare Abgrenzung asiatischer *Actaea* spp. zu den nordamerikanischen. Nach einer weiteren Optimierung, z. B. Auswahl von Wellenzahlbereichen oder Datenvorbehandlungen, ist es sicher möglich, unter Verwendung geeigneter multivariater Klassifizierungsverfahren, wie z.B. PLS-DA, Modelle zu etablieren, die eine korrekte Spezieszugehörigkeit vorhersagen können. Somit konnte direkt am pulverisierten Rhizom und ohne Extraktion eine Authentifizierung von *C. rhizoma* durchgeführt werden.

Insgesamt war es mit allen untersuchten Verfahren möglich, nah verwandte *Actaea* spp. voneinander abzugrenzen. Die Kopplung einfacher, etablierter analytischer Verfahren an eine multivariate Auswertung bzw. Modellbildung zur Klassifizierung einer Probe, zeigte ihr deutliches Potential in Routinelaboren eingesetzt zu werden, mit dem Ziel der Zeit- und Kostensparnis. Der Nachteil dieser Verfahren ist die Notwendigkeit eines ausreichend großen Probensatzes zur Kalibrierung bzw. Modellbildung. Idealerweise sollte dieser Probensatz alle möglichen Substitutionen beinhalten. Dies ist in der Praxis oft schwer möglich, auch wenn Vertriebswege qualifiziert sind und die Zahl der zu prüfenden Substitutionen begrenzt ist (wie auch im Falle von *C. rhizoma* nach Ph. Eur.). Die Verwendung von Klassifizierungsverfahren, die auch unbekannte Proben berücksichtigen können, ist daher notwendig.

Weiterhin ist eine Prüfung auf Identität und Substitution sehr gut mittels einfachen und gut etablierten dünnenschichtchromatografischen Verfahren möglich. Eine Authentifizierung einer Droge durch Vergleich mit einem authentischen Referenzstandard ist der praktikabelste Weg, eine solche Prüfung zu realisieren (Abbildung 30, S. 57). HPTLC-Fingerprints sind auch bei nah verwandten Arten oft sehr unterschiedlich. Problematisch wird es, wenn beispielsweise Material aus alternativen Quellen wie z. B. einem Anbau unter bestimmten Wachstumsbedingungen und Selektion von Chemotypen einen leicht anderen Fingerprint in der HPTLC aufzeigt wie z. B. eine Mischcharge aus Wildsammlungen. Dies war auch im Rahmen dieser Arbeit der Fall (siehe Abbildung 26, S. 54). Hier kommt die subjektive Auswertung von Fingerprints zur Identitätsprüfung an ihre Grenzen.

Generell ist eine Identifizierung einer Droge in der Regel einfacher möglich als eine Detektion von Verunreinigungen bzw. einer Untermischung. Will man beispielsweise eine Verschneidung einer Charge mit 5–10 % anderer *Actaea* spp. detektieren, ist ein größerer analytischer Aufwand nötig. Ankli *et al.* zeigte bereits im Jahr 2008, dass dies mithilfe einer komplexen HPTLC-Methode grundsätzlich möglich ist [80]. In der Regel ist es nötig, für eine Art spezifische Markersubstanzen zu finden wie z. B. bei asiatischen *Actaea* spp. das Cimifugin, welches dort in ausreichend großer Menge, aber in *A. racemosa* nicht vorkommt.

Ob eine Detektion von Verschneidungen mit den im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden, wie UV-Spektroskopie, LC/DAD oder NIR-Spektroskopie, ebenfalls möglich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Potentiell möglich wäre dies über eine quantitative Kalibrierung, z. B. über eine PLS-Regression, und Analyse von Mischungen der verschiedenen Arten, etwa im Bereich von 1 % bis 50 %. Vor allem für die NIR-Spektroskopie wäre dies ein vielversprechender Ansatz. In jeden Fall wäre hier wieder eine multivariate Modellbildung eine Voraussetzung.

Insgesamt zeigte der Ansatz sein großes Potential, einfache und robuste Methoden an eine multivariate Auswertung zu koppeln, um eine Arzneidroge zu qualifizieren. Auch wenn in der Regel eine Modellbildung mithilfe eines repräsentativen Probensatzes nötig ist, so ließen sich auf diesem Wege Zeit und Kosten einsparen. Vor allem Weiterentwicklungen in den Bereichen LC-Fingerprints und NIR-Spektroskopie sind vielversprechend. Ebenso wäre es interessant, massenspektrometrische Fingerprints beispielsweise aus Bin-Analysen basierend auf LC/MS-Daten (wie in Abschnitt 3.1.4 durchgeführt) für o. g. Zweck einzusetzen.

4.4 Quantifizierung mittels FT-NIR-Spektroskopie

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung von wertbestimmenden Inhaltsstoffen in *C. rhizoma* mittels NIRS grundsätzlich möglich ist. Die Vorhersagequalität schwankte jedoch je nach Referenzmethode, Homogenität des Probensatzes und Konzentration des/der zu quantifizierenden Inhaltsstoffs bzw. -gruppe.

Die entwickelte LC/DAD-Methode zur Bestimmung der Polyphenole wies eine hohe Präzision auf. Die mittlere RSD der dreifachen Bestimmungen lag bei unter 1 %. Die Extraktion, auch wenn sie aufgrund der Instabilität der Polyphenole nicht quantitativ gestaltet werden konnte, war also besonderes reproduzierbar. Weiterhin war das LOQ der Methode niedrig genug, um auch gering konzentrierte Polyphenole sicher zu quantifizieren. In der Summe führte diese hohe Güte der Analyseergebnisse zu einer guten bis sehr guten NIRS-Vorhersagequalität, sogar für einzelne Polyphenole.

Auf der anderen Seite stehen die Triterpenglykoside, die mit einer Methode bestimmt wurden, die ein höheres LOQ aufwies. Gleichzeitig treten diese Inhaltsstoffe zum Teil in deutlich niedrigerer Konzentration in *C. rhizoma* auf. Zudem wurde in diesem Fall die quantitative Extraktion der entsprechenden USP Monografie angewandt. Dies beinhaltete einen Verdampfungs- und Wiederauflöseschritt, aufgrund dessen die mittlere RSD aller dreifachen Bestimmungen im Vergleich zu den Polyphenolen bei deutlich höheren 5 % lag. Zusammen bedeutete dies eine größere Unsicherheit bei den Referenzwerten für die Triterpenglykoside. Es wurde deutlich, dass die Güte der Referenzdaten, die zur Erstellung eines NIRS Vorhersagemodells genutzt werden, einen großen Einfluss auf die Vorhersagequalität hat.

Die Heterogenität des Probensatzes (siehe Abbildung 64, S. 95) hatte ebenso einen Einfluss auf die NIRS Vorhersagequalität. Betrachtet man die Vorhersagemodelle des gesamten Sets, welches aus den Pflanzen unterschiedlicher Herkunft, den homogenen Klonpflanzen,

sowie den Mischchargen aus Wildsammlungen besteht, sieht man, dass in der Regel nur der Gesamtgehalt an Polyphenolen zu guten Ergebnissen führte. Für einzelne Verbindungen zeigten sich nur Korrelationen von $R^2 \leq 0,84$. Das gleiche Bild ergab sich für das heterogene Set der Pflanzen verschiedener Herkunft kultiviert in Berlin. Im Gegensatz dazu zeigte die Teilmenge der Klompflanzen auch für individuelle Polyphenole Korrelationen mit $R^2 \geq 0,92$ und guten Vorhersagequalitäten. Ähnlich verhielt sich die Handelsware mit Korrelation für einige individuelle Verbindungen mit $R^2 \geq 0,83$.

Weiterhin zeigte sich, dass in der Regel höher konzentrierte Einzelverbindungen, die in einem breiten Konzentrationsbereich vorliegen, besser mittels NIRS bestimmbar sind. Beispiele hierfür sind die Fukinolsäure (**4**) oder das Acetylshengmanolxylosid (**17**). Diese traten in den zur NIR-Spektroskopie verwendeten Proben in einem Bereich von etwa 0,1–0,7 % bzw. 0,02–0,27 % auf. Für andere individuelle Triterpenglykoside konnten keine Modelle entwickelt werden. Im Gegensatz dazu zeigten jedoch zum Teil niedriger konzentrierte Polyphenole gute Vorhersagequalitäten, z. B. die Cimicifugasäure D mit $R^2 = 0,97$ in Klompflanzen ($n = 56$) bei einer Konzentration von unter 0,05 %. Zu erklären ist dieses Phänomen vermutlich damit, dass wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt, die Polyphenole in *C. rhizoma* stets in konstanten Verhältnissen aufzutreten scheinen. Diese Kolinearität der Gehalte innerhalb der Klompflanzen z. B. für Fukinolsäure und Cimicifugasäure D mit $R^2 = 0,96$ führte offensichtlich dazu, dass auch für nur in geringen Mengen vorkommende Polyphenole NIRS-Vorhersagemodelle entwickelt werden konnten (Abbildung 70).

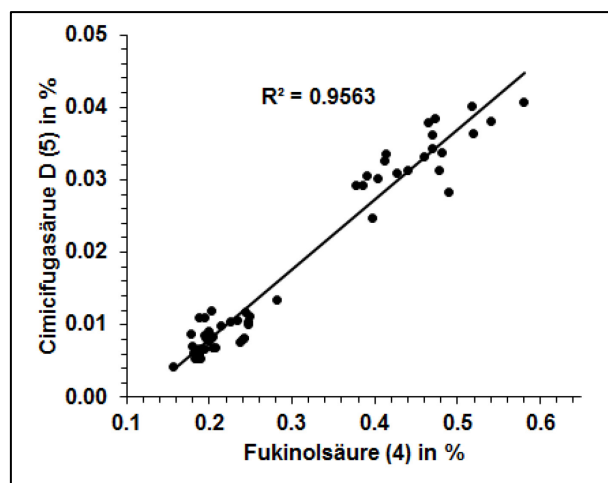


Abbildung 70: Kolinearität der Gehalte an Fukinolsäure (**4**) und Cimicifugasäure D (**5**) in *C. rhizoma* (nur Klompflanzen, $n = 56$), obere Punktwolke stellt Werte für K4 und K5 dar.

Die Gesamtgehalte an Polyphenolen lagen im Bereich von etwa 0,35–1,60 % und führten meist zu sehr guten Vorhersagequalitäten. Anders sah dies beim Gesamtgehalt an Triterpenglykosiden aus. Dieser Gesamtgehalt setzte sich aus einer im Vergleich zu den Polyphenolen größeren Anzahl an individuellen Gehalten von zwölf Einzelverbindungen zusammen und lag im Bereich von 0,05–1,38 %. Die individuellen Gehalte vieler der untersuchten Triterpenglykoside lagen unter dem LOD und wurden daher nicht in die Berechnung des Gesamtgehalts einbezogen. Die meisten Gehalte lagen nahe am LOQ und wurden mit größerer Unsicherheit bestimmt (siehe Abschnitte 3.1.1 und 4.1). Hinzu kommt, dass die aus Kultur in Berlin stammenden Pflanzen einen besonders niedrigen Gehalt an Triterpenglykosiden aufwiesen. Aus diesen Gründen konnten im Großen und Ganzen keine Korrelationen erzielt werden. Anders war dies bei den Mischchargen aus Wildsammlung ($n = 6$), die einen Gesamtgehalt an Triterpenglykosiden von über 0,87 % aufwiesen. Hier lagen die Gehalte aller Triterpenglykoside deutlich über dem LOQ und eine NIRS-Quantifizierung des Gesamtgehalts war möglich mit $R^2 = 0,93$ und $RPD = 4,22$. Auch wenn hier die relativ geringe Probenanzahl nur eine prinzipielle Aussage zulässt, so scheint die Möglichkeit der Etablierung eines Assays für Triterpenglykoside (Gesamtgehalt) auf der Basis der ELSD-Referenzmethoden der Arzneibücher USP oder Ph. Eur. in der Routineanalytik mittels NIR-Spektroskopie gegeben zu sein. Diesbezüglich sollten weitere Versuche durchgeführt werden.

Insgesamt ist die Möglichkeit der Quantifizierung von Inhaltsstoffen wie Polyphenolen und Triterpenglykosiden in *C. rhizoma* mittels NIR-Spektroskopie positiv zu bewerten. Unter Berücksichtigung von authentischer Handelsware und mit einigen methodischen Verbesserungen – dem Einsatz eines sensitiveren ELSD – ist eine solche Quantifizierung mit großer Wahrscheinlichkeit auch in Routinelaboren der pharmazeutischen Qualitätskontrolle möglich. Eine dazugehörige Methodvalidierung sollte aber neben den Parametern der Kreuzvalidierung auch noch andere Aspekte der (V)ICH-Guidelines wie z. B. Präzision oder den Arbeitsbereich beinhalten. Weiterhin muss ein Teil der Proben stets weiterhin „klassisch“ quantifiziert werden, um das verwendete Vorhersagemodell zu erweitern und zu trainieren.

Anhang

1. Polyphenole und Triterpenglykoside in Cimicifugae rhizoma

Tabelle 15: Gehalte an Polyphenolen und Triterpenglykosiden aus LC/DAD/ELSD (jeweils $n = 3$) innerhalb des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probensets von *C. rhizoma* (*Actaea racemosa* L.). Klonpflanzen (K), Einzelexemplare aus Kultur in Berlin (C) und aus Wildsammlungen (WE), Großhandelsware/Chargen aus Wildsammlungen (WC, B2 und B6) und Chargen aus Anbau (andere B). P/TG – Polyphenole/Triterpenglykoside Gesamtgehalt, NQ – Nicht quantifiziert. Zur Berechnung von TG wurden alle Messwerte \geq LOD verwendet. Für Details zu den Proben siehe Tabelle 1ff.

Probe	4	5	6	7	8	9	PG	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	TG
K1-P1	0,195	0,009	0,089	0,153	0,018	0,022	0,487	NQ	0,047	NQ	NQ	0,092	0,061	0,051	0,061	NQ	NQ	NQ	NQ	0,465
K1-P2	0,248	0,011	0,123	0,267	0,018	0,028	0,695	NQ	NQ	NQ	NQ	0,087	0,063	0,052	0,065	NQ	NQ	NQ	NQ	0,396
K1-P3	0,178	0,009	0,079	0,181	0,019	0,027	0,493	NQ	0,048	NQ	NQ	0,094	0,075	0,061	0,065	NQ	NQ	NQ	NQ	0,499
K1-P4	0,247	0,010	0,142	0,253	0,020	0,026	0,698	NQ	NQ	NQ	NQ	0,076	0,052	NQ	0,050	NQ	NQ	NQ	NQ	0,354
K1-P5	0,199	0,008	0,098	0,198	0,016	0,024	0,543	NQ	NQ	NQ	NQ	0,092	0,064	0,053	0,057	NQ	NQ	NQ	NQ	0,430
K1-P6	0,225	0,011	0,106	0,185	0,021	0,024	0,572	NQ	0,049	NQ	NQ	0,082	0,066	0,060	0,064	NQ	NQ	0,050	NQ	0,482
K1-P7	0,281	0,013	0,159	0,287	0,026	0,034	0,800	NQ	NQ	NQ	NQ	0,075	0,052	NQ	0,060	NQ	NQ	NQ	NQ	0,336
K1-P8	0,214	0,010	0,099	0,217	0,018	0,027	0,586	NQ	NQ	NQ	NQ	0,082	0,062	0,051	0,059	NQ	NQ	NQ	NQ	0,415
K1-P9	0,194	0,011	0,092	0,137	0,025	0,027	0,487	NQ	NQ	NQ	NQ	0,086	0,066	0,058	0,060	NQ	NQ	0,057	NQ	0,459
K1-P10	0,234	0,011	0,125	0,252	0,016	0,023	0,661	NQ	NQ	NQ	NQ	0,084	NQ	NQ	0,063	NQ	NQ	NQ	NQ	0,357
K1-P11	0,205	0,008	0,102	0,270	0,017	0,028	0,630	NQ	NQ	NQ	NQ	0,079	0,063	0,052	0,062	NQ	NQ	NQ	NQ	0,398
K1-P12	0,196	0,008	0,087	0,177	0,017	0,024	0,509	NQ	NQ	NQ	NQ	0,086	0,068	0,056	0,068	NQ	NQ	NQ	NQ	0,444
K1-P13	0,199	0,009	0,085	0,142	0,017	0,019	0,472	NQ	NQ	NQ	NQ	0,078	0,055	0,047	0,060	NQ	NQ	NQ	NQ	0,404
K1-P14	0,202	0,008	0,104	0,238	0,015	0,024	0,591	NQ	NQ	NQ	NQ	0,089	0,063	0,053	0,061	NQ	NQ	NQ	NQ	0,452
K1-P15	0,243	0,012	0,128	0,218	0,023	0,027	0,651	NQ	NQ	NQ	NQ	0,079	0,053	NQ	0,052	NQ	NQ	NQ	NQ	0,359
K2-P1	0,242	0,008	0,191	0,212	0,020	0,019	0,692	NQ	NQ	NQ	NQ	0,065	NQ	NQ	0,064	NQ	NQ	NQ	NQ	0,247
K2-P2	0,182	0,005	0,114	0,158	0,017	0,018	0,495	NQ	NQ	NQ	NQ	0,093	0,052	0,053	0,073	NQ	NQ	NQ	NQ	0,385
K2-P3	0,208	0,007	0,123	0,165	0,016	0,017	0,536	NQ	NQ	NQ	NQ	0,079	0,050	0,048	0,067	NQ	NQ	NQ	NQ	0,338
K2-P4	0,240	0,008	0,164	0,220	0,022	0,020	0,673	NQ	NQ	NQ	NQ	0,063	NQ	NQ	0,068	NQ	NQ	NQ	NQ	0,269
K2-P5	0,195	0,007	0,117	0,132	0,018	0,016	0,484	NQ	NQ	NQ	NQ	0,083	NQ	NQ	0,058	NQ	NQ	NQ	NQ	0,337
K2-P6	0,205	0,007	0,126	0,153	0,017	0,017	0,524	NQ	NQ	NQ	NQ	0,076	NQ	NQ	0,065	NQ	NQ	NQ	NQ	0,340
K2-P7	0,238	0,008	0,160	0,198	0,020	0,018	0,641	NQ	NQ	NQ	NQ	0,076	0,055	0,051	0,092	NQ	NQ	NQ	NQ	0,383
K2-P8	0,191	0,007	0,119	0,136	0,018	0,017	0,489	NQ	NQ	NQ	NQ	0,081	NQ	NQ	0,061	NQ	NQ	NQ	NQ	0,346
K2-P9	0,182	0,006	0,115	0,130	0,019	0,018	0,470	NQ	NQ	NQ	NQ	0,089	0,049	0,049	0,075	NQ	NQ	NQ	NQ	0,387
K2-P10	0,187	0,007	0,127	0,174	0,018	0,019	0,532	NQ	NQ	NQ	NQ	0,065	NQ	NQ	0,057	NQ	NQ	NQ	NQ	0,282
K2-P11	0,179	0,007	0,121	0,142	0,021	0,020	0,490	NQ	NQ	NQ	NQ	0,084	NQ	NQ	0,062	NQ	NQ	NQ	NQ	0,345
K2-P12	0,200	0,008	0,134	0,150	0,019	0,018	0,529	NQ	NQ	NQ	NQ	0,077	0,047	NQ	0,065	NQ	NQ	NQ	NQ	0,335
K3-P1	0,184	0,006	0,136	0,191	0,030	0,033	0,580	NQ	0,059	NQ	NQ	0,049	0,057	0,059	0,115	NQ	NQ	0,047	0,087	0,551
K3-P2	0,247	0,010	0,148	0,205	0,045	0,047	0,702	NQ	0,051	NQ	NQ	NQ	0,052	0,050	0,115	NQ	NQ	0,048	0,095	0,522
K3-P3	0,186	0,005	0,111	0,138	0,029	0,030	0,500	NQ	0,065	NQ	NQ	0,066	0,079	0,078	0,139	NQ	NQ	0,070	0,134	0,721
K3-P4	0,187	0,011	0,168	0,233	0,023	0,025	0,647	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,094	NQ	NQ	NQ	NQ	0,381
K3-P5	0,203	0,012	0,158	0,165	0,030	0,025	0,593	0,048	0,054	NQ	NQ	0,058	0,049	0,049	0,118	NQ	NQ	NQ	0,062	0,508
K3-P6	0,190	0,005	0,119	0,157	0,028	0,029	0,527	0,071	0,071	NQ	NQ	0,049	0,062	0,061	0,115	NQ	NQ	0,055	0,100	0,624
K3-P7	0,188	0,006	0,119	0,148	0,031	0,030	0,522	0,071	0,075	NQ	NQ	0,053	0,065	0,066	0,125	NQ	NQ	0,060	0,111	0,667
K3-P8	0,156	0,004	0,087	0,110	0,016	0,020	0,394	0,061	0,075	NQ	NQ	0,052	0,061	0,063	0,108	NQ	NQ	NQ	0,080	0,584

Tabelle 15: Fortgesetzt.

Probe	4	5	6	7	8	9	PG	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	TG
K4-P1	0,470	0,034	0,225	0,392	0,050	0,044	1,216	NQ	NQ	NQ	NQ	0,051	NQ	0,095	0,102	NQ	NQ	0,067	NQ	0,470
K4-P2	0,541	0,038	0,254	0,433	0,048	0,039	1,354	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,071	0,096	NQ	NQ	NQ	NQ	0,327
K4-P3	0,490	0,028	0,222	0,427	0,042	0,039	1,248	NQ	NQ	NQ	NQ	0,051	NQ	0,094	0,095	NQ	NQ	0,080	NQ	0,471
K4-P4	0,378	0,029	0,177	0,273	0,045	0,040	0,942	0,058	NQ	NQ	NQ	0,057	NQ	0,086	0,081	NQ	NQ	0,083	NQ	0,518
K4-P5	0,391	0,030	0,185	0,405	0,049	0,058	1,117	0,050	NQ	NQ	NQ	0,049	NQ	0,114	0,083	NQ	NQ	0,084	NQ	0,530
K4-P6	0,385	0,029	0,185	0,330	0,046	0,048	1,024	0,060	NQ	NQ	NQ	0,051	NQ	0,079	0,065	NQ	NQ	0,070	0,048	0,472
K4-P7	0,440	0,031	0,198	0,360	0,044	0,043	1,117	0,054	NQ	NQ	NQ	0,051	NQ	0,080	0,073	NQ	NQ	0,096	NQ	0,489
K4-P8	0,413	0,033	0,201	0,297	0,043	0,036	1,022	0,086	NQ	NQ	NQ	0,060	NQ	0,077	0,064	NQ	NQ	0,076	NQ	0,493
K4-P9	0,478	0,031	0,233	0,362	0,047	0,040	1,192	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,070	0,068	NQ	NQ	NQ	NQ	0,352
K4-P10	0,469	0,036	0,211	0,343	0,046	0,041	1,146	0,056	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,086	0,066	NQ	NQ	0,058	NQ	0,400
K4-P11	0,518	0,036	0,243	0,364	0,044	0,033	1,239	0,049	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,072	0,086	NQ	NQ	0,058	NQ	0,402
K5-P1	0,580	0,041	0,284	0,550	0,055	0,085	1,595	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,052	0,066	0,134	NQ	NQ	NQ	NQ	0,404
K5-P2	0,481	0,034	0,258	0,529	0,052	0,094	1,448	NQ	0,048	NQ	NQ	NQ	0,069	0,064	0,131	NQ	NQ	NQ	0,048	0,458
K5-P3	0,404	0,030	0,215	0,445	0,050	0,084	1,228	NQ	0,064	NQ	NQ	NQ	0,094	0,082	0,163	NQ	NQ	0,053	0,066	0,624
K5-P4	0,397	0,025	0,238	0,467	0,044	0,082	1,253	NQ	0,075	NQ	NQ	0,063	0,097	0,087	0,172	NQ	NQ	0,057	0,057	0,674
K5-P5	0,518	0,040	0,355	0,398	0,072	0,067	1,449	NQ	0,056	NQ	NQ	0,049	0,051	0,048	0,139	NQ	NQ	NQ	NQ	0,427
K5-P6	0,413	0,034	0,217	0,404	0,057	0,088	1,212	NQ	0,057	NQ	NQ	0,046	0,097	0,083	0,150	NQ	NQ	0,049	0,056	0,566
K5-P7	0,459	0,033	0,231	0,492	0,053	0,086	1,354	NQ	0,048	NQ	NQ	NQ	0,085	0,080	0,155	NQ	NQ	0,054	0,065	0,532
K5-P8	0,464	0,038	0,251	0,569	0,059	0,111	1,492	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,080	0,063	0,158	NQ	NQ	NQ	NQ	0,456
K5-P9	0,426	0,031	0,243	0,529	0,054	0,096	1,379	NQ	0,052	NQ	NQ	NQ	0,089	0,074	0,172	NQ	NQ	NQ	0,055	0,524
K5-P10	0,473	0,038	0,344	0,494	0,077	0,094	1,519	NQ	0,061	NQ	NQ	0,058	0,069	0,066	0,168	NQ	NQ	NQ	NQ	0,571
C1-P1	0,318	0,014	0,171	0,185	0,021	0,017	0,727	NQ	0,056	NQ	NQ	0,095	NQ	0,056	0,147	NQ	NQ	NQ	NQ	0,534
C1-P2	0,247	0,015	0,180	0,076	0,032	0,012	0,562	0,053	0,056	NQ	NQ	0,107	NQ	0,047	0,075	NQ	NQ	0,072	NQ	0,514
C1-P3	0,238	0,015	0,130	0,076	0,028	0,012	0,500	0,057	0,052	NQ	NQ	0,101	0,060	0,079	0,080	NQ	NQ	0,065	NQ	0,558
C1-P4	0,176	0,008	0,102	0,072	0,029	0,016	0,403	0,049	0,089	NQ	NQ	0,055	0,099	0,131	0,232	NQ	NQ	0,047	0,190	0,935
C1-P5	0,220	0,011	0,135	0,078	0,025	0,009	0,477	NQ	0,097	NQ	NQ	0,094	0,076	0,091	0,111	NQ	NQ	0,079	0,056	0,685
C1-P6	0,282	0,013	0,160	0,087	0,029	0,013	0,584	NQ	NQ	NQ	NQ	0,113	0,074	0,071	0,123	NQ	NQ	0,102	0,051	0,656
C1-P8	0,201	0,010	0,118	0,086	0,031	0,021	0,467	0,056	0,067	NQ	NQ	0,085	0,075	0,110	0,150	NQ	NQ	0,091	0,097	0,768
C1-P9	0,241	0,010	0,130	0,104	0,021	0,011	0,517	NQ	0,057	NQ	NQ	0,097	NQ	0,050	0,096	NQ	NQ	0,076	NQ	0,528
C2-P1	0,236	0,011	0,197	0,210	0,038	0,033	0,724	NQ	0,049	NQ	NQ	0,070	0,082	0,083	0,137	NQ	NQ	0,072	0,091	0,629
C2-P2	0,253	0,009	0,051	0,162	0,011	0,023	0,509	NQ	0,056	NQ	NQ	0,096	0,074	0,054	0,079	NQ	NQ	0,114	0,062	0,612
C2-P3	0,271	0,017	0,080	0,074	0,023	0,015	0,479	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,109	NQ	NQ	0,049	0,100	0,453
C2-P4	0,249	0,013	0,129	0,095	0,031	0,019	0,537	NQ	0,074	NQ	NQ	NQ	0,067	0,077	0,119	NQ	NQ	NQ	0,083	0,490
C2-P5	0,272	0,008	0,137	0,223	0,018	0,020	0,678	NQ	0,048	NQ	NQ	NQ	0,046	0,051	0,171	NQ	NQ	NQ	0,125	0,566
C2-P6	0,265	0,009	0,179	0,228	0,027	0,026	0,735	NQ	0,047	NQ	NQ	0,052	0,048	0,050	0,142	NQ	NQ	0,058	0,089	0,549
C2-P7	0,358	0,019	0,046	0,193	0,012	0,027	0,655	NQ	0,048	NQ	NQ	0,047	0,058	0,055	0,120	NQ	NQ	NQ	0,057	0,478
C2-P8	0,262	0,012	0,147	0,210	0,032	0,029	0,692	NQ	0,049	NQ	NQ	0,067	0,081	0,052	0,124	NQ	NQ	0,053	0,047	0,532
C2-P9	0,377	0,025	0,191	0,163	0,049	0,026	0,831	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,059	0,141	NQ	NQ	NQ	0,056	0,375
C2-P10	0,431	0,016	0,086	0,053	0,018	0,005	0,609	NQ	0,046	NQ	NQ	0,063	0,065	0,078	0,114	NQ	NQ	0,064	0,087	0,587

Tabelle 15: Fortgesetzt.

Probe	4	5	6	7	8	9	PG	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	TG
C3-P1	0,361	0,014	0,265	0,131	0,039	0,027	0,838	NQ	0,047	NQ	NQ	0,073	0,059	0,120	0,209	NQ	NQ	0,062	0,086	0,722
C3-P3	0,720	0,017	0,195	0,048	0,014	NQ	0,993	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,146	NQ	NQ	NQ	0,049	0,305
C3-P4	0,689	0,025	0,104	0,115	0,015	0,007	0,955	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,061	0,212	NQ	NQ	NQ	0,062	0,405
C3-P5	0,481	0,017	0,347	0,142	0,035	0,010	1,032	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,054	0,163	NQ	NQ	NQ	0,048	0,345
C3-P7	0,374	0,015	0,177	0,059	0,018	0,005	0,649	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,047	0,070	0,208	NQ	NQ	NQ	0,133	0,582
C3-P9	0,260	0,008	0,321	0,145	0,030	0,010	0,775	NQ	0,047	NQ	NQ	0,051	0,064	0,114	0,158	NQ	NQ	0,093	0,093	0,679
C4-P1	0,357	0,025	0,101	0,065	0,034	0,014	0,595	NQ	0,058	NQ	NQ	0,059	0,076	0,076	0,084	NQ	NQ	0,076	0,067	0,570
C4-P2	0,301	0,021	0,132	0,066	0,039	0,012	0,571	NQ	NQ	NQ	NQ	0,066	0,064	0,068	0,073	NQ	NQ	0,112	NQ	0,502
C4-P4	0,348	0,016	0,292	0,194	0,041	0,024	0,914	NQ	NQ	NQ	NQ	0,053	0,055	0,047	0,075	NQ	NQ	0,049	NQ	0,343
C4-P5	0,417	0,039	0,272	0,296	0,078	0,064	1,166	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,085	0,069	0,103	NQ	NQ	NQ	NQ	0,356
C4-P6	0,453	0,039	0,139	0,366	0,037	0,058	1,093	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,067	0,049	0,111	NQ	NQ	NQ	NQ	0,322
C4-P9	0,680	0,045	0,163	0,364	0,037	0,032	1,321	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,140	NQ	NQ	NQ	NQ	0,235
C4-P10	0,593	0,032	0,272	0,221	0,049	0,023	1,190	NQ	NQ	NQ	NQ	0,053	0,047	NQ	0,068	NQ	NQ	NQ	NQ	0,206
C5-P1	0,266	0,006	0,077	0,004	0,006	NQ	0,360	NQ	0,051	0,060	NQ	NQ	0,074	0,096	0,166	NQ	NQ	NQ	0,117	0,599
C6-P2	0,276	0,007	0,037	0,081	0,005	0,006	0,412	NQ	0,054	NQ	NQ	0,073	NQ	0,049	0,080	NQ	NQ	0,088	0,077	0,457
C6-P3	0,173	0,011	0,057	0,071	0,017	0,017	0,346	NQ	0,066	NQ	NQ	NQ	0,081	0,068	0,111	NQ	NQ	NQ	0,085	0,440
C6-P5	0,199	0,011	0,067	0,081	0,014	0,014	0,386	NQ	0,047	NQ	NQ	NQ	0,072	0,063	0,082	NQ	NQ	NQ	0,063	0,327
C6-P6	0,316	0,009	0,056	NQ	0,007	NQ	0,387	NQ	0,080	NQ	NQ	0,081	0,082	0,067	0,106	NQ	NQ	0,052	0,066	0,609
C6-P7	0,227	0,009	0,043	0,073	0,008	0,008	0,369	NQ	0,063	NQ	NQ	0,088	0,087	0,054	0,065	NQ	NQ	0,083	0,050	0,559
C7-P1	0,234	0,016	0,189	0,087	0,046	0,020	0,593	NQ	0,061	NQ	NQ	NQ	0,075	0,070	0,096	NQ	NQ	NQ	0,053	0,467
C7-P2	0,170	0,010	0,121	0,108	0,039	0,039	0,488	NQ	0,095	NQ	NQ	0,062	0,095	0,087	0,119	NQ	NQ	0,062	0,085	0,684
C7-P3	0,243	0,009	0,213	0,153	0,022	0,012	0,651	NQ	0,063	NQ	NQ	NQ	0,070	0,048	0,090	NQ	NQ	NQ	0,049	0,378
C7-P4	0,229	0,016	0,193	0,155	0,055	0,044	0,692	NQ	0,047	NQ	NQ	NQ	0,050	0,049	0,078	NQ	NQ	NQ	0,059	0,412
C7-P5	0,153	0,007	0,127	0,140	0,034	0,037	0,497	NQ	0,065	NQ	NQ	NQ	0,071	0,073	0,098	NQ	NQ	NQ	0,066	0,523
C7-P6	0,203	0,009	0,201	0,096	0,026	0,012	0,548	NQ	0,054	NQ	NQ	0,057	0,065	0,055	0,087	NQ	NQ	NQ	NQ	0,381
C7-P7	0,137	0,007	0,129	0,079	0,026	0,015	0,392	0,049	0,091	NQ	NQ	NQ	0,093	0,090	0,102	NQ	NQ	0,059	0,106	0,669
C8-P1	0,225	0,008	0,179	0,274	0,021	0,026	0,733	NQ	NQ	NQ	NQ	0,057	NQ	NQ	0,061	NQ	NQ	NQ	NQ	0,261
C9-P1	0,234	0,012	0,177	0,150	0,036	0,023	0,631	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,053	0,071	0,113	NQ	NQ	NQ	0,084	0,459
C9-P2	0,303	0,012	0,197	0,121	0,029	0,013	0,676	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,119	NQ	NQ	NQ	0,091	0,364
C9-P3	0,221	0,009	0,204	0,177	0,022	0,013	0,645	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,079	NQ	NQ	NQ	NQ	0,317
C9-P4	0,282	0,012	0,129	0,225	0,020	0,020	0,688	NQ	NQ	NQ	NQ	0,047	0,056	0,062	0,104	NQ	NQ	NQ	0,061	0,435
C9-P5	0,174	0,012	0,154	0,213	0,051	0,067	0,670	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,087	0,107	0,142	NQ	NQ	NQ	0,097	0,569
C9-P6	0,162	0,009	0,097	0,122	0,029	0,027	0,446	NQ	0,054	NQ	NQ	0,063	0,101	0,102	0,129	NQ	NQ	NQ	0,070	0,628
C9-P8	0,372	0,019	0,170	0,236	0,030	0,028	0,855	NQ	0,050	NQ	NQ	NQ	0,051	0,059	0,174	NQ	NQ	NQ	0,116	0,547
C10-P1	0,254	0,015	0,051	0,146	0,016	0,032	0,513	NQ	0,068	NQ	NQ	0,101	0,054	0,069	0,062	NQ	NQ	NQ	NQ	0,433
C10-P2	0,314	0,017	0,090	0,300	0,018	0,037	0,777	0,053	0,065	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,110	NQ	NQ	NQ	NQ	0,372
C10-P3	0,375	0,019	0,111	0,409	0,019	0,041	0,974	NQ	NQ	NQ	NQ	0,063	NQ	NQ	0,051	NQ	NQ	NQ	NQ	0,166
C10-P4	0,422	0,012	0,114	0,259	0,011	0,011	0,830	NQ	NQ	NQ	NQ	0,047	NQ	NQ	0,054	NQ	NQ	NQ	NQ	0,225
C10-P5	0,218	0,014	0,178	0,126	0,045	0,026	0,607	NQ	0,064	NQ	NQ	0,103	0,062	0,070	0,078	NQ	NQ	0,070	NQ	0,566
C10-P6	0,110	0,006	0,129	0,195	0,023	0,027	0,490	NQ	0,063	NQ	NQ	0,081	0,070	0,066	0,090	NQ	NQ	0,060	NQ	0,545

Tabelle 15: Fortgesetzt.

Probe	4	5	6	7	8	9	PG	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	TG
C10-P7	0,199	0,010	0,191	0,196	0,026	0,018	0,641	NQ	0,068	NQ	NQ	0,101	0,061	0,065	0,065	NQ	NQ	0,081	NQ	0,544
C10-P8	0,208	0,012	0,232	0,251	0,026	0,027	0,757	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,074
C10-P9	0,209	0,017	0,112	0,247	0,034	0,054	0,672	NQ	0,069	NQ	0,059	0,147	0,074	0,074	0,108	NQ	NQ	0,140	0,051	0,766
C11-P1	0,196	0,006	0,111	0,111	0,014	0,010	0,448	0,047	0,055	NQ	NQ	0,107	0,055	0,049	0,050	NQ	NQ	0,061	NQ	0,470
C11-P2	0,401	0,014	0,203	0,560	0,016	0,032	1,226	NQ	NQ	NQ	NQ	0,055	NQ	NQ	0,081	NQ	NQ	NQ	NQ	0,277
C11-P3	0,190	0,005	0,090	0,216	0,009	0,012	0,522	NQ	0,057	NQ	NQ	0,077	0,048	0,046	0,083	NQ	NQ	NQ	NQ	0,424
C11-P4	0,349	0,020	0,148	0,419	0,028	0,043	1,007	NQ	0,049	NQ	NQ	0,098	0,046	NQ	0,057	NQ	NQ	NQ	NQ	0,408
C11-P5	0,229	0,010	0,119	0,109	0,025	0,017	0,509	0,056	0,063	NQ	0,048	0,090	0,063	0,052	0,079	NQ	NQ	0,096	NQ	0,587
C11-P6	0,427	0,014	0,221	0,217	0,024	0,014	0,917	NQ	NQ	NQ	NQ	0,050	NQ	NQ	0,078	NQ	NQ	NQ	NQ	0,312
C11-P7	0,348	0,013	0,120	0,373	0,019	0,028	0,901	NQ	0,052	NQ	0,049	0,070	0,058	NQ	0,095	NQ	NQ	0,082	NQ	0,530
C11-P8	0,371	0,017	0,119	0,197	0,021	0,021	0,747	NQ	NQ	NQ	NQ	0,083	NQ	NQ	0,066	NQ	NQ	0,050	NQ	0,376
C11-P9	0,289	0,009	0,154	0,393	0,015	0,024	0,885	NQ	0,050	NQ	NQ	0,080	0,050	NQ	0,087	NQ	NQ	NQ	NQ	0,405
C12-P1	0,276	0,013	0,069	0,185	0,018	0,038	0,599	NQ	0,081	NQ	NQ	NQ	0,073	0,069	0,106	NQ	NQ	NQ	NQ	0,416
C12-P2	0,367	0,020	0,226	0,074	0,054	0,015	0,756	NQ	0,072	NQ	NQ	NQ	0,083	0,102	0,118	NQ	NQ	NQ	0,073	0,522
C12-P3	0,382	0,018	0,156	0,323	0,027	0,047	0,952	0,055	0,051	NQ	NQ	0,062	0,060	0,106	0,071	NQ	NQ	0,047	NQ	0,514
C12-P4	0,435	0,020	0,300	0,199	0,044	0,028	1,025	NQ	0,061	NQ	NQ	0,062	0,067	0,114	0,161	NQ	NQ	0,049	0,077	0,659
C13-P1	0,256	0,010	0,165	0,156	0,026	0,021	0,633	NQ	0,067	NQ	NQ	0,061	0,061	0,072	0,237	NQ	NQ	0,048	0,151	0,770
C13-P2	0,217	0,012	0,252	0,171	0,043	0,023	0,719	NQ	0,053	NQ	NQ	0,099	0,046	NQ	0,104	NQ	NQ	0,054	NQ	0,466
C13-P3	0,252	0,012	0,250	0,206	0,040	0,028	0,789	NQ	0,061	NQ	NQ	NQ	0,071	0,084	0,149	NQ	NQ	NQ	0,086	0,575
C13-P4	0,214	0,018	0,208	0,159	0,047	0,027	0,673	0,051	0,067	NQ	NQ	NQ	0,064	0,076	0,149	NQ	NQ	NQ	0,089	0,526
C13-P5	0,235	0,009	0,282	0,220	0,029	0,019	0,793	NQ	0,049	NQ	NQ	NQ	0,051	0,059	0,084	NQ	NQ	NQ	NQ	0,380
C13-P6	0,229	0,013	0,254	0,159	0,036	0,018	0,708	0,049	0,066	NQ	NQ	0,063	0,063	0,087	0,091	NQ	NQ	NQ	NQ	0,493
C14-P1	0,294	0,020	0,156	0,079	0,045	0,019	0,614	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,091	NQ	NQ	NQ	NQ	0,281
C14-P2	0,291	0,012	0,155	0,092	0,028	0,010	0,588	NQ	NQ	NQ	NQ	0,052	0,050	0,048	0,086	NQ	NQ	NQ	NQ	0,354
C14-P3	0,355	0,025	0,181	0,118	0,047	0,023	0,748	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,101	NQ	NQ	NQ	0,049	0,283
C14-P4	0,241	0,010	0,102	0,055	0,021	0,007	0,435	NQ	0,048	NQ	NQ	0,061	0,069	0,071	0,081	NQ	NQ	0,060	0,054	0,467
C14-P5	0,201	0,019	0,102	0,054	0,049	0,021	0,446	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,058	0,065	0,092	NQ	NQ	NQ	0,065	0,411
C15-P1	0,368	0,013	0,095	0,264	0,016	0,019	0,776	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,050	NQ	NQ	NQ	NQ	0,184
C15-P2	0,289	0,020	0,082	0,213	0,018	0,021	0,643	NQ	NQ	NQ	NQ	0,059	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,191
C15-P3	0,297	0,009	0,190	0,289	0,018	0,017	0,820	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,056	NQ	NQ	NQ	NQ	0,151
C15-P4	0,508	0,021	0,123	0,270	0,018	0,020	0,960	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,048	NQ	NQ	NQ	NQ	0,048
C15-P5	0,502	0,020	0,125	0,317	0,019	0,020	1,003	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,070	NQ	NQ	NQ	NQ	0,149
C16-P1	0,192	0,013	0,108	0,064	0,043	0,024	0,444	NQ	0,058	NQ	NQ	NQ	0,057	0,107	0,138	NQ	NQ	0,062	0,141	0,675
C16-P2	0,336	0,029	0,138	0,060	0,048	0,015	0,627	NQ	0,051	NQ	NQ	0,093	0,064	0,100	0,099	NQ	NQ	0,102	0,064	0,653
C16-P3	0,204	0,008	0,148	0,288	0,016	0,023	0,687	NQ	NQ	NQ	NQ	0,073	NQ	NQ	0,063	NQ	NQ	NQ	NQ	0,291
C16-P4	0,305	0,009	0,124	0,455	0,013	0,027	0,933	NQ	0,057	NQ	NQ	0,051	0,049	NQ	0,087	NQ	NQ	NQ	NQ	0,355
C16-P5	0,459	0,017	0,129	0,151	0,019	0,011	0,787	NQ	NQ	NQ	NQ	0,094	NQ	NQ	0,075	NQ	NQ	0,049	NQ	0,328
C16-P6	0,474	0,028	0,128	0,177	0,029	0,019	0,856	NQ	NQ	NQ	NQ	0,069	0,060	0,088	0,103	NQ	NQ	0,049	NQ	0,442
C16-P7	0,321	0,009	0,095	0,070	0,011	0,005	0,511	NQ	0,050	NQ	NQ	0,069	0,049	0,059	0,077	NQ	NQ	0,052	NQ	0,440

Tabelle 15: Fortgesetzt.

Probe	4	5	6	7	8	9	PG	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	TG
C17-P1	0,349	0,011	0,125	0,210	0,019	0,020	0,733	NQ	NQ	NQ	NQ	0,093	0,056	NQ	NQ	NQ	NQ	0,051	NQ	0,389
C17-P2	0,391	0,016	0,119	0,263	0,017	0,022	0,829	NQ	NQ	NQ	NQ	0,076	NQ	0,051	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,285
C17-P3	0,361	0,008	0,095	0,300	0,008	0,013	0,785	NQ	NQ	NQ	NQ	0,072	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,269
C17-P4	0,243	0,010	0,139	0,167	0,027	0,021	0,608	NQ	NQ	NQ	0,049	0,104	0,062	0,051	NQ	NQ	NQ	0,070	NQ	0,433
WC1	0,228	0,016	0,037	0,092	0,015	0,025	0,414	NQ	0,127	0,057	0,053	0,174	0,227	0,233	0,270	NQ	NQ	0,057	0,089	1,381
WC2	0,143	0,008	0,085	0,181	0,020	0,029	0,465	NQ	0,088	NQ	0,061	0,151	0,184	0,191	0,147	NQ	NQ	0,065	0,079	1,102
WC3	0,230	0,009	0,117	0,219	0,024	0,023	0,622	NQ	0,128	0,053	0,048	0,189	0,196	0,178	0,175	NQ	NQ	0,094	0,117	1,290
WC4	0,160	0,008	0,099	0,177	0,019	0,023	0,486	NQ	0,087	NQ	0,046	0,124	0,123	0,151	0,151	NQ	NQ	0,051	0,062	0,870
WC5	0,194	0,009	0,131	0,233	0,023	0,027	0,616	0,054	0,106	NQ	0,048	0,178	0,140	0,162	0,127	NQ	NQ	0,070	0,053	0,974
WC6	0,208	0,007	0,125	0,277	0,017	0,021	0,655	NQ	0,092	0,050	0,067	0,142	0,161	0,165	0,204	NQ	NQ	0,065	0,121	1,144
B2	0,387	0,016	0,134	0,386	0,017	0,026	0,965	NQ	0,076	NQ	NQ	0,143	0,152	0,147	0,235	NQ	NQ	NQ	0,049	0,940
B6	0,206	0,013	0,069	0,140	0,022	0,040	0,490	0,048	0,110	NQ	0,064	0,204	0,193	0,219	0,168	NQ	NQ	0,084	0,066	1,271
WE1	0,259	0,009	0,184	0,177	0,017	0,013	0,660	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,147	NQ	NQ	NQ	NQ	0,308
WE2	0,271	0,014	0,121	0,157	0,024	0,025	0,612	0,061	0,135	NQ	0,055	0,223	0,200	0,206	0,181	NQ	NQ	0,068	0,054	1,274
WE3	0,176	0,009	0,084	0,173	0,019	0,026	0,487	0,049	0,124	0,049	NQ	0,181	0,207	0,195	0,225	NQ	NQ	0,053	0,085	1,282
WE4	0,175	0,008	0,070	0,130	0,018	0,022	0,423	NQ	0,112	NQ	0,054	0,184	0,185	0,204	0,141	NQ	NQ	0,115	0,086	1,228
WE5	0,148	0,008	0,065	0,152	0,014	0,020	0,406	0,048	0,125	0,047	NQ	0,186	0,236	0,202	0,332	0,088	0,112	0,053	0,087	1,556
WE6	0,063	0,005	0,027	0,020	0,011	0,007	0,134	NQ	0,085	NQ	0,080	0,162	0,156	0,198	0,166	0,046	0,050	0,272	0,281	1,556
WE7	0,064	0,008	0,036	0,175	0,017	0,069	0,370	NQ	0,062	NQ	0,064	0,243	0,121	0,145	0,125	0,050	NQ	NQ	NQ	0,916
WE8	0,142	0,008	0,022	0,008	0,005	0,009	0,193	NQ	0,047	NQ	NQ	0,052	0,141	0,109	0,101	NQ	NQ	0,196	0,089	0,772
B1	0,233	0,015	0,095	0,324	0,019	0,039	0,726	NQ	0,048	NQ	NQ	0,052	0,088	0,060	0,245	NQ	NQ	NQ	0,092	0,671
B3	0,263	0,016	0,110	0,416	0,023	0,070	0,896	NQ	NQ	NQ	NQ	0,052	0,094	0,062	0,247	NQ	NQ	NQ	0,074	0,620
B4	0,165	0,011	0,059	0,201	0,012	0,021	0,469	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,136	NQ	NQ	NQ	NQ	0,240
B5	0,238	0,015	0,103	0,371	0,021	0,043	0,792	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,082	0,056	0,248	NQ	NQ	NQ	0,080	0,568
B7	0,295	0,020	0,100	0,279	0,025	0,035	0,753	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0,098	0,072	0,241	NQ	NQ	NQ	0,158	0,726
B8	0,207	0,016	0,076	0,146	0,024	0,026	0,495	0,048	0,056	NQ	NQ	0,049	0,134	0,097	0,251	NQ	NQ	0,073	0,208	1,025

2. Massenspektren der Polyphenole und Triterpenglykoside

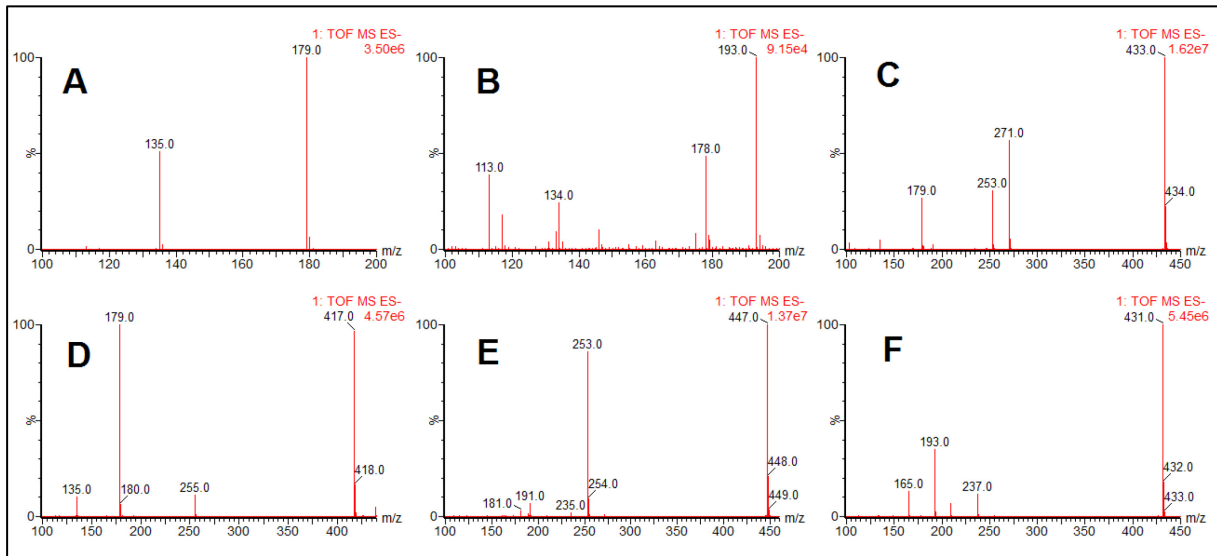


Abbildung 71: Massenspektren für Polyphenole aus LC/(-)-ESI-QTOF-MS zur Identifizierung von Peaks für Quantifizierung mittels LC/DAD. Kaffeesäure (**A**, **1**) m/z 179,037 $[M-H]^-$, (Iso-) Ferulasäure (**B**, **2**, **3**) m/z 193,044 $[M-H]^-$, Fukinolsäure (**C**, **4**) m/z 433,047 $[M-H]^-$, Cimicifugasäure D (**D**, **5**) m/z 417,031 $[M-H]^-$, Cimicifugasäuren A+B (**E**, **6**, **7**) m/z 447,057 $[M-H]^-$, Cimicifugasäure E+F (**F**, **8**, **9**) m/z 431,051 $[M-H]^-$. Für Fragmentationen siehe Tabelle 16.

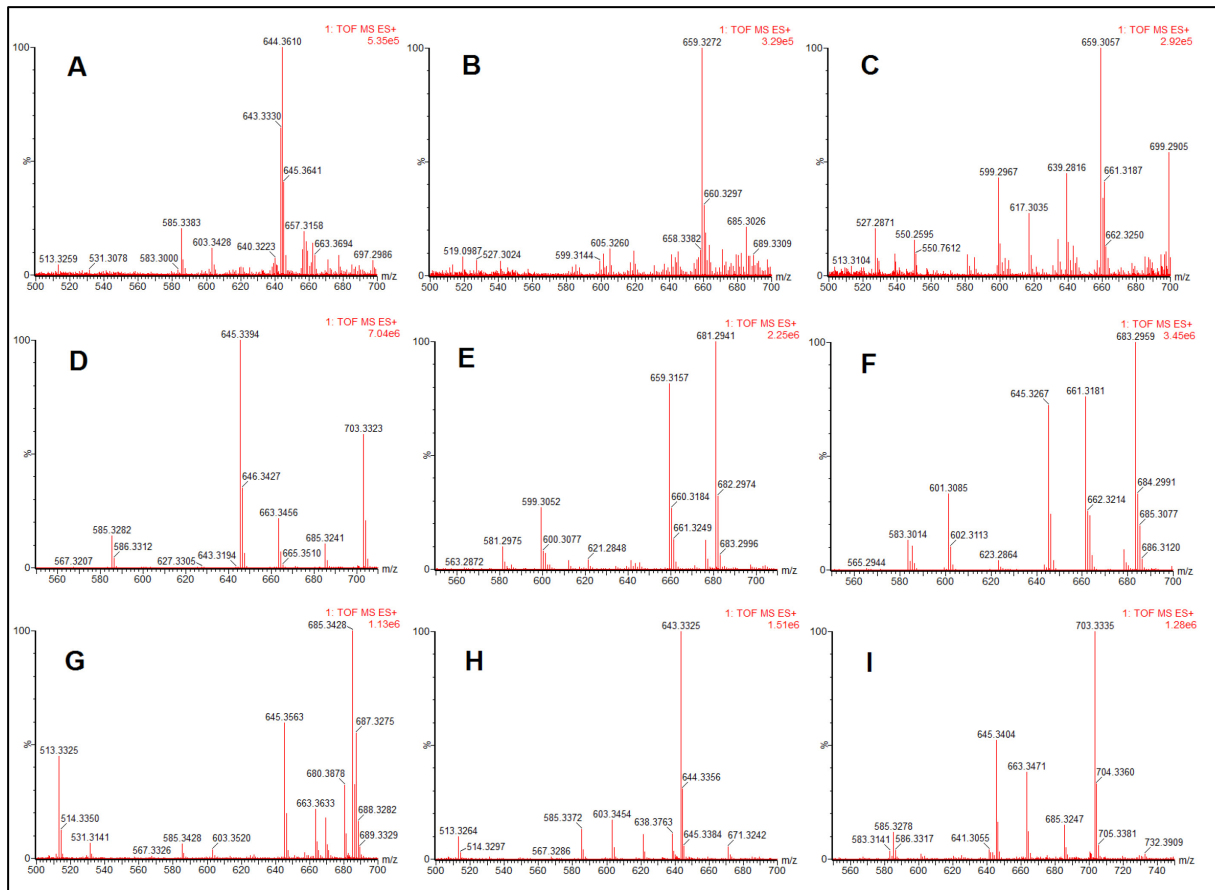


Abbildung 72: Massenspektren für Triterpenglykoside aus LC/(+)-ESI-QTOF-MS zur Identifizierung von Peaks zur Quantifizierung mittels LC/ELSD. Cimifugosid H1 (**A**, **10**) m/z 643,340 $[M+Na]^+$, Cimiracemosid A (**B**, **11**) m/z 659,378 $[M-H_2O+H]^+$, Actein (**C**, **12**) m/z 699,368 $[M+Na]^+$, Acetylhydroshengmanolarabinosid/-xylosid (**D**, **13, 14**) m/z 703,403 $[M+Na]^+$, Cimiracemosid J (**E**, **15**) m/z 681,361 $[M+Na]^+$, 23-*epi*-26-Deoxyactein (**F**, **16**) m/z 683,379 $[M+Na]^+$, Acetylshengmanolxylosid (**G**, **17**) m/z 685,389 $[M+Na]^+$, Cimigenolarabinosid/-xylosid (**H**, **18, 19**) m/z 643,380 $[M+Na]^+$, Acetylcimigenolarabinosid/-xylosid (**I**, **20, 21**) m/z 663,409 $[M+H]^+$. Für weitere Addukt-, Precursor- oder Fragmentationen siehe Tabelle 16.

3. Polyphenole und Triterpenglykoside in LC/MS

Tabelle 16: Ausgewählte Ionen (m/z) zur Identifizierung von Polyphenolen und Triterpenglykosiden in *C. rhizoma* Extrakten mittels LC/(-/+)-ESI-QTOF-MS.

Verbin- dung	t_R (min) LC/DAD	t_R (min) LC/MS	Summen- formel	Masse	Addukt-, Precursor- und Fragmentionen
1	4,4	10,5	C ₉ H ₈ O ₄	180,042	179,037 [M-H] ⁻ , 135,051 [M-COO] ⁻
2	9,0	19,9	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,058	193,044 [M-H] ⁻ , 178,031 [M-CH ₃ -H] ⁻ ,
3	10,6	22,3			134,046 [M-CH ₃ -COO] ⁻
4	12,9	25,7	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	434,085	433,047 [M-H] ⁻ , 271,037 [M ^{Fucic acid} -H] ⁻ ,
5	17,0	31,7	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	418,090	253,029 [M ^{Fucic acid} -H ₂ O-H] ⁻ , 179,038 [M ^{Caffeic acid} -H] ⁻
6	19,6	35,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,085	417,031 [M-H] ⁻ , 255,031 [M ^{Piscic acid} -H] ⁻ , 179,028 [M ^{Caffeic acid} -H] ⁻ ,
7	20,0	37,5			135,045 [M ^{Caffeic acid} -COO] ⁻
8	22,8	42,3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,106	447,057 [M-H] ⁻ , 253,028 [M ^{Fucic acid} -H ₂ O-H] ⁻
9	23,6	43,8			431,051 [M-H] ⁻ , 237,027 [M ^{Piscic acid} -H ₂ O-H] ⁻ ,
					193,044 [M ^{Ferulic acid} -H] ⁻
Verbin- dung	t_R (min) LC/ELSD	t_R (min) LC/MS	Summen- formel	Masse	Addukt-, Precursor- und Fragmentionen
10	9,3	6,9	C ₃₅ H ₅₆ O ₉	620,392	643,340 [M+Na] ⁺
11	10,1	7,4	C ₃₇ H ₅₆ O ₁₁	676,382	659,378 [M-H ₂ O+H] ⁺ , 599,360 [M-H ₂ O-CH ₃ COOH+H] ⁺
12	13,9	10,9	C ₃₇ H ₅₆ O ₁₁	676,382	699,368 [M+Na] ⁺ , 617,362 [M-CH ₃ COOH+H] ⁺ ,
13	15,3	11,9	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	680,414	599,360 [M-H ₂ O-CH ₃ COOH+H] ⁺
14	15,8	12,4	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	680,414	621,403 [M-CH ₃ COOH+H] ⁺ , 603,385 [M-H ₂ O-CH ₃ COOH+H] ⁺ ,
15	16,4	12,8	C ₃₈ H ₅₈ O ₉	658,408	585,378 [M-2H ₂ O-CH ₃ COOH+H] ⁺
16	17,5	13,7	C ₃₇ H ₅₆ O ₁₀	660,387	703,403 [M+Na] ⁺ , 685,390 [M-H ₂ O+H] ⁺ ,
17	18,2	14,2	C ₃₇ H ₅₈ O ₁₀	662,403	585,378 [M-2H ₂ O-CH ₃ COOH+H] ⁺
18	20,0	15,6	C ₃₅ H ₅₆ O ₉	662,403	681,361 [M+Na] ⁺ , 659,378 [M+H] ⁺ , 599,360 [M-CH ₃ COOH+H] ⁺ ,
19	21,9	17,1	C ₃₅ H ₅₆ O ₉	620,392	581,350 [M-H ₂ O-CH ₃ COOH+H] ⁺
20	25,4	19,8	C ₃₇ H ₅₈ O ₁₀	662,403	683,379 [M+Na] ⁺ , 661,398 [M+H] ⁺ , 601,371 [M-CH ₃ COOH+H] ⁺
21	28,9	22,6	C ₃₇ H ₅₈ O ₁₀	662,403	685,389 [M+Na] ⁺ , 680,438 [M+NH ₄] ⁺ , 663,409 [M+H] ⁺ ,
					585,378 [M-H ₂ O-CH ₃ COOH+H] ⁺
					603,385 [M-CH ₃ COOH+H] ⁺ , 585,378 [M-H ₂ O-CH ₃ COOH+H] ⁺

Zusammenfassung

Die Basis dieser Arbeit bildete ein umfangreicher Probensatz von am Albrecht Daniel Thaer-Institut der Humboldt Universität zu Berlin im Zeitraum von 2002–2014 kultivierten Einzelpflanzen von *Actaea racemosa* (L.) (Ranunculaceae) und anderen *Actaea* spp. Der Probensatz bestand aus vegetativ vermehrten Pflanzen – sogenannten Klonen – und Pflanzen unterschiedlicher Herkunft, z. B. aus Botanischen Gärten, von Universitäten oder Staudengärtnereien in Europa und den USA. Die Pflanzen sind unter einheitlichen Wachstumsbedingungen kultiviert und im Herbst 2014 gleichzeitig geerntet worden. Der pharmazeutisch genutzte Pflanzenteil ist das Rhizom (*Cimicifugae rhizoma*). Die Rhizome der in Berlin geernteten Exemplare wurden gemeinsam mit Mischchargen aus kommerziellem Anbau bzw. Wildsammlungen sowie Einzelexemplaren aus Wildsammlungen phytoanalytisch untersucht.

Verschiedene Aspekte standen dabei im Fokus. Zum einen wurde untersucht, wie homogen genetisch einheitliches Material im Hinblick auf wertbestimmende Inhaltsstoffe ist. Ebenso wurden in Berlin kultivierte Einzelexemplare von *A. racemosa* verschiedener Herkunft im Hinblick auf Polyphenol- und Triterpenglykosidmuster charakterisiert. Der zweite Aspekt dieser Arbeit war die Entwicklung alternativer analytischer Verfahren zur Prüfung auf Identität und Substitution von *C. rhizoma*. Vor dem Hintergrund immer aufwändigerer neuer Verfahren wie dem Metabolic Fingerprinting oder dem DNA-Barcoding wurde untersucht, ob auch gängige, bereits in Routinelaboren etablierte Verfahren wie UV/VIS-Spektroskopie, NIR-Spektroskopie oder HPLC/DAD geeignet sind, ebensolche Prüfung zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden sie an multivariate Analyseverfahren gekoppelt. Der dritte Aspekt dieser Arbeit betraf die Quantifizierung wertbestimmender Inhaltsstoffe in *C. rhizoma* mittels NIR-Spektroskopie.

Die verschiedenen Klonpflanzen zeigten Schwankungen an Gehalten von Fukinolsäure und Acetylshengmanolxylosid – als prominenteste Vertreter der beiden Inhaltsstoffgruppen Polyphenole und Triterpenglykoside – von 11,5–13,3 % bzw. 8,0–17,0 % und lagen damit geringfügig über bzw. auf dem Niveau der Schwankung innerhalb ein und desselben Rhizoms mit jeweils 13,3 % bzw. 5,7 %. Die Gehalte derselben Verbindungen schwankten in den in Berlin kultivierten, genetisch uneinheitlichen Exemplaren ($n = 101$) um 37,8 % bzw. 42,4 %. In Handelsware aus Wildsammlungen ($n = 6$) schwankten entsprechende Gehalte um 33,9 % bzw. 26,3 %. Starke Unterschiede ergaben sich vor allem im Vergleich der Pflanzen aus Wildsammlungen und aus Kultur im Hinblick auf den Gesamtgehalt an Triterpenglykosiden, der in ersteren im Mittel bei $> 1,1$ %, in letzteren bei $< 0,5$ % lag. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang der Einfluss der Wachstumsbedingungen bzw. der Einfluss der Wachstumsgeschwindigkeit. Für den Gehalt an Polyphenolen wurden allerdings keine großen Unterschiede in *C. rhizoma* verschiedener Herkunft gefunden. Im Hinblick auf Triterpenglykosid-

Fingerprints wurden daher weiterhin Chemotypen postuliert, da bestimmte Muster sowohl bei Exemplaren aus Kultur als auch aus Wildsammlungen auftraten.

Die UV/VIS-Spektroskopie, die NIR-Spektroskopie sowie die HPLC/UV konnten erfolgreich zur Abgrenzung von nah verwandten asiatischen und einer nordamerikanischen *Actaea* sp. und *A. racemosa* herangezogen werden. Ein auf Linearer Diskriminanzanalyse (LDA) basierendes multivariates Klassifizierungsmodell war in der Lage, die Zugehörigkeit einer Probe zu den Arten *A. cimicifuga*, *A. cordifolia*, *A. heracleifolia*, *A. simplex* und *A. racemosa* anhand von UV-Spektren eines Extrakts vorherzusagen. Ebenso konnten die Gehalte für Polyphenole in Rhizomen dieser verschiedenen *Actaea* spp. zu deren Unterscheidung herangezogen werden. In einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) basierend auf diesen Daten zeigten sich separate Cluster der jeweiligen Arten. Weiterhin konnte die NIR-Spektroskopie o. g. asiatische Arten von den nordamerikanischen abgrenzen. Zusätzlich war die NIR-Spektroskopie in der Lage, *C. rhizoma* Handelsware von den in Berlin kultivierten Exemplaren zu unterscheiden.

Basierend auf Referenzdaten für Polyphenole und Triterpenglykoside in *C. rhizoma* aus LC/DAD bzw. /ELSD wurden mittels PLS-Regression Vorhersagemodelle für Quantifizierung dieser Inhaltsstoffgruppen sowie Einzelverbindungen mittels NIR-Spektroskopie etabliert. Unterschiede in der Güte der Vorhersagemodelle (Kreuzvalidierungen) ergaben sich je nach Qualität der Referenzdaten aus LC, dem absoluten Gehalt der zu quantifizierenden Verbindung in *C. rhizoma* und je nach Probenstet. Für Polyphenole ergaben sich meist sehr gute bis gute Modelle für z. B. die Bestimmung des Gesamtgehalts in Klonpflanzen mit $R^2 = 0,98$ und RPD = 7,61 oder einzelne Polyphenole (alle $R^2 \geq 0,92$). Die heterogenere Gruppe der kultivierten Exemplare verschiedener Herkunft zeigte $R^2 = 0,93$ für den Gesamtgehalt, aber eine Modellentwicklung für einzelne Verbindungen war kaum möglich. Im gesamten Probenstet ($n = 163$), bestehend aus Klonpflanzen, kultivierten Exemplaren und Mischchargen aus Wildsammlungen zeigten nur der Gesamtgehalt an Polyphenolen ($R^2 = 0,95$ und RPD = 4,62) und die Summe von Cimicifugasäure A+B ($R^2 = 0,84$ und RPD = 2,49) Korrelation. Aufgrund der geringen Gehalte (häufig < LOQ) an Triterpenglykosiden in den kultivierten Exemplaren konnten generell keine Modelle etabliert werden. Der Bestwert lag hier bei $R^2 = 0,86$ für Acetylshengmanolxylosid in Klonpflanzen. Für die Handelsware aus Wildsammlungen mit ihren entsprechenden höheren Gehalten konnte allerdings ein vielversprechendes Modell auch für den Gesamtgehalt an Triterpenglykosiden ($R^2 0,93$ /RPD = 4,22) etabliert werden. Da hier allerdings nur sechs Proben mit einbezogen werden konnten, ist dieses Modell nicht als einsatzfähig zu betrachten. Weitere Untersuchungen sollten dahingehend angestellt werden.

Summary

This work is based on a large sample set of *Actaea racemosa* (L.) rhizomes (Cimicifugae rhizoma). The source plants have been cultivated in Berlin at the Albrecht Daniel Thaer-Institute of Agricultural and Horticultural Sciences in the years 2002–2014. The sample set consisted of genetically identical plants derived by vegetative propagation (clone plants), as well as a collection from different origins, e.g. botanical gardens or perennial nurseries from Europe and the US. Furthermore, different Asian and North American *Actaea* spp. have been cultivated. This set of samples from cultivation in Berlin was extended by different other types of *C. rhizoma*, i.e. by mixed batches from wholesalers and individual plants – both from wild harvesting in the US – and mixed batches from commercial cultivation in Germany. Altogether, over 200 samples have been phytoanalytically characterised by different methods of modern pharmacognosy, such as LC, TLC, LC/MS, UV/VIS and NIR spectroscopy.

We focussed on three different aspects during these studies. First, the cultivated specimens – especially the clone plants – were characterised with regards to their homogeneity in comparison to the plants from different origins. The plants from different origins were investigated for their patterns of polyphenols and triterpene glycosides. The cause of the plant's differences was assumed in the genetic diversity within the species *A. racemosa*, as they grew in the same environment. Secondly, this work focussed on development of alternative methods for species authentication. As recent methods get more and more sophisticated, e.g. metabolic fingerprinting or DNA-barcoding, we investigated simple and well-established methods. UV/VIS spectroscopy, HPLC, and NIR spectroscopy were coupled to multivariate analytical tools in order to make them capable of distinguishing different *Actaea* spp. from *A. racemosa*. Last, NIR spectroscopy was investigated for quantification of value determining compound classes in *C. rhizoma*.

The different sets of clone plants showed a low variability (relative standard deviation) of content in fukinolic acid or acetylshengmanolxyloside – the two most prominent representative compounds for both major groups of constituents in *C. rhizoma*, polyphenols and triterpene glycosides – with 11.5–13.3 % and 8.0–17.0 %, respectively. This variability was only slightly higher as/at the level of the variability in one rhizome with each 13.3 % and 5.7 %. In contrast, both compounds varied by 37.8 % and 42.4 % in rhizomes of plants from different origins cultivated in Berlin. The mixed batches from wild showed a variability of only 33.9 % and 26.3 %, respectively. Rhizomes/batches from wild harvests showed generally higher total contents in triterpene glycosides (mean 1.1 %) in comparison to the plants from cultivation in Berlin (mean 0.5 %). An environmental influence and an influence of growth rate are discussed. Nevertheless, polyphenol contents were comparable within these groups of samples. For this reason, triterpene glycoside fingerprints were investigated. Different pat-

terns of triterpene glycosides were found irrespectively of plant origin. Therefore, potential chemotypes of *A. racemosa* were proposed.

UV/VIS spectroscopy, HPLC, and NIR spectroscopy were successfully applied to distinguish between different Asian and North American *Actaea* spp. and *A. racemosa*. UV/VIS spectroscopy coupled to the multivariate classification technique Linear Discriminant Analysis (LDA) was able to predict species membership for *A. cimicifuga*, *A. cordifolia*, *A. heracleifolia*, *A. simplex* and *A. racemosa* within the sample set of this study. Furthermore, genuine patterns of polyphenols in the species rhizomes – quantified by LC/DAD – could be used to distinguish those species. The species formed separate clusters in Principle Component Analysis (PCA) based upon polyphenol data. In addition, NIR spectroscopy was able to discriminate at least North American and Asian *Actaea* spp. from each other.

NIR spectroscopy quantification of polyphenols and triterpene glycosides was investigated based upon reference data, determined by LC/DAD and LC/ELSD. Via Partial Least Squares Regression (PLSR) prediction models were built by correlating NIR spectra with reference data. Cross-validation was carried out. The quality of prediction models differed depending on the quality of reference data, the absolute content of the constituents in *C. rhizoma*, and the investigated sample subset. In general, model quality was good to very good for polyphenols, e.g. in clone plants alone with $R^2 = 0.98$ and $RPD = 7.61$ for the total content or $R^2 \geq 0.92$ and $RPD \geq 3.45$ even for individual polyphenols. The more heterogeneous group of plants from different origins, cultivated in Berlin showed $R^2 = 0.93$ for the total content, but low to no correlation for individual polyphenols. Within the heterogeneous whole sample set ($n = 163$), only model development for determination of total content of polyphenols ($R^2 = 0.95$ and $RPD = 4.62$) and sum of cimicifugic acids A+B ($R^2 = 0.84$ and $RPD = 2.49$) was possible. Generally, NIRS quantification models could not be established for triterpene glycosides, as they showed low contents in cultivated *C. rhizoma* with total content under 0.5 % and many individual glycosides below LOQ. The maximum value was $R^2 = 0.86$ for acetylshengmanolxyloside in clone plants. Nevertheless, the mixed batches from wild, with higher contents, showed promising correlation for the total content of triterpene glycosides ($R^2 = 0.93/ RPD = 4.22$). Only six batches were investigated in this case, further studies should be conducted therefore.

Literaturverzeichnis

1. Bundesverband der Arzneimittelhersteller e. V. (BAH): Der Arzneimittelmarkt in Deutschland – Zahlen und Fakten, <https://www.bah-bonn.de/de/publikationen/zahlen-fakten/> (19.10.2017)
 2. Einbond LS, Wen-Cai Y, He K, Wu H-a, Cruz E, Roller M, Kronenberg F. Growth inhibitory activity of extracts and compounds from *Cimicifuga* species on human breast cancer cells. *Phytomedicine* 2008; 15: 504-511
 3. Hirschberg AL, Edlund M, Svane G, Azavedo E, Skoog L, von Schoultz B. An isopropanolic extract of black cohosh does not increase mammographic breast density or breast cell proliferation in postmenopausal women. *Menopause (New York, NY)* 2007; 14: 89-96
 4. Park SY, Kim HJ, Lee SR, Choi YH, Jeong K, Chung H. Black cohosh inhibits 17 β -estradiol-induced cell proliferation of endometrial adenocarcinoma cells. *Gynecol Endocrinol* 2016; 32: 1-4
 5. Stute P, Kalkhake K, Kiesel L, Gotte M. The impact of testosterone, tibolone and black cohosh on purified mammary and placental 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2015; 30: 448-457
 6. Stute P, Nisslein T, Götte M, Kamischke A, Kiesel L, Klockenbusch W. Effects of black cohosh on estrogen biosynthesis in normal breast tissue in vitro. *Maturitas* 2007; 57: 382-391
 7. Burdette JE, Liu J, Chen SN, Fabricant DS, Pierson CE, Barker EL, Pezzuto JM, Mesecar A, Van Breemen RB, Farnsworth NR, Bolton JL. Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 5661-5670
 8. Cicek SS, Khom S, Taferner B, Hering S, Stuppner H. Bioactivity-guided isolation of GABA(A) receptor modulating constituents from the rhizomes of *Actaea racemosa*. *J Nat Prod* 2010; 73: 2024-2028
 9. Powell SL, Godecke T, Nikolic D, Chen SN, Ahn S, Dietz B, Farnsworth NR, van Breemen RB, Lankin DC, Pauli GF, Bolton JL. In vitro serotonergic activity of black cohosh and identification of *N*(omega)-methylserotonin as a potential active constituent. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 11718-11726
 10. Strommer B, Khom S, Kastenberger I, Cicek SS, Stuppner H, Schwarzer C, Hering S. A cycloartane glycoside derived from *Actaea racemosa* L. modulates GABAA receptors and induces pronounced sedation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 351: 234-242
 11. Wuttke W, Jarry H, Haunschild J, Stecher G, Schuh M, Seidlova-Wuttke D. The non-estrogenic alternative for the treatment of climacteric complaints: Black cohosh (*Cimicifuga* or *Actaea racemosa*). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 139: 302-310
 12. Eden J. Managing menopausal symptoms after breast cancer. *Eur J Endocrinol* 2016; 174: R71-R77
 13. Leach MJ, Moore V. Black cohosh (*Cimicifuga* spp.) for menopausal symptoms. The Cochrane database of systematic reviews 2012; 9: Cd007244
 14. Chen J, Gao H, Li Q, Cong J, Wu J, Pu D, Jiang G. Efficacy and safety of remifemin on peri-menopausal symptoms induced by post-operative GnRH-a therapy for
-

- endometriosis: a randomized study versus tibolone. *Med Sci Monit* 2014; 20: 1950-1957
15. Drewe J, Zimmermann C, Zahner C. The effect of a *Cimicifuga racemosa* extracts Ze 450 in the treatment of climacteric complaints—an observational study. *Phytomedicine* 2013; 20: 659-666
 16. Frei-Kleiner S, Schaffner W, Rahlfs VW, Bodmer C, Birkhäuser M. *Cimicifuga racemosa* dried ethanolic extract in menopausal disorders: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Maturitas* 2005; 51: 397-404
 17. Osmers R, Friede M, Liske E, Schnitker J, Freudenstein J, Henneicke-von Zepelin HH. Efficacy and safety of isopropanolic black cohosh extract for climacteric symptoms. *Obstet Gynecol* 2005; 105: 1074-1083
 18. Schellenberg R, Saller R, Hess L, Melzer J, Zimmermann C, Drewe J, Zahner C. Dose-Dependent Effects of the *Cimicifuga racemosa* Extract Ze 450 in the Treatment of Climacteric Complaints: A Randomized, Placebo-Controlled Study. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2012: 260-301
 19. Wuttke W, Rauš K, Gorkow C. Efficacy and tolerability of the Black cohosh (*Actaea racemosa*) ethanolic extract BNO 1055 on climacteric complaints: A double-blind, placebo- and conjugated estrogens-controlled study. *Maturitas* 2006; 55: S83-S91
 20. Wuttke W, Seidlova-Wuttke D, Gorkow C. The Cimicifuga preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 2003; 44 Suppl 1: S67-77
 21. Beer AM, Neff A. Differentiated Evaluation of Extract-Specific Evidence on *Cimicifuga racemosa*'s Efficacy and Safety for Climacteric Complaints. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013; 2013: Article ID 860602
 22. Knöss W. Assessment report on *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., rhizoma. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC); 2010: EMA/HMPC/3968/2008
 23. Mahady GB, Low Dog T, Barrett ML, Chavez ML, Gardiner P, Ko R, Marles RJ, Pellicore LS, Giancaspro GI, Sarma DN. United States Pharmacopeia review of the black cohosh case reports of hepatotoxicity. *Menopause (New York, NY)* 2008; 15: 628-638
 24. EMEA/HMPC. Public Statement – Assessment of Case Reports connected to Herbal Medicinal Products containing *Cimicifuga* Root. EMEA/HMPC/88766/2006; 2006
 25. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte: Risikobewertungsverfahren – *Cimicifuga*-haltige Arzneimittel: Leberschäden, Stufenplan, Stufe II (2009), https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RV_S TP/a-f/cimicifuga.html (19.10.2017)
 26. Painter, D., Perwaiz, S., Murty, M.: Black cohosh products and liver toxicity: update; Canadian Adverse Reaction Newsletter 20, http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/medeff/bulletin/carn-bcei_v20n1-eng.php (22.10.2017)
 27. EudraLex. GMP Annex 7, Manufacture of Herbal Medicinal Products; 2008
 28. EDQM. *Cimicifugae rhizoma*. European Pharmacopoeia 8th Edition: Council of Europe; 2013: 3702-3705
 29. Baker DA, Stevenson DW, Little DP. DNA barcode identification of black cohosh herbal dietary supplements. *J AOAC Int* 2012; 95: 1023-1034
 30. Harnly J, Chen P, Sun J, Huang H, Colson KL, Yuk J, McCoy JH, Reynaud DT, Harrington PB, Fletcher EJ. Comparison of Flow Injection MS, NMR, and DNA Sequencing: Methods for Identification and Authentication of Black Cohosh (*Actaea racemosa*). *Planta Med* 2015; 82: 250-262
-

31. Pate SJ, Clement JA, McCoy JA, Lance SL, Mathews KG. Development and characterization of microsatellite markers for *Actaea racemosa* (black cohosh, Ranunculaceae). *Am J Bot* 2012; 99: e274-276
 32. Xu H, Fabricant DS, Pierson CE, Bolton JL, Pezzuto JM, Fong H, Totura S, Farnsworth NR, Constantinou AI. A preliminary RAPD-PCR analysis of *Cimicifuga* species and other botanicals used for women's health. *Phytomedicine* 2002; 9: 757-762
 33. Zerega NC, Mori S, Lindqvist C, Zheng Q, Motley T. Using amplified fragment length polymorphisms (AFLP) to identify Black Cohosh (*Actaea racemosa*). *Econ Bot* 2002; 56: 154-164
 34. Nguyen HT, Lee D-K, Choi Y-G, Min J-E, Yoon SJ, Yu Y-H, Lim J, Lee J, Kwon SW, Park JH. A 1H NMR-based metabolomics approach to evaluate the geographical authenticity of herbal medicine and its application in building a model effectively assessing the mixing proportion of intentional admixtures: A case study of Panax ginseng: Metabolomics for the authenticity of herbal medicine. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 124: 120-128
 35. Avula B, Wang YH, Isaac G, Yuk J, Wrona M, Yu K, Khan IA. Metabolomics Based UHPLC-QtoF-MS Approach for the Authentication of Various Botanicals and Dietary Supplements. *Planta Med* 2016; 82: OA13
 36. Dentali S, Zimmermann M. Tonnage Surveys of Select North American Wild-Harvest Plants, 2006-2010. American Herbal Products Association; 2012
 37. Lyke J. Conservation status of *Cimicifuga rubifolia*, *C. americana*, and *C. racemosa*. *Medicinal Plant Conservation* 2001; 7: 22 – 24
 38. United States Department of Agriculture (USDA) – Natural Resources Conservation Service: *Actaea racemosa* (L.), <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ACRAR> (11.01.2017)
 39. NC State University: Black Cohosh (*Actaea racemosa* L.) – Horticulture Information Leaflets, <https://content.ces.ncsu.edu/black-cohosh-actaea-racemosa-l> (06.10.2017)
 40. Northeast Organic Farming Association (NOFA): Cultivation and Marketing of Woodland Medicinal Plants, <http://www.nofa.org/tnf/sp02/supplement/medicinal.php> (06.10.2017)
 41. Popp M, Schenk R, Abel G. Cultivation of *Cimicifuga racemosa* (L.) nuttal and quality of CR extract BNO 1055. *Maturitas* 2003; 44: S1-S7
 42. Pinker I, Schenk R. Somatic Embryogenesis in *Cimicifuga racemosa*. *Acta Hort* 2007; 764: 265-270
 43. Ramsey GW. *Cimicifuga racemosa*. *Flora of North America*. 3, Magnoliophyta, Magnoliidae and Hamamelidae: *Flora of North America* Editorial Committee; 1997
 44. Foster S. Black cohosh: *Cimicifuga racemosa*. A literature review. *HerbalGram* 1999; 45: 15
 45. Predny ML, DeAngelis P, Chamberlain JL. Black cohosh *Actaea racemosa*: An annotated bibliography. Service USDoAF ed. Asheville, NC: Southern Research Station; 2006: 99
 46. Compton JA, Culham A, Gibbings JG, Jury SL. Phylogeny of *Actaea* including *Cimicifuga* (Ranunculaceae) inferred from nrDNA ITS sequence variation. *Biochem Syst Ecol* 1998; 26: 185-197
 47. Compton JA, Culham A, Jury SL. Reclassification of *Actaea* to Include *Cimicifuga* and *Souliea* (Ranunculaceae): Phylogeny Inferred from Morphology, nrDNA ITS, and cpDNA trnL-F Sequence Variation. *Taxon* 1998; 47: 593-634
 48. Compton JA, Hedderson TAJ. A morphometric analysis of the *Cimicifuga foetida* L. complex (Ranunculaceae). *Bot J Linn Soc* 1997; 123: 1-23
-

49. The Plant List Version 1.1. – Publiziert im Internet: *Actaea racemosa* (L.), <http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/kew-2620567> (12.11.2017)
 50. Millsbaugh CF. American medicinal plants; an illustrated and descriptive guide to the American plants used as homopathic remedies: their history, preparation, chemistry and physiological effects. New York: Boericke & Tafel; 1887
 51. Foster S. Exploring the Peripatetic Maze of Black Cohosh Adulteration: A Review of the Nomenclature, Distribution, Chemistry, Market Status, Analytical Methods, and Safety. *HerbalGram* 2013; 32-51
 52. Gafner S. Adulteration of *Actaea racemosa*. *Botanical Adulterants Bulletin* 2016: 1-5
 53. Hashida M. Cimicifuga Rhizome. *The Japanese Pharmacopoeia, Sixteenth Edition*; 2011: 1622-1623
 54. Godecke T, Nikolic D, Lankin DC, Chen SN, Powell SL, Dietz B, Bolton JL, van Breemen RB, Farnsworth NR, Pauli GF. Phytochemistry of cimicifugic acids and associated bases in *Cimicifuga racemosa* root extracts. *Phytochem Anal* 2009; 20: 120-133
 55. Cicek S, Aberham A, Ganzera M, Stuppner H. Quantitative analysis of cycloartane glycosides in black cohosh rhizomes and dietary supplements by RRLC-ELSD and RRLC-qTOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 2011; 400: 2597-2605
 56. Fabricant DS, Nikolic D, Lankin DC, Chen SN, Jaki BU, Kronic A, van Breemen RB, Fong HH, Farnsworth NR, Pauli GF. Cimipronidine, a cyclic guanidine alkaloid from *Cimicifuga racemosa*. *J Nat Prod* 2005; 68: 1266-1270
 57. Wang W, Bai W, Cui G, Jin B, Wang K, Jia J, Da Y, Qin L. Effects of estradiol valerate and remifemin on norepinephrine signaling in the brain of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 2015; 101: 120-132
 58. Gödecke T, Lankin DC, Nikolic D, Chen S-N, van Breemen RB, Farnsworth NR, Pauli GF. Guanidine Alkaloids and Pictet-Spengler Adducts from Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *J Nat Prod* 2009; 72: 433-437
 59. Moser C, Vickers SP, Brammer R, Cheetham SC, Drewe J. Antidiabetic effects of the *Cimicifuga racemosa* extract Ze 450 in vitro and in vivo in ob/ob mice. *Phytomedicine* 2014; 21: 1382-1389
 60. Findeis MA, Schroeder F, McKee TD, Yager D, Fraering PC, Creaser SP, Austin WF, Clardy J, Wang R, Selkoe D, Eckman CB. Discovery of a Novel Pharmacological and Structural Class of Gamma Secretase Modulators Derived from the Extract of *Actaea racemosa*. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3: 941-951
 61. Beer AM, Osmers R, Schnitker J, Bai W, Mueck AO, Meden H. Efficacy of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) medicines for treatment of menopausal symptoms – comments on major statements of the Cochrane Collaboration report 2012 “black cohosh (*Cimicifuga* spp.) for menopausal symptoms (review)”. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29: 1022-1025
 62. Knöss W, Chinou I. Regulation of medicinal plants for public health–European community monographs on herbal substances. *Planta Med* 2012; 78: 1311-1316
 63. European Food Safety Authority: Pflanzliche Materialien und Zubereitungen, <https://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/botanicals> (23.01.2017)
 64. Giancaspro, Gabriel: Dietary Supplements – International Regulators Respond to a New and Growing Industry (16.09.2014), <http://qualitymatters.usp.org/dietary-supplements-international-regulators-respond-new-and-growing-industry> (22.10.2017)
 65. Tyler Smith KK, Veronica Eckl, Claire Morton, Ryan Stredney. Herbal Supplement Sales in US Increase 7.7% in 2016. *HerbalGram* 2017; 115: 10
 66. Brinkmann J. Taking a Closer Look at the US Black Cohosh Rhizome Trade. *HerbalGram* 2010; 7: 12
-

67. NatureServe: NatureServe Explorer: An online encyclopedia of life (web application) *Actaea racemosa* (L.), <http://explorer.natureserve.org> (12.11.2017)
68. Fischer S, Berti M, Wilckens R, Del Pozo A. Development of vegetative propagation for *Actaea racemosa* Nutt. *Ind Crops Prod* 2006; 24: 244-252
69. Thomas AL, Crawford Jr RJ, Havermann LJ, Applequist WL, Schweitzer BE, Woodbury SF, Miller JS. Effect of planting depth, planting season, and fungicide treatment on establishment of black cohosh in a poorly drained soil. *HortScience* 2006; 41: 374-376
70. Thomas AL, Miller JS, Applequist WL, Rottinghaus GE. Black cohosh rhizome and phytochemical production in response to shading, spacing, and age. *Acta Horti*; 2011: 175-184
71. Naud J, Olivier A, Bélanger A, Lapointe L. Medicinal understory herbaceous species cultivated under different light and soil conditions in maple forests in southern Québec, Canada. *Agroforest Syst* 2010; 79: 303-326
72. Small CJ, Chamberlain JL, Nuckols CM. Failure of black cohosh (*Actaea racemosa* L.) rhizome transplants: Potential causes and forest farming implications. *Agroforest Syst* 2014; 88: 815-822
73. De Capite A, Lancaster T, Puthoff D. Salicylic Acid Treatment Increases the Levels of Triterpene Glycosides in Black Cohosh (*Actaea racemosa*) Rhizomes. *J Chem Ecol* 2016; 42: 13-16
74. Thomas AL, Crawford Jr RJ, Rottinghaus GE, Tracy JK, Applequist WL, Schweitzer BE, Havermann LJ, Woodbury SF, Miller JS, Eilersieck MR, Gray DE. Occurrence of 23-*epi*-26-deoxyactein and cimicracemoside A in various black cohosh tissues throughout the growing season. *HortScience* 2007; 42: 535-539
75. Imai A, Lankin DC, Nikolić D, Ahn S, Van Breemen RB, Farnsworth NR, McAlpine JB, Chen SN, Pauli GF. Cycloartane Triterpenes from the Aerial Parts of *Actaea racemosa*. *J Nat Prod* 2016; 79: 541-554
76. Motley TJ, Lück L, Zerega NJC. Genetic Diversity and DNA Fingerprinting of Black Cohosh (*Actaea racemosa*). *Proceedings of the Global Summit on Medicinal Plants* 2004; 1: 112-118
77. Vickers A, Brosi SL, Howell J, Kaur B, Puthoff D, Eisenstein E. Ecological and Chemotypic Analysis for Improved Growth and Management of Naturally Occurring Black Cohosh (*Actaea racemosa* L.) Populations in Western Maryland. *Am J Plant Sci* 2015; 6: 3272-3281
78. Pinker I, Brosowski S, Schenk R. Somatic embryogenesis from stamens of *Actaea racemosa* L. *Acta Horti*; 2016: 13-20
79. Koll K. Optimierung und Validierung dünnschichtchromatographischer Verfahren in der Qualitätsanalytik von Phytopharmaka [Dissertation]. Bonn Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität; 2004:
80. Ankli A, Reich E, Steiner M. Rapid high-performance thin-layer chromatographic method for detection of 5% adulteration of black cohosh with *Cimicifuga foetida*, *C. heracleifolia*, *C. dahurica*, or *C. americana*. *J AOAC Int* 2008; 91: 1257
81. EDQM. Black Cohosh – *Cimicifugae* rhizoma. *Pharmeuropa* 2002; 14: 3
82. EDQM. Black Cohosh – *Cimicifugae* rhizoma. *Pharmeuropa* 2007; 19: 4
83. Charlesworth JM. Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography. *Anal Chem* 1978; 50: 1414-1420
84. Webster GK, Jensen JS, Diaz AR. An investigation into detector limitations using evaporative light-scattering detectors for pharmaceutical applications. *J Chromatogr Sci* 2004; 42: 484-490
85. Mourey TH, Oppenheimer LE. Principles of operation of an evaporative light-scattering detector for liquid chromatography. *Anal Chem* 1984; 56: 2427-2434

86. Cobb Z, Shaw PN, Lloyd LL, Wrench N, Barrett DA. Evaporative light-scattering detection coupled to microcolumn liquid chromatography for the analysis of underivatized amino acids: Sensitivity, linearity of response and comparisons with UV absorbance detection. *J Microcolumn Sep* 2001; 13: 169-175
87. Mathews TB, Higginson DP, Lyons R, Mitchell CJ, Sach WN, Snowden JM, Taylor RM, Wright GA. Improving Quantitative Measurements for the Evaporative Light Scattering Detector. *Chromatographia* 2004; 60: 625-633
88. de Villiers A, Górecki T, Lynen F, Szucs R, Sandra P. Improving the universal response of evaporative light scattering detection by mobile phase compensation. *J Chromatogr A* 2007; 1161: 183-191
89. Guiochon G, Moysan A, Holley C. Influence of Various Parameters on the Response Factors of the Evaporative Light Scattering Detector for a Number of Non-Volatile Compounds. *J Liq Chromatogr* 1988; 11: 2547-2570
90. Righezza M, Guiochon G. Effects of the Nature of the Solvent and Solutes on the Response of a Light-Scattering Detector. *J Liq Chromatogr* 1988; 11: 1967-2004
91. Ganzera M, Bedir E, Khan IA. Separation of *Cimicifuga racemosa* triterpene glycosides by reversed phase high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *Chromatographia* 2000; 52: 301-304
92. Li W, Chen S, Fabricant D, Angerhofer CK, Fong HHS, Farnsworth NR, Fitzloff JF. High-performance liquid chromatographic analysis of Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*) constituents with in-line evaporative light scattering and photodiode array detection. *Anal Chim Acta* 2002; 471: 61-75
93. He K, Pauli GF, Zheng B, Wang H, Bai N, Peng T, Roller M, Zheng Q. *Cimicifuga* species identification by high performance liquid chromatography–photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. *J Chromatogr A* 2006; 1112: 241-254
94. Jiang B, Ma C, Motley T, Kronenberg F, Kennelly EJ. Phytochemical fingerprinting to thwart black cohosh adulteration: a 15 *Actaea* species analysis. *Phytochem Anal* 2011; 22: 339-351
95. He K, Zheng B, Bai N, Peng T, Roller M, Zheng Q, Pauli GF, Wang H. *Cimicifuga* species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. *J Chromatogr A* 2006; 1112: 241-254
96. Jiang B, Kronenberg F, Nuntanakorn P, Kennelly EJ, Qiu M-H. Evaluation of the botanical authenticity and phytochemical profile of black cohosh products by high-performance liquid chromatography with selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 3242-3253
97. Sgamma T, Lockie-Williams C, Kreuzer M, Williams S, Scheyhing U, Koch E, Slater A, Howard C. DNA Barcoding for Industrial Quality Assurance. *Planta Med* 2017; 83: 1117-1129
98. Commission BP. Appendix XI V “Deoxyribonucleic acid (DNA) based identification techniques for herbal drugs”. *British Pharmacopoeia*; 2017
99. Lajis N, Maulidiani M, Abas F, Ismail IS. Chapter 30 – Metabolomics Approach in Pharmacognosy A2 – Badal, Simone. *Pharmacognosy*. Boston: Academic Press; 2017: 597-616
100. Ma C, Kavalier AR, Jiang B, Kennelly EJ. Metabolic profiling of *Actaea (Cimicifuga)* species extracts using high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 1461-1476
101. Geng P, Harnly JM, Sun J, Zhang M, Chen P. Feruloyl dopamine-O-hexosides are efficient marker compounds as orthogonal validation for authentication of black

- cohosh (*Actaea racemosa*)-an UHPLC-HRAM-MS chemometrics study. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409: 2591-2600
102. Alaerts G, Pieters S, Logie H, Van Erps J, Merino-Arevalo M, Dejaegher B, Smeyers-Verbeke J, Vander Heyden Y. Exploration and classification of chromatographic fingerprints as additional tool for identification and quality control of several *Artemisia* species. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 95: 34-46
103. Grubešić RJ, Vuković J, Kremer D, Vladimir-Knežević S. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39: 837-842
104. Hemmateenejad B, Abbaspour A, Maghami H, Miri R, Panjehshahin MR. Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts. *Anal Chim Acta* 2006; 575: 290-299
105. Souto UTCP, Pontes MJC, Silva EC, Galvão RKH, Araújo MCU, Sanches FAC, Cunha FAS, Oliveira MSR. UV-Vis spectrometric classification of coffees by SPA-LDA. *Food Chem* 2010; 119: 368-371
106. Chen P, Luthria D, Harrington Pd, Harnly JM. Discrimination among *Panax* Species using Spectral Fingerprinting. *J AOAC Int* 2011; 94: 1411-1421
107. Sârbu C, Naşcu-Briciu RD, Kot-Wasik A, Gorinstein S, Wasik A, Namieśnik J. Classification and fingerprinting of kiwi and pomelo fruits by multivariate analysis of chromatographic and spectroscopic data. *Food Chem* 2012; 130: 994-1002
108. Gad HA, El-Ahmady SH, Abou-Shoer MI, Al-Azizi MM. A modern approach to the authentication and quality assessment of thyme using UV spectroscopy and chemometric analysis. *Phytochem Anal* 2013; 24: 520-526
109. Yang J, Wang A-Q, Li X-j, Fan X, Yin S-S, Lan K. A chemical profiling strategy for semi-quantitative analysis of flavonoids in Ginkgo extracts. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 123: 147-154
110. Wen H, Kang S, Song Y, Song Y, Sung SH, Park S. Differentiation of cultivation sources of *Ganoderma lucidum* by NMR-based metabolomics approach. *Phytochem Anal* 2010; 21: 73-79
111. Soares PK, Scarminio IS. Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus *Bauhinia*. *Phytochem Anal* 2008; 19: 78-85
112. Peng L, Wang Y, Zhu H, Chen Q. Fingerprint profile of active components for *Artemisia selengensis* Turcz by HPLC-PAD combined with chemometrics. *Food Chem* 2011; 125: 1064-1071
113. Goodarzi M, Russell PJ, Vander Heyden Y. Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: A review. *Anal Chim Acta* 2013; 804: 16-28
114. Ruiz-Samblás C, Arrebola-Pascual C, Tres A, van Ruth S, Cuadros-Rodríguez L. Authentication of geographical origin of palm oil by chromatographic fingerprinting of triacylglycerols and partial least square-discriminant analysis. *Talanta* 2013; 116: 788-793
115. Radványi D, Gere A, Sipos L, Kovács S, Jókai Z, Fodor P. Discrimination of mushroom disease-related mould species based solely on unprocessed chromatograms. *J Chemom* 2016; 30: 197-202
116. Ding Y, Wu EQ, Liang C, Chen J, Tran MN, Hong CH, Jang Y, Park KL, Bae K, Kim YH, Kang JS. Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig samples sourced from various countries using HPLC-based fingerprint analysis. *Food Chem* 2011; 127: 755-760
117. Cheng XM, Zhao T, Yang T, Wang CH, Bligh SW, Wang ZT. HPLC fingerprints combined with principal component analysis, hierarchical cluster analysis and linear

- discriminant analysis for the classification and differentiation of *Peganum* sp. indigenous to China. *Phytochem Anal* 2010; 21: 279-289
118. Lu W, Jiang Q, Shi H, Niu Y, Gao B, Yu LL. Partial least-squares-discriminant analysis differentiating Chinese wolfberries by UPLC-MS and flow injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 9073-9080
119. Masson J, Liberto E, Brevard H, Bicchi C, Rubiolo P. A metabolomic approach to quality determination and authentication of raw plant material in the fragrance field. Iris rhizomes: A case study. *J Chromatogr A* 2014; 1368: 143-154
120. Xiang Z, Wang XQ, Cai XJ, Zeng S. Metabolomics study on quality control and discrimination of three curcuma species based on gas chromatograph-mass spectrometry. *Phytochem Anal* 2011; 22: 411-418
121. Gad HA, El-Ahmady SH, Abou-Shoer MI, Al-Azizi MM. Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. *Phytochem Anal* 2013; 24: 1-24
122. EDQM. Ph. Eur. 9.3 – 0521 „Chemometric methods applied to analytical data“.
123. Ballabio D, Todeschini R. Chapter 4 – Multivariate Classification for Qualitative Analysis A2 – Sun, Da-Wen. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. San Diego: Academic Press; 2009: 83-104
124. Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, van Velzen EJJ, van Duijnhoven JPM, van Dorsten FA. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics* 2008; 4: 81-89
125. Szymańska E, Saccenti E, Smilde AK, Westerhuis JA. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics* 2012; 8: 3-16
126. Triba MN, Le Moyec L, Amathieu R, Goossens C, Bouchemal N, Nahon P, Rutledge DN, Savarin P. PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular BioSystems* 2015; 11: 13-19
127. EMA. Guideline on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations. EMEA/CHMP/CVMP/QWP/17760/2009 Rev2; 2009
128. Q2(R1) I. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005:
129. De Bleye C, Chavez PF, Mantanus J, Marini R, Hubert P, Rozet E, Ziemons E. Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 69: 125-132
130. Kraehmer A, Engel A, Kadow D, Ali N, Umaharan P, Kroh LW, Schulz H. Fast and neat-determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chem* 2015; 181: 152-159
131. Kraehmer A, Gudi G, Weiher N, Gierus M, Schutze W, Schulz H. Characterization and quantification of secondary metabolite profiles in leaves of red and white clover species by NIR and ATR-IR spectroscopy. *Vib Spectrosc* 2013; 68: 96-103
132. Huck CW. Advances of vibrational spectroscopic methods in phytomics and bioanalysis. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 87: 26-35
133. Wang P, Yu Z. Species authentication and geographical origin discrimination of herbal medicines by near infrared spectroscopy: A review. *J Pharm Anal* 2015; 5: 277-284
134. Yang IC, Tsai C-Y, Hsieh K-W, Yang C-W, Ouyang F, Martin Lo Y, Chen S. Integration of SIMCA and near-infrared spectroscopy for rapid and precise identification of herbal medicines. *J Food Drug Anal* 2013; 21: 268-278

135. Wang F, Zhang Z, Cui X, de B. Harrington P. Identification of rhubarbs by using NIR spectrometry and temperature-constrained cascade correlation networks. *Talanta* 2006; 70: 1170-1176
136. Chen C-w, Yan H, Han B-x. Rapid identification of three varieties of *Chrysanthemum* with near infrared spectroscopy. *Rev Bras Farmacogn* 2014; 24: 33-37
137. Fan Q, Wang Y, Sun P, Liu S, Li Y. Discrimination of *Ephedra* plants with diffuse reflectance FT-NIRS and multivariate analysis. *Talanta* 2010; 80: 1245-1250
138. Kudo M, Watt RA, Moffat AC. Rapid Identification of *Digitalis purpurea* Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 1271-1277
139. Lucio-Gutierrez JR, Coello J, Maspoch S. Expeditious identification and semi-quantification of *Panax ginseng* using near infrared spectral fingerprints and multivariate analysis. *Anal Methods* 2013; 5: 857-865
140. Schulz H, Drews UH, Engelhardt A, Wegent HH, Lapczynski S. Application of near-infrared reflectance spectroscopy to the simultaneous prediction of alkaloids and phenolic substances in green tea leaves. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 5064-5067
141. Huck-pezzei VA, Bittner LK, Pallua JD, Sonderegger H, Abel G, Popp M, Bonn GK, Huck CW. A chromatographic and spectroscopic analytical platform for the characterization of St John's wort extract adulterations. *Anal Methods* 2013; 5: 616-628
142. Schönbichler SA, Bittner LKH, Pallua JD, Popp M, Abel G, Bonn GK, Huck CW. Simultaneous quantification of verbenaquin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 84: 97-102
143. Vermaak I, Hamman JH, Viljoen AM. A rapid spectroscopic method for quantification of P57 in *Hoodia gordonii* raw material. *Food Chem* 2010; 120: 940-944
144. Frizon CNT, Oliveira GA, Perussello CA, Peralta-Zamora PG, Camlofski AMO, Rossa ÜB, Hoffmann-Ribani R. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. *LWT – Food Science and Technology* 2015; 60: 795-801
145. Eberhard Teuscher, Matthias F. Melzig, Lindequist U. Biogene Arzneimittel, Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2012
146. Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002; 48: 155-171
147. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 2006; 78: 779-787
148. Grace SC, Embry S, Luo H. Haystack, a web-based tool for metabolomics research. *BMC Bioinformatics* 2014; 15 Suppl 11: S12
149. Tautenhahn R, Böttcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 504
150. Trevino V, Yanez-Garza IL, Rodriguez-Lopez CE, Urrea-Lopez R, Garza-Rodriguez ML, Barrera-Saldana HA, Tamez-Pena JG, Winkler R, Diaz de-la-Garza RI. GridMass: a fast two-dimensional feature detection method for LC/MS. *J Mass Spectrom* 2015; 50: 165-174
151. Lommen A. MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing. *Anal Chem* 2009; 81: 3079-3086
152. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. Mzmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 2010; 11: 395

153. Melamud E, Vastag L, Rabinowitz JD. Metabolomic analysis and visualization engine for LC-MS data. *Anal Chem* 2010; 82: 9818-9826
 154. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: W251-W257
 155. Gowda H, Ivanisevic J, Johnson CH, Kurczyk ME, Benton HP, Rinehart D, Nguyen T, Ray J, Kuehl J, Arevalo B, Westenskow PD, Wang J, Arkin AP, Deutschbauer AM, Patti GJ, Siuzdak G. Interactive XCMS Online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Anal Chem* 2014; 86: 6931-6939
 156. EDQM. Ph. Eur. 9.3 – 2820 “Herbal Drugs: Sampling and Sample Preparation”.
 157. Mukhopadhyay S, Luthria DL, Robbins RJ. Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *J Sci Food Agric* 2006; 86: 156-162
 158. Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current protocols in bioinformatics* 2016; 55: 14.10.11-14.10.91
 159. Nuntanakorn P, Jiang B, Yang H, Cervantes-cervantes M, Kronenberg F, Kennelly EJ. Analysis of polyphenolic compounds and radical scavenging activity of four American *Actaea* species. *Phytochem Anal* 2007; 18: 219-228
 160. Agilent. Manual „Understanding Your Spectra Module“, Man. Part Nr. G2180-90024 – Match Factor. 2008: Seite 21
 161. EDQM: Detailed view of *Actaea racemosa* Herbal Reference Substance (HRS), <https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/View=Y0001463> (12.11.2017)
 162. Bittner M, Springer A, Schenk R, Melzig MF. Cultivation of Black Cohosh: Non-targeted Chemical Profiling and Comparison to Wild. *PMIO* 2017; 4: Tu-PO-172
 163. Bittner M, Schenk R, Springer A, Melzig MF. Economical, Plain, and Rapid Authentication of *Actaea racemosa* L. (syn. *Cimicifuga racemosa*, Black Cohosh) Herbal Raw Material by Resilient RP-PDA-HPLC and Chemometric Analysis. *Phytochem Anal* 2016; 27: 318-325
 164. Bittner M, Schenk R, Melzig MF. Alternative approach to species identification of *Actaea racemosa* L. (syn. *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., black cohosh) herbal starting material: UV spectroscopy coupled with LDA. *Phytochemistry Letters* 2016; 18: 220-225
 165. Bittner M, Krahmer A, Schenk R, Springer A, Gudi G, Melzig MF. NIR Spectroscopy of *Actaea racemosa* L. rhizome – En Route to Fast and Low-Cost Quality Assessment. *Planta Med* 2017; 83: 1085-1096
 166. Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Domínguez-Alvarez J, Hernández-Méndez J. Cloud Point Extraction as a Preconcentration Step Prior to Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* 1999; 71: 2468-2474
 167. Zhou J, Sun XL, Wang SW. Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* with analysis by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2008; 1200: 93-99
-

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Blütenstand von <i>Actaea racemosa</i>	4
Abbildung 2: Balgfrüchte von <i>Actaea racemosa</i>	4
Abbildung 3: Illustration „ <i>Cimicifuga racemosa</i> “	5
Abbildung 4: Pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe der Traubensilberkerze	7
Abbildung 5: Entwicklungen der (Wild-)Ernte von <i>Actaea racemosa</i> Rhizom.	10
Abbildung 6: Erhaltungsstatus von <i>A. racemosa</i> in den USA und Kanada	11
Abbildung 7: Beispiele für histologische Charakteristika von <i>C. rhizoma</i>	13
Abbildung 8: Metabolomics.....	22
Abbildung 9: Versuchsfeld zur Kultivierung.....	24
Abbildung 10: Kommerzielle Mischcharge von <i>C. rhizoma</i> aus Wildsammlungen.....	25
Abbildung 11: Ein gereinigtes Rhizom.....	32
Abbildung 12: Grob zerkleinertes und getrocknetes Rhizom	32
Abbildung 13: Untersuchte Polyphenole	35
Abbildung 14: Chromatogramm eines <i>C. rhizoma</i> Extrakts bei UV-Detektion	35
Abbildung 15: Untersuchte Triterpen-Glykoside.....	37
Abbildung 16: Chromatogramm eines <i>Actaea racemosa</i> Extrakts (ELSD).	37
Abbildung 17: Extraktion der Polyphenole.....	43
Abbildung 18: Untersuchung der Peakreinheit (<i>peak purity</i>).	45
Abbildung 19: Darstellung der Peakreinheit (<i>peak purity</i>) für Fukinolsäure.....	46
Abbildung 20: BPC eines <i>C. rhizoma</i> Extrakts aus LC/(-)-ESI-QTOF-MS	46
Abbildung 21: Validierung der LC/DAD Methode	48
Abbildung 22: Stabilität eines <i>C. rhizoma</i> Extrakts.....	49
Abbildung 23: BPC eines <i>C. rhizoma</i> Extrakts aus LC/(-)-ESI-QTOF-MS	51
Abbildung 24: Linearität der LC/ELSD Methode.....	52
Abbildung 25: Systemeignungstest nach USP	52
Abbildung 26: HPTLC-Untersuchung von <i>C. rhizoma</i>	54
Abbildung 27: HPTLC-Fingerprints von Klonpflanzen	55
Abbildung 28: HPTLC-Fingerprints von <i>C. rhizoma</i> aus Kultur.....	55
Abbildung 29: HPTLC-Fingerprints von Handelsware	56
Abbildung 30: HPTLC-Fingerprints verschiedener <i>Actaea</i> spp.	57
Abbildung 31: Gehalt (%) an Polyphenolen und Triterpenglykosiden.....	60
Abbildung 32: Quartile der Gehalte Fukinolsäure und Acetylshengmanolxylosid	61
Abbildung 33: Quartile der Gesamtgehalte.....	62
Abbildung 34: PCA der quantitativen Daten aus LC/DAD/ELSD	63
Abbildung 35: Quartile der Gehalte in den Exemplaren aus Kultur	64

Abbildung 36: Varianzanalyse für die Gehalte	64
Abbildung 37: Ergebnisse des Two-Group-Vergleichs (C/WE).....	67
Abbildung 38: Ergebnisse des Two-Group-Vergleichs (AC/WC)	67
Abbildung 39: Heatmap über die Verteilung der Gehalte.....	68
Abbildung 40: PCA basierend auf quantitativen Daten für Triterpenglykoside.....	69
Abbildung 41: Potentieller ASX-Chemotyp	70
Abbildung 42: Triterpenglykosid-Fingerprints in Handelsware	71
Abbildung 43: Triterpenglykosid-Fingerprints von Einzelexemplaren aus den USA	72
Abbildung 44: DOA-Chemotyp-Fingerprints	72
Abbildung 45: AHSX-Chemotyp.....	73
Abbildung 46: ASX/ACX-Chemotyp	73
Abbildung 47: F1-Generation.	75
Abbildung 48: Beispiel für eine Bin-Analyse	77
Abbildung 49: Mittels LC/MS untersuchten Exemplare von <i>C. rhizoma</i>	78
Abbildung 50: Heatmap für potentielle Chemotypen aus Daten einer Bin-Analyse	79
Abbildung 51: <i>Ion intensity map</i> eines Extraktes von <i>Cimicifugae Rhizoma</i>	80
Abbildung 52: Dual-Plot der PCA aus LC/MS ^E Daten.....	81
Abbildung 53: Dual-Plot der PCA aus LC/MS ^E Daten.....	82
Abbildung 54: UV-Absorptionsspektren der Proben verschiedener <i>Actaea</i> spp.	85
Abbildung 55: PCA der UV-Absorptionsspektren verschiedener <i>Actaea</i> Spezies	86
Abbildung 56: Ergebnisse für Validierung der Vorhersagemodelle.....	87
Abbildung 57: Chromatogramme für verschiedene <i>Actaea</i> spp.	88
Abbildung 58: PCA der quantitativen Daten aus LC/DAD für <i>Actaea</i> spp.....	89
Abbildung 59: PCA der Daten für <i>A. racemosa</i> und <i>A. heracleifolia</i>	89
Abbildung 60: NIR-Rohspektren der verschiedenen <i>Actaea</i> spp.....	90
Abbildung 61: Mittelwertspektren der verschiedenen <i>Actaea</i> spp.....	91
Abbildung 62: Hauptkomponentenanalyse der NIR Spektren.....	92
Abbildung 63: Aufnahme von Raman-Spektren.....	93
Abbildung 64: NIR-Spektren aller Exemplare von <i>C. rhizoma</i> ($n = 163$).....	95
Abbildung 65: PCA für die NIRS Quantifizierung.....	96
Abbildung 66: zehnfache Kreuzvalidierung der NIRS Vorhersagemodelle	98
Abbildung 67: Einfluss der Mobilen Phase auf Detektorresponse in ELSD	102
Abbildung 68: PCA und HCA basierend auf Daten für Triterpenglykoside.	105
Abbildung 69: DOA-Typ Triterpenglykosid-Fingerprints.....	106
Abbildung 70: Kolinearität der Gehalte an Polyphenolen.	111
Abbildung 71: Massenspektren für Polyphenole	119
Abbildung 72: Massenspektren für Triterpenglykoside.....	120

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Probenset der untersuchten Exemplare von <i>C. rhizoma</i> aus Kultur.....	26
Tabelle 2: Probenset der verschiedenen <i>Actaea</i> spp.	27
Tabelle 3: Andere Proben von <i>C. rhizoma</i>	28
Tabelle 4: Ermittlung der mittleren Ausbeute des ersten Extraktionsschritts.....	44
Tabelle 5: Stabilität eines <i>C. rhizoma</i> Extrakts und Standardlösung	49
Tabelle 6: Systemparameter und SST nach USP	51
Tabelle 7: HPTLC, Set untersuchter Proben von <i>C. rhizoma</i>	53
Tabelle 8: Quantifizierte Exemplare von <i>C. rhizoma</i>	58
Tabelle 9: Schwankung und Mittelwerte der Gehalte	66
Tabelle 10: Gehalte an Polyphenolen in generativen Nachkommen	74
Tabelle 11: Mittels UPLC/(+)-ESI-QTOF-MS/MS ^E untersuchte Exemplare.....	76
Tabelle 12: Probenliste für Versuche zur Identifizierung von <i>C. rhizoma</i>	84
Tabelle 13: Konfusionsmatrix	86
Tabelle 14: Validierungsergebnisse für NIRS-Quantifizierung.....	99
Tabelle 15: Gehalte an Polyphenolen und Triterpenglykosiden.	114
Tabelle 16: Ausgewählte Ionen (<i>m/z</i>) zur Identifizierung.....	121

Publikationsverzeichnis

Im Rahmen dieser Arbeit sind u. a. folgende Veröffentlichungen in Fachzeitschriften (*peer-reviewed*) entstanden:

Bittner, M., Schenk, R., Springer, A. and Melzig, M. F. (2016). “Economical, Plain, and Rapid Authentication of *Actaea 139acemose* L. (syn. *Cimicifuga 139acemose*, Black Cohosh) Herbal Raw Material by Resilient RP-PDA-HPLC and Chemometric Analysis.” Phytochemical Analysis **27**(6): 318-325. // DOI: 10.1002/pca.2622

Bittner, M., Kraehmer, A. and Melzig, M. F. (2016). “Quantification of polyphenols in powdered *Actaea 139acemose* (black cohosh) rhizomes by NIR spectroscopy.” Planta Medica **81** (S 01): S1-s381 // DOI: 10.1055/s-0036-1597047 (Conference Paper)

Bittner, M., Schenk, R. and Melzig, M. F. (2016). “Alternative approach to species identification of *Actaea 139acemose* L. (syn. *Cimicifuga 139acemose* (L.) Nutt., black cohosh) herbal starting material: UV spectroscopy coupled with LDA.” Phytochemistry Letters **18**: 220-225. // DOI: 10.1016/j.phytol.2016.10.001

Bittner, M., Kraehmer, A., Schenk, R., Springer, A., Gudi, G. and Melzig, M. F. (2017). “NIR Spectroscopy of *Actaea 139acemose* L. rhizome – En Route to Fast and Low-Cost Quality Assessment.” Planta Medica **83**(12-13): 1085-1096. // DOI: 10.1055/s-0043-108122

Bittner, M., Springer, A., Schenk, R., Melzig, M. F. (2017). “Cultivation of Black Cohosh: Non-targeted Chemical Profiling and Comparison to Wild” Planta Medica International Open **4** (S 01): Tu-PO-172 // DOI: 10.1055/s-0037-1608500 (Conference Paper)

Kraehmer, A., Bittner, M., Kiefl, J., Blüthner, W.-D., Biertümpfel, A. and Schulz, H. (accepted). “Near Infrared (NIR) Spectroscopy and Plant Analysis – Fast Alternatives for Authentication and Quality Assessment” ICNIR-2017 Proceedings, IM Publications

Bittner, M., Schenk, R., Melzig, M. F. (in preparation). “Towards cultivation of *Actaea 139acemose* (L.): Homogeneity, chemotypes and comparison to wild”

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig, der mir dieses spannende Thema überlassen und von Anfang an großes Vertrauen in mich gesetzt hat.

Herrn Prof. Dr. Werner Knöss (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. Regina Schenk (Humboldt Universität zu Berlin) für die Kultivierung und die Ernte der Exemplare von *Actaea racemosa* (L.). Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Hartwig Schulz (Julius-Kühn-Institut) möchte ich für die Möglichkeit danken, am Institut NIR-Messungen durchzuführen und die vorhandenen Labore mit zu nutzen. Ich habe mich stets sehr willkommen gefühlt.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Wolber (Freie Universität Berlin) danke ich für die Ermöglichung von Messungen an der HPLC-Anlage des Praktikums Instrumentelle Analytik.

Frau Dr. Andrea Krähmer (Julius-Kühn-Institut) danke ich für die freundliche Zusammenarbeit, die Einführung in NIR-Spektroskopie sowie für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung von Messungen und Erstellung der NIR-Korrelationen.

Herrn Dr. Andreas Springer (Freie Universität Berlin) danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die schnelle Etablierung von LC/MS-Methoden.

Herrn Dr. Gennadi Gudi (Julius-Kühn-Institut) danke ich für die Unterstützung in Fragen zur Chemometrie und bei der qualitativen Auswertung der NIR-Spektren.

Weiterhin danke ich Herrn Maged Sharaf, PhD (American Herbal Product Association), Herrn Dr. Gunnar Weibchen (Waters) und Frau Margit Werther (CAMAG, Berlin).

Meinen Wahlpflichtstudenten danke ich für ihre Mitarbeit.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst und der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie danke ich für die finanzielle Unterstützung zur Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen.

Bei Frau Dr. Julia Lazar-Schurreit und Herrn Dr. Stefan Böttger bedanke ich mich für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit während der studentischen Praktika und den Arzneipflanzenexkursionen. Ebenso danke ich den zahlreichen Mitstreitern im Arbeitskreis für die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Zu guter Letzt danke ich meiner lieben Familie für ihre Unterstützung.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 30. November 2017

Marian Bittner
