EINSATZ SCHWINGUNGSSPEKTROSKOPISCHER METHODEN ZUR QUALITÄTSBEWERTUNG PFLANZLICHER ROHSTOFFE UND CHARAKTERISIERUNG VON PHYTOEXTRAKTIONSPROZESSEN

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

> vorgelegt von Dipl.-Ing. (FH), Diplom-Biologe GENNADI GUDI aus Petropavlovsk

> > Berlin, Juni 2016

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom April 2013 bis Mai 2016 unter Betreuung von Direktor und Prof. Dr. Hartwig Schulz (Julius-Kühn Institut) und Ko-Betreuung von Univ.-Prof. Dr. Matthias F. Melzig (Institut für Pharmazie der FU Berlin) am Julius-Kühn Institut, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz in Berlin angefertigt.

1. Gutachter:	UnivProf. Dr. Matthias F. Melzig
2. Gutachter:	Direktor und Prof. Dr. Hartwig Schulz

Disputation am 24.11.2016.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Matthias Melzig für die umfassende Betreuung meiner Doktorarbeit und Herrn Direktor und Professor Dr. Hartwig Schulz für die Überlassung des Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und sein außerordentliches Interesse an dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Andrea Krähmer. Ohne ihre ständige Unterstützung in allen Arbeitsaspekten und unaufhörliche Ermunterung hätte ich wohl diese Arbeit nie zum Ende gebracht. Auch die nun wirklich auf Deutsch verständlich klingelnden Ausdrücke im Text sind ihren sorgfältigen Korrekturen und Nachbesserungsvorschlägen zu verdanken.

Ich möchte aber auch allen meinen Kollegen und Koautoren für ihre Hilfsbereitschaft und produktive Zusammenarbeit ganz herzlich danken. Mein besonderen Dank gilt dabei Frau Bärbel Zeiger und Herrn Dr. Hans Krüger für die Durchführung der GC-Analysen, Herrn Mario Harke für die Hilfe bei der Durchführung der spektroskopischen Messungen und Probenvorbereitung, Herrn Roland Buchhorn und seinem Team, und hier vor allem Frau Claudia Könecke, für den Anbau und die Betreuung der Versuchspflanzen. Herrn Dr. Christoph Grunert und Herrn Mathias Solf von der Firma Bombastus-Werke AG danke ich für das Bereitstellen einer Salbeiakzession und Durchführen von Destillationsreferenzanalysen.

Für die finanzielle Unterstützung der Forschungsarbeiten möchte ich mich an dieser Stelle bei der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) ganz herzlich bedanken (Förderkennzeichen "Schu 566/14-1").

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen meinen Familienangehörigen für ihre Unterstützung und unendliche Geduld während meiner ständigen gedanklichen Auseinandersetzung mit dieser Arbeit und außerdem bei meiner Frau Dr. Elena Blokhina für zahlreiche theoretische Diskussionen rund um das Thema.

Inhalt

Danksagung	1
Abkürzungen	4
Publikationsliste	5
Einleitung	7
Zielstellung	11
Ergebnisse und Diskussion	13
Arbeitspaket 1 – Fenchel	15
Arbeitspaket 2 – Salbei	23
Arbeitspaket 3 – Eibe	29
Zusammenfassung	37
Summary	38
Ausblick	40
Literaturverzeichnis	41
Anhang 1 – Originalveröffentlichungen (Volltext)	43
Anhang 2 – Zusatzmaterial aus den Publikationen	73
Anhang 3 – Zusatzmaterial, nicht veröffentlicht	77

Abkürzungen

- ATR-FTIRS Abgeschwächte Total-Reflexion Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie
- 10-DAB 10-Deacetylbaccatin III
- DAD Diode Array Detector
- ELSD Lichtstreudetektor/Evaporative Light Scattering Detector
- EOC essential oil components/ Ätherisch-Öl-Komponenten gewonnen über Extraktion
- GC Gaschromatographie
- HCA hierarchische Cluster Analyse
- HPLC Hochleistungsflüssigchromatographie/High Performance Liquid Chromatography
- HPTLC Hochleistungsdünnschichtchromatographie/High Performance Thin Layer Chromatography
- IPK Gatersleben Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben
- MS Massenspektrometrie
- NIRS Nahinfrarot-Spektroskopie
- PCA Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)
- Ph. Eur. Europäische Pharmakopöe/ Europäisches Arzneibuch
- PLS Projection on Latent Structures (alternative: Partial Least Squares)
- RMSECV Root Mean Square Error of Cross Validation
- SER(S) Surface-Enhanced Raman (Scattering)
- SERR(S) Surface-Enhanced Resonance Raman (Scattering)
- SIMCA Soft Independent Modelling of Class Analogy
- TERS Tip-Enhanced Raman Scattering
- TG Trockengewicht
- TLC Dünnschichtchromatographie/Thin Layer Chromatography
- UV-VIS Ultraviolett-sichtbares Licht

5

Publikationsliste

1. Gennadi Gudi, Andrea Krähmer, Hans Krüger, Lothar Hennig and Hartwig Schulz, *Discrimination of fennel chemotypes applying IR and Raman spectroscopy - discovery of a new γ-asarone chemotype.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(16): p. 3537-3547.

2. Gennadi Gudi, Andrea Krähmer, Hans Krüger and Hartwig Schulz, Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared Spectroscopy on Intact Dried Leaves of Sage (Salvia officinalis L.): Accelerated Chemotaxonomic Discrimination and Analysis of Essential Oil Composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(39): p. 8743-8750.

3. Gennadi Gudi, Andrea Krähmer, Iraj Koudous, Jochen Strube and Hartwig Schulz, Infrared and Raman spectroscopic methods for characterization of Taxus baccata L. - Improved taxane isolation by accelerated quality control and process surveillance. Talanta, 2015. **143**: p. 42-49.

Die Beschreibungen zu Material und Methoden finden sich ausführlich in den entsprechenden Publikationen. Die im Anhang dieser Arbeit aufgeführten Angaben zu Material und Methoden beziehen sich nur auf zusätzliche Experimente, die nicht in die jeweiligen Publikationen aufgenommen wurden.







Publikationen, die nicht in dieser Arbeit berücksichtigt worden sind

- 1. Edelmann, H.G., Gudi, G. and F. Kühnemann, *The gravitropic setpoint angle of dark-grown rye seedlings and the role of ethylene.* Journal of Experimental Botany, 2002. **53**(374): pp. 1627-1634.
- Buchweitz, M., Gudi, G., Carle, R., Kammerer, R.D. and Schulz, H. Systematic investigations of anthocyanin-metal interactions by Raman spectroscopy. Journal of Raman Spectroscopy, 2012.
 43(12): pp. 2001-2007.
- 3. Gudi, G., W. Schütze, and H. Schulz, *Rapid analysis of rosmarinic acid in lemon Balm (Melissa officinalis L.).* Asian Chem. Lett., 2011. **15**: pp. 10.
- 4. Krähmer, A., Gudi, G., Weither, N., Gierus, M., Schütze, W. and Schulz, H. *Characterization and quantification of secondary metabolite profiles in leaves of red and white clover species by NIR and ATR-IR spectroscopy*. Vibrational Spectroscopy, 2013. **68**(0): pp. 96-103.
- 5. Koudous, I., Both, S., Gudi, G., Schulz, H. and Strube, J. *Process design based on physicochemical properties for the example of obtaining valuable products from plant-based extracts*, in *Comptes Rendus Chimie Green extraction of natural products*, C. R. Chimie. 2014. **17**: pp. 218-231.
- 6. Schulz, H., Krähmer, A., Naumann, A., Gudi, G., *Infrared and Raman Spectroscopic Mapping and Imaging of Plant Materials*, in *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, R. Salzer and H.W. Siesler, Editors. 2014, Wiley-VCH: Weinheim. pp. 227-295.

Einleitung

Pflanzen stellen seit je her für den Menschen nicht nur eine Nahrungs- und Futtermittelquelle dar, sondern finden auf vielfältigstem Wege Verwendung als Arzneimittel, Färbestoffe, Konservierungsmittel, zur Erzeugung von Kleidung, als Energieträger und im Spezialfall der Bäume u.a. auch als Baumaterial und Papierrohstoff.

Besonders in den letzten Jahren werden pflanzenbasierten Arzneimitteln wieder zunehmend Beachtung geschenkt was u.a. einem wachsenden Verbraucherinteresse, vermehrt auftretenden Resistenzen gegen chemisch-synthetische Analoga und einem Wandel in der Landwirtschaft hin zu mehr Biodiversiät und Bioökonomie geschuldet ist.

Da das Wirkstoffspektrum in Pflanzen stark abhängig ist sowohl vom genetischen Hintergrund, den Klimaund Anbauverhältnissen als auch von Nachernteprozessen wie Trocknung, Zerkleinerung oder Lagerung ist, werden die Qualitätsanforderungen an pflanzliche Rohstoffe (Drogen) und deren Erzeugnisse in den jeweiligen Arzneibüchern festgeschrieben. So beschreibt beispielsweise das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) Drogen als "im Allgemeinen aus noch unverarbeiteten ganzen, zerkleinerten oder zerbrochenen Pflanzen, Pflanzenteilen, Algen, Pilzen oder Flechten" bestehend, die "gewöhnlich in getrocknetem, manchmal auch in frischem Zustand verwendet" werden [2]. In der Europäischen Pharmakopöe und dem Deutschen Arzneibuch sind die Analysemethoden erfasst, die für die Bestimmung der qualitativen und quantitativen Charakteristika der Rohrstoffe und deren Produkte zugelassen sind. Die häufigsten Methoden stellen noch immer überwiegend verschiedene Arten chromatographischer Trennmethoden wie Gas-(GC) oder Flüssigchromatographie (LC), Dünnschicht- oder Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) oder Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gekoppelt mit verschiedensten Detektionssystemen wie beispielsweise Massenspektrometrie (MS), Diodenarraydetektion (DAD), UV-VIS oder Lichtstreudetektion (ELSD) dar. Diese Verfahren erlauben durch vorhergehende Isolation und Konzentration der relevanten Analyte eine eindeutige Detektion der Zielstoffe sowie präzise quantitative Aussagen über deren Gehalt in einem Feedgemisch. Andererseits bedürfen sie aber einer oft arbeits- und materialintensiven Probenvorbereitung mit hohem Verbrauch von Lösungsmitteln/Hilfschemikalien, relativ langen Bearbeitungszeiten und qualifiziertem Personal.

Des Weiteren stellen diese invasiven Methoden einen Verlust des entsprechenden Probenmaterials dar, das zwar hinsichtlich der Arzneibuch-Anforderungen irrelevant ist, im Falle von z. B. Samenmaterial für weitergehende Experimenten in der Züchtungsforschung dann aber nicht mehr zur Verfügung steht.

Schwingungsspektroskopische Methoden bieten dort vielfältige Ansatzpunkte für alternative analytische Methoden, da aufgrund der für die Messung nötigen Wechselwirkung der Probe mit Licht im UV/VIS- und

Infrarot-Bereich oft zerstörungsfrei gearbeitet werden kann. Zusätzlich kann je nach Beschaffenheit der Probe und Konzentrationsbereich der relevanten Inhaltstoffe direkt am pflanzlichen Material oder an verschiedenen Prozessstufen gemessen werden, unabhängig vom Aggregatzustand. Dies stellt besonders bei Feststoffen und Rohextrakten einen enormen Zeit- und Kostenvorteil gegenüber chromatographischen Methoden dar.

Ebenso kann die inhaltstoffliche Gesamtheit einer Probe, das Metabolom, mittels MIRS, NIRS oder RS schnell und unabhängig von Polarität und Lösungseigenschaften der Inhaltstoffe erfasst werden. Dies erlaubt im Falle großer Probenserien ein schnelles qualitatives und halbquantitatives Screening und stellt eine wertvolle Ergänzung zu den etablierten Metabolomics-Techniken dar.

Besonders bei der Qualitätsbewertung und Authentifizierung pflanzlicher Rohstoffe sowie der *in-line*-Prozesskontrolle bietet die Schwingungsspektroskopie vielfältige Einsatzmöglichkeiten für eine schnelle vorort-Analytik.

Im Folgenden sind die Vorteile schwingungsspektroskopischer Methoden gegenüber Chromatographiegekoppelten Analysetechniken noch einmal kurz zusammengefasst:

- direkte Messung aller Aggregatzustände;
- die zu analysierenden Proben können sowohl im Makro- wie auch im Mikrobereich gemessen werden;
- Zerstörungsfreie Prüfung;
- Vereinfachte Probenvorbereitungsmethoden;
- Geringer oder gar kein Verbrauch von Hilfsmaterialien (z.B. Lösungsmittel);
- Kurze Bearbeitungszeit/Schnelles Analysenergebnis
- Entwicklung mobiler Geräte für Messungen vor Ort (Feldanbau, Destillations-/ Extraktionsbehälter).

Mit Hilfe der IR- und Raman-Spektroskopie ist es möglich, Substanzen in beliebigen Aggregatzuständen zu analysieren. Das bedeutet, dass im Gegenteil zu den meisten konventionellen Analysemethoden nicht das zu analysierende Objekt an ein Messgerät angepasst werden muss, sondern je nach Objektart das Instrument eingerichtet wird bzw. eine spezielle Applikationseinheit genutzt werden kann. Daraus folgt, dass das Rohmaterial intakt und direkt gemessen und analysiert werden kann und somit nur minimale Einflüsse der Probenvorbereitung und des Messvorganges selbst das Analyseergebnis beeinflussen. Ebenso werden der Aufwand der Probenpräparation und Anforderungen an Personalqualifikationen auf ein Minimum reduziert.

Darüber hinaus kann die zu analysierende Materialmenge stark variieren – von einzelnen Zellen und Molekülen (verschiedene mikroskopische Techniken wie Tip-Enhanced Raman Scattering (TERS) verknüpft mit Surface-Enhanced Raman (Resonance) SER-/SERR-Spektroskopie etc. [3, 4]) bis hin zu astronomischen

Dimensionen (Raman-Light Detection and Ranging – Raman-LIDAR [5]). In Bezug auf pharmazeutische Anforderungen der Qualitäts- und Prozesskontrolle haben diese extremen Anwendungen allerdings nur wenig Bedeutung, zeigen aber das generelle Potenzial dieser Methoden. In der Wareneingangskontrolle fällt der Stichprobenahme eine bedeutende Rolle zu. Wird bereits bei der Probenahme keine repräsentative Auswahl getroffen, hat das resultierende Analysenergebnis nur eine geringe Aussagekraft. Genau dies stellt einen enormen Vorteil der IRS und RS dar. Im Fall kleiner Probenmengen kann aufgrund der kurzen Messzeiten eine große Probenzahl analysiert werden und so bei vergleichsweise geringem Messaufwand die Gesamtheit einer Makroprobe besser beschrieben werden. Besonders die NIRS mit Eindringtiefen der NIR-Strahlen von mehreren Millimetern und relativ großen Messfenstern gestattet aber auch die Messung von mehreren Gramm einer Probe im Minutentakt.

Beide Aspekte – schnelle Messzeit und variable Probenmenge – erlauben eine umfassendere Betrachtung größerer Chargen und Prozesse, als dies mit chromatographischen Methoden in vergleichbarer Zeit realisierbar wäre.

Beispiele solcher Applikationen von NIRS-Methoden finden sich zahlreich besonders im Bereich der Pflanzen-, Lebensmittel- und pharmazeutischen Analytik [3, 4, 6-8].

Trotz vielfältiger Vorteile der Schwingungsspektroskopie gibt es aber auch hier Einschränkungen und Grenzen. So stellt das Spektrum immer die Summe aller IR- bzw. oder Raman-aktiven Komponenten einer Probe in Abhängigkeit der jeweiligen IR-/Raman-Aktivität dar. Dies erschwert die Interpretation der Spektren besonders im Falle komplizierter Mischungen wie pflanzlichem Rohmaterial. Dadurch bedingt sind diese Methoden auch meist weniger empfindlich und haben geringere Nachweisgrenzen als chromatographische Methoden, besonders wenn schwach IR- oder Raman-aktive Strukturen untersucht werden sollen. Ebenso bedarf es für die quantitative Bestimmung zunächst der Entwicklung geeigneter Vorhersagemodelle auf Basis von Referenzdaten direkter Analysetechniken wie GC-MS oder HPLC-MS. Dazu stehen heute vielfältige chemometrische Methoden zur qualitativen und quantitativen Auswertung zur Verfügung, die mit diversen statistischen Methoden auch gering konzentrierte Inhaltsstoffe bestimmbar machen.

Aktuell werden IR-spektroskopische Methoden in der Europäischen Pharmakopöe daher nur zur Identitätsprüfung reiner Substanzen eingesetzt, die anhand eines qualitativen Vergleiches der Probenspektren mit einem Standardspektrum vorgenommen wird [2, 9].

Die Entwicklung und Implementierung neuer schwingungsspektroskopischer Verfahren zur schnelleren und kostengünstigeren Analyse pflanzlicher Produkte liegt aber im Interesse sowohl der Anbauer und Züchter als auch der verarbeitenden pharmazeutischen Industrie durch die im Folgenden beschriebenen Anwendungsgebiete:

Pflanzenzüchtung/-anbau:

- Selektion von Elitesaatgut mit hoher Drogenqualität, bzw. ausgeprägten Qualitätsmerkmalen;
- Anbau- und Ernteoptimierung durch Wachstums- und Qualitätskontrolle bereits auf dem Feld;
- Screening großer Einzelpflanzensets zur Auswahl neuer Zuchtkandidaten;
- Chemotypisierung von Akzessionen gleicher Arten aber unterschiedlicher Inhaltstoffzusammensetzung.

Rohstoffqualität:

- Chemotypisierung von Rohmaterialien und ggf. Diskriminierung der unterschiedlichen Genotypen (Arten, Sorten) und Wachstumsbedingungen (Anbauorte, -jahre, Altersstadien) hinsichtlich der Produktqualität;
- Authentizitätsprüfung bei optisch/haptisch schwer differenzierbaren Herkünften;
- Quantifizierung von Wasser- und Wirkstoffgehalten besonders bei Arznei- und Gewürzpflanzen mit leichtflüchtigen Wertkomponenten über Kalibrationsmodelle basierend auf Referenzanalytik (HPLC, GC u.a.).

Einsatz in der Prozesssteuerung/Verarbeitung pflanzlicher Rohstoffe:

- spektroskopische Begleitung von Prozessen zur kontinuierlichen Überwachung der Extraktionsqualität und inhaltstofflichen Zusammensetzung (Erkennung von Vorlauf- und Nachlauf-Fraktionen minderer Qualität),
- Entwicklung optimaler Extraktionsprozesse über simultane Analytik bei Variation der Prozessparameter
- Einsatz von spektroskopischen Mapping-/Imaging-Techniken an pflanzlichem Material zur Darstellung der Inhaltsstoffverteilung und optimaler Probenvorbereitung f
 ür Extraktionsprozesse,
- Verfahrensoptimierung und Reduktion von prozessbedingten Verlusten.

Auf Basis dieser denkbaren Einsatzmöglichkeiten der Schwingungsspektroskopie in der Pflanzenanalytik ergeben sich die im folgenden beschriebenen Zielstellungen dieser Arbeit welche im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes: "Entwicklung einer Methode zum Entwurf der optimalen Trennsequenz als Funktion der Charakterisierung komplexer Feedgemische zur Isolierung von Wertkomponenten aus Pflanzenextrakten" angefertigt wurde (Schu 566/14-1 und Str 586/4-1).

Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und praktische Anwendung schwingungsspektroskopischer Methoden (IRS, NIRS und Raman-S) für die Qualitätsbewertung pflanzlicher Rohmaterialien und in der Prozesskontrolle begleitend zur technologischen Gewinnung und Verarbeitung dieser Rohstoffe. Die Arbeit wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der TU Clausthal durgeführt, wodurch sich die Auswahl der gemeinsam zu bearbeitenden Pflanzenarten als Modelle ergeben hat. Neben ihrer wirtschaftlichen Bedeutung sollten die Drogen möglichst unterschiedliche prozesstechnisch relevante Eigenschaften aufweisen, z.B. verschiedene Pflanzenteile wie Früchte oder Blätter, Stoffgruppen der Wertstoffe, Konzentrationen der Zielkomponenten im Rohmaterial und deren Verteilung im Pflanzengewebe. Daher ist es vorteilhaft, für einen Teil der Modelle, bereits pharmazeutisch sehr gut beschriebenen Drogen (wie z.B. Fenchelfrüchte) zu nutzen.

Als Beispielorganismen wurden dabei drei verschiedene Modellpflanzen ausgewählt, von denen unterschiedliche Pflanzenkompartimente jeweils die pharmazeutisch wirksamen Inhaltstoffe enthalten:

- Fenchel, Foeniculum vulgare Mill., Früchte als Rohprodukt,
- Eibe, Taxus baccata L., Nadeln als Rohprodukt,
- Salbei, *Salvia officinalis* L., Blätter als Rohprodukt.

Als Aufgabenschwerpunkte sollten dazu schwingungsspektroskopische Modelle zur:

- Chemotypisierung bzw. Evaluierung natürlicher Chemotypen bzw.
 Differenzierung von Kultur- und Wildtypen,
- Quantifizierung wertgebender Inhaltsstoffe und Qualitätsparameter gemäß
 Vorgaben der Ph. Eur.,
- Qualitätsbewertung im Hinblick auf Phytoextraktionsprozess-relevante Stoffparameter (Wassergehalt, Kontaminationsgrad...),
- Prozessbegleitende Qualitätskontrolle und Wirkstoffquantifizierung,

entwickelt werden.

Somit ergeben sich in Bezug auf die ausgewählten Modellpflanzen und unter Betrachtung der oben benannten Aufgabenschwerpunkte, die folgenden Arbeitspakete:

Das erste Arbeitspaket umfasst die Entwicklung neuer, schneller und einfach handhabbarer schwingungsspektroskopischer Techniken, die eine sichere Diskriminierung von verschiedenen Wild- und

Kultur-Chemotypen des Fenchels im Züchtungsprozess ermöglichen. Außerdem soll geprüft werden, ob die entsprechenden Messmethoden eine Identifizierung von Fenchel gemäß Ph. Eur. und somit eine Unterscheidung von nicht verzehrs- und verkehrstauglicher Typen gestattet. Ebenso soll eine schnelle Methode zur Diskriminierung von Süß- und Bitterfenchel auf Basis der Ätherisch-Öl-Zusammensetzung erarbeitet werden.

Der zweite Aufgabenkomplex widmet sich der Anwendung von ATR-FTIR-Spektroskopie für direkte qualitative und quantitative Analyse von ätherischem Öl in getrockneten, intakten Blättern von Salbei unter Berücksichtigung verschiedener Einflussfaktoren auf die Qualität wie Sorte, Stadium der Blattentwicklung und Erntezeitpunkt.

Im dritten Arbeitspaket sollen am Bespiel von Eibennadeln die Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes von IR- und Raman-Spektroskopie für die routinemäßige Qualitätskontrolle und die prozessbegleitende Analytik in der technologischen Verarbeitung der Pflanzenrohstoffe und Extrakte umfassend untersucht werden.

Ergebnisse und Diskussion

Als wertgebende Inhaltstoffe werden bei den drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Versuchspflanzen verschiedene Sekundärmetabolite betrachtet. Während es sich bei der Eibe mit Taxanen chemisch gesehen um Diterpenoide handelt, die über Lösungsmittelextraktion aus dem Pflanzengewebe isoliert werden, stellen ätherische Öle die ökonomisch und pharmazeutisch relevanten Inhaltstoffe bei Fenchel und Salbei dar.

Ätherische Öle sind je nach Herkunftspflanze komplexe Gemische volatiler Verbindungen mit meist charakteristischem Geruch. Sie sind gut löslich in organischen Lösungsmitteln, enthalten aber keine Fette. Der Begriff "ätherisches Öl" ist der Definition nach an die nicht extraktiven Prozesse wie z.B. Wasserdampfdestillation oder Auspressen des Pflanzengewebes gebunden; außerdem werden bestimmte Komponenten des ätherischen Öls erst während des Destillationsprozesses gebildet. Laut Ph. Eur. bildet das ätherische Öl nach der Wasserdampfdestillation eine separate organische Phase und lässt sich so leicht von dem Hydrolat abtrennen.

Da in den vorliegenden Arbeiten meist eine hohe Anzahl an Proben und geringe Mengen an jeweiligem Probenmaterial untersucht wurden, kamen anstelle der Wasserdampfdestillation verschiedene Extraktionsmethoden zum Einsatz. Damit konnte unter Verwendung kleinerer Probenmenge eine höhere Probenanzahl in vergleichsweise kurzer Analysezeit und geringerem präparativen Aufwand untersucht werden. Die Isolationsmethode (Extraktion oder Destillation) beeinflusst dabei aber nicht nur die erhaltene Gesamtmenge an ätherischem Öl bzw. Extrakt, sondern auch deren chemische Zusammensetzung. Daher ist es nicht zulässig die hier extraktiv gewonnenen organischen Fraktionen als ätherisches Öl zu bezeichnen. Da die hier betrachteten Extrakte in ihrer qualitativen und quantitativen chemischen Zusammensetzung aber prinzipiell mit den jeweiligen ätherischen Ölen vergleichbar sind, soll für die Beschreibung der Extrakte hier dennoch der Begriff Ätherisch-Öl-Komponenten (EOC, essential oil components) eingeführt werden. Am Beispiel des Salbeis (*Salvia officinalis* L.) der später im Arbeitspaket 2 hinsichtlich seiner chemotypischen Variabilität beschrieben wird, wurde der methodische Nachweis für die Vergleichbarkeit von Destillation und Extraktion gezeigt.

In Abbildung 1 sind die Verhältnisse der jeweiligen Komponenten im Extrakt gegenüber denen im ätherischen Öl dargestellt.

In beiden Fällen, Extraktion und Wasserdampfdestillation, werden chemisch vergleichbare Substanzgemische erhalten, wie die entsprechende GC-FID-Analytik zeigt. Dabei beträgt die Gesamtausbeute bei der Extraktion etwa das Zweifache gegenüber der Wasserdampfdestillation. Zu dieser scheinbaren Ausbeuteerhöhung tragen aber nicht alle EOC gleichermaßen bei, sondern vor allem

Komponenten wie 1,8-Cineol, α - und β -Caryophyllen, Manool sowie die nicht näher definierten, als "Rest" zusammengefassten unbekannten Bestandteile. Dies gilt es bei der Betrachtung der über Extraktion gewonnenen EOC zu berücksichtigen. Da die in dieser Arbeit entwickelten Kalibrationsmodelle zunächst die prinzipielle Anwendbarkeit spektroskopischer Methoden zeigen sollen, wurden hier die referenzanalytischen Messungen ausschließlich an Extrakten vorgenommen und auf entsprechende Modellentwicklungen basierend auf Wasserdampfdestillations-Proben verzichtet. Im Falle eines Einsatzes spektroskopischer Methoden zur Überprüfung der Arzneibuchkonformität pflanzlicher Rohmaterialien müsste entweder eine Wasserdampfdestillation durchgeführt werden, oder für jede EOC ein Korrekturfaktor zwischen Destillation und Extraktion errechnet werden, der der unterschiedlichen Extraktionsfähigkeit jeder Komponente Rechnung trägt.



Abbildung 1. Vergleich der chemischen Zusammensetzung von ätherischem Öl und Lösungsmittelextrakt aus Salbeiblättern verschiedener Akzessionen basierend auf GC-FID-Analyse. Dargestellt ist das Verhältnis der gesamten EOC und aller Einzelkomponenten von Extrakt zu Destillat (rechte Skala, relative Einheiten). Die verschiedenfarbigen Balken zeigen die Verhältnisse für jede Akzession. Die breiten grauen Balken bezeichnen den prozentualen Beitrag jeder Komponente (linke Skala) zur Änderung des gesamten EOC-Gehalte des Extrakts gegenüber dem Destillat gemittelt über alle Akzessionen (Formel: (Komponente Extrakt – Komponente Destillation) / (Gesamtgehalt Extrakt – Gesamtgehalt Destillation) *100). Versuchsdesign: Ernte 26.-29.05.2015 aller Akzessionen, Destillation und Extraktion in zweifacher Wiederholung (daher keine Variabilitätsangaben) im JKI durchgeführt.

In der Abbildung 2 sind solche Umrechnungsfaktoren für EOC und einzelnen Ölkomponenten zwischen Destillation- und Extraktionsverfahren beispielhaft am Salbei dargestellt. Dabei handelt es sich um Mittelwerte über alle Akzessionen und Probenvarianten. Es muss aber berücksichtigt werden, dass einzelne Akzessionen genotypisch scheinbar inhomogen sind (Abbildung 13), was sich auf die Zusammensetzung der pflanzlichen Matrix und der EOC auswirkt. Dies muss beim praktischen Überführen der Korrekturfaktoren in

ein späteres Vorhersagemodell basierend auf Extrakten entsprechend berücksichtigt werden. Die detaillierte Untersuchung dieser Korrelationen auch im Hinblick auf eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von trockenem auf frisches Blattmaterial ist im Rahmen eines Nachfolger-Projekts vorgesehen.



Abbildung 2. Mittlere Verhältnisse der absoluten Mengen einzelner EOC (ml 100 g⁻¹) in Extrakten zu entsprechenden Destillaten sowie die entsprechenden Standardfehler der Mittelwerte. Die gelber Balken bezeichnen den prozentualen Beitrag jeder Komponente zur Änderung der gesamten EOC-Gehalte des Extrakts gegenüber dem Destillat gemittelt über die Akzessionen des gewählten Datensets. Berechnung wie in der Abbildung 1. Versuchsdesign: Ernte 29.09.-12.10.2015 Akzessionen SALV 13, SALV 15, SALV 25, SALV 29, SALV 34 SALV 63, SALV 65 und drei Stichproben aus dem kommerziellen Saatgut von Bingenheimer-Saatgut; Destillation in dreifacher Wiederholung der Firma Bombastus-Werke, Extraktion in 10-facher Wiederholung wurde im JKI durchgeführt.

Arbeitspaket 1 - Fenchel

Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) ist wirtschaftlich gesehen eine der wichtigsten Pflanzenarten der Gattung *Foeninculum* und wird seit dem Altertum als Lebensmittel, Gewürz und Heilpflanze kultiviert



Abbildung 3. Fenchelknollen als Gemüse (A) und Fenchelfrüchte als Arzneiteedroge (B).

(Abbildung 3). Die Art zeigt eine große Vielfalt hinsichtlich morphologischer Erscheinung und sekundärem Inhaltsstoffspektrum (Abbildung 4).

So sind neben den beiden im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Varietäten *F. vulgare* ssp. *vulgare* var. *vulgare* ("Bitterfenchel) und ssp. *vulgare* var. *dulce* ("Süßfenchel) in der Literatur weitere Unterarten und Varietäten wie *F. vulgare* ssp. *vulgare* var. *azoricum* oder *F.*

vulgare ssp. piperitum [10] inhaltstofflich beschrieben. Pharmazeutisch bedeutsam sind allerdings nur der Süßfenchel [11] mit einem sehr hohen Gehalt an *trans*-Anethol (≥ 80 %) bei moderatem Fenchongehalt (< 15 %) im ätherischen Öl, sowie der Bitterfenchel [12], der durch niedrigere *trans*-Anetholgehalte (ab 60 %) bei höherem Anteil von Fenchon (15-25 %) im Öl charakterisiert ist. Anhand phänologischer Merkmale sind die Früchte beider Fencheltypen nur schwer zu unterscheiden, weshalb das Arzneibuch eine entsprechende GC-Analytik des Öls als Qualitätskriterium definiert.

Eine Beziehung zwischen inhaltstofflicher Zusammensetzung des ätherischen Öls und der Morphologie der Fenchelfrüchte ist bisher auch bei anderen Fenchelgenotypen als nicht konstant beobachtet worden, was in Abbildung 4 veranschaulicht ist. Dort sind Fenchelfrüchte verschiedener Akzessionen/Sorten den verschiedenen Chemotypen zugeordnet. Die morphologische Vielfalt ist besonders deutlich bei der Akzession FOE 43 zu erkennen, deren Früchte von zwei Jahresernten, 2002 und 2003, jeweils sehr unterschiedliche Erscheinungsbilder zeigten (Abbildung 4, mittlere Reihe).

In dieser Arbeit wurden insgesamt 11 Fenchelakzessionen untersucht, zusätzlich zu den in Abbildung 4

gezeigten auch noch zwei kommerzielle Süßfenchelvarietäten ,Chumen' und ,Feniks'. Anhand dieses Probensets sollte eine schnelle und einfach handhabbare Chemotypisierung mittels IRund/oder Raman-Spektroskopie entwickelt werden basierend auf einem Quantifizierungsmodell, das den Gehalt relevanter Inhaltsstoffe vorgegebener mit Genauigkeit abschätzen lässt.



Abbildung 4. Fenchelfrüchte von verschiedenen Akzessionen und Sorten nach Chemotypen farbig markiert. *trans*-Anethol-Chemotyp (orange) in der oberen Reihe teilt sich in zwei Subtypen – Süßfenchel (grau) und Bitterfenchel (gelb), FOE 43 und 48 als Estragol-Typen (rot, Mitte) sowie der Piperitenonoxid-Typ (blau, FOE 25) und γ -Asaron-Typ (grün, FOE 86 und 87, unten). Die Zahlen nach dem Schrägstrich stellen das jeweilige Erntejahr der Früchte dar. Die morphologische Variabilität ist sehr hoch, auch innerhalb einer einzelnen Akzession, was besonders deutlich bei der Akzession FOE 43 zu erkennen ist.

Für die zwei im Arzneibuch definierten Fenchelchemotypen Bitterfenchel und Süßfenchel werden der Gesamtgehalt des ätherischen Öls mit 40 und 20 ml kg⁻¹ und jeweiligen Anteilen von *trans*-Anethol von mindestens 60 bzw. 80 % angegeben. Der Fenchongehalt liegt dabei für bittereren Fenchel wie oben benannt höher als beim Süßfenchel. Weitere Ölkomponenten werden für die Qualitätsbeschreibung nicht berücksichtigt, allerdings sollte der Gehalt an Estragol möglichst gering sein, da Estragol in Tierversuchen eine kanzerogene Wirkung gezeigt hat [3, 4]. Ein konkreter Grenzwert für Estragol als weiteres Qualitätskriterium hat aber bislang noch nicht Einzug im Ph. Eur. gefunden.

Eine detaillierte GC-Analyse der Zusammensetzung des ätherischen Öls ermöglicht eine genauere Chemotypisierung des Fenchels auch unter Berücksichtigung von Nebenkomponenten. Tabelle 1 zeigt die entsprechenden Ergebnisse für die untersuchten Fenchelakzessionen, die analog zu Abbildung 1 je nach Anteil der Hauptkomponente im Öl in 5 Gruppen unterteilt werden könne n.

Tabelle 1. Zusammensetzung der Ätherisch-Ölkomponenten (EOC) von Lösungsmittelextrakten (CCl ₄) der verschiedenen															
Fenchelakzessionen [% im Öl]. Adapted with permission from [13]. Copyright © 2014 American Chemical Society															
Probenbez.	lpha - Pinen	Myrcen	p -Cymen	Limonen	Fenchon	Estragol	Anisaldehyd	trans-Anethol	γ -Terpinen	Terpinolen	Piperitenonoxid	eta - Phellandren	Methyleugenol	γ-Asaron	Rest, nicht identifiziert
¹ Berfena	5,90	1,13	0,40	2,71	24,66	2,23	1,78	52,79							8,40
¹ FOE 16/03	4,26	1,01	0,92	3,13	25,34	2,31	1,29	54,85							6,89
² FOE 18/11	1,66		0,19	11,16	6,29	2,78		73,00							4,92
³ FOE 25/10	0,63	0,87	1,45	47,18	0,34				10,64	4,68	28,65				4,68
⁴ FOE 43/02	2,64	1,83	1,27	3,86	33,19	53,78	0,24	2,64							0,79
⁴ FOE 43/03	7,69		1,14	1,55	17,25	57,20	3,18	4,50							7,49
⁴ FOE 48/03	7,47	2,22	0,66	3,84	35,08	44,65									6,08
⁵ FOE 86/99	15,27	1,15		1,62	9,19							2,26		65,95	4,56
⁵ FOE 87/99	11,36	1,17		1,84	8,92							2,55	1,77	68,63	3,76
⁶ Chumen	3,90	0,72	0,27	3,39	7,75	2,94		76,39							4,64
⁶ Feniks	2,83	1,00	0,45	4,28	10,01	3,09		75,49							2,85
1 – <i>trans</i> -Anethol-Fenchon-Typ (bitter); 2 – <i>trans</i> -Anethol-Typ (süß); 3 - Piperitenonoxid-Typ; 4 - Fenchon-Estragol-Typ															

Diese Gruppen (Chemo-Typen) lassen sich auf Basis der metabolischen Profile leicht mithilfe von hierarchischer Clusteranalyse (HCA) voneinander trennen, wie in Abbildung 5 dargestellt ist. Der Estragol-Typ weist hierbei einen extrem niedrigen *trans*-Anethol-Gehalt auf bei gleichzeitig sehr hohen Estragolwerten (> 40 %). Aufgrund der hohen Fenchongehalte könnte dieser Typ aber bei ausschließlicher Betrachtung des Fenchons fälschlicherweise als Bitterfenchel gekennzeichnet werden. Die anderen Chemotypen lassen sich gemäß Ph. Eur. weder als Bitter- noch als Süßfenchel definieren.



Abbildung 5. Hierarchische Clusteranalyse der verschiedenen Fenchelakzessionen basierend auf den GC-FID Daten der CCl₄-Extrakte der Fenchelsamen (ohne Betrachtung der Jahreswiederholung 2013 von FOE 43). Adapted with permission from [13]. Copyright © 2014 American Chemical Society

In Abbildung 6 sind die Strukturformeln der basierend auf den Ergebnissen der GC-Analytik wichtigsten EOC dargestellt. Diese Komponenten können über ihre chemische Struktur in mehreren Gruppen unterteilt werden, die sich in ihrer IR-Aktivität deutlich unterscheiden lassen. Innerhalb jeder Gruppe weisen die entsprechenden Substanzen dabei ähnliche spektrale Charakteristika auf, weswegen sich ihre Trennung in komplexen Gemischen einzig mit Hilfe der IR-Spektren schwierig gestaltet.

So zeigen Estragol, *y*-Asaron, Methyleugenol und *trans*-Anethol den typischen Phenylpropanoid-Grundkörper, allerdings nur *trans*-Anethol weist eine in Konjugation mit dem aromatischen Ringsystem stehende allylische C=C-Doppelbindung auf (blauer Cluster). Fenchon und Piperitenonoxid weisen beide jeweils eine sehr IR-aktive C=O-Doppelbindung (Ketofunktion) im gesättigten Kohlenstoff-Ringsystem auf (grüner Cluster). Im Gegensatz dazu steht diese Ketofunktion bei Anisaldehyd noch in Konjugation zum Aromaten (oranger Cluster). Alle weiteren Komponenten sind reine Kohlenwasserstoffverbindungen der Terpene und lassen sich nur anhand der Positionen ihrer C=C-Doppelbindungen unterscheiden. So weisen Myrcen und β -Phellandren (roter Cluster) zwei konjugierte Doppelbindungen auf, Limonen, γ -Terpinen, Terpinolen und α -Pinen (pinkfarbener Cluster) hingegen nur eine oder zwei isolierte Doppelbindungen. p-Cymen zeigt als einziges dieser Terpene ein aromatisches Ringsystem (brauner Cluster).



Abbildung 6. Hauptbestandteile der EOCs verschiedener Fencheltypen gruppiert nach IR-aktiven funktionellen Gruppen.

Abbildung 7 zeigt die ATR-FTIR- und Raman-Spektren für jeweils eine repräsentative Akzession der vier Chemotypen (FOE 43, FOE 87, FOE 25) sowie für den *trans*-Anethol-Typ differenziert Bitter- (FOE 16) und Süßfenchel (,Chumen'). Ebenso sind die entsprechenden ATR-FTIR- und Raman-Spektren für die Standardverbindungen der jeweiligen Hauptkomponenten (*trans*-Anethol, Fenchon, Estragol, *γ*-Asaron und Limonen) gezeigt.

Wie den in Abbildung 7A gezeigten ATR-FTIR-Spektren zu entnehmen ist, zeigen alle Akzessionen ein intensives und charakteristisches Signal um 1740 cm⁻¹, das auf eine sehr IR-aktive C=O-Valenzschwingung wie beim Fenchon hinweist. Da auch die Akzession FOE 25 aufgrund der hohen Gehalte an Piperitenonoxyd

(> 28 %) bei gleichzeitig nur sehr geringem Fenchongehalt (< 1 %) eine starke C=O-Absorption zeigt, ist das C=O-Signal allein kein ausreichendes Unterscheidungskriterium für die jeweiligen Chemotypen.

Auf Basis der Signale des Kohlenstoffgerüstes und dessen Substitutionsmusters können die verschiedenen Phenylpropanoide (γ -Asaron, Estragol, *trans*-Anethol) aber unterschieden werden, auch wenn die entsprechenden Signale eine weit geringere IR-Aktivität aufzeigen. So kann *trans*-Anethol anhand der hypsochromen Verschiebung der Streckschwingung der allylischen C=C Bande ($\nu_{C=C}$ – von 1656 cm⁻¹) gegenüber Estragol und γ -Asaron unterschieden werden, wobei die isolierte Position der aliphatischen C=C-Bande zu einem Signal bei geringerer Wellenzahl führt (1638 bzw. 1640 cm⁻¹). Gleiches lässt sich für die Deformationsschwingung γ_{CH} der aliphatischen C=C-Doppelbindung beobachten, die bei *trans*-Anethol aufgrund der *trans*-Substitution zu höherer Wellenzahl (962 cm⁻¹) gegenüber der endständigen Position bei Estragol und γ -Asaron (912 cm⁻¹) hin verschoben ist.

Estragol und γ -Asaron hingegen lassen sich aufgrund des unterschiedlich hohen Substitutionsgrades des Aromaten (Estragol 3 Substituenten, γ -Asaron 4 Substitutenten) mithilfe der symmetrischen und antisymmetrischen Valenzschwingungen v_{C-O-C} im Bereich von 1242 (Estragol) und 1224 bzw. 1204 cm⁻¹ (γ -Asaron) unterscheiden.

Der Piperitenonoxid-Typ FOE 25 ist durch sehr hohe Limonengehalte gekennzeichnet. Limonen besitzt zwei isolierte C=C-Doppelbindungen die zu den entsprechenden charakteristischen Signalen für $v_{C=C}$ bei 1677 und 1644 cm⁻¹ sowie für γ_{CH} bei 914 und 886 cm⁻¹ führen.

Aufgrund der besonderen Raman-Aktivität der ungesättigten C=C-Systeme sind die entsprechenden Signalunterschiede bei $\nu_{C=C}$ und γ_{CH} in den Ramanspektren wesentlich intensiver und charakteristischer als im ATR-FTIR.

Bei umfassender Betrachtung aller beschriebenen charakteristischen Signale im Fingerprintbereich kann eine sichere Klassifizierung der Fenchelakzessionen in die jeweiligen Chemotypen über ATR-FTIR und RS mit Hilfe multivariater hierarchischer Clusteranalyse erhalten werden. Abbildung 8 zeigt die entsprechende Clusterung auf Basis der FTIR-ATR-Spektren in Analogie zu den GC-Referenzdaten (Abbildung 5).



Abbildung 7. Charakteristische ATR-FTIR- (A) und Raman-Spektren (B) von CCl₄-Extrakten verschiedener Akzessionen (FOE 43, FOE 87, FOE 25, FOE 16 und Chumen) im Vergleich zu den entsprechendenden Standards der Hauptkomponenten (*trans*-Anethol, Fenchon, Estragol, γ -Asaron und Limonen). Reprinted with permission from [13]. Copyright © 2014 American Chemical Society. Alle Akzessionen zeigen ein intensives und charakteristisches Signal um 1740 cm⁻¹ (C=O), daher kann das C=O-Signal allein nicht als Diskriminierungsfaktor der Chemotypen verwendet werden. Eine sichere Klassifizierung kann auf Basis anderer Signale aus Fingerprintbereich, vor allem der Banden C=C im Bereich 1680 - 1630 cm⁻¹, C-O-C im Bereich 1250 - 1200 cm⁻¹ sowie CH-Schwingungen im Bereich 960 - 880 cm⁻¹, vorgenommen werden.

Ebenso kann auf Basis des Intensitätsverhältnisses der charakteristischen Banden von Fenchon (~1740 cm⁻¹) und von *trans*-Anethol (1605, 1507 und 1241 cm⁻¹) auf deren Konzentrationsverhältnis Rückschluss gezogen werden, was die Unterscheidung von bitterem und süßem Fenchel ermöglicht.



Abbildung 8. Hierarchische Clusteranalyse über FTIR-ATR-Spektren von einzelnen Fenchelfrüchten (links). Rechts sind charakteristische Spektren für zwei Arzneibuch-relevante Fenchel-Klassen, bitter und süßer, zum Vergleich abgebildet. Adapted with permission from [13]. Copyright © 2014 American Chemical Society.

Abbildung 9 stellt den Fingerprintbereich der ATR-FTIR-Spektren von süßem ("Feniks") und bitterem ("Berfena") Fenchel gegenüber den Standardspektren von Fenchon und *trans*-Anethol detailliert dar. Gut zu erkennen ist hierbei das sich vom Süßfenchel zum Bitterfenchel hin verkleinernde Verhältnis zwischen $v_{c=c}$ (*trans*-Anethol) und $v_{c=o}$ (Fenchon), was die Unterscheidung beider Arzneibuchvarianten ermöglicht.



Abbildung 9. Spektrale Unterschiede von bitterem und süßem Fenchel verursacht durch verschiedene Inhaltverhältnisse von Fenchon und *trans*-Anethol (ATR-IR Spektren der beiden Standard-Verbindungen Fenchon und *trans*-Anethol mit Zuordnungen der jeweiligen funktionellen Gruppen dargestellt in mittlerer Reihe). Verschiedene Inhaltverhältnisse von Fenchon und *trans*-Anethol führen zu verschiedenen Intensitätsverhältnissen der Spektren von Bitter- und Süßfenchel der markierten Banden (1740 cm⁻¹ gegenüber 1605, 1507 und 1241 cm⁻¹), obere und untere Reihen entsprechend.

Neben dem Gehalt an *trans*-Anethol im ätherischen Öl ist besonders der Ölgesamtgehalt als Qualitätskriterium über das Ph. Eur. definiert. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis einer Nahinfrarotspektroskopie (NIRS)-basierten Vorhersage des ätherischen Ölgehaltes anhand von GC-FID-Referenzdaten. Im Gegensatz zur FTIR-ATR-Messungen wurden hier nicht einzelne Früchte vermessen, sondern eine Einwaage von etwa 5 g mit ca. tausend Einzelfrüchten untersucht. Bei einer entsprechend gestalteten Probenahme erlaubt dies auch die Extrapolation der Ergebnisse auf größere Erntemengen.



Abbildung 10. NIR-Kalibration der intakten Fenchelfruchte. A – NIR-Mittelwertspektrum (schwarz) mit Vertrauensbereich (p=0.05, blau) von intakten Fenchelfrüchten. Der markierte Spektralbereich (7502 - 6098 cm⁻¹) wird zur Quantifizierung des EOC-Gehaltes genutzt. B – Kreuzvalidation ('leave-out"10 %) zur Vorhersage des EOC-Gehaltes in Fenchelfrüchten. (1. Ableitung, MSC).

Somit kann unter Vermeidung kosten- und arbeitsintensiver Chromatographie eine einfache und schnelle Zuordnung unbekannter Fenchelfrüchte zu den jeweiligen Chemotypen auf Basis von Lösungsmittelextrakten (ATR-FTIR/RS) erhalten werden sowie direkt an den Früchten (ATR-FTIR/NIRS) zerstörungsfrei ohne weitere Extraktionsschritte der Gehalt an ätherischem Öl bestimmt werden.

Im Rahmen des ersten Arbeitspakets wurde eine neue, schnelle, zerstörungsfreie und einfach handhabbare schwingungsspektroskopische Technik zur Diskriminierung von verschiedenen Wild- und Kultur-Chemotypen des Fenchels auf Basis von Lösungsmittelextrakten (ATR-FTIR/RS) sowie direkt an den Früchten (ATR-FTIR/NIRS) entwickelt. Dabei wurde gezeigt, dass alle spektroskopischen Messmethoden eine Identifizierung von Fenchel gemäß Ph. Eur. und somit eine Unterscheidung von Süß- und Bitterfenchel gewährleisten. Hierzu werden chemometrische Methoden der multivariaten Analyse erfolgreich eingesetzt.

Anwendungsgebiete entsprechend Seite 9:

<u>Pflanzenzüchtung/-anbau</u> - Selektion; Screening großer Einzelpflanzensets zur Auswahl neuer Zuchtkandidaten; Chemotypisierung von Genbank-Akzessionen.

<u>Rohstoffqualität</u> - Authentizitätsprüfung bei optisch/haptisch schwer differenzierbaren Herkünften; Quantifizierung von Wasser- und Wirkstoffgehalten bei Arznei- und Gewürzpflanzen mit leichtflüchtigen Wertkomponenten.

Arbeitspaket 2 - Salbei

Salbei (*Salvia officinalis* L.) wird weltweit als Gewürzpflanze und afgrund der pharmazeutischen Wirkung seiner Blätter kultiviert. Die Verwendung von Salbeidroge als Meditinaltee oder als pflanzliches Arzneimittel ist nach den Standards des Europäischen Arzneibuchs eingeschränkt. Die pharmazeutischen Anwendungen und der aromatische Geschmack von Salbei ist vorwiegend durch die z.T. hohen Gehalten an ätherischem Öl begründet, das reich an Thujon und Campher mit α - und β -Pinen, 1,8-Cineol und Camphen als Nebenkomponenten ist. Salbei zeigt dabei eine große Variabilität hinsichtlich der Gesamtgehalte sowie der Zusammensetzung des ätherischen Öls.

Diese Variabilität wurde an 12 verschiedenen Genbankakzessionen von Salbei des IPK Gatersleben (SALV 13, SALV 15, SALV 25, SALV 28, SALV 29, SALV 30, SALV 31, SALV 34, SALV 36, SALV 63, SALV 65, SALV 67) untersucht. Insgesamt wurden 30 Einzelpflanzen je Akzession auf dem Versuchsfeld des JKI – Standort Berlin-Dahlem kultiviert und hinsichtlich der Variabilität an Ätherisch-Öl-Gehalt und -Zusammensetzung jeweils die Blätter von 10 Einzelpflanzen je Akzession mittels GC-FID und ATR-FTIR untersucht. Dabei wurden verschiedenen Altersstadien der Blätter sowie zwei verschiedene Erntezeitpunkte (H1 = 25.07.2013) und H2 = 25.09.2013) über die Vegetationsperiode hinweg betrachtet.

Abbildung 11 zeigt die Variabilität der prozentualen Zusammensetzung der Ätherisch-Ölfraktionen anhand von Lösungsmittelextrakten junger Blätter für die verschiedenen Akzessionen.







Abbildung 12. Zusammensetzung von Lösungsmittelextrakten junger Blätter von drei repräsentativen Salbeiakzessionen nach GC-FID-Analyse (ml 100 g⁻¹, Ernte 25. Juli 2013). Erstellt aus Daten der Experimente, die in [1] beschrieben sind. Methodendetails wie in Abbildung 11.

einer insgesamt sehr geringen Thujonfraktion (SALV29) bzw. sehr schwankender Zusammensetzung der Thujonfraktion mit hohem Gehalt an α -Thujon (SALV63) bzw. β -Thujon (SALV13).

Während in allen drei Akzessionen Campher die Haupt- bzw. zweitgrößte Komponente darstellt, lassen sich große Schwankungen im Gehalt und Zusammensetzung der Thujone wie auch für Camphen, 1,8-Cineol, α -Pinen und α -Caryophyllen beobachten. Diese zum Teil extreme Variabilität zwischen den Akzessionen lässt sich aber auch innerhalb der Versuchspflanzen einer Akzession beobachten. Abbildung 13 zeigt dazu beispielhaft die Zusammensetzung der Ätherisch-Öl-Fraktionen für 10 Einzelpflanzen der Akzession SALV36 bestimmt mittels GC-FID der Lösungsmittelextrakte.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnten zum Teil sehr drastische Unterschiede in der Zusammensetzung der Thujonfraktion selbst innerhalb einer Akzession beobachtet werden. So gibt es in der Akzession SALV36 Pflanzen mit fast ausschließlich β -Thujon (Pflanzen 10, 11 und 28) gegenüber solchen mit fast gleichem Gehalt an α - und β -Thujon (z.B. Pflanze 04, 07, 29).

Insgesamt zeigen die betrachteten Salbeiakzessionen nicht nur eine hohe Variabilität hinsichtlich des Ätherisch-Ölgehaltes Akzessionen, sondern auch innerhalb ein und Methodendetails wie in Abbildung 11.



Abbildung 13. Vergleich der Gehalte der fünf wichtigsten Ätherisch-Öl-Komponenten von 10 Einzelpflanzen (p02...p29) der Akzession SALV 36 nach GC-FID-Analyse von Lösungsmittelextrakten (Ernte 25. Juli 2013, junge Blätter). Die linke y-Achse bezieht sich auf den Gesamtgehalt von EOC (breite graue Balken im Hintergrund) und und dessen Zusammensetzung zwischen den die rechte y-Achse auf den Gehalt der einzelnen Komponenten. Erstellt aus Daten der Experimente, die in [1] beschrieben sind.

derselben Akzession. Dies ist sicher unter anderem damit zu begründen, dass es sich bei den Akzessionen

Neben Akzessionen mit einem sehr geringen Gesamtthujongehalt (α - + β -Thujon) wie SALV29 und SALV30 konnte eine sehr große Schwankungsbreite bei der Zusammensetzung der Thujonfraktionen bezüglich des Verhältnisses von α - zu β -Thujon beobachtet werden. Bei nahezu allen Akzessionen wurde hingegen ein Camphergehalt von über 20% gefunden.

Abbildung 12 zeigt diese z.T. sehr drastischen Unterschiede in der Zusammensetzung des ätherischen Öls beispielhaft für die drei Akzessionen SALV 13, SALV29 und SALV63 mit um regionale Sammlungen handelt, die nicht immer genetisch identisch sein müssen. Darüber hinaus konnten z.T. große Veränderungen in der Zusammensetzung des ätherischen Öls im Verlauf der Vegetationsperiode beobachtet werden. Abbildung 14 zeigt die entsprechenden Ätherisch-Öl-Gehalte für zwei verschiedene Altersstadien der Salbeiblätter aller 12 betrachteten Akzessionen (Mittelwerte beider Erntezeitpunkte).

Wie Abbildung 14 zeigt, liegt der Gehalt an ätherischem Öl Jahreszeit-unabhängig in jungen Blättern mit bis zu zweifach höherem Gehalt deutlich über dem der alten Blätter. Diese Beobachtung ist auch für alle betrachteten Akzessionen gültig.

Die umfassenden Ergebnisse zur Variabilität des 4 Ätherisch-Ölgehaltes und seiner chemischen Zusammensetzung zwischen innerhalb und verschiedener Akzessionen wie auch die Abhängigkeit vom Blattalter und Erntezeitpunkt müssen bei der ¹ Entwicklung schwingungsspektroskopischen o von Methoden unbedingt berücksichtigt werden.

Um aufbauend auf zerstörungsfreie ATR-FTIR-Analytik ein schnelles und günstiges Verfahren für ein chemotypisches Screening wie auch eine quantitative Copyright © 2015 American Chemical Society. Junge Blätter Analyse des ätherischen Öls zu etablieren, müssen Abmessungen ab 50/15 mm.



Abbildung 14. Vergleich der Ätherisch-Öl-Gehalte aller 12 Akzessionen für die getrennte Betrachtung alter (blau) und Blätter nach **GC-FID-Analyse** junger (rot) Lösungsmittelextrakten (Mittelung über beide Ernten 25.07. und 25.09.2013). Adapted with permission from [1]. mit Längen/Breiten bis 30/10 mm; alte Blätter mit

diese Erkenntnisse in eine optimale Gestaltung von Probenahme und die Wahl des Erntezeitpunktes einfließen.

Eine weitere Herausforderung an die Entwicklung einer spektroskopischen Diskriminierungsmethode für Salbei stellt die im Vergleich zum Fenchel generell niedrigere Konzentration an ätherischem Öl im Rohmaterial dar. Dies stellt höhere Ansprüche an die Spektrenbearbeitung und nachfolgende chemometrische Modellierung, was dem Stadium der Spektrenauswertung eine besondere Bedeutung gibt.

Die betrachteten Lösungsmittelxtrakte aus Salbei bestehen überwiegend aus Terpenoiden (85-90 %), die auch die Hauptkomponenten eines ätherischen Öls sind (siehe Abbildung 11). Diese Substanzen weisen eine hohe Variabilität über alle untersuchten Varietäten und Akzessionen auf (Tabelle 2).

In Abbildung 15 sind die Mittelwertspektren alter und junger Salbeiblätter zu den beiden Erntezeiten gezeigt. Diese Spektren wurden über alle Akzessionen gemittelt. Zum Vergleich sind auch Spektren der beiden Hauptkomponenten des ätherischen Öls, Campher und α -/ β -Thujon mit ihren charakteristischen Banden (hellgrau markierte Bereiche) dargestellt.

Tabelle 2. Über GC-FID ermittelte chemische Zusammensetzung der EOC aller 12 Salbeiakzessionen zusammengefasst für alle einzelnen Versuchspflanzen unter Einbeziehung beider Altersstadien der Blätter ("alt" und "jung") sowie beider Erntezeitpunkte zum 25.07. und 25.09.2013 (n= 448). Adapted with permission from [1]. Copyright © 2015 American Chemical Society.

Komponente	Mittel*	SD**	Max	Min	Q1**	Q3**	Mittel***
EOC Gehalt	3.109	1.215	7.330	0.575	2.188	3.961	
lpha-Thujon	0.610	0.383	2.136	0.008	0.328	0.849	19.6
eta-Thujon	0.236	0.255	1.311	0.000	0.050	0.343	7.6
Campher	0.511	0.268	1.782	0.005	0.325	0.644	16.4
1,8-Cineol	0.254	0.151	0.946	0.017	0.140	0.337	8.2
lpha-Pinen	0.094	0.089	0.634	0.008	0.039	0.111	3.0
eta-Pinen	0.048	0.042	0.355	0.007	0.020	0.062	1.5
Camphen	0.121	0.086	0.546	0.014	0.066	0.145	3.9
Myrcen	0.024	0.013	0.079	0.003	0.016	0.029	0.8
Limonen	0.037	0.018	0.109	0.006	0.025	0.043	1.3
Borneol	0.039	0.034	0.185	0.000	0.015	0.051	1.3
lpha-Caryophyllen	0.251	0.169	0.943	0.025	0.123	0.338	8.1
eta-Caryophyllen	0.129	0.120	0.911	0.008	0.051	0.161	4.2
Manool	0.283	0.166	1.037	0.041	0.162	0.372	9.1
Viridiflorol	0.156	0.106	0.633	0.000	0.078	0.213	5.2

* mL 100 g⁻¹ TG; ** SD – Standardabweichung; Q1, Q3 – Quantile 1 und 3 entsprechend; *** %;

Die in Abbildung 15 farbig hinterlegten Spektralbereiche zeigen charakteristische Signale der Hauptkomponenten Campher und Thujon, die auch in den Blattspektren des Salbeis neben den Signalen der Blattmatrix zu beobachten sind. Sowohl Campher als auch α -/ β -Thujon besitzen jeweils eine an einen Cyclopentanring gebundene Ketogruppe, die eine charakteristische Valenzschwingung $v_{C=0}$ bei 1740 cm⁻¹ zeigt. Beide Terpenoide beinhalten ebenso dimethylsubstituierte Methylengruppen mit dem charakteristischen Doppelbandenmuster für die entsprechenden Deformationsschwingungen bei 1390 und

1370 cm⁻¹. Neben den dominierenden Signalen von Cellulose als Blattmatrix um 1100 cm⁻¹ sind auch die charakteristischen Banden von Campher und Thujon in den Spektren aller Salbeiblätter zu finden. Weitere Salbei-Inhaltstoffe Flavonoide wie z.B. und Phenolcarbonsäuren liefern im cm⁻¹ Wellenzahlenbereich 1800-800 auch charakteristische IR-Banden, die allerdings von Signalen der anderen Drogenbestandteile nur chemometrisch abgegrenzt werden können.

Wie in Abbildung 16A gezeigt, lassen sich mit Hilfe einer PCA die ATR-FTIR-Spektren der adaxialen Blattseiten von Salbei entlang der 1.



3600 3200 2800 2400 2000 1800 1600 1400 1200 1000 800 600 Wavenumber, cm⁻¹

Abbildung 15. ATR-FTIR-Spektren von alten und jungen Salbeiblättern zu beiden Erntezeitpunkten (H1 = 25.07.2013 und H2 = 25.09.2013) als Mittelwertspektren über alle Akzessionen sowie die entsprechenden ATR-FTIR-Spektren von Campher und α -/ β -Thujon. Die farbig hinterlegten Spektralbereiche zeigen charakteristische Signale der Standards, die in den Spektren der Salbeiblätter wiederzufinden sind. Reprinted with permission from [1]. Copyright © 2015 American Chemical Society.

Hauptkomponente in zwei Cluster teilen, die jeweils alle jungen und alle alten Blätter zusammenfassen.



Abbildung 16. PCA-Score-Diagramm der ATR-FTIR-Spektren von adaxialen Blattseiten alter (blau) und junger (rot) Salbeiblätter aller 12 Akzessionen zu den Erntezeitpunkten H1 (25.07.2013, Kreis) und H2 (25.09.2013, Dreieck) (A) und die entsprechenden Loading-Spektren für PC1 und PC2 (B). Adapted with permission from [1]. Copyright © 2015 American Chemical Society. Das erste Loading (PC1) spiegelt den Gesamtgehalt an EOCs in jungen und alten Blättern wieder; das zweite Loading (PC2) repräsentiert die Unterschiede der pflanzlichen Matrix in zwei Ernten.

Wie die charakteristischen Signale um 1740 und 1390 cm⁻¹ in PC1 des Loading-Plots in Abbildung 16B zeigen, erfolgt die Trennung in alte und junge Blätter vorwiegend auf Basis der Gesamtgehalte an EOCs mit verschiedenen Anteilen an Campher und Thujon. Wie Abbildung 14 zeigt, beinhalten die jungen Blätter aller Akzessionen fast doppelt so viele EOCs wie die alten Blätter. Die zweite Hauptkomponente PC2 hingegen trennt die Spektren auf Basis von Signalen der pflanzlichen Matrix (1000 cm⁻¹) in die zwei Erntezeitpunkte H1 und H2 (Abbildung 16B).

Eine Abtrennung einzelner Akzessionen auf Basis der spektralen Eigenschaften ihrer Blätter war trotz relativ großer Variabilität des EOC-Gesamtgehaltes und des Gehaltes einzelner Komponenten wie α - und β -Thujon allerdings nicht möglich (Abbildung 17A). Abbildung 17B stellt noch einmal zusammenfassend den Gesamtgehalt an EOCs sowie an α - und β -Thujon laut GC-FID dar.



Abbildung 17. PCA-Score-Diagramm der ATR-FTIR-Spektren der adaxialen Blattseiten junger Salbeiblätter aller Akzessionen zum Erntezeitpunkt H1. Jeder Akzession ist eine individuelle Farbe zugeordnet (A). GC-Referenzwerte für den Gesamtgehalt der EOCs sowie α - und β -Thujon für den Erntezeitpunkt H1 aller Akzessionen (B). Adapted with permission from [1]. Copyright © 2015 American Chemical Society.

Eine ähnlich ungenügende Trennung der Akzessionen auf Basis der entsprechenden GC-FID-Profile zeigt Abbildung 18A (Score-Diagramm) mit dem entsprechenden Loading-Diagramm für die einzelnen EOCs (Abbildung 18B). Nur einzelne Akzessionen mit extremen Gehalten an β -Thujon (SALV13, SALV36) oder Campher (SALV 29, SALV 30) trennen sich vom Rest aller Akzessionen. Dieser Unterschied zur ATR-FTIR ist in der chemischen Differenzierung von α - und β -Thujon mittels GC-FID begründet, die sich aufgrund der ähnlichen IR-Aktivität im ATR-FTIR nicht erhalten lässt.



Abbildung 18. PCA-Score-Diagramm basierend auf den GC-FID-Profilen der Extrakte aus jungen Salbeiblättern aller 12 Akzessionen zum Erntezeitpunkt H1 (A) sowie das dazugehörige Loading-Diagramm für die individuellen EOC-Komponenten (B). Zahlen der Datenbeschriftungen sind eine Abkürzungsform der Akzessionsbezeichnungen (ohne Vorsilber SALV). Hier können die Akzessionen SALV 13 und SALV 36 mit hohem β -Thujon- und niedrigen Campher-Gehalten sowie die Akzessionen SALV 29 und SALV 30 mit umgekehrten Mengenverhältnissen dieser beiden Komponenten anhand der zweiten und dritten Hauptkomponente (PC2, PC3) deutlich von den restlichen Akzessionen unterschieden werden.

Trotz der ungenügenden Unterscheidung einzelner Salbeiakzessionen mittels ATR-FTIR lassen sich für die Mehrzahl der EOC sowie den gesamten EOC-Gehalt gute bis sehr gute Vorhersagemodelle erzeugen. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse von Kreuz-Validierung der über alle Akzessionen für Pflanzen gleichen



Abbildung 19. ATR-FTIR-basierte PLS-Kalibrationsmodelle für die Vorhersage des Gesamt-EOC-Gehaltes sowie der einzelnen Komponenten. Adapted with permission from [1]. Copyright © 2015 American Chemical Society. Ergebnisse der 10-fachen Kreuzvalidierung von Spektren gemittelt für jede Akzession über Erntezeitpunkt oder Alter der Blätter.

Blattalters und gleicher Erntezeit gemittelten ATR-FTIR-Spektren dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Modelle hinsichtlich verwendeter Spektrenvorbehandlung und genutzter Spektralbereiche finden sich in Tabelle 3 der entsprechenden Publikation [1]. Im Ergebnis der Modellerstellung bleibt zu bemerken, dass aufgrund der oben dargestellten hohen Variabilität innerhalb der natürlichen Populationen (Akzessionen) eine entsprechend umfangreiche Stichprobenanzahl erforderlich ist, um aussagefähige Kalibrationsmodelle zu bekommen. In dem gezeigten Fall bedeutet dies, dass je Parzelle (Akzession) 10 Pflanzen mit je 5 Blättern beprobt wurden (12 x 10 = 120 für Ernte H1, witterungsbedingt nur 104 für Ernte H2). Da sowohl junge als auf alte Blätter in das Modell eingeflossen sind, ergab sich damit eine Probenanzahl von insgesamt 448 Pflanzen (224 [H1+H2] x 2 [jung+alt] = 448). Um die Variabilität innerhalb der Akzessionen zu reduzieren, wurden die Spektren aller Pflanzen einer Akzession für H1, H2, junge und alte Blätter gemittelt, was zu einer finalen Probenanzahl von n=48 in den Modellen führt. Insgesamt wurden also über 2200 Blätter (448 x 5 Blätter je Pflanze = 2240) für die Modellerstellung verwendet.

In diesem Arbeitspaket wurden Kalibrationsmodelle für direkte qualitative und quantitative Analysen des ätherischen Öls in getrockneten, intakten Blättern von Salbei mit Hilfe von PLS Verfahren erfolgreich erstellt.

Anwendungsgebiete entsprechend Seite 9:

<u>Pflanzenzüchtung/-anbau</u> - Selektion; Anbau- und Ernteoptimierung durch Wachstums- und Qualitätskontrolle bereits auf dem Feld (wird weiter bearbeitet, s. Anlage 3); Screening großer Einzelpflanzensets zur Auswahl neuer Zuchtkandidaten; Chemotypisierung von Akzessionen gleicher Arten aber unterschiedlicher Inhaltstoffzusammensetzung.

<u>Rohstoffqualität</u> - Diskriminierung der unterschiedlichen Genotypen (Arten, Sorten) und Wachstumsbedingungen (Anbauorte, -jahre, Ontogenese) hinsichtlich der Produktqualität; Quantifizierung von Wasser- und Wirkstoffgehalten bei Arznei- und Gewürzpflanzen mit leichtflüchtigen Substanzen.

Arbeitspaket 3 – Eibe

Eiben (*Taxus*) bilden eine Pflanzengattung in der Familie der Eibengewächse (Taxaceae) von denen in Europa nur die Europäische Eibe (*Taxus baccata* L.) heimisch ist. Die meisten Eibenarten enthalten toxische Diterpene wie Paclitaxel oder 10-Deacetylbaccatin III (10-DAB) deren Struktur in Abbildung 20 dargestellt ist.

Paclitaxel als Inhaltstoff der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia* Nutt.) wurde 1971 erstmalig aus der Rinde isoliert und wird unter der geschützten Handelsbezeichnung Taxol[®] in der Tumortherapie als

Antikrebsmittel eingesetzt. Aufgrund der geringen Gehalte an Paclitaxel in der Eibenrinde und dem mit der Rohstoffgewinnung einhergehenden Totalverlust der Eibenbäume wurde Taxol[®] bis vor kurzem vor allem semisynthetisch aus 10-Deacetylbaccatin III (10-DAB) als pflanzliche Vorstufe hergestellt. 10-DAB ist Inhaltstoff in den Nadeln verschiedener Eibenarten und besonders die Europäische Eibe wird heutzutage als "nachwachsende" Rohstoffquelle für das bedeutsame Krebstherapethikum genutzt. Zurzeit ist Eibe trotz der großen Bedeutung für die Pharmaindustrie noch nicht in der Ph. Eur. erfasst worden. Daher werden zur Qualitätsbewertung in der verarbeitenden Industrie vorwiegend die Restfeuchte der Droge sowie die botanische Artdefinition herangezogen. Eine exakte botanische Klassifizierung ist aber auch bei den Eiben aufgrund der Variabilität der morphologischen Erscheinungsformen der Nadeln, die als Rohprodukt im Wareneingang eintreffen, schwierig. Daher war ein Ziel der analytischen Arbeiten, Einsatzmöglichkeiten der schwingungsspektroskopischen Methoden für die botanische Klassifizierung von Eibenarten näher zu untersuchen.



paclitaxel

10-deacetylbaccatin III

Abbildung 20 Strukturformeln von Paclitaxel und 10-Deacetylbaccatin III. Reprinted with permission from [14]. Copyright © 2015 Elsevier.

Dazu wurden die Nadeln von sechs Eibenarten aus dem Botanischen Garten Berlin-Dahlem mit 11 Varietäten und einer Kopfeibenart (*Cephalotaxus harringtonia*), wenn möglich mit Wiederholungsmessungen an mehreren Pflanzenproben derselben Art/Varietät, mittels ATR-FTIR untersucht.

Eine sichere Diskriminierung der Eibenarten anhand frischer wie auch getrockneter Proben (Nadeln) konnte mittels ATR-FTIR-Spektren nicht erhalten werden. Die Spektren der Nadeln zeigten eine sehr große Variabilität abhängig vom Alter und von Umweltbedingungen, hier vor allem beeinflusst durch die Beleuchtung. Problemlos aber konnten Koniferen anderer Gattungen wie *C. harringtonia* von den Taxaceaen unterschieden werden (Abbildung 21A). Das gleiche Ergebnis konnte mittels NIRS an den Nadeln der Eiben erhalten werden (Abbildung 21B).



Abbildung 21. (A) - PCA der ATR-FTIR-Spektren von luftgetrockneten und vermahlenen Nadeln der sechs verschiedenen Eibenarten mit 11 Varietäten (Rauten) mit separater Markierung für *T. baccata* "Pendula" (Quadrat) und der Kopfeibe *C. harringtonia* (Dreieck). Adapted with permission from [14]. Copyright © 2015 Elsevier. (B) - NIRS-basierte Diskriminierung der Taxaceaen und *C. harringtonia* anhand der Spektren von getrockneten, intakten Nadeln.

Neben der botanischen einwandfreien Zuordnung, die auch die Gehalte an relevanten Taxanen bestimmt, sind weitere Qualitätsmerkmale des Rohmaterials wie der Grad der botanischen Verunreinigung mit anderen Arten, der Materialverunreinigung durch z.B. Astteile oder die Produktfeuchte bedeutsam. Daher wurden verschiedene schwingungsspektroskopische Methoden auf ihre Eignung zur Bestimmung von botanischen und Material-Verunreinigungen wie auch der Restproduktfeuchte im pflanzlichen Material untersucht.

So konnte in einem Versuchsaufbau der Grad der Verunreinigung des gewünschten Rohmaterials von *T. baccata* mit steigendem Anteil an *C. harringtonia* erfolgreich mittels NIRS vorhergesagt werden. Abbildung 22A zeigt das Kalibrationsmodell mit den entsprechenden statistischen Parametern der Kreuzvalidierung. In einem ähnlichen Setup wurden Nadelproben von *T. baccata* mit steigendem Anteil an Ästen/Holz verunreinigt und der prozentuale Massenanteil mittels NIRS vorhergesagt (Abbildung 22B). In beiden Fällen konnte der jeweilige Grad der Verunreinigung mit einem hohem Bestimmheitsmaß R² (0,99 bzw. 0,94) kalibriert und damit ein gutes Vorhersagemodell auf Basis schneller und zerstörungsfreier NIRS erstellt werden.



Abbildung 22. NIRS-basierte Kalibrationsmodelle und statistische Parameter der Kreuzvalidierungen für die Bestimmung der botanischen Verunreinigung von *T. baccata* mit *C. harringtonia* (A) sowie für die Materialverunreinigung von *T. baccata* Nadeln mit Ästen/Holz (B). Reprinted with permission from [14]. Copyright © 2015 Elsevier. Zur Herstellung der simulierten botanischen Verunreinigung (A) wurden 21 Proben bestehend aus den Nadeln von *T. baccata* mit steigenden Anteilen der Nadeln von *C. harringtonia* (Trockengewicht) homogen vermischt. Für die Materialverunreinigung (B) wurden in ähnlicher Weise die Proben aus den Nadeln von *T. baccata* und zerkleinertem Astholz erstellt.

Ebenso führte die Analyse der Eibennadeln mittels NIRS zur Erstellung eines sehr guten Vorhersagemodelles für die Restfeuchte des Pflanzenmaterials, welche über Trockenwaage als Referenzmethode bestimmt wurde. Abbildung 23 zeigt das PLS-Modell für die Kreuzvalidierung sowie die entsprechenden statistischen Parameter.

Für das weitere und mit Abstand wichtigste Qualitätskriterium, der Konzentration der eigentlichen Zielkomponenten 10-DAB, sollte eine Bestimmungsmethode zur direkten Vorhersage in den Eibennadeln entwickelt werden.

Eine direkte Kalibration der Spektren von Rohmaterial (frische oder getrocknete Nadeln) mit der

Konzentration des Zielstoffes 10-DAB konnte in zufriedenstellender Güte mit keiner der untersuchten spektroskopischen Methoden (NIRS, ATR-FTIR, RS) erhalten werden. Das liegt an der relativ hohen Nachweisgrenze von 10-DAB, die selbst in methanolischen Extrakten, also nach Entfernen der pflanzlichen Matrix noch bei über 1 % bezogen auf das Trockengewicht der Nadeln liegt (Abbildung 25 B). Des Weiteren weisen die Eibennadeln generell einen sehr niedrigen Gehalt an 10-DAB in der Droge auf, die mit wenigen Zehntelprozent deutlich unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Ebenso konnte keine indirekte Kalibration auf Basis spektroskopischer Signale von anderen Inhaltstoffen mit hoher IR- oder Raman-Aktivität, deren Gehalt mit dem von 10-DAB korreliert, gefunden werden (indirekte Korrelation).



Abbildung 23. NIRS-basiertes Kalibrationsmodell und statistische Parameter der Kreuzvalidierungen die Bestimmung der Restfeuchte für in luftgetrockneten Nadeln von T. baccata L. Reprinted with permission from [14] (supplementary material). Copyright © 2015 Elsevier. Referenzwerte wurden über Wägung mit einer Trockenwaage Sartorius-35M bestimmt.

Neben der Charakterisierung des Rohmaterials für die Extraktion besteht auch ein zunehmender Bedarf an schnellen Analysemethoden direkt im Prozess zur Steuerung und Optimierung der Wirkstoffisolation.

Im Falle der Taxane wird dazu das pflanzliche Material mit Methanol extrahiert und die Taxane über verschiedene Prozessstufen gereinigt und aufkonzentriert. Die jeweiligen Prozessstufen der Isolation wurden mittels ATR-FTIR- und Raman-Spektroskopie untersucht. Abbildung 24 zeigt die Spektren der entsprechenden Prozessstufen im Vergleich zu ATR-FTIR und RS.



Abbildung 24 ATR-FTIR-Spektren (A) und Raman-Spektren (B) für die Prozessstufen der Extraktion von 10-DAB aus Eibennadeln beginnend mit dem pflanzlichen Rohmaterial (a), dem reinen Lösungsmittel Methanol (b), gefolgt von schrittweiser Reduktion des Lösungsmittels im Rohextrakt auf ein Volumen von 1:2 (c) zu 1:10 (d) - Nachfolgende Fällung des 10-DAB mit Wasser (e) und Extraktion der wässrigen Phase mit Ethylacetat (f) im Vergleich zu einer methanolischen Lösung des Standards 10-DAB (g). Reprinted with permission from [14]. Copyright © 2015 Elsevier.

Abbildung 25A zeigt noch einmal den Fingerprintbereich der Raman-Spektren des methanolischen Eibenextraktes gegenüber den Spektren von reinem Methanol und dem 10-DAB Standard. So ist das Spektrum des Eibenextraktes stark von den Lösungsmittelbanden des Methanols definiert, mit der antisymmetrischen Deformationsschwingung δ_{CH3} bei 1453 cm⁻¹ und der Valenzschwingung v_{c-0} bei 1036 cm⁻¹. Deutlich ist aber auch die zum 10-DAB gehörende Schwingungen des aromatischen Systems $v_{c=c}$ bei 1604 cm⁻¹ und der isolierten Doppelbindung $v_{c=c}$ bei 1623 cm⁻¹ zu erkennen. Letztere ist im Extrakt um 14 cm⁻¹ gegenüber dem Spektrum des festen Standards verschoben (1623 -> 1637 cm⁻¹) wobei die

Verschiebung für den 10-DAB-Standard in reinem Methanol nur noch 3 cm⁻¹ beträgt. Die Verschiebung der aromatischen Streckschwingung $v_{c=c}$ beträgt sowohl in reinem Methanol als auch im Extrakt jeweils 3 cm⁻¹ (vergl. Abbildung 25, Abbildung 26A).



Weitere charakteristische Signale im Extraktspektrum bei 1530 und 1157 cm⁻¹ stammen von Carotinoiden,

die aus Nadeln mit extrahiert werden. Auf Basis der Streckschwingungen das aromatischen Ringsystems im 10-DAB und der isolierten Doppelbindungen konnte ein Vorhersagemodell für die 10-DAB-Konzentration im Perkolationsprozess mittels Raman-Spektroskopie erstellt werden.

Abbildung 26B zeigt das entsprechende Kalibrationsmodell mit den zugehörigen statistischen Parametern der Kreuzvalidierung.



Abbildung 26. Nachweis von 10-DAB gelöst in Methanol und im Methanolextrakt aus Eibennadeln – A und PLS-Kalibrationsmodell der Konzentration von 10-DAB im Methanol während Extraktion mittels Perkolation-Verfahren. Reprinted with permission from [14]. Copyright © 2015 Elsevier.

Neben der Überwachung der Konzentration des Zielstoffes ist auch eine Inprozess-Bestimmung der Menge an mit extrahiertem Wasser wichtig. Dafür eignet sich am besten die ATR-FTIR aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Selektivität für wässrige OH-Gruppen (Abbildung 27).



Abbildung 27. Bestimmung des Restwassergehaltes in methanolischenen Extrakten von 10-DAB mittels FTIR-ATR. ATR-FTIR-Spektren von Methanol. Wasser und Eibenrohextrakt im für die Kalibration relevanten Spektralbereich (A) sowie das dazugehörige PLS-Kalibrationsmodell mit den entsprechenden statistischen Parametern (B).

Im dritten Arbeitspaket wurden PLS-Kalibrationsmodelle zur Feuchtigkeitsbestimmung sowie zur Analyse von Verunreinigungen im Rohmaterial (z.B. im Rahmen einer Eingangskontrolle) erfolgreich entwickelt. Darüber hinaus wurden Kalibrationsmodelle für DAB III- und Wassergehaltsbestimmung in Eibenextrakten zum Einsatz im Extraktionsprozess erstellt. Wie umfangreich am Beispiel der Eibe gezeigt werden konnte, sind schwingungsspektroskopische Methoden in vielen Bereichen der Rohstoffcharakterisierung wie auch der Prozesskontrolle erfolgreich einsetzbar und ermöglichen so eine schnelle Bewertung und Steuerung von Extraktionsprozessen. Weiterführende Untersuchungen sollen zukünftig eine *inline*-Implementierung in den Extraktionsprozess wie auch eine Verbesserung der Vorhersagemodelle der Zielkomponenten im pflanzlichen Rohmaterial ermöglichen. In diesem Zusammenhang wird insbesondere nach Korrelationen gesucht, die eine Kalibration zur Bestimmung schlüssiger prozesstechnischer Parameter wie z.B.

Diffusionskoeffizienten oder der Gleichgewichtskonstante ermöglichen und auf deren Basis Messeinrichtungen direkt an eine Extraktionslinie gekoppelt werden können.

Es wurde festgestellt, dass die Empfindlichkeit der verwendeten schwingungsspektroskopischen Methode nicht ausreicht, um stabile Kalibrationsmodelle für die Analyse im Konzentrationsbereich deutlich unter 1 % (DAB III-Gehalt in der Droge) zu erstellen.

Anwendungsgebiete (entsprechend Seite 9):

Rohstoffqualität - Quantifizierung von Wasser- und Wirkstoffgehalten.

<u>Einsatz in der Prozesssteuerung/Verarbeitung pflanzlicher Rohstoffe</u> - spektroskopische Begleitung von Prozessen zur kontinuierlichen Überwachung der Extraktionsqualität und inhaltstofflichen Zusammensetzung (Erkennung von Vorlauf- und Nachlauf-Fraktionen minderer Qualität); - Entwicklung optimaler Extraktionsprozesse über simultane Analytik bei Variation der Prozessparameter (wird weiter entwickelt im DFG-Nachfolgeprojekt); Einsatz von spektroskopischen Mapping-/Imaging-Techniken an pflanzlichem Material zur Darstellung der Inhaltsstoffverteilung und optimaler Probenvorbereitung für Extraktionsprozesse (s. in [14]); Verfahrensoptimierung und Reduktion von prozessbedingten Verlusten (wird weiter entwickelt im DFG-Nachfolgeprojekt).

Zusammenfassung

Als Hauptziele der vorliegenden Arbeit wurden die Entwicklung und praktische Anwendung schwingungsspektroskopischer Methoden (IRS, NIRS und Raman-S) für die Qualitätsbewertung ausgewählter pflanzlicher Rohmaterialien und in der Prozesskontrolle begleitend zur technologischen Gewinnung und Verarbeitung dieser Rohstoffe benannt. Dazu wurden drei taxonomisch sehr verschiedene Modellorganismen - Fenchel, Salbei und Eibe untersucht.

Am Beispiel von Fenchel wurde gezeigt, dass mittels FTIR-spektroskopischer Techniken die unterschiedlichen Chemotypen des Fenchels auch nach Arzneibuchvorgaben hinsichtlich Süß- und Bitterfenchel erfolgreich diskriminiert werden können. Diese Diskriminierung gelang erstmalig sowohl an einzelnen Früchten mittels ATR-FTIR, als auch bei größeren Probeneinwaagen im Makrosampling mittels NIRS. Für eine Diskriminierung der Extrakte (CCl₄) wurde die Raman-Spektroskopie erfolgreich eingesetzt. Neben der chemotypischen Charakterisierung wurde auch ein neuer, bislang nicht beschriebener Fenchel-Chemotyp gefunden. Dieser enthält hohe Mengen an γ -Asaron und ist aufgrund der Toxizität dieser Verbindung nicht als Medizinaldroge zugelassen. Jedoch werden γ -Asaron in der Literatur fungizide und allelopathische Eigenschaften zugeschrieben, weshalb Extrakte dieser Chemotyps als biobasierte Pflanzenschutzmittel Verwendung finden könnten.

Aufgrund des relativ hohen Gehaltes an EOCs in den Drogen konnte mithilfe der ATR-FTIR eine Expressbestimmung von EOC-Gehalt und -Zusammensetzung direkt am getrockneten Rohmaterial entwickelt werden. Neben dem Gesamtgehalt an EOCs konnten somit auch Vorhersagemodelle für die hauptsächlichen Einzelkomponenten in guter bis sehr guter Qualität erstellt werden. Ebenso konnte mittels Hauptkomponentenanalyse eine schnelle Identifizierung von Salbeiblättern in unterschiedlichen Wachstumsstadien (junge Blätter in der Größe bis <10/30 mm Breite/Länge beinhalten fast die doppelte Menge an EOCs als altere Blätter - >15/30 mm) und zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten (Hauptunterschiede liegen in der Zusammensetzung der pflanzlichen Matrix) entwickelt werden. Diese zerstörungsfreien Bestimmungen nehmen laut dem entwickelten Protokoll nur wenige Minuten in Anspruch und benötigen keine aufwendige Probenpräparation. Es bestehen daher gute Voraussetzungen, diese Bestimmung auch an intakten frischen Blättern durchzuführen, was ein wesentlicher Bestandteil fortführender Untersuchungen sein wird.

Anhand von Eibennadeln wurden im dritten Arbeitspaket die Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes von IR- und Raman-Spektroskopie für die routinemäßige Qualitätskontrolle auch in der prozessbegleitenden Analytik in der technologischen Verarbeitung der Pflanzenrohstoffe und Extrakte umfassend untersucht.

Die sehr geringe Konzentration des wertgebenden Zielstoffes 10-Deacetylbakkatin III im pflanzlichen Rohmaterial, den Eibennadeln, liegt unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten spektroskopischen Techniken und ermöglichte daher keine direkte Quantifizierung von 10-DAB. Mit Hilfe der NIRS konnten aber vielfältige, für den Phytoextraktionsprozess relevante technologische Parameter, die zur Vorbereitung der Droge für die Extraktion sowie zur Berechnung von z.B. benötigen Lösungsmittelmengen, Extraktionszeiten in verschiedenen Stufen etc. wesentlich beitragen, wie Restfeuchte und Reinheit des Materials botanische Kontamination erfolgreich sowie ggf. bestimmt und entsprechende Vorhersagemodelle entwickelt werden. Damit bietet besonders die NIRS ein umfangreich einsetzbares Werkzeug in der Wareneingangskontrolle bei der Qualitätsbewertung des pflanzlichen Rohmaterials und eine ideale Ergänzung zu der aktuell nur visuell erfolgenden Begutachtung.

In den nächsten Prozessstufen, z.B. während unterschiedlicher Extraktionsstadien (Perkolation, Mazeration), mittels ATR-FTIR-Spektroskopie und Raman-Spektroskopie konnten im Anschluss valide Vorhersagemodelle für die Bestimmung des Wassergehaltes (ATR-FTIR) und der 10-DAB-Konzentration (RS) im Extrakt entwickelt werden, sowie die Anreicherung der Zielkomponente über den Prozess verfolgt werden.

Summary

The main objectives of the present work were focused on method development and application of vibrational spectroscopy (IRS, NIRS and Raman-S) for the quality evaluation of selected plant raw materials, in process control of the technological extraction and in processing of these raw materials. In this context, three taxonomically very different model organisms, fennel, sage and yew were investigated.

Using the example of fennel showed that FTIR spectroscopic techniques discriminated the different chemotypes of fennel as well as sweet and bitter fennel according to Pharmacopoeia specifications. This discrimination succeeded for the first time, both on individual fruits using ATR-FTIR, as well as with larger sample weights by NIRS. Raman spectroscopy was successful for discrimination of extracts (CCl₄) of fennel fruits. Besides, a new, not previously described fennel chemotype was found. This contains a high level of γ -asarone and because of its toxicity this chemotype is not in use as a drug. Nevertheless, in literature γ -asarone is described to possess antifungal and allelopathic properties and extracts of this chemotype could therefore be applied as bio-pesticides, which however should be evaluated in further studies.

Because of the relatively high content of essential oil components (EOCs) in drugs a rapid analysis of EOCs content and composition directly on the dried raw material using ATR-FTIR could be developed. In addition to the total content of EOCs, also predictive models for the major EOCs of good to very good quality could be established. Also, a rapid identification of dried sage leaves at different growth stages (young leaves of

the sizes up to <10/30 mm width / length include almost double of the amount of EOCs of old ones - >15/30 mm calculated on dry weight) and harvest time (main differences are in the composition of vegetable matrix) could be done by principal component analysis. These non-destructive procedures take, according to the developed protocol, only a few minutes and do not require laborious sample preparation. These are good prerequisites to carry out this method also on intact fresh leaves, which will be an essential part of further investigations.

In the third work package the possibilities and limitations of the use of IR and Raman spectroscopy for routine quality control in process-related analytics in the technological processing of plant raw materials and extracts have been extensively studied on the basis of yew needles.

The very low concentration of the valuable target substance 10-deacetylbaccatin III (DAB) in the plant raw material, the yew needles, is below the detection limit of the spectroscopic techniques used here and therefore did not allow a direct quantification of DAB. Using NIRS, diverse technological parameters with relevance for the extraction process, such as residual moisture and purity of the material and botanical contamination, were successfully determined and corresponding prediction models were developed. These are significant for preparing the drug for extraction and calculating of required amount of solvents, extraction time at various stages etc. Thus especially NIRS was found to be a powerful tool in the incoming goods inspection in the quality control of herbal raw material and an improvement the procedure, which is very often based only on visual inspections.

In the next stages of the process, e.g., during different extraction stages (percolation, maceration), valid predictive models for the determination of water content (ATR-FTIR) and 10-DAB concentration (RS) in extracts have been developed by means of ATR-FTIR spectroscopy and Raman spectroscopy and finally the enrichment of the target component tracked through the process.

Ausblick

Die hier gezeigten und im Rahmen der Arbeit entwickelten Methoden zur qualitativen und quantitativen Bewertung verschiedener pflanzlicher Materialien besitzen zum jetzigen Zeitpunkt vorwiegend Modellcharakter, zeigen aber generell die Möglichkeit für einen erfolgreichen Einsatz des Einsatzes schwingungsspektroskopischer Methoden in der Qualitäts- und Prozesskontrolle auf.

Für weiterführende Arbeiten ergeben sich daher unter anderen die folgenden Themen:

Um eine für den Fenchel nutzbare Qualitätskontrolle nach Vorgaben des Ph. Eur. zu entwickeln, bedarf es der Verwendung von Wasserdampfdestillation als Referenzmethode oder der Ermittlung und Implementierung von entsprechenden Korrekturfaktoren, wie sie am Beispiel des Salbeis beschrieben wurden.

Im Falle des Salbeis stellen die anhand der Droge umfangreich untersuchte Probenvariabilität und das damit erzeugte Probenahmeprotokoll eine ideale Voraussetzung für die Übertragung der Modelle auf das Frischmaterial dar. Unter Verwendung frischer Blätter wäre eine Qualitätskontrolle bereits direkt auf dem Feld und damit anbau- und erntebegleitend denkbar. Somit ließen sich perspektivisch auch arbeits- und kostenintensive Maßnahmen des Pflanzenschutzes optimieren. Arbeiten zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf frische Salbeiblätter sind aktuell im Rahmen eines DFG-Nachfolgeprojektes in Bearbeitung.

Für den Themenkomplex der prozessbegleitenden Analytik am Beispiel der Eibe sollte als zukünftiges Thema die Implementierung der entwickelten Methoden von der at-line hin zur in-line-Prozesskontrolle angestrebt werden. Des Weiteren besteht in jedem Fall Potenzial, über Verwendung empfindlicherer Analysemethoden besonders im Bereich der Raman-Spektroskopie (z.B. SERS oder CARS) die Quantifizierung von 10-DAB direkt im pflanzlichen Material weiter zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

- 1. Gudi, G., et al., Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared Spectroscopy on Intact Dried Leaves of Sage (Salvia officinalis L.): Accelerated Chemotaxonomic Discrimination and Analysis of Essential Oil Composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(39): p. 8743-8750.
- 2. Arzneibuch-Kommission, E., *Europäisches Arzneibuch 8. Ausgabe, Grundwerk 2014 einschließlich 1. Nachtrag.* Amtliche deutsche Ausgabe ed. 2016, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- 3. Boehme, R., et al., *Biochemical imaging below the diffraction limit probing cellular membrane related structures by tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS).* Journal of Biophotonics, 2010. **3**(7): p. 455-461.
- 4. Cialla, D., et al., *Raman to the limit: tip-enhanced Raman spectroscopic investigations of a single tobacco mosaic virus.* Journal of Raman Spectroscopy, 2009. **40**(3): p. 240-243.
- 5. Whiteman, D.N., *LIDAR | Raman A2 Holton, James R*, in *Encyclopedia of Atmospheric Sciences*. 2003, Academic Press: Oxford, p. 1202-1212.
- 6. Rodionova, O.Y. and A.L. Pomerantsev, *NIR-based approach to counterfeit-drug detection*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2010. **29**(8): p. 795-803.
- 7. Roggo, Y., et al., *A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **44**(3): p. 683-700.
- 8. Jamrogiewicz, M., *Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **66**: p. 1-10.
- 9. Arzneibuch-Kommission, E., *D-Camphora /D-Camphora*, in *Europäisches Arzneibuch 8. Ausgabe*, *Grundwerk 2014 einschließlich 1. Nachtrag.* 2014, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart. chapter: 8.0/1400, p. 2640.
- 10. Badoc, A., et al., *Essential oil of Foeniculum vulgare Mill. (fennel) subsp. piperitum (Ucria) Cout. fruit.* Journal of Essential Oil Research, 1994. **6**(4): p. 333-336.
- 11. Arzneibuch-Kommission, E., Süßer Fenchel Foeniculi dulcis fructus, in Europäisches Arzneibuch 8. Ausgabe, Grundwerk 2014 einschließlich 1. Nachtrag. 2014, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart. chapter: 8.0/0825, p. 1875.
- 12. Arzneibuch-Kommission, E., *Bitterer Fenchel Foeniculi amari fructus*, in *Europäisches Arzneibuch 8. Ausgabe, Grundwerk 2014 einschließlich 1. Nachtrag.* 2014, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart. chapter: 8.0/0824, p. 1874.
- Gudi, G., et al., Discrimination of fennel chemotypes applying IR and Raman spectroscopy discovery of a new g-asarone chemotype. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. 62(16): p. 3537-3547.
- Gudi, G., et al., Infrared and Raman spectroscopic methods for characterization of Taxus baccata L.
 Improved taxane isolation by accelerated quality control and process surveillance. Talanta, 2015.
 143: p. 42-49.

Anhang 1 – Originalveröffentlichungen (Volltext)

(Seiten 45-56)

http://dx.doi.org/10.1021/jf405752x

Gennadi Gudi, Andrea Krähmer, Hans Krüger, Lothar Hennig and Hartwig Schulz, *Discrimination of fennel chemotypes applying IR and Raman spectroscopy - discovery of a new γ-asarone chemotype*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(16): p. 3537-3547.



(Seiten 57-64)

http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03852

Gennadi Gudi, Andrea Krähmer, Hans Krüger and Hartwig Schulz, Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared Spectroscopy on Intact Dried Leaves of Sage (Salvia officinalis L.): Accelerated Chemotaxonomic Discrimination and Analysis of Essential Oil Composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(39): p. 8743-8750.



(Seiten 65-72)

http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.090

Gennadi Gudi, Andrea Krähmer, Iraj Koudous, Jochen Strube and Hartwig Schulz, Infrared and Raman spectroscopic methods for characterization of Taxus baccata L. - Improved taxane isolation by accelerated quality control and process surveillance. Talanta, 2015. **143**: p. 42-49.



Anhang 2 - Zusatzmaterial aus den Publikationen

Zusatzmaterial zu:

Gennadi Gudi, Andrea Krähmer, Hans Krüger and Hartwig Schulz, Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared Spectroscopy on Intact Dried Leaves of Sage (Salvia officinalis L.): Accelerated Chemotaxonomic Discrimination and Analysis of Essential Oil Composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(39): p. 8743-8750.



Figure S1: Principle Component Analysis (PCA) of GC/FID data for the solvent extracts of leaf material from all 12 accessions of *S. officinalis* L.

PCA-Score-Diagramm für PC-1/PC-2 basierend auf den GC-FID-Profilen der Extrakte aus jungen Salbeiblättern aller 12 Akzessionen zum Erntezeitpunkt H1 (Datenset wie in Abbildung 18). Zahlen der Datenbeschriftungen entsprechen einer Abkürzungsform der Akzessionsbezeichnungen (ohne Vorsilber SALV). Die erste Hauptkomponente trennt die Proben nach α -Thujon-Gehalt. Eine Probe entspricht einer Salbeipflanze.



Figure S2: Results of tenfold cross-validation of ATR-FTIR and GC data for the (A) yield of essential oil, (B) α -thujone, (C) β -thujone, (D) camphor, (E) 1,8-cineole, (F) α -pinene and (G) β -pinene by correlation of averaged spectra for each plant (n=448)

ATR-FTIR-basierte PLS-Kalibrationsmodelle für die Vorhersage des Gesamt-EOC-Gehaltes sowie der einzelnen EOC-Komponenten. Adapted with permission from [1]. Copyright © 2015 American Chemical Society. Ergebnisse der 10-fachen Kreuzvalidierung von Einzelspektren.

Zusatzmaterial zu:

Gennadi Gudi, Andrea Krähmer, Iraj Koudous, Jochen Strube and Hartwig Schulz, Infrared and Raman spectroscopic methods for characterization of Taxus baccata L. - Improved taxane isolation by accelerated quality control and process surveillance. Talanta, 2015. **143**: p. 42-49.



Supplementary material Fig. S1: Principle components (PC) 2 and 3 used for PCA in Figure 2 (hier: Abbildung 21A).

Loading-Spektren für die Hauptkomponenten PC-2 und PC-3 aus der PCA der ATR-FTIR-Spektren von luftgetrockneten und vermahlenen Nadeln der sechs verschiedenen Eibenarten mit 11 Varietäten (die Scores sind in Abbildung 21A dargestellt). Adapted with permission from [14]. Copyright © 2015 Elsevier.



Supplementary material Fig. S3: Reference analytical determination of water and 10-DAB content.

Referenzwerte für die Kalibrationsmodelle zur Bestimmung in methanolischem Eibenextraxt: A –Wassergehalt (Kalibration in Abbildung 27) und B – 10-DAB-Konzentration (Kalibration in Abbildung 26).

Anhang 3 - Zusatzmaterial, nicht veröffentlicht

Destillation an Salbei zum Vergleich des Gesamtgehalts sowie der Zusammensetzung der EOC aus Extrakten und aus dem ätherischen Öl. In diesen Versuchen wurden Korrelationen zwischen verschiedenen Verfahren zur Gewinnung des ätherischen Öls mittels Destillation bzw. Extraktion näher untersucht und analysiert. Diese Untersuchung ist Bestandteil eines Kooperationsprojekts mit der Bombastus-Werke AG, Freital, Deutschland mit dem Ziel eine schnelle Methode zur Bestimmung des EOC-Gehaltes an frischem Salbei auf dem Feld zu entwickeln, um auf diese Weise optimalen Erntezeitpunkt vorherzusagen.

Material und Methoden

Saatgut von 12 verschiedenen Genbankakzessionen von Salbei (*Silvia officicnalis* L.) vom IPK Gatersleben (SALV 13, SALV 15, SALV 25, SALV 28, SALV 29, SALV 30, SALV 31, SALV 34, SALV 36, SALV 63, SALV 65, SALV 67) sowie eine kommerzielle Akzession von Bingenheimer Saatgut AG, Echzell, Deutschland (BgS) wurden erhalten. Insgesamt wurden 30 Einzelpflanzen je Akzession (BgS: 3 x 30 = 90) auf dem Versuchsfeld des JKI am Standort Berlin-Dahlem kultiviert. Zusätzliche 6 Stichproben wurden aus kommerziellen Chargen der Firma Bombastus-Werke AG (BW) erzeugt. Diese Proben stammen aus 6 Ernten desselben Anbaufeldes im Juli-August 2015: 14.07.; 20.07.; 29.07.; 03.08.; 11.08.; und 14.08. entsprechend.

Das BW-Material wird nach der Ernte luftgetrocknet und innerhalb von 1-2 Wochen gerebelt (Abbildung 30) und dann in diesem Zustand gelagert. Die Extraktion erfolgte im Oktober 2015 am JKI-Dahlem; die Destillation wurde anschließend in Freital bei der Firma Bombastus-Werke AG Ende Oktober bzw. Anfang November 2015 durchgeführt. Die Akzessionen im Versuchsfeld JKI wurden zweimal geerntet: 26.-29.05.2015 – alle Akzessionen + 1 x BgS und 27.-30.09.2015 Akzessionen SALV: 13, 15, 25, 29, 34, 63, 65 + 3 x BgS. Das Material wurde luftgetrocknet, zeitnah (innerhalb von 1 bis 2 Wochen) extrahiert und destilliert. Die Destillation von der Mai-Ernte wurde am JKI in Quedlinburg durchgeführt; die Destillation der September-Ernte wurde von Bombastus-Werke AG in Freital durchgeführt. Extraktion von allen Proben erfolgte im JKI-Dahlem.

Extraktion

200 mg getrocknete Blattdroge werden in 2 ml Eppendorf-Gefäß mit 2 Mahlkugeln und Zugabe von 1 ml ISTD-Lösung (Carvacrol 1:2000 in Isooctan) 10 min. lang in einer Schwingmühle extrahiert und anschließend 10 min. zentrifugiert. Die Extraktionen wurden in 10-fachen Wiederholungen durchgeführt.

Destillation

20 g getrocknete Blattdroge werden zusammen mit 300ml dest. Wasser in einem 500 ml Rundkolben 90 min. lang destilliert (bei Heizstufe 3 mit Zugabe von Entschäumer). Alle Destillationen wurden in 2- bis 3-

facher Wiederholungen durchgeführt (je nach Verfügbarkeit des Materials).

Erste Ergebnisse

In der Abbildung 28 sind die ernteabhängigen Werte des EOC-Gehalts innerhalb 6 Stichproben der Bombastus-Werke dargestellt.



Abbildung 28. Vergleich der Ätherisch-Öl-Gehalte (A) und einzelnen Ätherisch-Öl-Komponenten (B) einer kommerziellen Salbei-Anbau (Bombastus-Werke AG, Freital) nach GC-FID-Analyse von Destillaten und Lösungsmittelextrakten aus 6 nacheinander folgenden Ernten ()h1-h6). Erntezeitpunkten (1-6): 14.07.; 20.07.; 29.07.; 03.08.; 11.08.; und 14.08. im Jahr 2015.

Hier ist eine deutliche Korrelation zwischen Destillations- und Extraktionsergebnissen zu sehen.

In der Abbildung 29 ist diese Korrelation über alle Proben aus allen Ernten und Herkunft abgebildet.



Abbildung 29. Korrelation des Ölgehalts bei Destillation und Extraktion [ml/100g]: 13 Proben den Mai-Ernten 2015 und 10 Proben den September-Ernten 2015 (Versuchsfeld JKI-Dahlem) sowie 6 Proben aus den Juli-August-Ernten 2015 von Freital (BW).

Die Abbildung 30 illustriert die Problematik beim Erstellen eines auf IR-Spektroskopie der Drogen basierenden Kalibrationsmodells. Selbst bei der gaschromatographischen Analyse, aufgrund der Inhomogenität der Droge, ist die Probenmenge (200 mg) nicht ausreichend um die inhaltstoffliche Zusammensetzung repräsentativ abzubilden.

Um die Variabilität innerhalb einer Charge bestmöglich auszugleichen sind daher mehrere Einwaagen notwendig (oder eine sehr starke Homogenisierung/Vermahlung von großen Drogenmengen, was unpraktisch und nicht wirtschaftlich ist). Die Probenvolumina, die bei der ATR-FTIR-Messung erfasst werden (Abbildung 30, kleine Rechtecke im oberen Teil) sind sogar noch um eine Größenordnung kleiner als bei der GC-Untersuchung. Dadurch erlangt die richtige Auswahl der Beprobungsmethode (Anzahl der Messungen, genaue Messposition am Blatt etc.) für die Entwicklung einer robusten Kalibration höchste Bedeutung.



Abbildung 30. Aufnahme von zwei Zerkleinerungsgraden einer Salbeidroge. Links – kommerzielle Charge, Pflanzenmaterial getrocknet und gerebelt, recht – die gleiche Stichprobe nach zusätzlicher Zerkleinerung mithilfe eines Rollschneiders. Rot markierende Bereiche entsprechen der Mengen, die jeweils für einzelne Analyse durch entsprechend GC oder FTIR-ATR-Spektroskopie entnommen wird. Für eine Destillation wird eine Menge genommen, die dem Zehnfachen des gesamten Bildes entspricht.