

**HERSTELLUNG, IN-LINE-EINSCHLUSS
UND CHARAKTERISIERUNG
LIPOPHILER UND HYDROPHILER KAMILLENEXTRAKTE
UNTER EINSATZ VON VERDICHTETEM KOHLENDIOXID**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2003

vorgelegt von

CLAUDIA SUSANNE KAISER

Tag der mündlichen Prüfung:

18.07.2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. C. Schmidt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. S. Laufer

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Meinem verehrten Lehrer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt, danke ich für die Schaffung optimaler Arbeitsbedingungen und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Seine hervorragende Betreuung und Unterstützung waren mir stets eine große Hilfe. Er hat durch die Möglichkeit der Teilnahme an Weiterbildungsseminaren zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie, durch den Besuch von Kongressen und Seminaren und durch die Teilnahme an Exkursionen, aber auch durch den Kontakt zu vielen ausländischen Wissenschaftlern nicht nur meinen technologischen Horizont erweitert, sondern mir die Möglichkeit gegeben, viele interessante Menschen kennen zu lernen.

Herrn Prof. Dr. S. Laufer danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Bei der Firma Robugen GmbH, vornehmlich vertreten durch Herrn Dr. B. Hempel, bedanke ich mich für die Überlassung von Kamillenblüten und Referenzsubstanzen sowie für anregende Diskussionen rund um die Kamille.

Herrn Roland Walker danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft bei der CO₂-Extraktion sowie bei der gemeinsamen Betreuung von Praktika. Herrn Klaus Weyhing möchte ich danken für seine Unterstützung in HPLC-Fragen. Bei Frau Renate Beer und Frau Martina Brenn bedanke ich mich für ihre hilfsbereite und freundliche Art, die mir bei der Bewältigung von kleinen und großen Problemen geholfen hat.

Herrn Geiger und seinem Werkstatt-Team gilt ein Dank für viele kleine Reparaturen, Anregungen und Hilfen bei gerätetechnischen Problemen. Frau Söllinger und Herrn Walker in der Chemikalienausgabe danke ich für ihre unkomplizierte und schnelle Hilfe und die stets freundliche Art.

Ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat Frau Senta Üzgün durch ihre große Mithilfe bei der Probenaufbereitung und Analytik von β -Cyclodextrin-Komplexen sowie bei Wassergehaltsbestimmungen.

Meinen ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen danke ich ganz herzlich für das hervorragende Arbeitsklima, den guten Austausch und die konstruktive Zusammenarbeit. Mit zahlreichen unterhaltsamen Diskussionen über Sport im Allgemeinen, über Fußball

im Besonderen, über Harald Schmidt und viele andere Dinge trugen sie stets dazu bei, dass mir die Arbeit Spaß und Freude bereitete. Es war mir ein großes Vergnügen, mit den Damen Katharina Lämmle und Hélène Rey das Labor, sowie auch mit den Herren Harald Römpp und Hans-Jürgen Martin Freuden und Sorgen teilen zu dürfen.

Ganz besonders danke ich Herrn Harald Römpp, nicht nur für das schnelle und überaus sorgfältige Korrekturlesen des Manuskriptes und anderer wissenschaftlicher Beiträge, sondern auch für viele Diskussionen, sein reges Interesse und seine großartige freundschaftliche Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an meine Mutter für die gewissenhafte Durchsicht des Manuskriptes und an meine Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und den privaten Rückhalt für das Gelingen dieser Arbeit darstellen.

*Für meine Eltern
in Liebe und Dankbarkeit*

Zu unserer Natur gehört die Bewegung.

Die vollkommene Ruhe ist der Tod.

Blaise Pascal

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 2 | Extraktion mit überkritischen Gasen | 4 |
| 2.1 | Literaturübersicht | 4 |
| 2.2 | Überkritische Gase..... | 5 |
| 2.2.1 | Der überkritische Zustand | 5 |
| 2.2.2 | Physikalisch-chemische Eigenschaften überkritischer Gase | 7 |
| 2.2.3 | Überkritisches Kohlendioxid | 10 |
| 2.3 | Phasendiagramme | 10 |
| 2.4 | Thermodynamik des Extraktionsprozesses | 14 |
| 3 | Analytik der Kamilleninhaltsstoffe | 17 |
| 3.1 | Gaschromatographie (GC) zur quantitativen Bestimmung von (-)- α -Bisabolol ... | 17 |
| 3.2 | Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) | 23 |
| 3.2.1 | Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur quantitativen Bestimmung von Matricin und En-In-Dicycloethern..... | 23 |
| 3.2.2 | Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur quantitativen Bestimmung von Apigenin und Apigenin-7-glucosid | 28 |
| 4 | Extraktion von Kamillenblüten mit überkritischem Kohlendioxid | 32 |
| 4.1 | Literaturüberblick | 32 |
| 4.2 | Optimierung der Extraktionsparameter..... | 35 |
| 4.2.1 | Extraktionsdruck..... | 36 |
| 4.2.2 | Extraktionsdauer | 37 |
| 4.2.3 | CO ₂ -Massenfluss | 39 |
| 4.2.4 | Weitere Einflussparameter: Geschwindigkeit der Entspannung des Abscheidebehälters und Art der Trocknung der Extrakte..... | 41 |
| 4.3 | Aufstellung einer Gesamtextraktionsbilanz unter Berücksichtigung des Zerkleinerungsgrades der Droge..... | 43 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.4 | Diskussion der Ergebnisse..... | 47 |
| 4.4.1 | Optimierung der Extraktionsparameter..... | 47 |
| 4.4.1.1 | Extraktionsdruck..... | 47 |
| 4.4.1.2 | Extraktionsdauer..... | 49 |
| 4.4.1.3 | CO ₂ -Massenfluss..... | 49 |
| 4.4.1.4 | Sonstige Einflussparameter..... | 50 |
| 4.4.2 | Gesamtextraktionsbilanz und Einfluss des Zerkleinerungsgrades..... | 51 |
| 4.5 | Zusammenfassung..... | 52 |
| 5 | In-line-Einschluss von Kamilleninhaltsstoffen..... | 55 |
| 5.1 | Allgemeines..... | 55 |
| 5.2 | Literaturübersicht..... | 57 |
| 5.3 | Herstellung und Analytik von In-line-Einschlussverbindungen eines Kamillen-CO ₂ -Extraktes mit β -Cyclodextrin..... | 58 |
| 5.4 | Gesamtgehalt und Einschussrate von Kamilleninhaltsstoffen im CO ₂ -Extrakt/ β -CD-Komplex..... | 61 |
| 5.5 | Diskussion der Ergebnisse..... | 63 |
| 5.6 | Zusammenfassung..... | 66 |
| 6 | Stabilitätsuntersuchungen von Matricin..... | 67 |
| 6.1 | Literaturübersicht..... | 67 |
| 6.2 | Einfluss der Trocknungsart von CO ₂ -Extrakten auf die Stabilität von Matricin.... | 69 |
| 6.3 | Stabilität von Matricin in einem CO ₂ -Extrakt/ β -CD-Komplex..... | 71 |
| 6.4 | Diskussion der Ergebnisse..... | 74 |
| 6.5 | Zusammenfassung..... | 76 |
| 7 | Extraktion hydrophiler Inhaltsstoffe und fraktionierte CO₂-Extraktion..... | 77 |
| 7.1 | Literaturübersicht..... | 77 |
| 7.2 | Fraktionierte Extraktion mit lipophilem Vorextraktionsschritt..... | 78 |
| 7.3 | Fraktionierte Schleppmittelextraktion..... | 80 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 7.4 | Herstellung eines Gesamtextraktes mittels Schlepplmittelextraktion | 82 |
| 7.5 | Diskussion der Ergebnisse | 84 |
| 7.6 | Zusammenfassung | 88 |
| 8 | Experimenteller Teil | 91 |
| 8.1 | Materialien | 91 |
| 8.1.1 | Kamillenblüten | 91 |
| 8.1.2 | Standardsubstanzen | 91 |
| 8.1.3 | Lösungsmittel und Chemikalien | 92 |
| 8.1.4 | Sonstige Verbrauchsmaterialien | 93 |
| 8.1.5 | Geräte zur allgemeinen Verwendung | 94 |
| 8.2 | Datenverarbeitung | 95 |
| 8.3 | Analytik | 95 |
| 8.3.1 | Gaschromatographie (GC) | 95 |
| 8.3.1.1 | Beschreibung der Methode | 95 |
| 8.3.1.2 | Probenvorbereitung und Standardlösungen | 96 |
| 8.3.1.3 | Kalibrierung und Validierung | 97 |
| 8.3.2 | Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) | 99 |
| 8.3.2.1 | Beschreibung der Methode zur Bestimmung von Matricin, cis- und trans-En-In-Dicycloether (lipophile Inhaltsstoffe) | 99 |
| 8.3.2.2 | Beschreibung der Methode zur Bestimmung von Apigenin und Apigenin-7-glucosid (hydrophile Inhaltsstoffe) | 100 |
| 8.3.2.3 | Probenvorbereitung und Standardlösungen | 100 |
| 8.3.2.4 | Kalibrierung und Validierung | 101 |
| 8.3.3 | Bestimmung der Einschussrate des CO ₂ -Extraktes in β-CD-Komplexe | 104 |
| 8.3.4 | Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl-Fischer | 105 |
| 8.3.5 | pH-Wert-Messungen | 106 |
| 8.3.6 | Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) | 106 |
| 8.3.7 | Siebanalyse der Kamillendroge | 107 |
| 8.4 | Extraktion von Kamillenblüten mit überkritischem CO ₂ | 107 |
| 8.4.1 | Beschreibung der Hochdruckextraktionsanlage | 107 |
| 8.4.2 | Optimierung der Extraktionsbedingungen | 111 |
| 8.4.3 | In-line-Einschluss von Kamilleninhaltsstoffen in β-Cyclodextrin | 112 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 8.4.4 | Einfluss des Zerkleinerungsgrades auf die Extraktionsbilanz..... | 112 |
| 8.4.5 | Extraktion unter Zusatz von Schleppmittel..... | 112 |
| 8.4.5.1 | Fraktionierte Extraktion mit lipophilem Vorextraktionsschritt.... | 112 |
| 8.4.5.2 | Fraktionierte Schleppmittelextraktion | 114 |
| 8.4.5.3 | Herstellung eines Gesamtextraktes mittels Schleppmittelextraktion..... | 114 |
| 8.5 | Extraktion der Kamillenblüten mittels Mazeration und Remazeration | 115 |
| 8.6 | Trocknung der CO ₂ -Extrakte | 115 |
| 8.6.1 | Trocknung im Exsikkator | 115 |
| 8.6.2 | Gefriertrocknung..... | 115 |
| 8.6.3 | Trocknung von Schleppmittelextrakten..... | 116 |
| 9 | Zusammenfassung..... | 117 |
| 10 | Literaturverzeichnis | 122 |
| 11 | Anhang..... | 139 |
| 11.1 | Messdaten der Kalibrierung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Matricin, cis- und trans-En-In-Dicycloether | 139 |
| 11.2 | Messdaten der Validierung für Matricin, cis- und trans-EID..... | 142 |
| 11.3 | Messdaten der Kalibrierung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Apigenin- und Apigenin-7-glucosid | 144 |
| 11.4 | Messdaten der Validierung für Apigenin-7-glucosid | 146 |
| 11.5 | Messdaten der Kalibrierung und Validierung der gaschromatographischen Methode zur quantitativen Bestimmung von (-)- α -Bisabolol | 147 |
| 11.6 | Firmenverzeichnis..... | 153 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| Art.-Nr. | Artikelnummer |
| Aufl. | Auflage |
| β -CD | β -Cyclodextrin |
| BfArM | Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| Ch.-B. | Chargenbezeichnung |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DSC | Differential Scanning Calorimetry |
| EID | En-In-Dicycloether |
| EOS | equation of state (Zustandsgleichung) |
| et al. | et alii |
| EtOH | Ethanol |
| Fa. | Firma |
| FE | Flächeneinheiten |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| Gl. | Gleichung |
| GC | Gaschromatographie |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatographie |
| Hrsg. | Herausgeber |
| I.D. | Innendurchmesser |
| MeOH | Methanol |
| mV | Millivolt |
| M_r | relative Molmasse |
| n. d. | nicht detektierbar |
| p. a. | pro analysi |
| relsdv | relative Standardabweichung |
| RT | Raumtemperatur |
| S. | Seite |
| SM | Schleppmittel |
| sog. | so genannt |
| syn. | synonym |

| | |
|------|--------------------------------------|
| Tab. | Tabelle |
| USP | United States Pharmacopeia |
| UV | ultravioletter Bereich des Spektrums |
| var | Varianz |
| vgl. | vergleiche |
| V/V | Volumenanteile |

Besondere Hinweise:

Falls nicht anders gekennzeichnet geben Fehlerbalken in den Abbildungen den 95 %-Vertrauensbereich des Mittelwertes an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht beziehungsweise vorgestellt:

Übersichtsarbeit:

- C. S. Kaiser, H. Römpp und P. C. Schmidt – „Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide“ – Pharmazie 56, 907-926 (2001)

Originalarbeiten / Kongressbeiträge:

- C. S. Kaiser, H. Römpp und P. C. Schmidt – „Supercritical CO₂ extraction of chamomile flowers: extraction efficiency, stability, and in-line-inclusion of chamomile CO₂-extract in β -cyclodextrin“ – Phytochemical Analysis, zur Publikation eingereicht
- C. S. Kaiser, H. Römpp und P. C. Schmidt – „Extraktion von Kamille mit überkritischem Kohlendioxid“ – Vortrag, DPhG Jahrestagung Münster 2000, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 333, Suppl. 2 (2000)
- C. S. Kaiser, H. Römpp und P. C. Schmidt – „Extraction of chamomile essential oil with supercritical carbon dioxide – preliminary results“ – Poster, International Symposium on High Pressure Chemical Engineering, Hamburg 2001
- C. S. Kaiser, H. Römpp und P. C. Schmidt – „Extraktion von Kamillenblüten mit überkritischem CO₂ – Einfluss verschiedener Extraktionsparameter“ – Poster, DPhG Jahrestagung Halle 2001, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 334, Suppl. 2 (2001)
- C. S. Kaiser, H. Römpp und P. C. Schmidt – „Investigations on the stability of matricine gained by supercritical carbon dioxide extraction“ – Poster, DPhG Doktorandentagung Frankfurt/Main 2002
- C. S. Kaiser, H. Römpp und P. C. Schmidt – „Überkritische CO₂-Extraktion und In-line-Einschluss von Kamilleninhaltsstoffen in β -Cyclodextrin“ – Vortrag, DPhG Doktorandentagung Düsseldorf 2003

Kapitel 1

Einleitung und Zielsetzung

Die echte Kamille (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) ist eine seit Jahrhunderten in der Volksmedizin bekannte Heilpflanze. Bereits im 5. Jahrhundert vor Christus erkennt Hippokrates die Kamillenblüten als wertvolle Arzneidroge mit vielfältigen Wirkungen. Mitte der 1980er Jahre ist sie die meistverwendete pflanzliche Droge (Wichtl 1984a), und auch heute sind noch knapp 100 Fertigarzneimittel im Handel, die Auszüge aus Kamille enthalten (Rote Liste 2003). Im Europäischen Arzneibuch (2002a, b) finden sich eine Monographie der Droge selbst (*Matricariae flos*) sowie – 2001 neu aufgenommen – eine Monographie des Fluidextraktes (*Matricariae extractum fluidum*).

Die Inhaltsstoffe der Kamille lassen sich in eine lipophile und eine hydrophile Gruppe einteilen. Zu den lipophilen Inhaltsstoffen zählen die Bestandteile des ätherischen Öles wie (-)- α -Bisabolol, die Bisabololoxide, die En-In-Dicycloether (syn. Spiroether), Chamazulen, β -Farnesen und weitere Mono- und Sesquiterpene, Cumarin-Derivate sowie wachsartige Substanzen. Chamazulen, das dem ätherischen Öl die blaue Farbe verleiht, kommt nicht genuin in der Pflanze vor, sondern wird während der Wasserdampfdestillation aus einem Proazulen, dem Matricin, gebildet. Die hydrophile Stoffgruppe umfasst Flavonoide, vor allem Apigenin-7-glucosid und dessen Aglykon Apigenin, daneben kommen Polysaccharide und Phenylcarbonsäuren vor.

Die pharmakologischen Wirkungen der Kamille sind vielfältig. Die Kommission E (1984) des früheren Bundesgesundheitsamtes (heute BfArM) beurteilt die Kamille positiv und schreibt ihr antiphlogistische, musklotrop-spasmolytische, wundheilungsfördernde, desodorierende, antibakterielle und den Harnstoffwechsel anregende Wirkungen zu. Die Anwendungsgebiete derzeit erhältlicher Kamillenpräparate zur innerlichen Anwendung umfassen die Therapie gastro-intestinaler Spasmen und entzündlicher Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes. Die äußerliche Anwendung dient der Behandlung von Haut- und Schleimhautentzündungen einschließlich der Mundhöhle und des Zahnfleisches sowie des Genital- und Analbereiches. Kamillendampfbäder und Inhalationen werden bei entzündlichen Erkrankungen und Reizzuständen der Atemwege eingesetzt (Kommission E 1984).

Die antiphlogistische Wirkung wird in der Hauptsache den lipophilen Inhaltsstoffen zugeschrieben und ist für (-)- α -Bisabolol, Matricin, Chamazulen und die En-In-Dicycloether durch verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen belegt (Breinlich und Scharnagel 1968,

Jakovlev et al. 1979, Jakovlev et al. 1983). Die spasmolytische Aktivität von Kamillenzubereitungen ist in erster Linie auf die Flavonoide, aber auch auf (-)- α -Bisabolol und die En-Indicycloether zurückzuführen (Achterrath-Tuckermann et al. 1980). Demzufolge ist das diversifizierte Wirkungsspektrum der Kamille nicht durch die Anwesenheit eines einzelnen Inhaltsstoffes bedingt, sondern vielmehr durch die Gesamtheit pharmakologisch unterschiedlich wirksamer Substanzen gegeben (Wichtl 1984b). Vergleichende Untersuchungen zur in-vivo Wirksamkeit von einzelnen Kamilleninhaltsstoffen und verschiedenen Extraktzubereitungen bestätigen die Beteiligung unterschiedlicher Inhaltsstoffe an der Wirkung von Kamillenextrakten (Hempel und Hirschelmann 1998). Dieselbe Studie belegt für eine Salbe, die 1 % eines überkritischen Kohlendioxid-Extraktes enthält, eine starke antiphlogistische Wirksamkeit, die einer 0,25 %igen Hydrocortisonsalbe entspricht. Umfassende Übersichten zur Pharmakologie der Kamille geben Schilcher (1987), Ammon und Kaul (1992) und Carle und Gomaa (1992a). Eine Arbeit aus diesem Jahr beschreibt die Aktualität der Forschung an einem „Dauerbrenner“ der Phytopharmazie (Hitzinger et al. 2003).

Obwohl für Matricin eine deutlich höhere antiphlogistische Wirksamkeit nachgewiesen ist als für das Zersetzungsprodukt Chamazulen, wird es bei der Standardisierung von Kamillenpräparaten bislang aufgrund seiner Instabilität nicht berücksichtigt (Jakovlev et al. 1983). In Ethanol/Wasser-Mischungen, die bei weitem am häufigsten zur Herstellung von Kamillenextrakten eingesetzt werden, beträgt die Halbwertszeit von Matricin nur wenige Tage (Ghassemi-Dehkordi 1988). Das Intermediärprodukt der Zersetzungsreaktion – die Chamazulencarbonsäure – weist eine hohe Strukturähnlichkeit mit synthetischen Antiphlogistika vom Typ der Profene auf, ihre Wirkung entspricht im Tiermodell einer akuten Entzündung der des S-(+)-Naproxen. Matricin stellt demzufolge ein natürliches Prodrug dieser verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses gerückten, antiphlogistisch wirkenden Substanz dar (Robugen GmbH 2001).

Eine alternative Extraktionsmethode, die bei niedrigen Temperaturen die Anreicherung lipophiler Inhaltsstoffe ohne den Einsatz organischer Lösungsmittel ermöglicht, stellt die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (CO₂) dar. Damit besteht die Möglichkeit, einen Matricin enthaltenden Extrakt ohne die Verwendung chlorierter Kohlenwasserstoffe als Lösungsmittel herzustellen. Auch der Einsatz des gemäß Arzneimittel-Warnhinweisverordnung (AMWarnV 1985) ab 0,05 g/Dosis deklarationspflichtigen Ethanol kann somit umgangen werden. Während die Hochdruckextraktion mit CO₂ im Bereich der Lebensmittelindustrie ein bereits seit den 1970er Jahren etabliertes Verfahren darstellt, kann sie sich im Arzneimittel-sektor trotz vieler Vorteile aufgrund umfangreicher regulatorischer Anforderungen nur sehr

langsam durchsetzen. Derzeit befinden sich zwei CO₂-Extrakte auf dem deutschen Markt, ein Pestwurz-Wurzel- (Petadolex®) und ein Sägepalmenpräparat (Serenoa ratiopharm®).

In dieser Arbeit sollen die Möglichkeiten der CO₂-Extraktion für die Herstellung standardisierter Phytopharmaka am Beispiel der Kamille im Technikumsmaßstab untersucht werden. Dazu wird zunächst anhand von stabilen, lipophilen Inhaltsstoffen eine Optimierung der Extraktionsparameter im Hinblick auf Selektivität und Ausbeute vorgenommen. Der Einfluss der Vorbehandlung des Drogenmaterials und der Trocknung der Extrakte wird unter dem Aspekt der Stabilität von Inhaltsstoffen, insbesondere des Matricins, betrachtet. Um eine Verbesserung technologischer Extrakteigenschaften zu erzielen, werden In-line-Einschlussverbindungen durch Koppelung von CO₂-Extraktion und Komplexierung mit β -Cyclodextrin hergestellt. Die Stabilität von Matricin in den resultierenden CO₂-Extrakt/ β -Cyclodextrin-Komplexen wird mit den Stabilitätsdaten eines reinen CO₂-Extraktes verglichen. Ferner sollen hydrophile Kamilleninhaltsstoffe wie Apigenin und Apigenin-7-glucosid mittels überkritischer Ethanol- bzw. Methanol/CO₂-Mischungen extrahiert werden. Zur gesonderten Anreicherung lipophiler und hydrophiler Inhaltsstoffe werden fraktionierte Extraktionsschemata angewendet. Darüber hinaus soll die Möglichkeit zur Herstellung eines Kamillenextraktes, der die gesamte Bandbreite pharmakologisch wirksamer Kamilleninhaltsstoffe enthält, unter Verwendung überkritischen Kohlendioxids untersucht werden.

Kapitel 2

Extraktion mit überkritischen Gasen

2.1 Literaturübersicht

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts beobachtet Cagniard de la Tour (1822) das Verschwinden der gas-flüssig Phasengrenze am Beispiel von 36 %igem Ethanol, Diethylether und Petrol-ether beim Überschreiten einer bestimmten Temperatur und bezeichnet den neu entdeckten Zustand als „l'état particulier“. Der englische Chemiker und Mediziner Andrews (1869) stellt bei seinen Untersuchungen über Kohlendioxid fest, dass die Trennlinie zwischen Flüssigkeit und Gas bei 31 °C und erhöhtem Druck verschwindet, und dass ein Gas bei Temperaturen oberhalb eines bestimmten Punktes nicht mehr durch einfache Druckerhöhung verflüssigt werden kann. Er definiert diesen Punkt als „kritischen Punkt“.

„On partially liquefying carbonic acid by pressure alone, and gradually raising at the same time the temperature to 88°Fahr., the surface of demarcation between the liquid and gas became fainter, lost its curvature, and at last disappeared. The space was then occupied by a homogeneous fluid ... At temperatures above 88° no apparent liquefaction of carbonic acid, or separation into two distinct forms of matter, could be effected, even when a pressure of 300 or 400 atmospheres was applied.“ (Andrews 1869)

Die erhöhte Lösungskapazität von Gasen jenseits des kritischen Punktes – sog. überkritische Gase – wird von Hannay und Hogarth (1879) erstmals am Beispiel anorganischer Salze in überkritischem Ethanol beschrieben. Bereits früh wird der entscheidende Einfluss der Dichte eines überkritischen Gases auf die Lösungskapazität entdeckt (Tyner 1910).

Die Anwendung dieser Beobachtungen wird seit den 1930er Jahren vor allem für die Fraktionierung von natürlichen und synthetischen Ölen genutzt. Umfangreiche Arbeiten in den 1960er Jahren verhelfen dieser neuen Trennmethode zum Durchbruch und bewirken eine Ausweitung der Anwendungsgebiete auf den Bereich der Naturstoffextraktion (Zosel 1978). Im technischen Maßstab wird überkritisches Kohlendioxid unter anderem zur Entcoffeinierung von Rohkaffee (Zosel 1970) und zur Gewinnung von Hopfenextrakten (Vitzthum und Hubert 1971) eingesetzt. Die zahlreichen Forschungsarbeiten zur Anwendung überkritischer Gase umfassen im Bereich der Naturstoffe die Extraktion und Fraktionierung von fetten Ölen, ätherischen Ölen und Aromen, Alkaloiden, Steroiden, Carotinoiden und weiteren Stoffgruppen. Eine detaillierte Übersicht über den Stand der Forschung bis Mitte der 1980er Jahre geben Stahl et al. (1987). Über die chromatographische Anwendung überkritischer Fluide

(Klesper et al. 1968) weitet sich das Einsatzgebiet auf Methoden zur Probenvorbereitung aus (Hawthorne 1990). Arbeiten zur Extraktion mit überkritischen Gasen im analytischen Maßstab sind von Modey et al. (1996) zusammengestellt. Jarvis und Morgan (1997) besprechen die Isolierung verschiedener Klassen von Pflanzeninhaltsstoffen, darunter ätherische Öle, andere Duft- und Aromastoffe, pharmazeutische Wirkstoffe, Lipide und Alkaloide. Kaiser et al. (2001) betrachten in einer umfassenden Literaturübersicht pharmazeutisch relevante Verfahren, insbesondere die Extraktion pharmakologisch aktiver Substanzen aus pflanzlichen Matrices im analytischen und präparativen Maßstab. Eine Zusammenfassung neuerer Entwicklungen der Anwendung überkritischer Gase in der pharmazeutischen Industrie gibt Perut (2003). Eine Reihe weiterer Übersichtsarbeiten legt den Schwerpunkt auf nicht-extraktive Verfahren unter Einsatz von überkritischen Gasen, dabei stehen Partikel-Design und Mikroisierung von pharmazeutischen Wirkstoffen im Vordergrund (Donsi und Reverchon 1991, Subramaniam et al. 1997, Tiwari Sandip und Udupa 1999).

2.2 Überkritische Gase

2.2.1 Der überkritische Zustand

Der kritische Punkt einer Substanz ist durch eine kritische Temperatur und einen kritischen Druck charakterisiert und markiert in einem Druck-Temperatur-Diagramm das Ende der Dampfdruckkurve (Abb. 2.1). Der überkritische Zustand ist demzufolge erreicht, wenn sowohl Temperatur als auch Druck oberhalb der kritischen Werte dieser Substanz liegen. Die kritischen Parameter Druck, Temperatur und die zugehörige Dichte sind von den zwischenmolekularen Kräften abhängig und in Tab. 2.1 für ausgewählte Gase und Flüssigkeiten angegeben.

Der überkritische Zustand ist durch Verdichtung eines Gases bei einer überkritischen Temperatur oder durch Erwärmung einer Flüssigkeit bei einem überkritischen Druck zu erreichen. Beim Übergang vom flüssigen oder gasförmigen Zustand in den überkritischen Zustand wird keine Phasengrenze überschritten und damit findet keine sprunghafte, sondern eine kontinuierliche Änderung der physikalischen Eigenschaften statt. Überkritische Gase werden auch als Fluide bezeichnet.

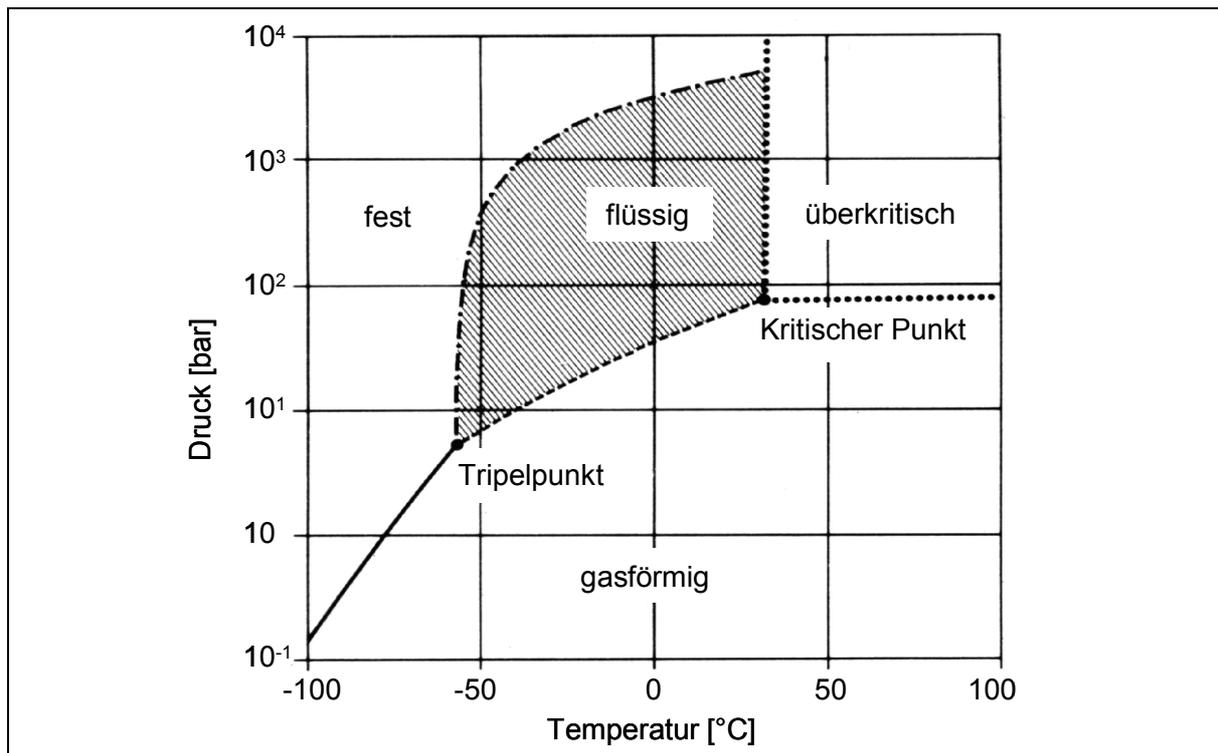


Abb. 2.1 Definition des überkritischen Zustands am Beispiel von CO_2
(aus Buse Gase 1992)

Tab. 2.1 Kritische Parameter ausgewählter Substanzen

| | kritische Temperatur [°C] | kritischer Druck [bar] | kritische Dichte [g/cm ³] |
|----------------------------------|------------------------------|---------------------------|--|
| Kohlendioxid ¹ | 31 | 73 | 0,47 |
| Distickstoffmonoxid ¹ | 37 | 73 | 0,45 |
| Propan ¹ | 97 | 42 | 0,22 |
| Ethanol ² | 243 | 64 | 0,28 |
| Methanol ² | 240 | 79 | 0,27 |
| Wasser ² | 374 | 218 | 0,32 |

¹ Daten aus Stahl et al. (1987)

² Daten aus Page et al. (1992)

2.2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften überkritischer Gase

In Tab. 2.2 ist ein Größenordnungsvergleich wichtiger physikalisch-chemischer Eigenschaften für Gase, Flüssigkeiten und verdichtete Gase (Fluide) aufgestellt. Die Dichte eines Gases beträgt etwa 10^{-3} kg/m^3 und ist damit etwa drei Zehnerpotenzen niedriger als die Dichte einer Flüssigkeit. In Abhängigkeit von Druck und Temperatur liegt die Dichte eines überkritischen Fluides im Bereich der Dichten von flüssigen Lösungsmitteln. Die Viskosität dieser Fluide beträgt dagegen nur 1/100 der Viskosität einer Flüssigkeit und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die eines Gases unter Normalbedingungen. Der Diffusionskoeffizient verdichteter Gase liegt zwischen 10^{-3} und $10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, damit nehmen sie eine Mittelstellung zwischen Flüssigkeiten mit Werten um $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ und Gasen mit Werten von $10^{-1} \text{ cm}^2/\text{s}$ ein.

Tab. 2.2 Größenordnungsvergleich physikalischer Daten von Gas, Flüssigkeit und verdichtetem Gas (nach Gouw und Jentoft 1972)

| | Dichte [kg/m^3] | Viskosität [$\text{mPa}\cdot\text{s}$] | Diffusionskoeffizient [cm^2/s] |
|---------------------|----------------------------|--|--|
| Gas (1 bar, 25 °C) | 10^{-3} | 10^{-2} | 10^{-1} |
| Flüssigkeit (25 °C) | 1 | 1 | $5 \cdot 10^{-6}$ |
| verdichtetes Gas | 0,2–0,9 | 10^{-2} | 10^{-3} – 10^{-4} |

Die flüssigkeitsähnliche Dichte ist entscheidend für die Fähigkeit, schwerflüchtige Stoffe bei relativ niedrigen Temperaturen zu lösen. Abb. 2.2 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit eines Stoffes in einem überkritischen Gas am Beispiel von Quarz in überkritischem Wasser. Steigender Druck oder fallende Temperatur führen jeweils zu einer Dichteerhöhung, somit kann unter isothermen Bedingungen eine Steigerung der Dichte nur durch Druckerhöhung erreicht werden, die Löslichkeit nimmt dabei zu. Bei konstanter Dichte (Isochoren) und damit konstanter Lösungskapazität des überkritischen Gases ergibt sich mit steigender Temperatur eine stetige Zunahme der Löslichkeit, da eine Erhöhung des Dampfdruckes eine verbesserte Löslichkeit in der überkritischen Phase bewirkt. Betrachtet man die Löslichkeit bei konstantem Druck (Isobaren) und steigender Temperatur, so beeinflussen einerseits die abnehmende Dichte und andererseits der steigende Dampfdruck das Löslichkeitsverhalten jeweils in unterschiedlicher Richtung. Bei Drücken bis etwa 750 bar kann zunächst eine Zunahme der Löslichkeit aufgrund des steigenden Dampfdruckes beobachtet werden. Im Bereich der kritischen Temperatur (374 °C) überwiegt dann der Effekt der stark abnehmenden Dichte und führt zu einer Reduktion der Löslichkeit bei einem Temperaturanstieg. Liegt der

Druck oberhalb von 750 bar, so wird der negative Effekt der abnehmenden Dichte durch den exponentiell steigenden Dampfdruck überkompensiert, woraus eine Löslichkeitszunahme resultiert.

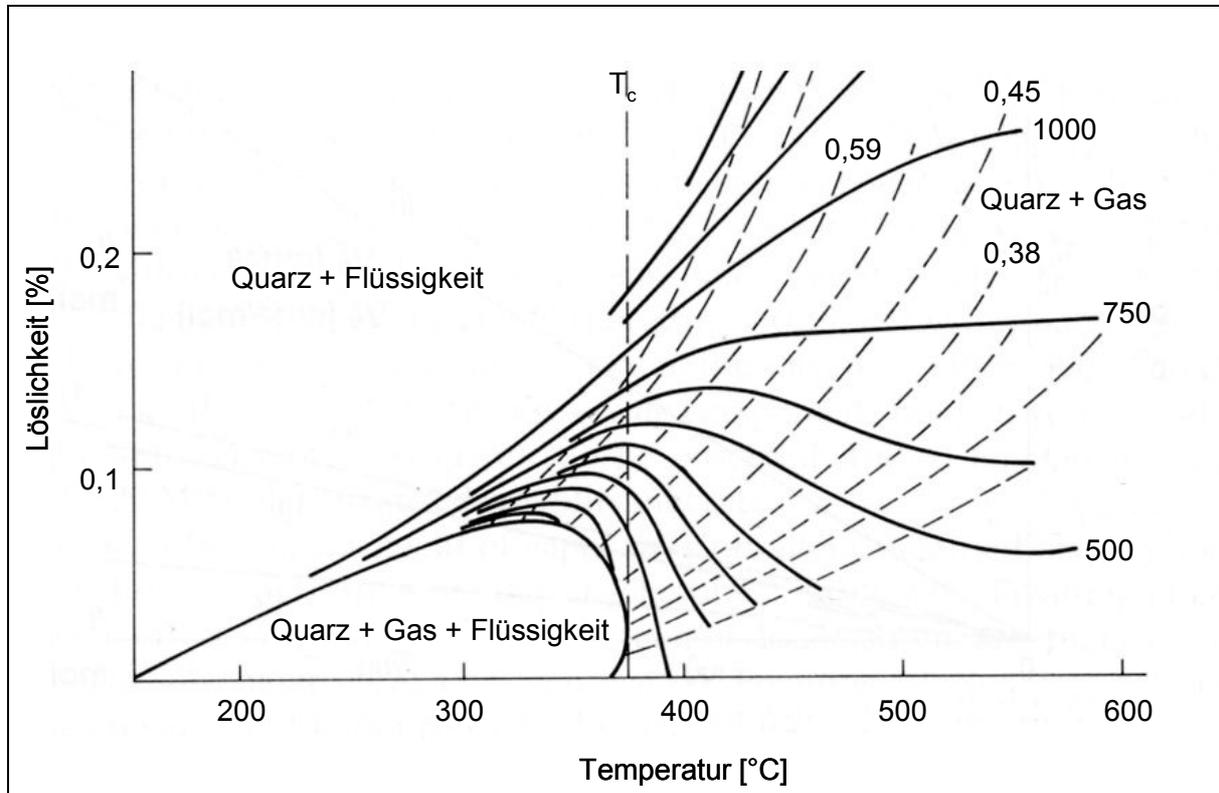


Abb. 2.2 Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit am Beispiel von Quarz in Wasser
(—) Isobaren [bar]; (-----) Isochoren [g/cm³] (nach Brunner 1994)

Den starken Einfluss des Druckes auf die Dichte im Bereich des kritischen Punktes zeigt Abb. 2.3 am Beispiel von CO₂. Dies ermöglicht eine hohe Variabilität der Lösungskapazität eines verdichteten Gases durch geeignete Wahl der Extraktionsparameter Druck und Temperatur. Dagegen ist die Dichtezunahme bei hohem Druck nur noch sehr gering.

Ebenfalls in Abb. 2.3 ist die Abhängigkeit der relativen Dielektrizitätskonstanten (ϵ) von CO₂ in Abhängigkeit vom Druck bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Die Dielektrizitätskonstante ist ein Maß für die Polarität eines Lösungsmittels und damit für die Fähigkeit, polare Substanzen zu lösen. Der Verlauf der Kurven entspricht dem Verlauf der Dichtekurven, die Zunahme ist im Bereich des kritischen Druckes (73 bar) bei nahekritischen Temperaturen (40 °C) am deutlichsten ausgeprägt. Insgesamt handelt es sich aber auch bei hohen Drücken um ein sehr lipophiles Lösungsmittel im Vergleich zu Ethanol ($\epsilon = 25,3$) oder Wasser ($\epsilon = 80,1$).

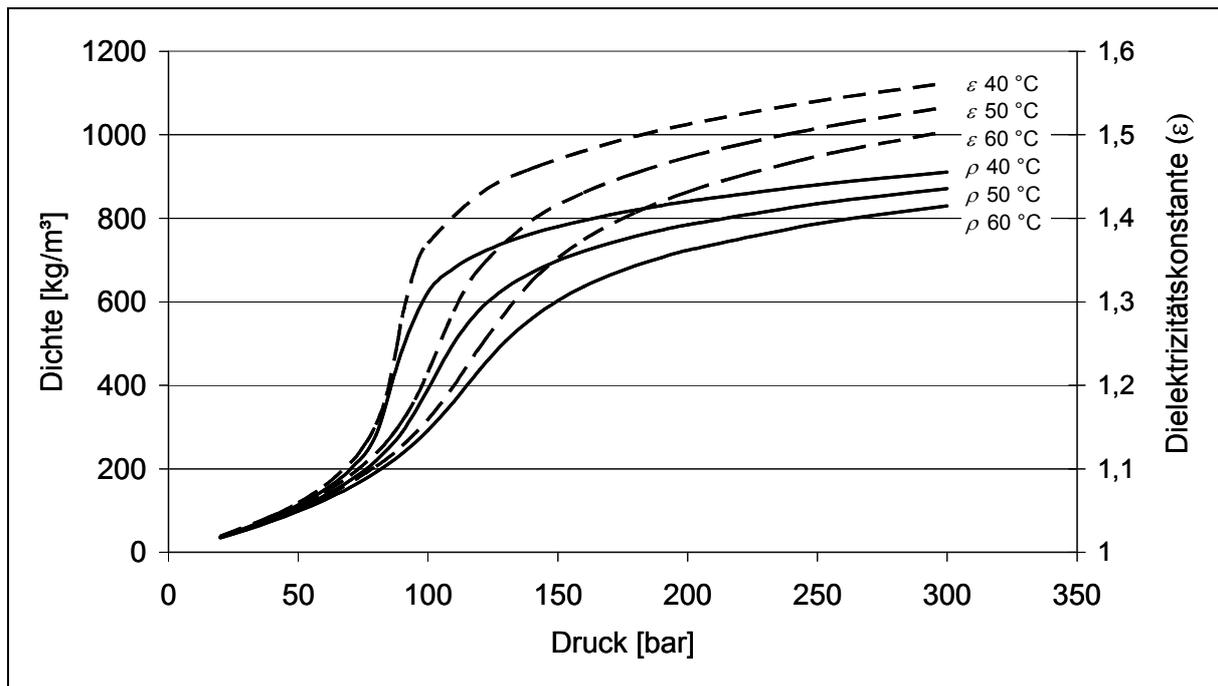


Abb. 2.3 Dichte und relative Dielektrizitätskonstante von CO_2 als Funktion von Druck und Temperatur; Dichten berechnet nach Bender (1970); relative Dielektrizitätskonstanten nach Moriyoshi et al. (1993)

Das Massentransportverhalten einer zu extrahierenden Substanz wird wesentlich durch den Diffusionskoeffizienten bestimmt, der die Proportionalitätskonstante zwischen Massenfluss und Konzentrationsgradient darstellt (Ficksches Diffusionsgesetz, Gl. 2.1). Der Diffusionskoeffizient wiederum ist gemäß der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 2.2) von der Viskosität des umgebenden Mediums abhängig. Daraus folgt, dass Transportprozesse in verdichteten Gasen einerseits durch niedrige Viskositäten, andererseits durch hohe Diffusionskoeffizienten im Vergleich zur Lösungsmittelextraktion beschleunigt werden. Liong et al. (1991) geben eine Übersicht über experimentell ermittelte Diffusionskoeffizienten in verdichteten Gasen, Smith et al. (1990) untersuchen zusätzlich den Einfluss von Methanol als Cosolvens auf die Transporteigenschaften in überkritischem CO_2 .

$$J = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad (2.1)$$

| | |
|------|--|
| J | Massenfluss [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| D | Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] |
| dc | Konzentrationsgradient [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$] |
| dx | Diffusionsstrecke [m] |

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot d \cdot \eta} \quad (2.2)$$

| | |
|--------|---|
| k | Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) |
| T | Temperatur [K] |
| d | Durchmesser eines Moleküls [m] |
| η | Viskosität [Pa·s] des umgebenden Mediums |

2.2.3 Überkritisches Kohlendioxid

Das in der Naturstoffextraktion bei weitem am häufigsten eingesetzte Gas ist Kohlendioxid (CO_2). Seine niedrige kritische Temperatur ($31 \text{ }^\circ\text{C}$) bei einem moderaten kritischen Druck (73 bar) erlaubt die schonende Extraktion insbesondere thermolabiler Substanzen. Darüber hinaus ist es physiologisch unbedenklich, keimfrei und bakteriostatisch, nicht brennbar oder explosiv, umweltfreundlich und in großen Mengen günstig verfügbar.

Aufgrund seines symmetrischen, linearen Aufbaus weist CO_2 kein permanentes Dipolmoment auf und besitzt daher in verdichtetem Zustand die Eigenschaften eines lipophilen Lösungsmittels. Dies bedingt die hohe Selektivität von überkritischem CO_2 für lipophile Inhaltsstoffe. Verdichtete Gase sind im allgemeinen schwache Lösungsmittel mit einer Beladungskapazität von maximal einigen Gewichtsprozent. Dies erfordert bei der Extraktion höhere Lösungsmitteldurchsätze als bei Verwendung organischer Lösungsmittel. Durch Zusatz eines konventionellen Lösungsmittels kann die Lösungskapazität erhöht, der Arbeitsdruck gesenkt und die Extraktion polarerer Inhaltsstoffe ermöglicht werden. Ethanol, Methanol, Dichlormethan, Aceton oder Hexan sind Beispiele für diese sog. Schlepptmittel oder Modifizier.

2.3 Phasendiagramme

Die Extraktion mit verdichteten Gasen ist ein Verfahren, das wie die Destillation oder die klassische Lösungsmittlextraktion Phasengleichgewichte in einem System unter bestimmten Zustandsbedingungen zur Stofftrennung ausnutzt. Das System besteht demzufolge aus mindestens drei Komponenten, dem verdichteten Gas und den beiden zu trennenden Substanzen. Da eine Pflanzenmatrix ein Multikomponentensystem darstellt, können zur vereinfachten Betrachtung der zu extrahierende Stoff aufgrund von homogenen chemisch-physikalischen Eigenschaften als *eine* Pseudokomponente und das pflanzliche Trägermaterial als völlig unlöslich angenommen werden. Der Trennvorgang beruht dann auf (quasi)-binären Gleichgewichten. Diese werden durch Druck (p), Temperatur (T) und Molenbruch (x) voll-

ständig beschrieben. Ihre graphische Darstellung in einem binären Phasendiagramm erlaubt Abschätzungen über

- die Lösungskapazität des verdichteten Gases,
- die Löslichkeit des verdichteten Gases in der kondensierten Phase,
- die Selektivität des Lösungsmittels für verschiedene Komponenten,
- die Abhängigkeit der Lösungsmittleigenschaften von Zustandsgrößen,
- die Lage und Ausdehnung von Zweiphasengebieten
- und die Festlegung von Extraktions- und Abscheidebedingungen.

Phasendiagramme sind weiter hilfreich, wenn zur Änderung der Lösungsmittleigenschaften dem reinen verdichteten Gas (z. B. CO₂) ein Schlepptmittel (z. B. Methanol, Ethanol) zugesetzt wird. In diesen Fällen wird der thermodynamische Zustand des Lösungsmittels durch das binäre Gleichgewicht der beteiligten Komponenten bestimmt.

Die Gibbs'sche Phasenregel (Gl. 2.3) beschreibt die Beziehung zwischen der Anzahl der unabhängigen Variablen (Freiheitsgrade F), der Zahl der Komponenten (K) und der Zahl der Phasen (P). In einem binären System ($K = 2$) ist demnach eine homogene Phase durch einen Raum und der Koexistenzbereich zweier Phasen durch eine Fläche charakterisiert.

$$F = K - P + 2 \quad (2.3)$$

Der einfachste Fall eines Phasendiagrammes für binäre Mischungen liegt vor, wenn nur gas/flüssig-Gleichgewichte auftreten und die beiden flüssigen Komponenten keine Mischungslücke aufweisen (Abb. 2.4). Dieses Verhalten trifft für Systeme mit Substanzen ähnlicher Molmasse, Polarität und kritischem Punkt zu. Schneider (1970, 1978) und Brunner (1994) beschreiben das Phasenverhalten von Zweistoffsystemen unter Berücksichtigung von Mischungslücken sowie ternäre und quartäre Systeme.

Im dargestellten Beispiel entspricht die Komponente 1 dem Kohlendioxid oder einer ähnlich leicht flüchtigen Substanz. Der kritische Punkt (CP) kennzeichnet jeweils das Ende der Dampfdruckkurve (gestrichelte Linie). Die Kurve CL stellt die kritische Kurve der möglichen binären Mischungen dar (Abb. 2.4 **a**). Dargestellt ist nur ein möglicher Verlauf, ebenso sind ein linearer Verlauf oder eine Kurve mit einem Minimum möglich. Bei Bedingungen jenseits der kritischen Kurve sind die Komponenten vollständig miteinander mischbar und bilden eine einheitliche überkritische Phase. Die Abbildung Abb. 2.4 **b**) zeigt einen Schnitt bei konstanter

Temperatur T_1 , welche bezüglich beider Komponenten unterkritisch ist. Die resultierende Fläche entspricht dem spindelförmigen Siedediagramm bei einer Destillation. Entspannt man eine homogene flüssige Mischung der Zusammensetzung a auf den Druck im Punkt b , tritt eine Phasentrennung in Flüssigkeit der Zusammensetzung c und Gasphase der Zusammensetzung d ein, deren Massenverhältnis sich aus dem Hebelgesetz ergibt. Bei Überschreitung der kritischen Temperatur der flüchtigeren Komponente 1 ergeben sich charakteristische Schleifen, dargestellt in Abb. 2.4 c). Bei hohen Konzentrationen von Komponente 1 liegt keine Phasengrenze mehr vor, es erfolgen kontinuierliche Übergänge vom flüssigen oder gasförmigen zum überkritischen Zustand.

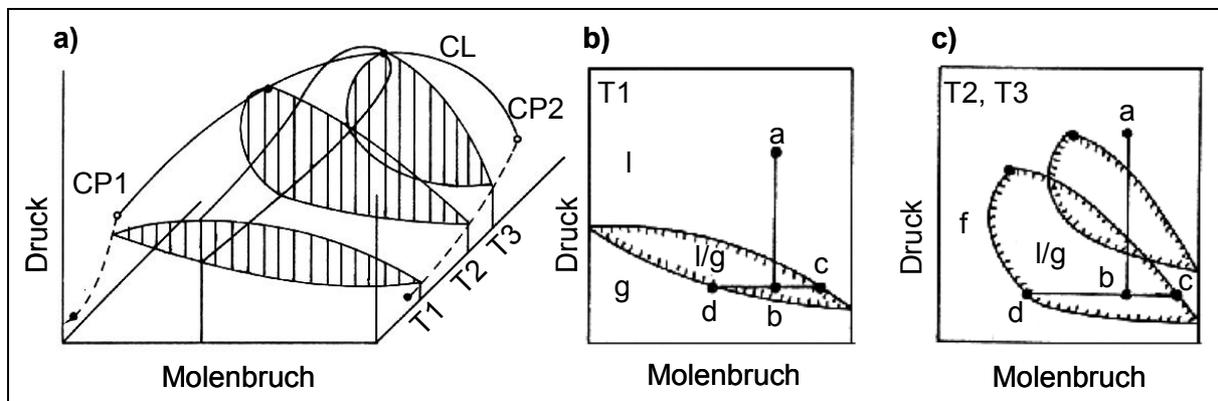


Abb. 2.4 **a)** pT_x -Diagramm einer binären Mischung; (▨) Zweiphasengebiet; CP1, CP2: kritische Punkte der Komponenten 1 und 2; CL: kritische Kurve binärer Mischungen aus 1 und 2; T_1 , T_2 , T_3 : ausgewählte Temperaturen; (-----): Dampfdruckkurven der Komponenten 1 und 2;
b) Isotherme im $p(x)$ -Diagramm bei T_1 ; a , b , c , d : Beschreibung siehe Text
c) Isothermen im $p(x)$ -Diagramm bei T_2 und T_3
 l: flüssig; g: gasförmig; f: überkritisch; l/g: Zweiphasengebiet flüssig/gasförmig

Für binäre Mischungen aus CO_2 und Ethanol bzw. CO_2 und Methanol stehen in der Literatur experimentell ermittelte Daten mehrerer Autoren zur Verfügung, anhand derer die Lage von Zweiphasengebieten abgeschätzt werden kann (Tab. 2.3). Dies ist für die Wahl der Extraktionsbedingungen, die Zusammensetzung und die Eigenschaften des resultierenden Lösungsmittels von entscheidender Bedeutung. Tritt Wasser, welches in der Extraktionsmatrix vorliegt, dem Lösungsmittelgemisch als dritte Komponente hinzu, kann in Abhängigkeit vom Stoffmengenanteil des Wassers die Betrachtung ternärer Systeme notwendig sein. Literaturdaten sind verfügbar, aber meist auf kleinere Temperaturbereiche beschränkt (Tab. 2.3). Eine umfassende Zusammenstellung experimenteller Daten zu Phasengleichgewichten unter Beteiligung von CO_2 geben Page et al. (1992).

Tab. 2.3 Literaturüberblick: binäre und ternäre Phasengleichgewichte unter Beteiligung von CO₂, Methanol, Ethanol und Wasser

| Autoren | Jahr | System | Temperaturbereich |
|-----------------------|-------|---|-------------------|
| Semenova et al. | 1979 | CO ₂ /Methanol | 50–125 °C |
| Chang und Rousseau | 1985 | CO ₂ /Methanol CO ₂ /Methanol/Wasser | -30–25 °C |
| Gilbert und Paulaitis | 1986 | CO ₂ /Ethanol/Wasser | 35 °C–65 °C |
| Suzuki et al. | 1990 | CO ₂ /Methanol CO ₂ /Ethanol | 40–60 °C |
| Jennings et al. | 1991 | CO ₂ /Ethanol | 41–64 °C |
| Page et al. | 1991 | CO ₂ /Methanol | 60–120 °C |
| Yoon et al. | 1993a | CO ₂ /Methanol/Wasser | 32–40 °C |
| Yoon et al. | 1993b | CO ₂ /Methanol | 40 °C |
| Lim et al. | 1994 | CO ₂ /Ethanol CO ₂ /Ethanol/Wasser | 40–70 °C |

2.4 Thermodynamik des Extraktionsprozesses

Die Zustandsänderungen des im Kreislauf geführten Gases während einer Extraktion werden anhand eines Temperatur-Entropie-Diagrammes für den Betrieb mit einer Flüssiggaspumpe veranschaulicht (Abb. 2.5). Hierbei sind umgesetzte Wärmemengen durch Flächen unter der Kurve einer Zustandsänderung repräsentiert (siehe Definition der Entropie in den Gleichungen 2.4 und 2.5). Beispielhafte Berechnungen und Optimierungen des Energiebedarfes von Extraktionen mit verdichteten Gasen finden sich bei Eggers und Tschiersch (1980), Brunner (1987, 1994), Lack und Marr (1988) und Smith et al. (1999).

$$S = \frac{Q}{T} \quad (2.4)$$

$$dQ = T \cdot dS \quad (2.5)$$

S Entropie [$\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$]

T Temperatur [K]

Q Wärme [J]

In Abb. 2.5 sind die Bereiche eingezeichnet, in denen das Kohlendioxid als homogene flüssige, gasförmige oder überkritische Phase vorliegt, sowie das Zweiphasengebiet flüssig/gasförmig. Die gestrichelte Linie zur Abgrenzung des überkritischen Bereiches dient der Verdeutlichung und stellt keine Phasengrenze dar. In Punkt **A** liegt CO_2 gasförmig bei einem Druck von 40 bar vor. Durch isobare Kühlung beginnt beim Eintritt in das Zweiphasengebiet (**B**) die Kondensation. Während des Phasenüberganges von gasförmig nach flüssig wird kontinuierlich Wärme entzogen, Druck und Temperatur bleiben dabei konstant. Der Stoffmengenanteil an flüssiger Phase nimmt dabei kontinuierlich zu und ist gleich 1, wenn das Zweiphasengebiet an Punkt (**C**) verlassen wird. Um sicherzustellen, dass bei Druckreduktion während der Ansaugphase der Hochdruckpumpe ausschließlich flüssiges CO_2 vorliegt, wird dieses unterkühlt (**C** \rightarrow **D**), bevor es auf den Extraktionsdruck von 250 bar verdichtet wird (**E**). Die Prozessführung wird dabei idealisiert als adiabatisch betrachtet, das heißt es treten keine Wärmeverluste auf. Verläuft die Druckerhöhung adiabatisch reversibel, so bleibt dabei die Entropie konstant (isentrop). Durch Wärmezufuhr wird isobar die gewünschte Extraktionstemperatur von 40 °C erreicht (**F**: Arbeitspunkt der Extraktion). Die Abscheidung erfolgt durch isenthalpe Drosselung in das Zweiphasengebiet. Eine vollständige Abscheidung wird erreicht, indem durch Wärmezufuhr CO_2 in den gasförmigen Zustand überführt wird (**B** \rightarrow **A**). Dabei reduziert sich die Lösungskapazität auf ein Minimum.

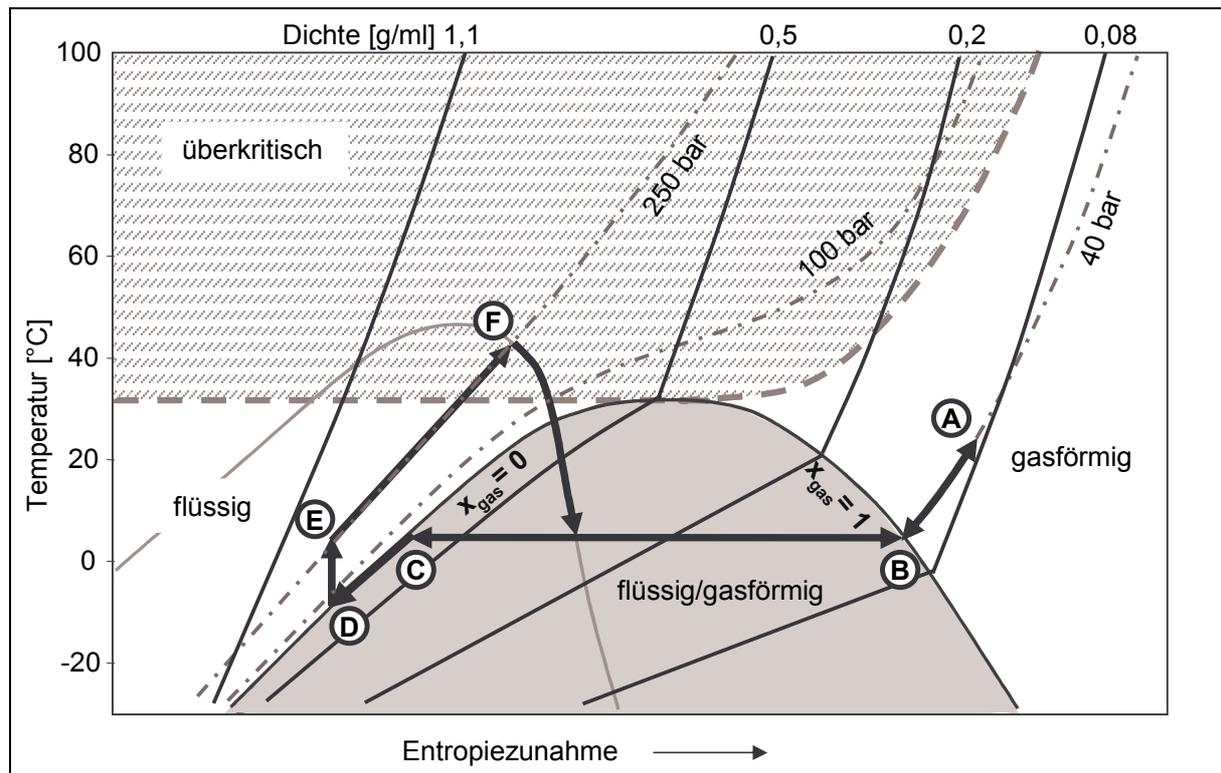


Abb. 2.5 Extraktionskreislauf im T,S-Diagramm von CO₂ (Erklärung **A – F**: siehe Text)

- (■) Zweiphasengebiet: flüssig/gasförmig; (▨) überkritischer Zustand
- (—) Isochoren; (- - - -) Isobaren; (- · - ·) Isenthalpe
- (- - -) Abgrenzung des überkritischen Bereichs

Drosselung bedeutet eine Druckreduktion ohne Gewinn von technischer Arbeit oder kinetischer Energie. Daher verläuft sie immer in Richtung zunehmender Entropie und ist damit ein adiabatischer, aber irreversibler Prozess (isenthalp). Bei der Drosselung realer Gase kommt es aufgrund des Joule-Thomson-Effektes zu einer Abkühlung. Da zwischen Teilchen realer Gase anziehende Wechselwirkungen bestehen, ist zum Lösen dieser Teilchen voneinander bei einer Drucksenkung die Überwindung dieser Anziehungskräfte notwendig. Die dafür nötige Energie wird bei adiabatischer Prozessführung nicht der Umgebung, sondern dem Gas selbst entzogen, wodurch es sich abkühlt. Bei hohen Drücken kann der gegenteilige Effekt – eine Erwärmung des Gases – eintreten, wenn die Teilchen so stark angenähert sind, dass ihr Eigenvolumen abstoßende Kräfte bewirkt, die bei Expansion in Form von Wärmeenergie frei wird. Van der Waals berücksichtigt in seiner p-V-T-Zustandsgleichung (equation of state = EOS) für reale Gase diese anziehenden und abstoßenden Wechselwirkungen (Gl. 2.6). Diese gehen ebenfalls in die Berechnung des Joule-Thomson-Effektes ein, der sich aus der Änderung der Temperatur mit dem Druck bei konstanter Enthalpie ergibt (Gl. 2.7).

$$\left(p + \frac{a}{v^2}\right) \cdot (v - b) = R \cdot T \quad (2.6)$$

p Druck [Pa]

R allgemeine Gaskonstante [8,314 J·mol⁻¹·K⁻¹]

T Temperatur [K]

$\frac{a}{v^2}$ Binnendruck des Gases, bedingt durch Anziehungskräfte [Pa]

v molares Volumen des Gases [m³/mol]

$v - b$ Kovolumen [m³/g], bedingt durch das Eigenvolumen der Teilchen

a Van-der-Waals-Konstante [Pa·m⁶·mol⁻²]

b Van-der-Waals-Konstante [m³·mol⁻¹]

$$\eta_{JT} = \left(\frac{\partial T}{\partial p}\right)_H = \frac{\frac{2a}{R \cdot T} - b}{c_p} \quad (2.7)$$

η_{JT} Joule-Thomson-Koeffizient

c_p Wärmekapazität des Gases bei konstantem Druck [J mol⁻¹·K⁻¹]

Die Konstanten a und b können experimentell ermittelt oder aus den kritischen Werten eines Gases über die Beziehungen 2.8 und 2.9 berechnet werden.

$$p_c = \frac{a}{27 \cdot b^2} \quad (2.8)$$

$$T_c = \frac{8 \cdot a}{27 \cdot R \cdot b} \quad (2.9)$$

p_c kritischer Druck [Pa]

T_c kritische Temperatur [K]

Ausgehend von der van-der-Waals-EOS werden weitere Gleichungen aufgestellt, die eine bessere Einbindung experimenteller Daten bieten. Die Bender-EOS ist ein Beispiel einer multiparametrischen Gleichung, welche vor allem im flüssigen und überkritischen Zustand eine sehr genaue Anpassung an empirische Daten für eine Reinsubstanz wie CO₂ liefert (Bender 1970). Brunner (1994) beschreibt die Entwicklung verschiedener Zustandsgleichungen und deren Vorteile und die Grenzen der Aussagekraft. Des Weiteren gibt er eine ausführliche Erläuterung und Herleitung der für den Extraktionsprozess relevanten thermodynamischen Parameter.

Kapitel 3

Analytik der Kamilleninhaltsstoffe

3.1 Gaschromatographie (GC) zur quantitativen Bestimmung von (-)- α -Bisabolol

Die Gaschromatographie zur Bestimmung von Bestandteilen des ätherischen Kamillenöls ist ein in zahlreichen Arbeiten beschriebenes Verfahren. Isaac et al. (1968) führen die erste quantitative gaschromatographische Bestimmung von (-)- α -Bisabolol durch. In den folgenden Jahren gelingt unter Einsatz von unterschiedlich polaren, gepackten Säulen die Trennung von (-)- α -Bisabolol, den Bisabololoxiden und des Bisabolonoxids (Glasl und Wagner 1976) sowie die getrennte Erfassung der beiden isomeren En-In-Dicycloether (Reichling und Becker 1977). Der Einsatz von Kapillarsäulen bringt eine weitere Verbesserung der Trennleistung, da infolge des geringeren Druckabfalles wesentlich längere Trennkapillaren eingesetzt werden können (Grant 1976). Umfassende Literaturübersichten über die gaschromatographischen Trennverfahren geben Schilcher (1987), Vogel (1992) und Ness (1995).

Die in dieser Arbeit angewandte Methode wurde von Ness (1995) entwickelt und von Waleczek (2002) für die Detektion von höhermolekularen, lipophilen Inhaltsstoffen erweitert. Die n-Alkane stellen hierbei die mengenmäßig am stärksten vertretenen Komponenten dar (Stransky et al. 1981). C₂₅-, C₂₇-, C₂₉- und C₃₁-n-Alkan eluieren zwischen 230 und 290 °C und werden durch Vergleich der Gaschromatogramme mit der Literatur (Grünhagen 1994, Reverchon und Senatore 1994) zugeordnet.

Die quantitative Bestimmung von (-)- α -Bisabolol erfolgt nach Kalibrierung mit n-Hexadecan als internem Standard. Zur Berechnung des Gehaltes der eingesetzten Probenlösungen wird zunächst eine Standardlösung mit bekanntem Gehalt an (-)- α -Bisabolol und n-Hexadecan analysiert. Aus den resultierenden Peakflächenwerten lässt sich ein Responsefaktor f errechnen (siehe Gleichungen 3.1 und 3.2), der für die weitere Auswertung zugrunde gelegt wird (Wollrab 1983). Dieses Vorgehen ist in der Kapillar-GC vor allem bei Verwendung eines Split-Injektors von Vorteil, da bei einem Split von 1/10 und einem Gesamtinjektionsvolumen von 5 μ l nur 0,5 μ l auf die Säule gelangen. Die möglichen Schwankungen des Injektionsvolumens wirken sich auf Analyt und internen Standard gleichermaßen aus und werden durch Berechnung des Peakflächenverhältnisses kompensiert.

Da keine Referenzsubstanzen vorliegen, werden β -Farnesen und die n-Alkane als (-)- α -Bisabolol berechnet. Die Responsefaktoren von Bisabololoxid A (f = 1,50) und B (f = 1,58) wer-

den der Dissertation von Waleczek (2002) entnommen, in der identische Geräte und Methoden verwendet werden.

$$f = \frac{m_{Bis} \cdot A_{Hex}}{A_{Bis} \cdot m_{Hex}} \quad (3.1)$$

f Responsefaktor

m_{Bis} eingesetzte Menge an (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml]

m_{Hex} eingesetzte Menge an n-Hexadecan [mg/100 ml]

A_{Bis} Flächeneinheiten für (-)- α -Bisabolol

A_{Hex} Flächeneinheiten für n-Hexadecan

$$m_x = f \cdot m_{Hex} \cdot \frac{A_x}{A_{Hex}} \quad (3.2)$$

m_x Menge der zu bestimmenden Substanz x [mg/100 ml]

m_{Hex} eingesetzte Menge an internem Standard [mg/100 ml]

A_x Flächeneinheiten für die zu berechnende Substanz x

A_{Hex} Flächeneinheiten für den internen Standard

Das Gaschromatogramm eines unter Referenzbedingungen hergestellten Kamillen-CO₂-Extraktes ist in Abb. 3.1 dargestellt.

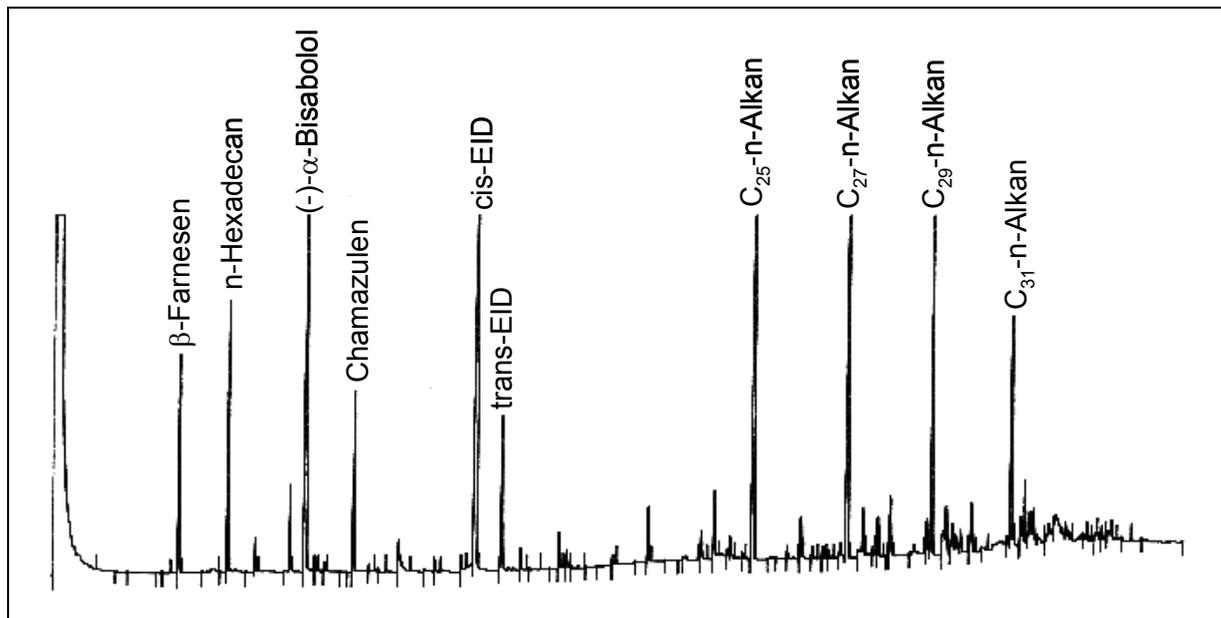


Abb. 3.1 Gaschromatogramm eines Kamillen-CO₂-Extraktes, hergestellt unter Referenzbedingungen (90 bar, 40 °C, 8 kg CO₂/h, 3 h)

Für den internen Standard n-Hexadecan wird eine Grundkalibrierung mit Ermittlung der Verfahrenskenndaten durchgeführt. Die Kalibriergerade wird durch lineare Regression nach der Methode der Minimierung der Summe der quadrierten Abweichungen ermittelt (Gottwald 2000). Da die eingesetzte Konzentration des internen Standards in den Probenlösungen jeweils ungefähr 2,2 mg n-Hexadecan/100 ml beträgt, wird der Kalibrierbereich so gewählt, dass diese Konzentration ungefähr mit dem Datenschwerpunkt übereinstimmt. Die Güte der Kalibrierung wird anhand des Residuenplots beurteilt. Die Rohdaten sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 11.5, S. 147).

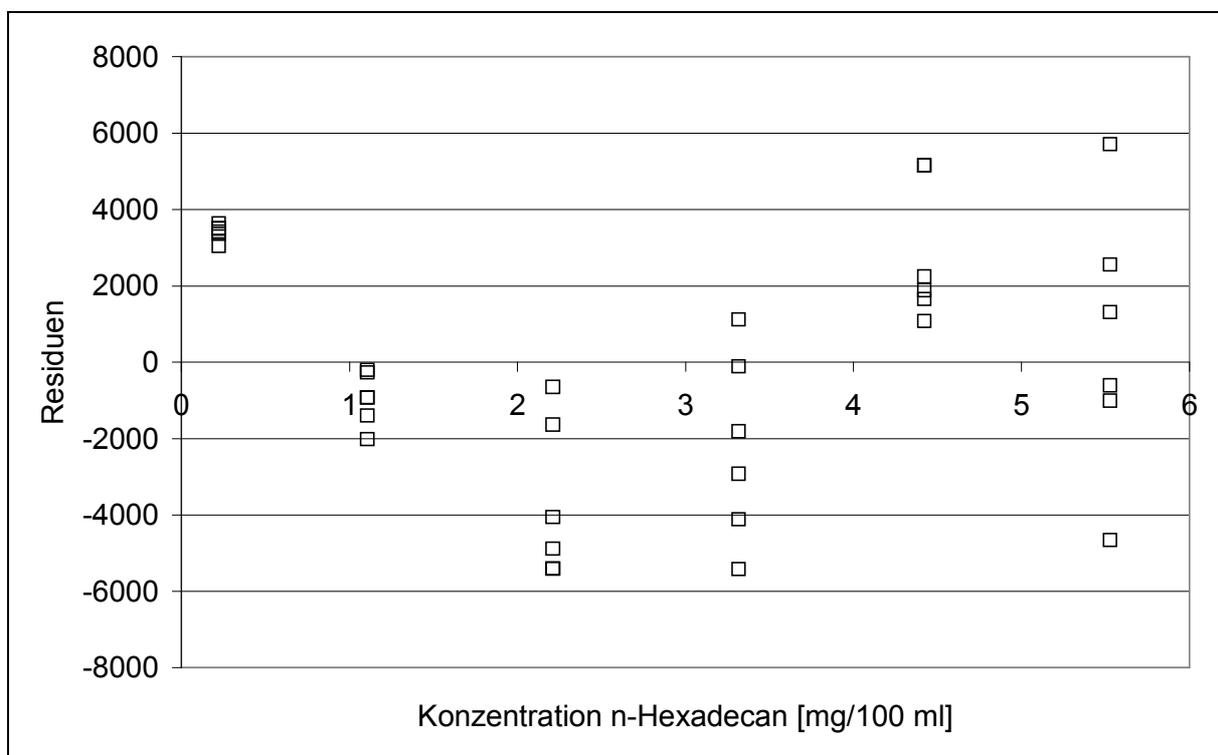


Abb. 3.2 Residuenplot des internen Standards n-Hexadecan; (□) Residuen

Die Erstellung der Kalibriergeraden von (-)- α -Bisabolol erfolgt durch Auftragung des Flächenquotienten aus zu bestimmender Substanz und internem Standard. Die Abb. 3.3 und Abb. 3.4 zeigen jeweils die Regressionsgerade und den Residuenplot. Der 95 %-Vertrauensbereich, der zur optischen Verdeutlichung um den Faktor 10 aufgeweitet ist, ist ebenfalls dargestellt. Er repräsentiert die Unsicherheit des Datenschwerpunktes in y-Richtung sowie die Unsicherheit der Steigung der Geraden. Die nach Gottwald (2000) berechneten Daten werden mit den Auswertungen der Statistikfunktionen des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel verglichen und dadurch abgesichert.

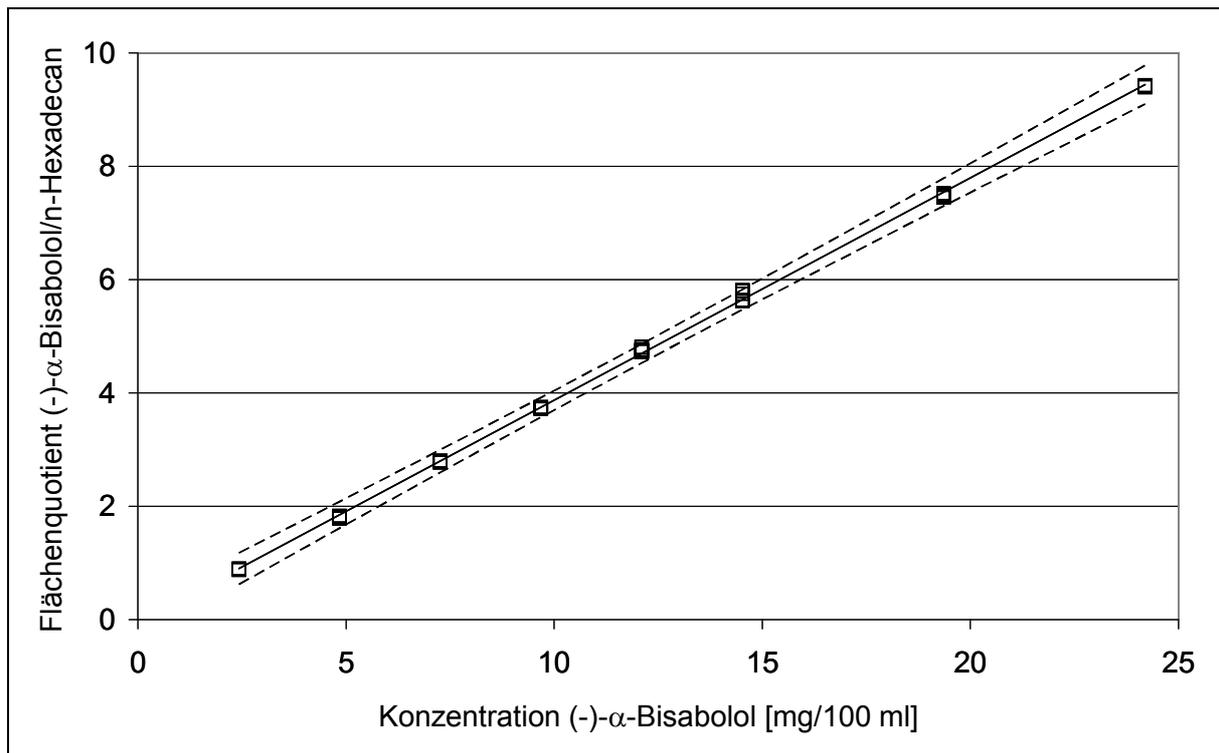


Abb. 3.3 Kalibriergerade für (-)-α-Bisabolol; (□) Messwerte; (—) Regressionsgerade; (-----) Vertrauensbereich, um Faktor 10 aufgeweitet

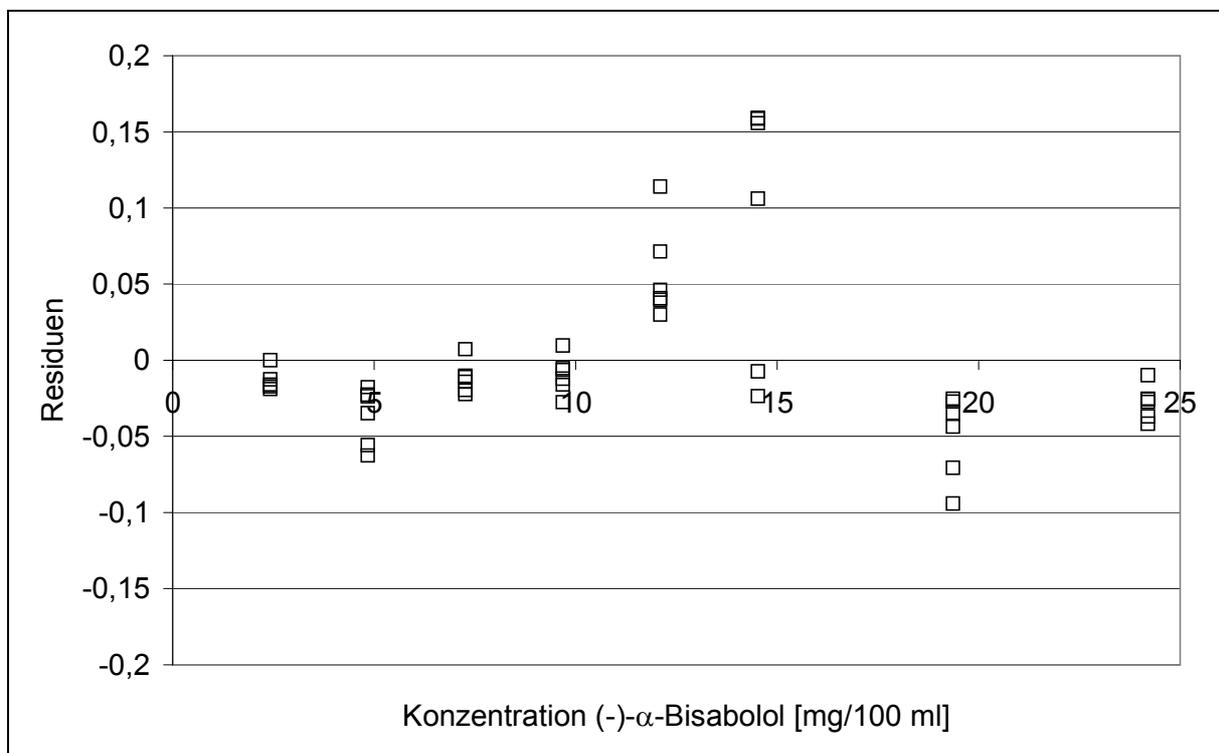


Abb. 3.4 Residuenplot der Kalibrierung für (-)-α-Bisabolol; (□) Residuen

Die Verfahrensdaten für die Grundkalibrierung des internen Standards und für (-)- α -Bisabolol sind in Tab. 3.1 angegeben.

Tab. 3.1 Daten der Kalibrierung der GC-Methode für (-)- α -Bisabolol und n-Hexadecan

| Parameter | (-)- α -Bisabolol | n-Hexadecan |
|---|---|--|
| Messbereich [mg/100 ml] | 2,4196–24,196 | 0,2211–5,5275 |
| Anzahl der Messpunkte | 48 | 36 |
| Datenschwerpunkt | $\bar{x} = 11,7956$ $\bar{y} = 4,5751$ | $\bar{x} = 2,8006$ $\bar{y} = 169825$ |
| Korrelationskoeffizient | 0,9998 | 0,9996 |
| Reststandardabweichung | 0,0568 | 3294 |
| Verfahrensstandardabweichung | 0,1448 | 0,0531 |
| relative Verfahrensstandardabweichung | 1,23 % | 1,90 % |
| Geradengleichung (-)- α -Bisabolol | $f(x) = 4,5751 + 0,3920(x - 11,7956)$ | |
| Geradengleichung n-Hexadecan | $f(x) = 169825 + 61993(x - 2,8006)$ | |

Im Rahmen der Validierung von Analysemethoden werden Selektivität (specificity), Wiederfindung (Richtigkeit, accuracy), Systempräzision und Methodenpräzision (precision), Bestimmungsgrenze (quantitation limit) und Nachweisgrenze (detection limit) bestimmt. Genaue Definitionen und Erläuterungen zu den Begriffen sind in der USP 26 (2003) zu finden. Da die Validierung der gaschromatographischen Methode bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben ist (Ness 1995, Waleczek 2002), wird die Prüfung der Selektivität auf eine Bestimmung der Identität reduziert. Dies erfolgt durch Verwendung von Standardsubstanzen und den Vergleich der Retentionszeiten. Somit ist eine eindeutige Zuordnung eines Messsignals zu einer bestimmten Substanz gegeben. Die Richtigkeit einer Methode beschreibt den Grad der Übereinstimmung der gemessenen Werte mit den wahren Werten. Dazu wird die Wiederfindungsrate nach Zudosieren einer Standardlösung bestimmt. Dieses Vorgehen gewährleistet, dass systematische Fehler bei der Probenaufarbeitung erkannt und eliminiert werden können. Die Systempräzision gibt die zufälligen Fehler des Messsystems bei wiederholter Injektion derselben Probe an, während die Methodenpräzision durch wiederholte Herstellung gleicher Extrakte den gesamten Bereich der Probenaufbereitung und Messung

umfasst. Die Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD) ist der kleinste Gehalt eines Analyten in einer Probe, für den die betreffende Analysenmethode mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % Signalwerte liefert. Dient ein Analysenverfahren lediglich zur Gehaltsbestimmung eines Bestandteils in höherer Konzentration, so kann auf die Ermittlung der Nachweisgrenze verzichtet werden (ICH-Guideline Q2A 1994). Die Bestimmungsgrenze (Limit of quantitation, LOQ) ist die kleinste Konzentration einer zu messenden Substanz, die mit einer vorgegebenen Präzision quantitativ bestimmt werden kann. Sie ist in der Regel deutlich höher als die Nachweisgrenze. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie bestimmt. Die mittlere Höhe dieses Signals wird mit 3 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet (Renger et al. 1994). Die Bestimmungsgrenze wird graphisch aus dem unteren Ende der Kalibriergeraden und dem 95 %-Vertrauensbereich ermittelt (Ermer und Kibat 1998, siehe Abb. 3.5). Die statistischen Daten zur Validierung zeigt Tab. 3.2 (Rohdaten siehe Anhang, Kapitel 11.5, S. 147).

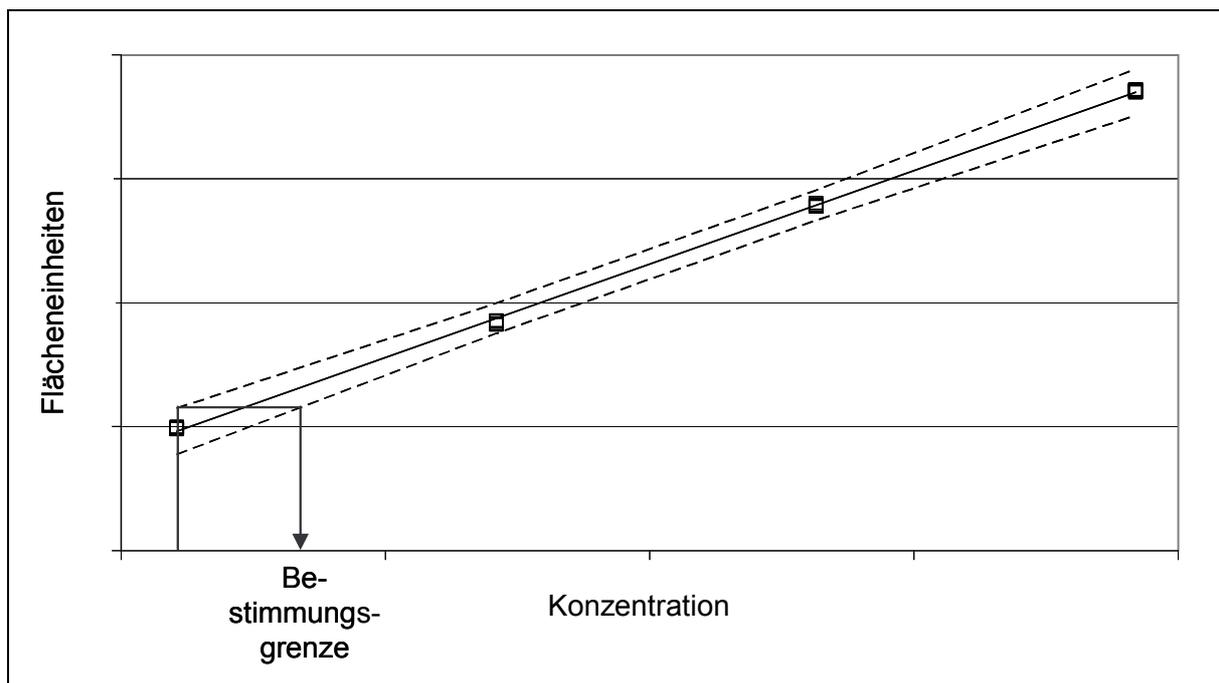


Abb. 3.5 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur graphischen Ermittlung der Bestimmungsgrenze nach Ermer und Kibat (1998)
(—) Regressionsgerade; (-----) Vertrauensbereich

Tab. 3.2 Statistische Daten zur Validierung der GC-Methode von (-)- α -Bisabolol

| Parameter | Soll-Gehalt [%] | Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] | rel. Standardabweichung [%] | Wiederfindungsrate [%] |
|-------------------|-----------------|--|-----------------------------|------------------------|
| Systempräzision | | 8,469 (n = 8) | 0,95 | |
| Methodenpräzision | | ca. 8,9 (n = 18) | 1,35 | |
| Wiederfindung | 90,00 | 7,622 | 0,52 | 99,68 |
| | 109,43 | 9,268 | 0,42 | 103,17 |
| | 118,86 | 10,066 | 2,18 | 100,80 |
| Bestimmungsgrenze | | 0,689 | | |
| Nachweisgrenze | | 2,562 | | |

3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.2.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur quantitativen Bestimmung von Matricin und En-In-Dicycloethern

Die quantitative Bestimmung von Matricin in Kamillenblüten und Kamillenextrakten erfolgt in der Literatur häufig indirekt nach einer Zersetzung zum Abbauprodukt Chamazulen (Vuorela et al. 1989, Saberi 1990). Dabei kann das tiefblaue Chamazulen photometrisch oder gaschromatographisch erfasst werden. Da jedoch keine vollständige Konversion von Matricin zu Chamazulen gegeben ist, liefern diese Methoden zu geringe Matricingehalte (Schmidt et al. 1991). Darüber hinaus ist keine Differenzierung zwischen bereits im Extrakt gebildetem und während der Aufarbeitung entstandenem Chamazulen möglich. Da die Extraktion mit überkritischem CO₂ eine Möglichkeit zur schonenden Herstellung von matricinhaltigen Kamillenextrakten ist, soll die verwendete analytische Methode Matricin direkt und von Chamazulen getrennt erfassen. Die erste Methode zur Bestimmung von Matricin aus einer komplexen Extraktmatrix wird von Ghassemi-Dehkordi (1988) beschrieben. Soyke (1991) und Ness (1995) optimieren sie hinsichtlich Trennleistung und Analysenzeit, die Erfassung und Trennung der beiden isomeren En-In-Dicycloether ist in einem Lauf möglich. Für die flüchtigen Dicycloether ist auch die gaschromatographische Trennung möglich (Reichling und Becker 1977), eine Quantifizierung erscheint jedoch problematisch, da mit Verlusten und Isomerisierungen gerechnet werden muss (Schilcher 1987). Daher ist für diese Substanzen ebenfalls eine HPLC-Methode vorzuziehen.

Die zur Erstellung der Kalibrierung verwendete Matricin-Referenzsubstanz wird von Ness (1995) isoliert. Die DSC-Methode zur Bestimmung des Reinheitsgrades ist derselben Arbeit entnommen und ergibt eine Reinheit von 97,39 % (siehe Abb. 3.6). Die Gehaltsabnahme beträgt nach einer Lagerungsdauer von sieben Jahren bei -30 °C etwa 2 % gegenüber dem von Ness (1995) ermittelten Reinheitsgrad (99,4 %).

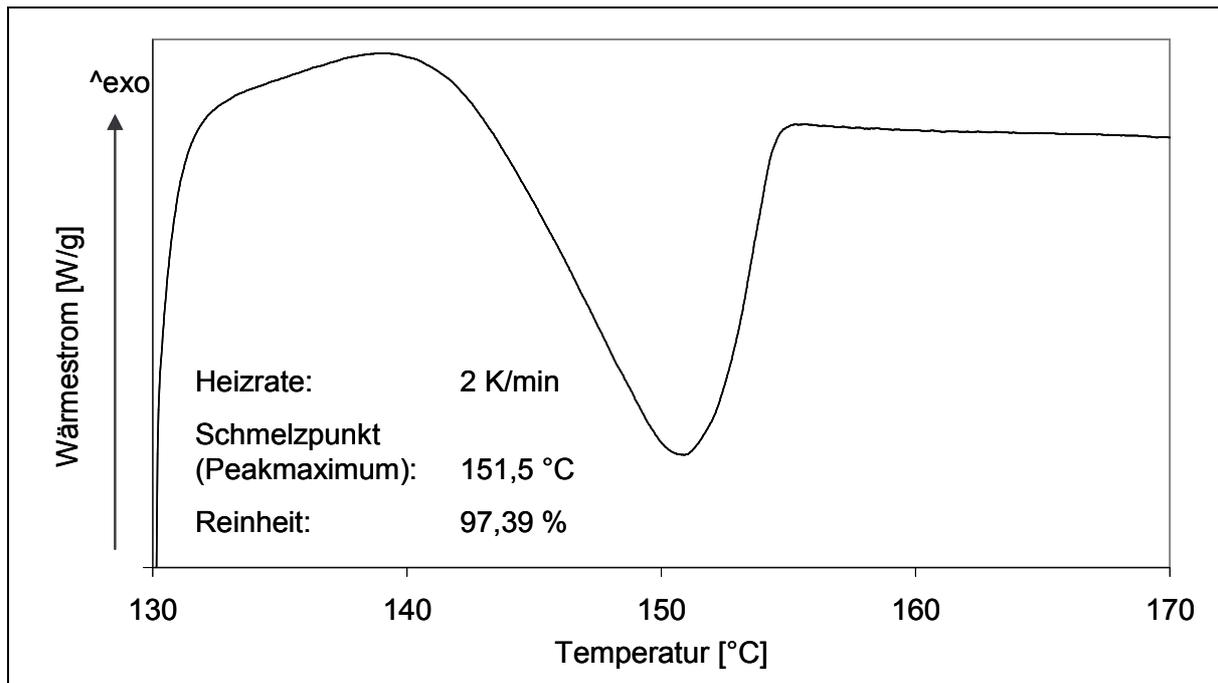


Abb. 3.6 Reinheitsbestimmung von Matricin mittels DSC

Die zur quantitativen Bestimmung angewandte HPLC-Methode entspricht derjenigen, die von Ness (1995) beschrieben wird. Die UV-photometrische Detektion erfolgt bei 244 nm im Absorptionsmaximum von Matricin. Bei dieser Wellenlänge weisen auch die En-In-Dicycloether eine hohe spezifische Absorption auf. Das Probenlösungsmittel ist Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V), welches eine quantitative Extraktion der Inhaltsstoffe ermöglicht und mit dem verwendeten Fließmittel mischbar ist. Ein Beispielchromatogramm ist in Abb. 3.7 abgebildet.

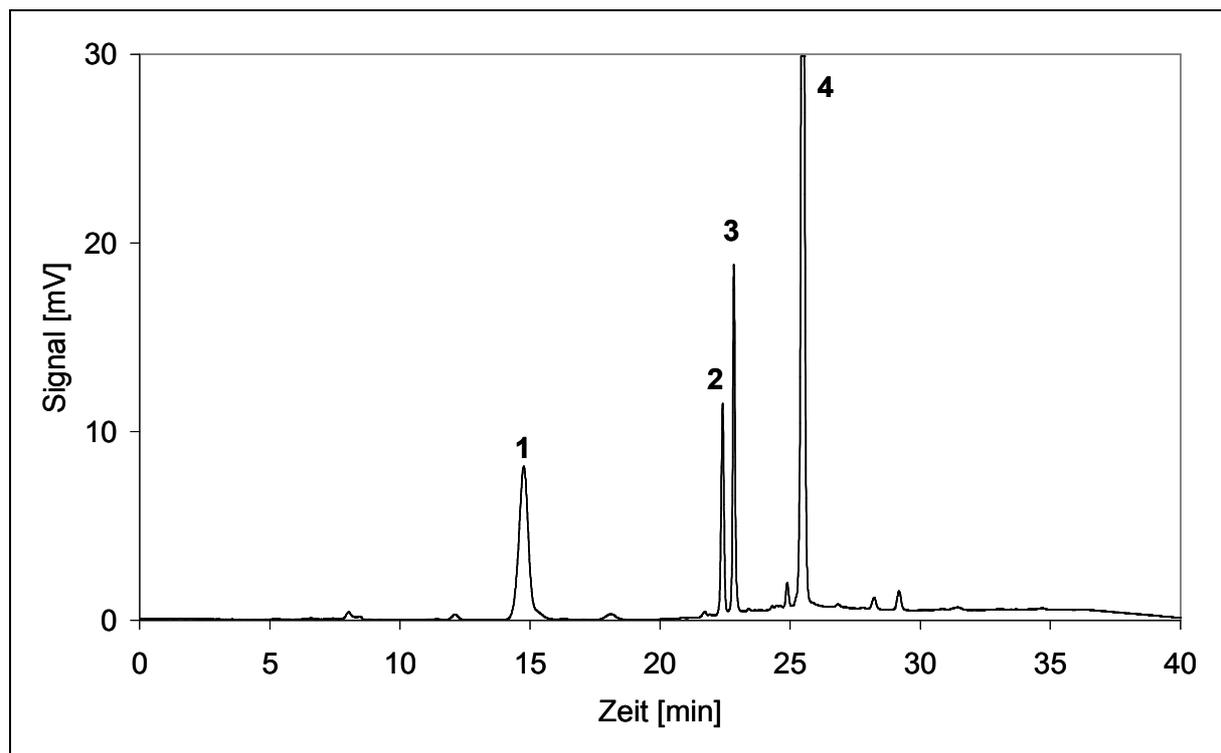


Abb. 3.7 HPLC-Chromatogramm eines CO₂-Extraktes

1 Matricin, 2 Chamazulencarbonsäure, 3 trans-EID, 4 cis-EID

Exemplarisch für dieses Verfahren sind in Abb. 3.8 und Abb. 3.9 die Regressionsgerade und der Residuenplot für Matricin dargestellt. Die Rohdaten der Kalibrierungen für Matricin, cis- und trans-En-In-Dicycloether können dem Anhang (Kapitel 11.1, S. 139 und Kapitel 11.2, S. 142) entnommen werden. Die charakteristischen Kenngrößen der Kalibrierung für Matricin, cis- und trans-En-In-Dicycloether sind in Tab. 3.3 angegeben.

Die Validierung dieser Methode wird wie unter 3.1 beschrieben durchgeführt. Während eine Kalibrierung für alle quantifizierten Substanzen essentiell ist, wird die Verfahrensvalidierung für die En-In-Dicycloether am Beispiel des mengenmäßig dominierenden cis-EID durchgeführt. Die statistischen Daten der Validierung sind in Tab. 3.4 zusammengestellt.

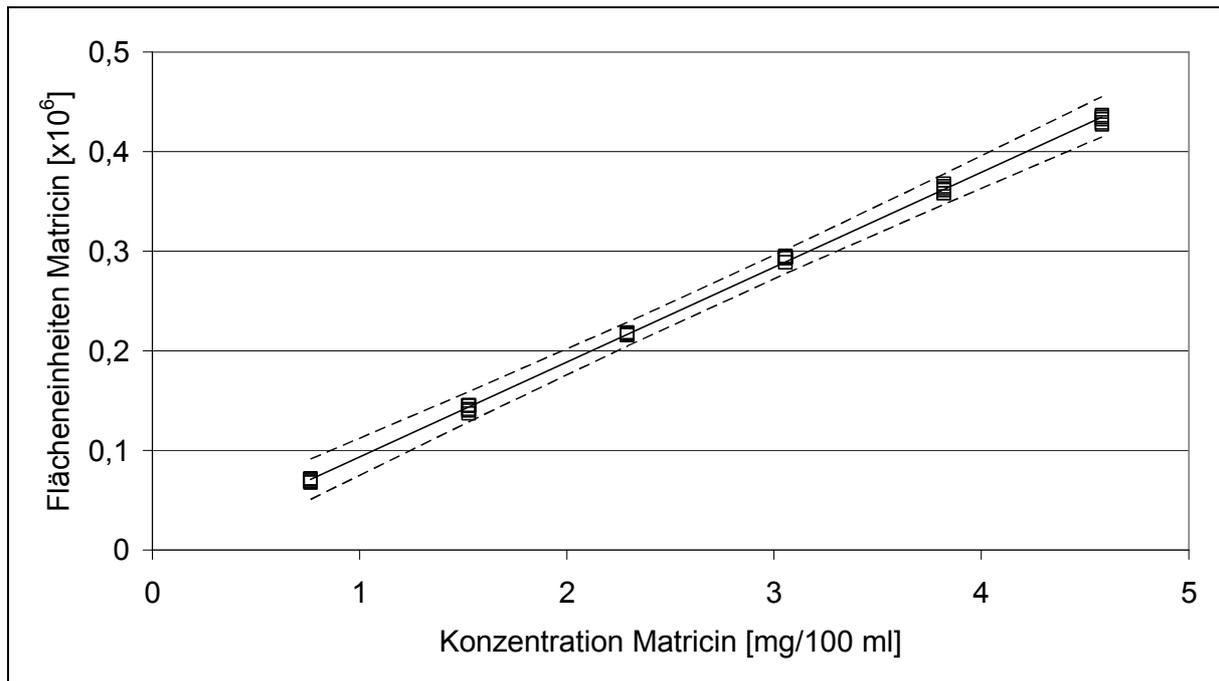


Abb. 3.8 Kalibriergerade für Matricin; (\square) Messwerte; (—) Regressionsgerade; (-----) Vertrauensbereich, um Faktor 10 aufgeweitet

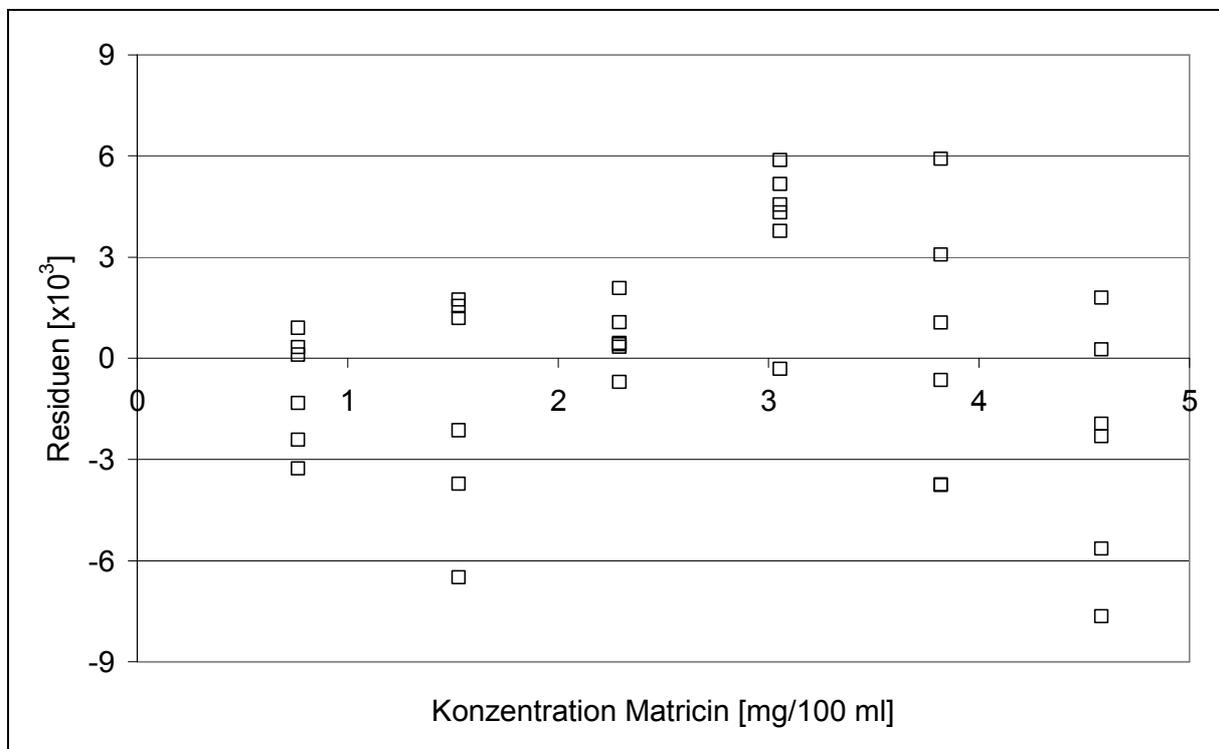


Abb. 3.9 Residuenplot der Kalibrierung für Matricin; (\square) Residuen

Tab. 3.3 Daten der Kalibrierung der HPLC-Methode für Matricin, cis- und trans-En-In-Dicycloether

| Parameter | Matricin | cis-En-In-Dicycloether | trans-En-In-Dicycloether |
|------------------------------|--|--|--|
| Messbereich [mg/100 ml] | 0,7636–4,5816 | 6,7327–33,6637 | 0,9878–4,8936 |
| Anzahl der Messpunkte | 36 | 30 | 30 |
| Datenschwerpunkt | $\bar{x} = 2,6726$ $\bar{y} = 252933$ | $\bar{x} = 20,1982$ $\bar{y} = 1125406$ | $\bar{x} = 2,9361$ $\bar{y} = 152378$ |
| Korrelationskoeffizient | 0,9997 | 0,9990 | 0,9990 |
| Reststandardabweichung | 3364 | 24412 | 3388 |
| Verfahrensstandardabweichung | 0,0353 | 0,4511 | 0,0657 |
| rel. Verfahrensstandardabw. | 1,32 % | 2,23 % | 2,24 % |
| Geradengleichung Matricin | $f(x) = 252933 + 95331(x - 2,6726)$ | | |
| Geradengleichung cis-EID | $f(x) = 1125406 + 54119(x - 20,1982)$ | | |
| Geradengleichung trans-EID | $f(x) = 152378 + 51576(x - 2,9361)$ | | |

Tab. 3.4 Statistische Daten zur Validierung der HPLC-Methode für Matricin und cis-En-In-Dicycloether

| Parameter | Soll-Gehalt [%] | Konzentration [mg/100 ml] | rel. Standardabweichung [%] | Wiederfindungsrate [%] |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Matricin | | | | |
| Systempräzision | | 1,955 (n = 6) | 2,33 | |
| Methodenpräzision | | ca. 3,5 (n = 18) | 5,50 | |
| Wiederfindung | 90,00 | 1,760 | 2,34 | 99,33 |
| | 110,94 | 2,169 | 2,05 | 98,70 |
| | 121,88 | 2,383 | 1,02 | 102,74 |

Tab. 3.4 (Fortsetzung)

| Parameter | Soll-Gehalt [%] | Konzentration [mg/100 ml] | rel. Standardabweichung [%] | Wiederfindungsrate [%] |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|
| cis-EID | | | | |
| Systempräzision | | 9,398 (n = 6) | 1,57 | |
| Methodenpräzision | | ca. 11 (n = 18) | 4,55 | |
| Wiederfindung | 90,00 | 8,458 | 1,30 | 96,99 |
| | 109,87 | 10,326 | 1,05 | 97,92 |
| | 119,75 | 11,254 | 1,15 | 101,55 |

3.2.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur quantitativen Bestimmung von Apigenin und Apigenin-7-glucosid

Die quantitative Bestimmung der wichtigsten Kamillenflavonoide mittels einer HPLC-Gradientenmethode gelingt erstmals Redaelli et al. (1981). Die Trennung von Apigenin, Apigenin-7-glucosid und acetylierten Apigenin-7-glucosiden erfolgt dabei auf einer Umkehrphasensäule mit einer mobilen Phase, die Acetonitril in Wasser (15–60 %) und 2 % Essigsäure enthält. Dölle et al. (1985) vergleichen verschiedene HPLC-Methoden zur Flavonoidbestimmung, wobei als stationäre Phase jeweils C-18-Umkehrphasen und als mobile Phase saure (pH = 2–3) Mischungen aus Wasser, Methanol und Acetonitril eingesetzt werden. Ein Gradientenprogramm ist in allen Fällen notwendig, um sowohl die polaren Glucoside als auch die wesentlich unpolaren Aglyka in akzeptabler Analysenzeit von der Säule zu eluieren.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode entstammt der Arbeit von Vogel (1992). Sie wird bezüglich stationärer und mobiler Phase sowie Flussrate und Detektionswellenlänge übernommen. Um eine bessere Auflösung der Peaks im Bereich der Retentionszeit von Apigenin-7-glucosid zu erreichen, wird die Zusammensetzung der mobilen Phase in diesem isokratischen Teil des Chromatogramms leicht in Richtung zunehmender Hydrophilie verändert; der Wasseranteil im Fließmittelgemisch wird dazu von 75 auf 78 % erhöht. An die Elution der hydrophilen Substanzen, einschließlich Apigenin-7-glucosid (14 min), schließt sich das von Vogel (1992) entwickelte Gradientenprogramm an. Dadurch eluieren zunächst die acetylierten Derivate des Apigenin-7-glucosids (19–20 min), anschließend Apigenin und bei hohen Acetonitrilkonzentrationen verlassen die lipophilen En-In-Dicycloether nach 25–30 min die

Säule. Abb. 3.10 zeigt das Chromatogramm eines Kamillenextraktes auf Basis des beschriebenen Gradientensystems.

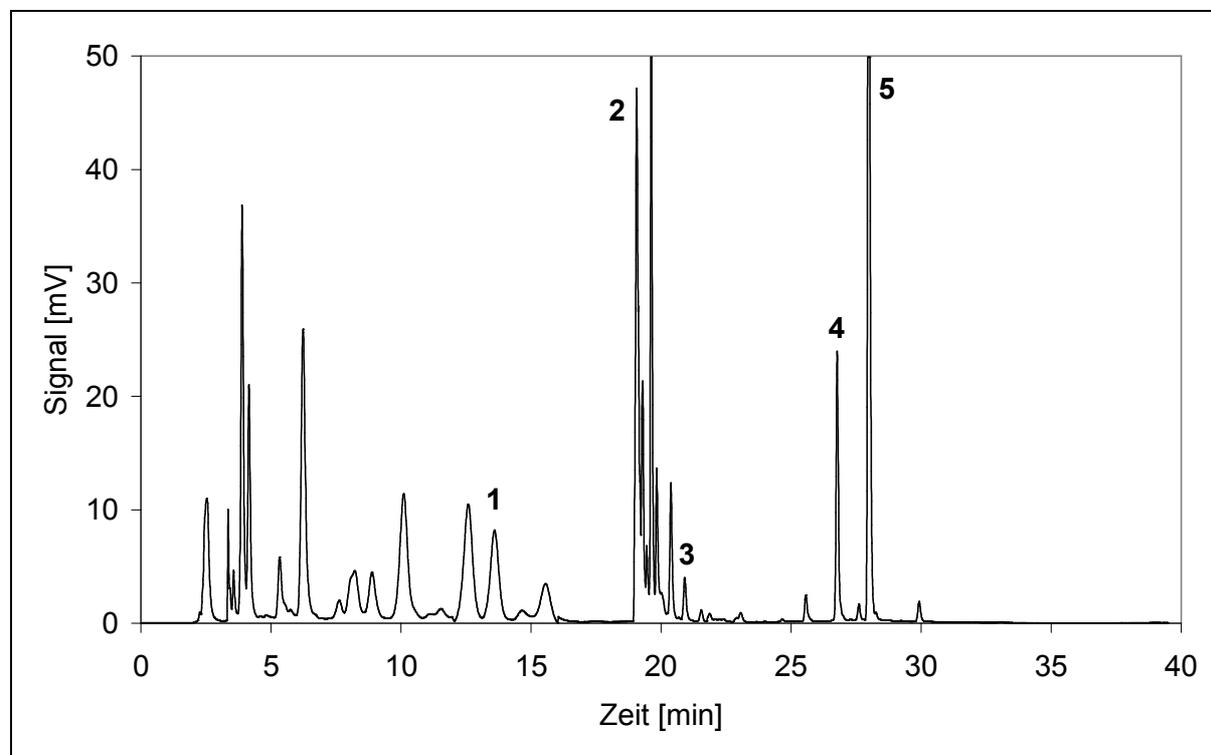


Abb. 3.10 HPLC-Chromatogramm eines Kamillenmazerates;

- 1** Apigenin-7-glucosid, **2** acetylierte Apigenin-7-glucoside (19–20 min),
3 Apigenin, **4** cis-EID, **5** trans-EID

Für Apigenin-7-glucosid und Apigenin wird die Methode kalibriert und für Apigenin-7-glucosid im Hinblick auf Richtigkeit, Systempräzision und Methodenpräzision validiert. Abb. 3.11 und Abb. 3.12 zeigen die Kalibriergerade und den Residuenplot für Apigenin. Die charakteristischen Kenngrößen der Kalibrierung sind in Tab. 3.5 für Apigenin und Apigenin-7-glucosid dargestellt (Rohdaten siehe Anhang, Kapitel 11.3, S. 144 und Kapitel 11.4, S. 146).

Die Validierung wird wie unter 3.1 beschrieben für Apigenin-7-glucosid durchgeführt. Die statistischen Daten zur Validierung dieser HPLC-Methode sind Tab. 3.6 zu entnehmen. Da Apigenin nur in geringer Menge in der Droge und in den Extrakten vorkommt, wird hier eine Kalibrierung im Bereich niedriger Konzentrationswerte durchgeführt, entsprechend werden für diese Substanz Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze ermittelt.

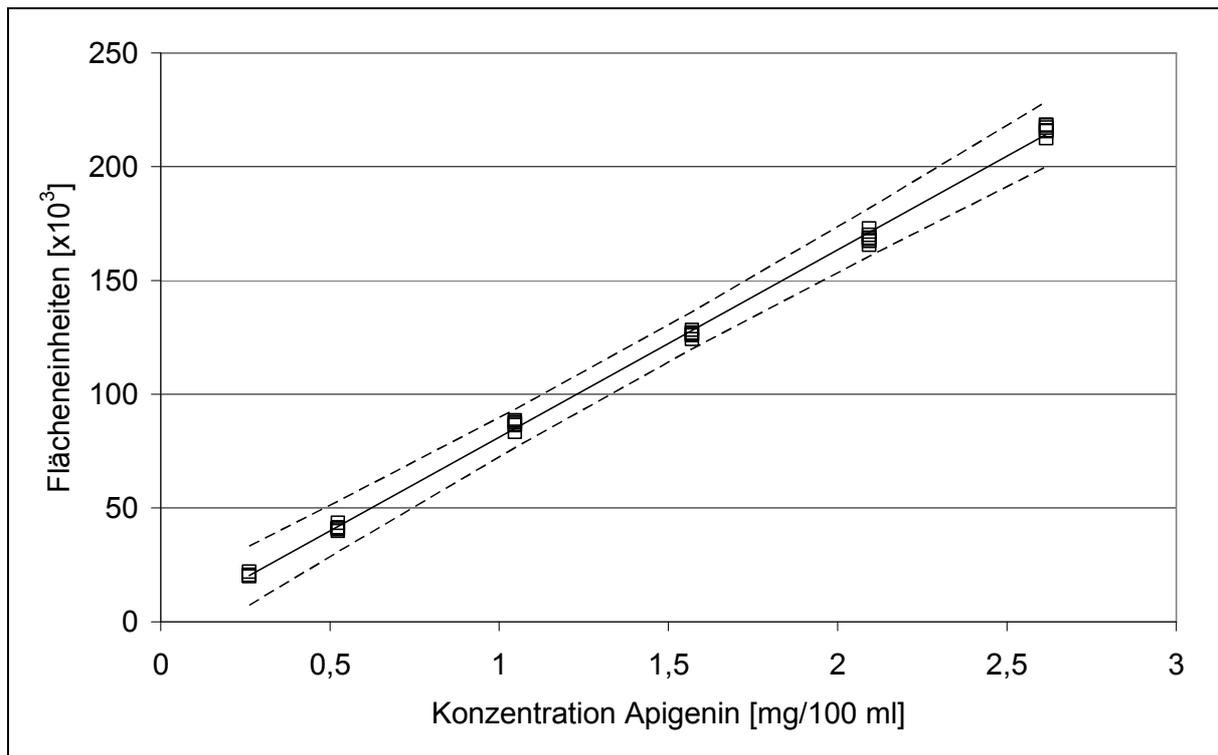


Abb. 3.11 Kalibriergerade für Apigenin; (\square) Messwerte; (—) Regressionsgerade; (-----) Vertrauensbereich, um Faktor 10 aufgeweitet

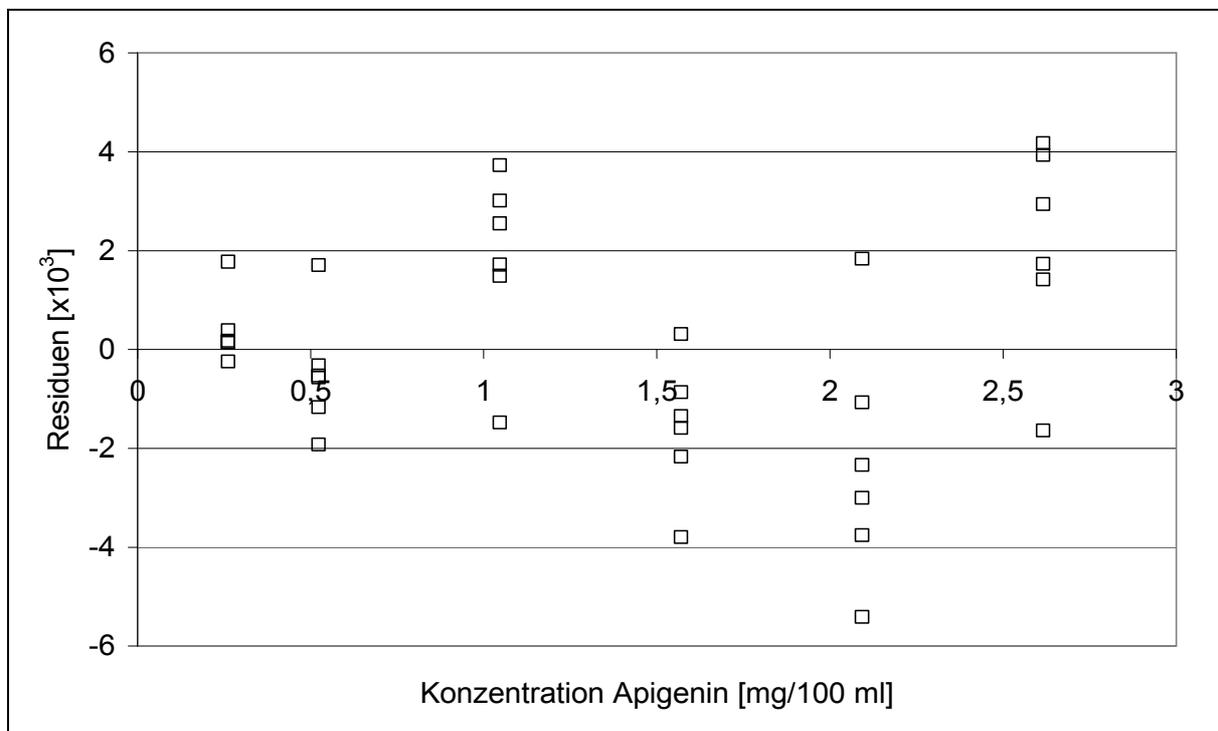


Abb. 3.12 Residuenplot der Kalibrierung für Apigenin; (\square) Residuen

Tab. 3.5 Daten der Kalibrierung der HPLC-Methode für Apigenin und Apigenin-7-glucosid

| Parameter | Apigenin | Apigenin-7-glucosid |
|---------------------------------------|--|--|
| Messbereich [mg/100 ml] | 0,2616–2,6160 | 0,7012–14,0240 |
| Anzahl der Messpunkte | 36 | 30 |
| Datenschwerpunkt | $\bar{x} = 1,3516$ $\bar{y} = 110038$ | $\bar{x} = 7,1522$ $\bar{y} = 206093$ |
| Korrelationskoeffizient | 0,9995 | 0,9993 |
| Reststandardabweichung | 2332 | 5465 |
| Verfahrensstandardabweichung | 0,0283 | 0,1851 |
| relative Verfahrensstandardabweichung | 2,09 % | 2,59 % |
| Geradengleichung Apigenin | $f(x) = 110038 + 82386(x - 1,3516)$ | |
| Geradengleichung Apigenin-7-glucosid | $f(x) = 206093 + 29525(x - 7,1522)$ | |

Tab. 3.6 Statistische Daten zur Validierung der HPLC-Methode von Apigenin-7-glucosid und Apigenin

| Parameter | Soll-Gehalt [%] | Konzentration [mg/100 ml] | rel. Standardabweichung [%] | Wiederfindungsrate [%] |
|----------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Apigenin-7-glucosid | | | | |
| Systempräzision | | 11,885 (n = 6) | 0,54 | |
| Methodenpräzision | | ca. 9 (n = 18) | 3,53 | |
| Wiederfindung | 90,00 | 10,697 | 1,94 | 98,34 |
| | 116,12 | 13,801 | 1,96 | 99,09 |
| | 132,25 | 15,718 | 1,81 | 98,87 |
| Apigenin | | | | |
| Bestimmungsgrenze | 0,2503 mg/100 ml | | | |
| Nachweisgrenze | 0,9343 mg/100 ml | | | |

Kapitel 4

Extraktion von Kamillenblüten mit überkritischem Kohlendioxid

4.1 Literaturüberblick

Die Extraktion von Kamillenblüten mit überkritischem CO₂ wird erstmals von Stahl und Schilz (1976) beschrieben. Die Untersuchungen im analytischen Maßstab zeigen eine gute Löslichkeit von Terpenkohlenwasserstoffen, En-In-Dicycloethern, (-)- α -Bisabolol, Herniarin und Matricin in überkritischem CO₂ bei niedrigen Drücken (70–100 bar). Die Extraktionstemperatur von 40 °C erlaubt die Gewinnung eines Kamillenextraktes, der die lipophilen Inhaltsstoffe in genuiner Form enthält. Die Bestimmung erfolgt halb-quantitativ durch Vergleich der Bandenintensitäten nach einer Dünnschichtchromatographie. In weiteren Arbeiten im präparativen Maßstab, bei denen neben CO₂ auch Distickstoffoxid (N₂O) als überkritisches Gas zum Einsatz kommt, wird der Einfluss der Verfahrensparameter Druck, Durchflussmenge und Gasart auf Ausbeute und Gehalt an Matricin, Bisaboloiden und En-In-Dicycloethern im Extrakt untersucht (Stahl und Schütz 1978). Matricin wird als Chamazulen bestimmt, somit ist keine Aussage über das Ausmaß einer Zersetzung während oder nach der Extraktion möglich. Obwohl mit N₂O höhere Gesamtextraktausbeuten erzielt werden, bleibt die extrahierte Menge an relevanten Inhaltsstoffen gleich. Die Ausbeutesteigerung ist demzufolge auf eine verstärkte Extraktion von Begleitstoffen zurückzuführen. Stahl et al. melden 1978 unter der Überschrift „Verfahren zur Extraktion von Kamille mit überkritischen Gasen“ ein Patent an, das sowohl die fraktionierte Extraktion als auch die fraktionierte Abscheidung in verschiedenen Druckstufen umfasst. Ein weiteres Patent beinhaltet zusätzlich die Extraktion von Kamillenblüten mit flüssigem CO₂ (Behr et al. 1982). Die Herstellung eines Kamillen-Gesamtextraktes, der sowohl lipophile als auch hydrophile Inhaltsstoffe beinhaltet, wird als dreistufiges Verfahren beschrieben, indem zunächst eine CO₂-Extraktion durchgeführt wird, dann mittels Autofermentation die Hydrolyse von Flavonoid-Glykosiden im Drogenrückstand erfolgt und anschließend die Flavonoid-Aglyka durch eine Lösungsmittlextraktion gewonnen werden. Durch Kombination des lipophilen CO₂-Extraktes und des hydrophilen Extraktes resultiert ein Gesamtextrakt (Mauz und Hempel 1997).

Vuorela et al. (1990) extrahieren verschiedene Chemotypen der Kamille mit überkritischem CO₂ bei 40 °C und 200 bar und analysieren diese Extrakte mittels Headspace-Gaschromatographie. Chamazulen, das als Zersetzungsprodukt des Matricins während der Gaschromatographie entsteht, wird nur in Spuren in den Extrakten nachgewiesen. Die Hauptbestandtei-

le der Ätherisch-Öl-Fraktion in den Kamillenblüten sowie im CO₂-Extrakt sind in Abhängigkeit vom Chemotyp (-)- α -Bisabolol bzw. Bisabololoxid A.

Reverchon und Senatore (1994) gelingt die Trennung des ätherischen Öls von co-extrahierten Cuticularalkanen durch fraktionierte Abscheidung bei 0 °C und 90 bar in der 1. Abscheidestufe und -5 °C und 30 bar in der 2. Stufe. Hierbei nutzen sie die Tatsache, dass die Löslichkeit von Ätherisch-Öl-Komponenten bei tiefen Temperaturen und entsprechend hohen Dichten stark zunimmt, während die Löslichkeit der nicht-flüchtigen Alkane bei diesen Bedingungen um eine Zehnerpotenz gegenüber den Extraktionsbedingungen verringert ist (Stahl et al. 1983).

Untersuchungen im analytischen und präparativen Maßstab werden von Scalia et al. (1999) durchgeführt. Dabei liegen die bei der CO₂-Extraktion erzielten Ausbeuten 4,4-mal höher als die der Wasserdampfdestillation, was teilweise durch die Co-Extraktion von höhermolekularen Kohlenwasserstoffen (wachsartige Substanzen) bedingt ist. Eine Zersetzung von Matricin zu Chamazulen wird durch optische Beurteilung aufgrund der gelben Farbe des Extraktes ausgeschlossen. Die quantitative Bestimmung von Matricin erfolgt mittels Gaschromatographie nach Konversion zu Chamazulen, auf die Problematik dieser Methode wurde bereits in Kapitel 3.2.1 (S. 23) hingewiesen. Erstmals wird auch die Extrahierbarkeit der Flavonoide Apigenin und Apigenin-7-glucosid untersucht. Bei 40 °C und 200 bar betragen die im analytischen Maßstab erzielten Ausbeuten 71,4 % bzw. 0,8 % für Apigenin und Apigenin-7-glucosid. Im präparativen Maßstab werden 56,1 % bzw. 0,5 % der Ausbeuten einer Soxhlet-Extraktion erreicht. Eine Temperaturerhöhung auf 50 °C oder eine Druckerhöhung auf 400 bar bringen keine Verbesserung der Extraktionsergebnisse. Die Zugabe von 5 % Methanol (V/V) als Schlepplmittel wird nur im analytischen Maßstab untersucht. Dadurch lassen sich die Ausbeuten auf 143,3 % bzw. 14,6 % für Apigenin und Apigenin-7-glucosid steigern.

Zekovic (2000) findet eine „schlechte Löslichkeit“ von Apigenin und „Unlöslichkeit“ von Apigenin-7-glucosid in überkritischem CO₂ bei 40 °C in einem Druckbereich von 80–260 bar. Er nutzt die überkritische CO₂-Extraktion zur Abtrennung der flüchtigen Extraktbestandteile, um im Drogenrückstand nach enzymatischer Fermentation das spasmolytisch stärker wirksame Apigenin (Achterrath-Tuckermann et al. 1980) gegenüber Apigenin-7-glucosid anzureichern.

Die Kinetik des Extraktionsprozesses von Kamillenblüten wird von Pekic et al. (1994) in Abhängigkeit vom Zerkleinerungsgrad der Droge bei 40 °C und 80 bar im Labormaßstab untersucht. Die experimentell ermittelten Parameter zur Beschreibung der kinetischen Extraktionskurven weisen eine gute Übereinstimmung mit berechneten Werten aus Modellgleichungen auf. Die Zerkleinerung der Droge bewirkt eine signifikante Steigerung der Extrakt-

ausbeute bei gleich bleibendem Gehalt an ätherischem Öl. Dies steht in Widerspruch zu den Annahmen von Stahl und Schütz (1978), die aufgrund der Lokalisation der lipophilen Wirkstoffe in subepidermalen Drüsen keine Notwendigkeit für eine Zerkleinerung sehen. In weiteren Arbeiten leiten Pekic et al. (1995a, b) anhand experimenteller Daten Regressionsgleichungen zur Berechnung der Extraktausbeute bzw. der Ausbeute an (-)- α -Bisabolol und Bisabololoxiden in Abhängigkeit von Extraktionsdruck (80–160 bar) und Extraktionstemperatur (40–80 °C) ab. Die Ausbeuten an ätherischem Öl liegen in Abhängigkeit vom Extraktionsdruck bis zu 2,2-mal höher als bei Wasserdampfdestillaten. Dies wird auf das Löslichkeitsverhalten höhermolekularer, wachsartiger Substanzen zurückgeführt, die ebenfalls in Kamillenblüten enthalten sind. Diese enthalten ätherisches Öl in teilweise gelöstem Zustand, das einer Wasserdampfdestillation nicht zugänglich ist und mittels überkritischem CO₂ bei höheren Drücken zusammen mit den schwerer löslichen lipophilen Substanzen extrahiert wird.

Zur Vorhersage der Gesamtlöslichkeit von Inhaltsstoffen der Kamille in überkritischem CO₂ im Temperaturbereich von 40 bis 80 °C bei Drücken zwischen 80 und 160 bar wenden Tolic et al. (1996) die Chrastil-Gleichung an (Chrastil 1982, Gl. 4.1). Die Auftragung des Logarithmus der experimentell bestimmten Löslichkeit über dem Logarithmus der Dichte des CO₂ ergibt annähernd lineare Zusammenhänge und damit eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Ergebnissen. Pekic et al. (1997) stellen quantitative Zusammenhänge zwischen der Gesamtextraktausbeute und der eingesetzten Menge an CO₂ auf und verifizieren diese anhand experimenteller Daten.

$$\ln(S) = \frac{a}{T} + b + k \cdot \ln(d) \quad (4.1)$$

| | |
|-----|---|
| S | Löslichkeit einer Substanz |
| T | Temperatur |
| d | Dichte des Lösungsmittels |
| k | Anzahl Lösungsmittelmoleküle zur Solvatation eines Substanz-Moleküls |
| a | $\frac{\Delta H}{R}$, mit ΔH = Lösungswärme + Verdampfungswärme der Substanz |
| b | Konstante in Abhängigkeit der Molekulargewichte von Substanz und Lösungsmittel |

Der Ansatz von Povh et al. (2001) zur mathematischen Beschreibung des Extraktionsverlaufes hinsichtlich der Zeitabhängigkeit der Gesamtausbeute beinhaltet die Unterteilung in drei Extraktionsphasen. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch eine konstante, hohe Extraktionsgeschwindigkeit, während der zweiten Phase sinkt die Extraktionsgeschwindigkeit, die

dritte Phase repräsentiert ausschließlich diffusionskontrollierte Extraktionsvorgänge und weist die geringste Extraktionsgeschwindigkeit auf. Jede Phase wird durch einen linearen Zusammenhang zwischen Extraktausbeute und Extraktionszeit beschrieben.

4.2 Optimierung der Extraktionsparameter

Selektivität und Ausbeute einer CO₂-Extraktion können durch Variation verschiedener Extraktionsparameter optimiert werden (Abb. 4.1). Dabei muss ein Kompromiss zwischen einer hohen Anreicherung pharmakologisch wertvoller Inhaltsstoffe, einer akzeptablen Ausbeute dieser Substanzen und der Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses gefunden werden. Da eine Erhöhung der Extraktionstemperatur zu Verlusten an flüchtigen oder hitzelabilen Inhaltsstoffen führt, sowie die Dichte des CO₂ und damit seine Lösungskapazität senkt, wird die Extraktionstemperatur bei 40 °C konstant belassen. Nach unten ist die Extraktionstemperatur durch die kritische Temperatur von 31 °C begrenzt. Die Optimierung wird anhand von ausgewählten, stabilen Leitsubstanzen des ätherischen Kamillenöls bzw. der Alkane als Vertreter der Cuticularwachse durchgeführt. Auf die Problematik der Instabilität bestimmter Inhaltsstoffe wird in den Kapiteln 4.3 und 6 gesondert eingegangen. Die eingesetzte Droge der Sorte Mabamille (Ernte 1999) wird geschnitten geliefert und eingesetzt. Die erhaltenen Extrakte werden im Exsikkator bei Raumtemperatur unter Lichtschutz bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

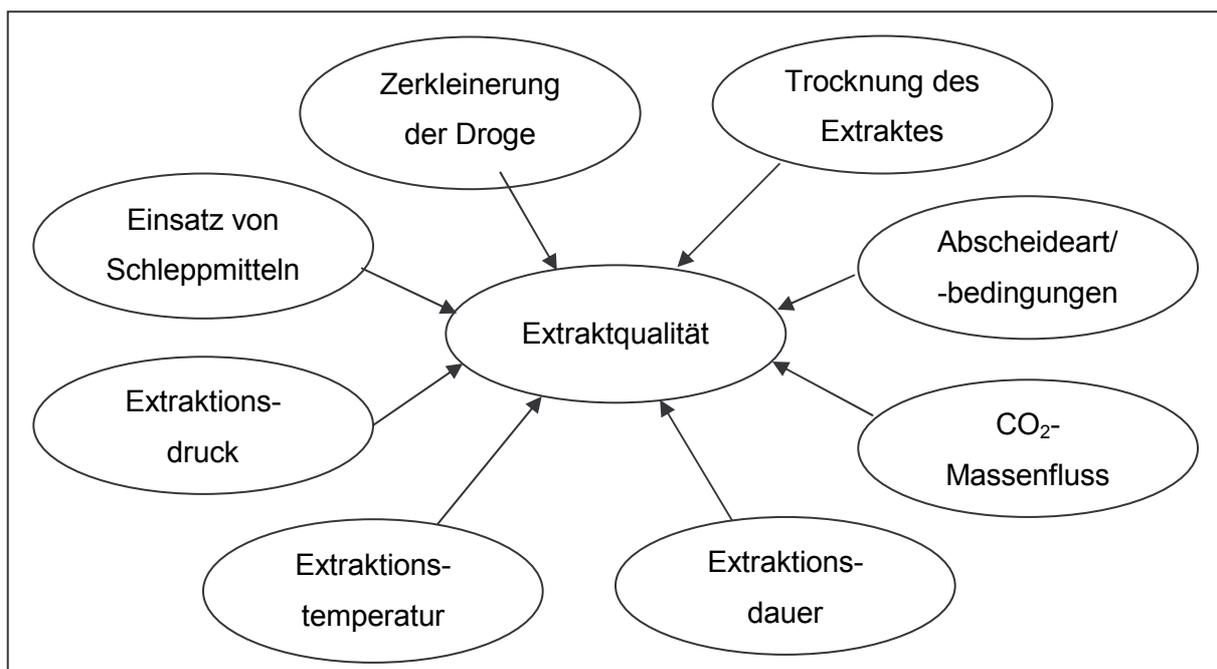


Abb. 4.1 Einflussgrößen auf die Extraktqualität bei einer CO₂-Extraktion

4.2.1 Extraktionsdruck

Der Einfluss des Extraktionsdruckes wird bei 90, 150 und 200 bar untersucht. Unter diesen Bedingungen resultieren CO_2 -Dichten von 490, 780 und 840 kg/m^3 . Abb. 4.2 zeigt den Gehalt an Kamilleninhaltsstoffen im CO_2 -Extrakt sowie die Gesamtextraktausbeute in Prozent bezogen auf die Einwaage an Drogenmaterial. Für Bestandteile des ätherischen Kamillenöls (β -Farnesen, (-)- α -Bisabolol, Bisabololoxide, En-In-Dicycloether) sowie für das C_{25} -n-Alkan als Vertreter der Cuticularalkane findet bei einer Druckerhöhung auf 150 bar eine drastische Abnahme des Gehaltes an Inhaltsstoffen im Extrakt auf 60–70 % des Gehaltes eines bei 90 bar hergestellten Extraktes statt. Ausgehend von einem Extraktionsdruck von 150 bar bewirkt eine weitere Druckerhöhung auf 200 bar nur noch eine geringfügige Gehaltsabnahme, die zwischen 5 und 10 % liegt.

Die Gesamtextraktausbeute weist ein entgegengesetztes Verhalten bei Drucksteigerung auf. Während bei 90 bar Ausbeuten von etwa 0,9 % erzielt werden, verdoppeln sich diese annähernd auf 1,7 bzw. 1,75 % bei 150 bzw. 200 bar.

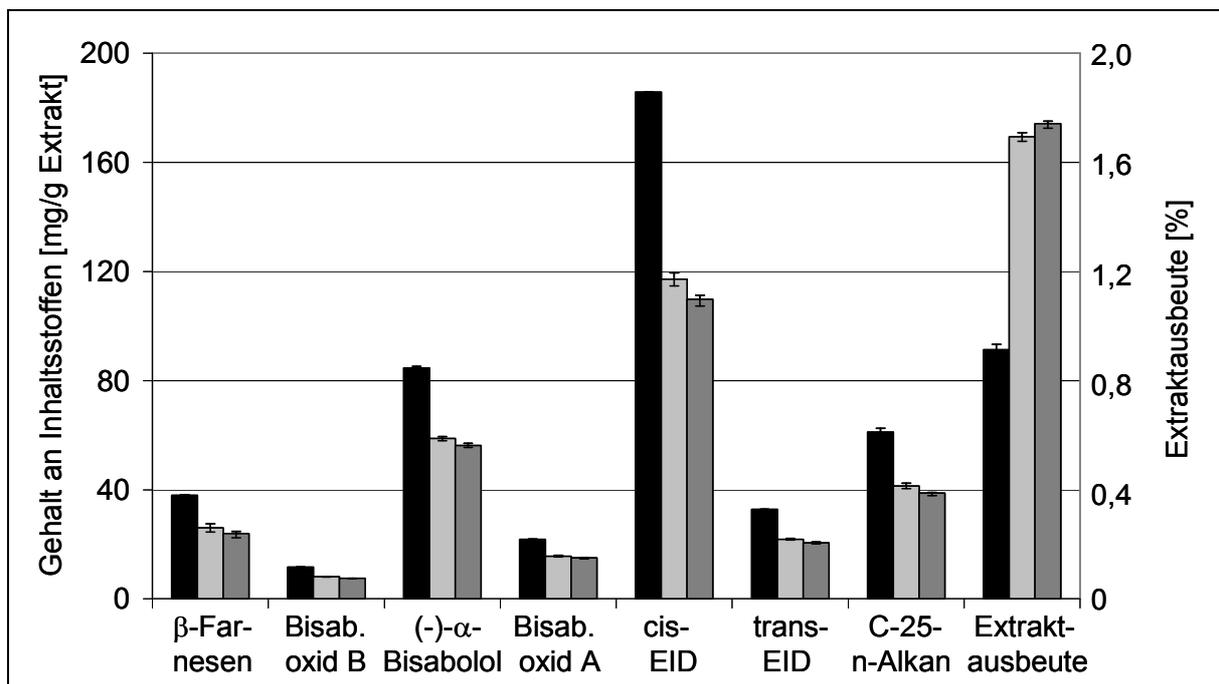


Abb. 4.2 Gehalt an Kamilleninhaltsstoffen im CO_2 -Extrakt und Extraktausbeute in Abhängigkeit vom Extraktionsdruck; Bedingungen: 40 °C, 3 h, 8 $\text{kg CO}_2/\text{h}$, Trocknung im Exsikkator; (■) 90 bar, (□) 150 bar, (▣) 200 bar; Fehlerbalken = Spannweite (n = 2)

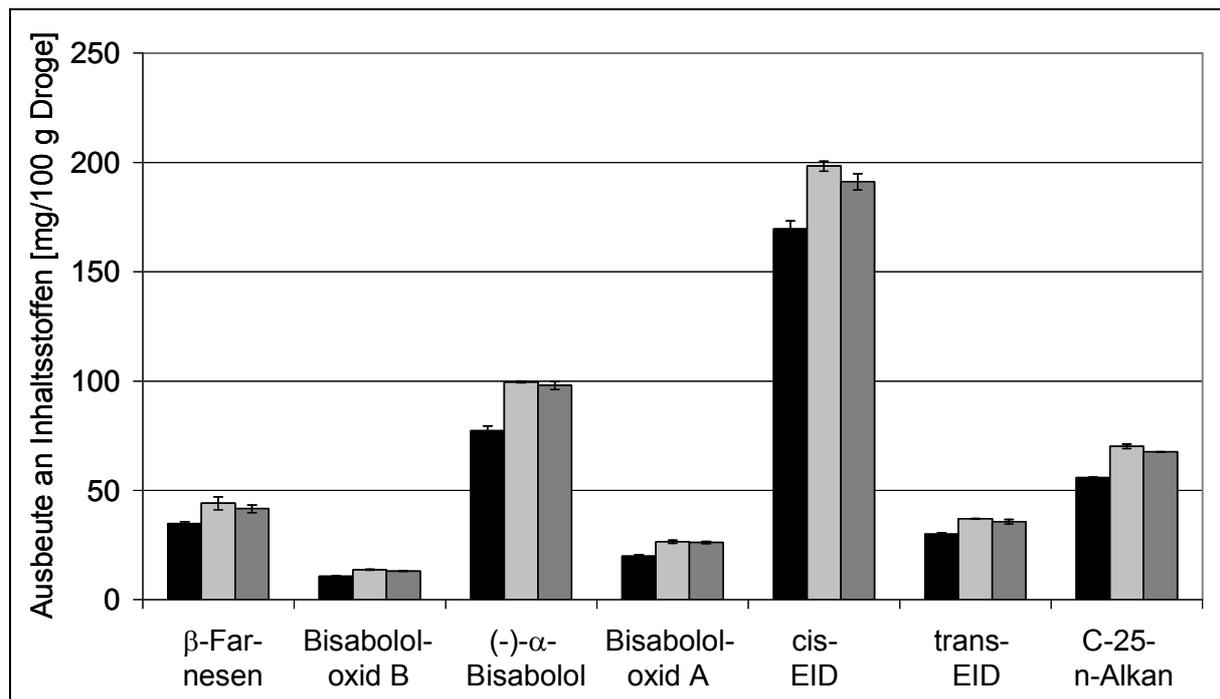


Abb. 4.3 Ausbeute an Kamilleninhaltsstoffen aus 100 g Droge (40 °C, 3 h, 8 kg CO₂/h); (■) 90 bar, (□) 150 bar, (▒) 200 bar; Fehlerbalken = Spannweite (n = 2)

Um beurteilen zu können, inwieweit durch eine Druckerhöhung auch die Ausbeute an relevanten Inhaltsstoffen verbessert wird, sind in Abb. 4.3 die aus Gehalt im Extrakt und Gesamtextraktausbeute gemäß Gl. 4.2 berechneten Ausbeuten der Inhaltsstoffe dargestellt.

$$\text{Ausbeute Inhaltsstoff [mg/100 g Droge]} = \text{Gehalt Inhaltsstoff [mg/g Extrakt]} * \text{Extraktausbeute [g Extrakt/100 g Droge]} \quad (4.2)$$

Die beobachtete Zunahme der Inhaltsstoff-Ausbeute beträgt zwischen 15 und 25 % bei Druckerhöhung auf 150 bar, die Extraktion bei 200 bar bringt dagegen keine weitergehende Steigerung der Ausbeuten.

4.2.2 Extraktionsdauer

Die Extraktionsdauer bestimmt bei konstantem CO₂-Massenfluss das Droge/Lösungsmittel-Verhältnis der Extraktion. Es beträgt bei einer Extraktionsdauer von 1 h, einem Massenfluss von 8 kg CO₂/h und einer Drogeneinwaage von 0,2 kg Kamillenblüten 1:40, entsprechend erhöht es sich bei längerer Extraktion auf 1:120 (3 h), 1:200 (5 h) und 1:280 (7 h).

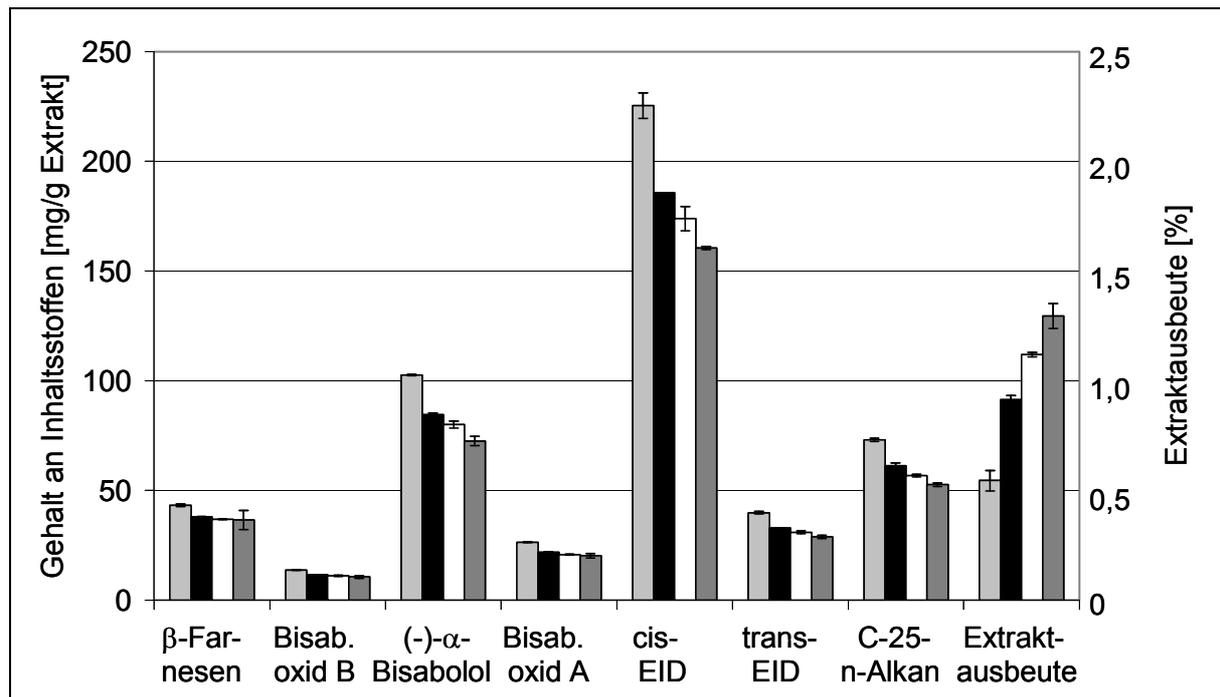


Abb. 4.4 Gehalt an Kamilleninhaltsstoffen im CO_2 -Extrakt (40 °C, 90 bar, 8 kg CO_2/h) und Extraktausbeute in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer;
 (□) 1 h, (■) 3 h, (□) 5 h, (■) 7 h; Fehlerbalken = Spannweite (n = 2)

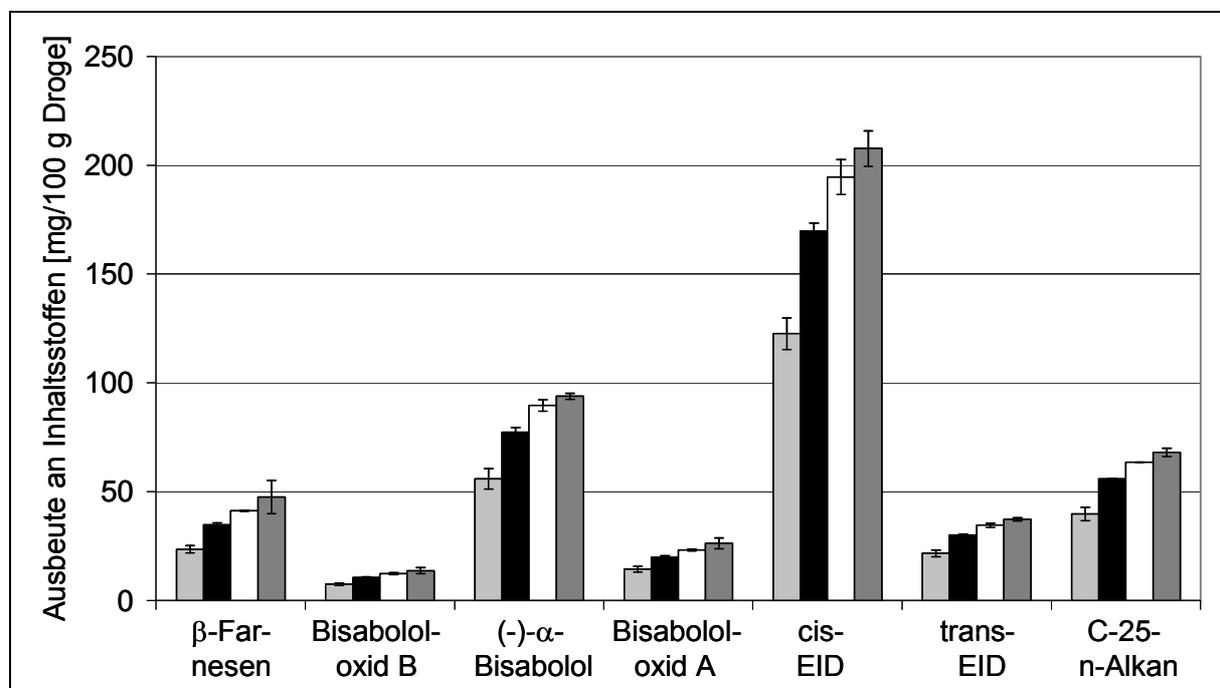


Abb. 4.5 Ausbeute an Kamilleninhaltsstoffen aus 100 g Droge (40 °C, 90 bar, 8 kg CO_2/h);
 (□) 1 h, (■) 3 h, (□) 5 h, (■) 7 h; Fehlerbalken = Spannweite (n = 2)

In Abb. 4.4 ist der Einfluss der Extraktionsdauer und damit des Droge/Lösungsmittel-Verhältnisses auf den Gehalt an Inhaltsstoffen im Extrakt sowie auf die Gesamtextraktausbeute dargestellt. Analog den Beobachtungen, die bei einer Druckerhöhung (siehe 4.2.1) gemacht werden, findet bei Verlängerung der Extraktionsdauer eine Abnahme der Extraktgehalte bei gleichzeitiger Zunahme der Extraktausbeuten statt. Es resultieren bei einer Verlängerung von 1 h auf 3 h zwischen 10 und 20 % geringere Gehalte im Extrakt, wobei die Gesamtextraktausbeute um knapp 70 % steigt. Die Verlängerung der Extraktionsdauer auf 5 h bzw. 7 h hat eine weitere Abnahme der Gehalte im Extrakt bei gleichzeitiger Steigerung der Gesamtextraktausbeute zur Folge. Diese Veränderungen sind aber mit zunehmender Extraktionsdauer deutlich schwächer ausgeprägt. Die Abnahme der Extraktgehalte beträgt jeweils ca. 5 %, die Zunahme der Extraktausbeute liegt bei je ca. 40 %.

Abb. 4.5 zeigt die gemäß Gl. 4.2 berechneten Ausbeuten der Kamilleninhaltsstoffe in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer. Die Verlängerung der Extraktionszeit um jeweils 2 h bewirkt eine Ausbeutesteigerung, die jedoch mit zunehmender Extraktionszeit geringer ausfällt. Eine 7-stündige Extraktion liefert ähnliche Ausbeuten an Kamilleninhaltsstoffen wie sie durch eine Druckerhöhung auf 150 bzw. 200 bar erzielt werden, ein vergleichbarer Grad an Erschöpfung des Drogenmaterials wird erreicht (siehe Abb. 4.3).

4.2.3 CO₂-Massenfluss

Die Untersuchung von Extraktzusammensetzung und –ausbeute unter dem Einfluss verschiedener CO₂-Flussraten erlaubt Aussagen über das Massentransferverhalten der Kamilleninhaltsstoffe. So benötigen langsame Diffusionsprozesse geringere Flussraten, um eine Gleichgewichtseinstellung zu erreichen, als schnelle Auswaschprozesse. Um die unter 4.2.2 geschilderten Einflüsse auszuschließen, wird die Gesamtmenge CO₂ bei 24 kg konstant gehalten. Entsprechend variiert die Extraktionsdauer zwischen 1 h bei einer Flussrate von 12 kg/h und 6 h bei einer Flussrate von 4 kg/h. Eine 2-stündige stationäre Zwischenmazeration unter Druck ohne CO₂-Durchfluss soll den Nutzen eines Quellungsvorganges zur Beschleunigung des Massentransfers untersuchen.

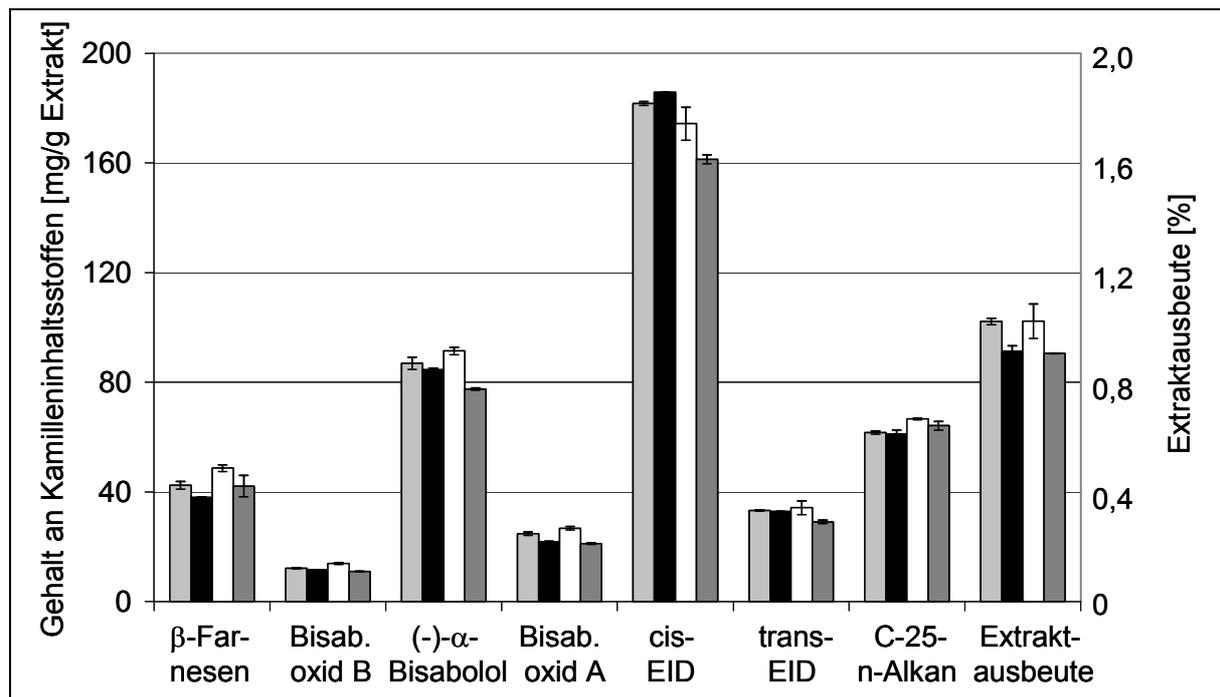


Abb. 4.6 Gehalt an Kamilleninhaltsstoffen im CO_2 -Extrakt (40 °C, 90 bar) und Extraktausbeute in Abhängigkeit vom CO_2 -Massenfluss; (■) 4 kg/h, 6 h; (■) 8 kg/h, 3 h; (□) 8 kg/h, 3 h, 2 h stationäre Zwischenmazeration, (■) 12 kg/h, 2 h; Fehlerbalken = Spannweite (n = 2)

Abb. 4.6 zeigt den Einfluss des CO_2 -Massenflusses auf den Gehalt an Inhaltsstoffen im Extrakt sowie auf die Gesamtextraktausbeute, in Abb. 4.7 sind die Ausbeuten der Kamilleninhaltsstoffe nach Gl. 4.2 dargestellt. Verglichen mit den Referenzbedingungen (8 kg/h, 3 h) werden durch geringere Flussraten sowie durch stationäre Zwischenmazeration höhere Ausbeuten an Kamilleninhaltsstoffen erzielt, die bei ähnlichen Gehalten im Extrakt auf höhere Gesamtextraktausbeuten zurückzuführen sind. Die Ausbeutesteigerung liegt zwischen 5 und 30 %, wobei eine Verlängerung der Prozesszeit von 3 h auf 5 h (Zwischenmazeration) bzw. 6 h (4 kg CO_2 /h) notwendig ist. Hohe CO_2 -Durchflussraten von 12 kg/h und damit einhergehend kürzere Prozesszeiten (2 h) führen für (-)- α -Bisabolol und cis-EID zu 10–15 % geringeren Ausbeuten, für die anderen Inhaltsstoffe ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

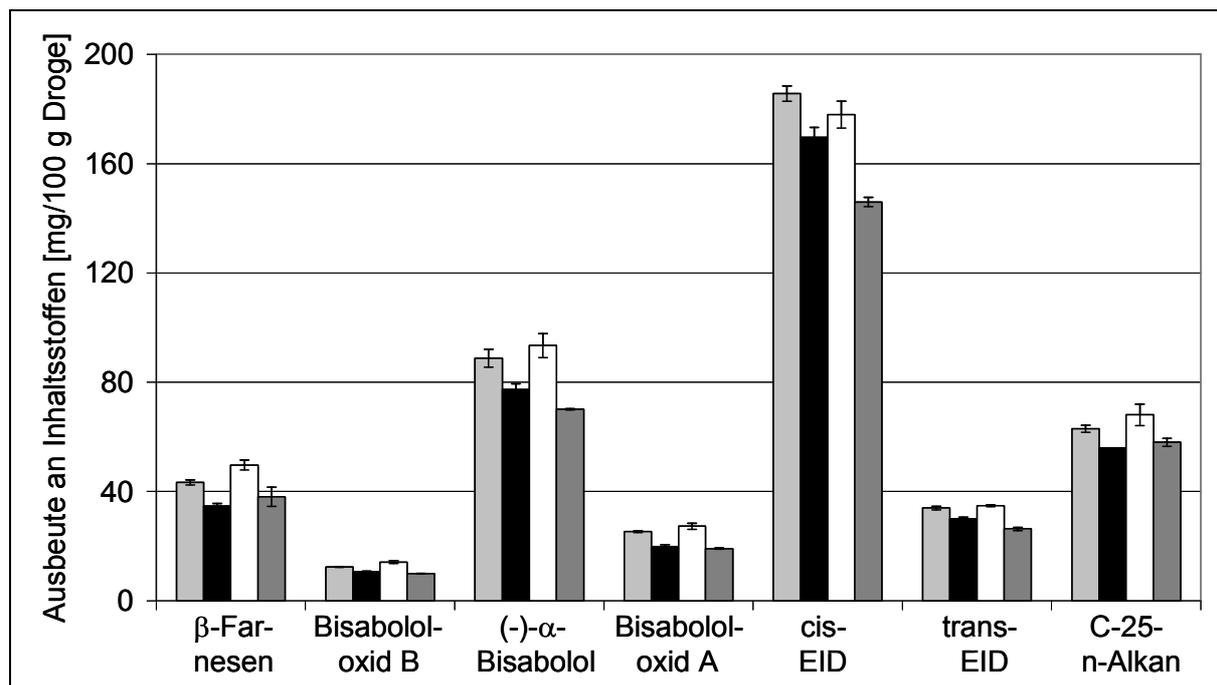


Abb. 4.7 Ausbeute an Kamilleninhaltsstoffen aus 100 g Droge (40 °C, 90 bar) in Abhängigkeit vom CO₂-Massenfluss; (□) 4 kg/h, 6 h; (■) 8 kg/h, 3 h; (□) 8 kg/h, 3 h, 2 h stationäre Zwischenmazeration, (■) 12 kg/h, 2 h; Fehlerbalken = Spannweite (n = 2)

4.2.4 Weitere Einflussparameter: Geschwindigkeit der Entspannung des Abscheidebehälters und Art der Trocknung der Extrakte

Im Anschluss an die Extraktion folgen weitere Prozessschritte, die Einfluss auf die Extraktqualität haben können. Im Endabscheidebehälter liegt während der Extraktion flüssiges CO₂ vor, welches den ankommenden Extrakt aufnimmt und nach Beendigung der Extraktion vom Abscheidedruck (40 bar) auf Normaldruck entspannt werden muss. Dabei erfolgt nach Öffnung des Ablassventiles eine schnelle Ausdehnung von ca. 0,5 l Flüssigkeit auf 250 l Gas, wobei das gasförmige CO₂ gemäß dem Druckgradienten mit hoher Geschwindigkeit den Abscheidebehälter verlässt. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass im flüssigen CO₂ gelöste Substanzen durch den Gasstrom mitgerissen werden und demzufolge Verluste auftreten. Über manuelle Einstellung eines geeigneten Öffnungsgrades des Ablassventiles kann die Geschwindigkeit des austretenden Gasstromes reduziert und damit eine langsame Entspannung vorgenommen werden.

Nach Entnahme des Extraktes ist dessen Trocknung wie auch die Trocknung frischen Pflanzenmaterials ein kritischer Verfahrensschritt. Es kann zu hohen Verlusten an wertbestim-

menden Inhaltsstoffen kommen, insbesondere wenn ätherische Öle enthalten sind (Carle und Gomaa 1992b). Daher wird als Referenzverfahren im Rahmen der Prozessoptimierung die Trocknung bei Raumtemperatur und Normaldruck unter Lichtschutz durchgeführt. Als alternatives, zeitsparendes Verfahren wird die Gefriertrocknung untersucht. Eine Extraktion bei 40 °C, 90 bar, 8 kg CO₂/h über 3 h führt zur Co-Extraktion von 10–14 g Wasser, wovon ca. 4 g bereits vor Beginn eines Trocknungsschrittes abgenommen werden können, da eine Separation aus der lipophilen Extraktmatrix stattfindet. Diese werden bei der Berechnung des Trocknungsverlustes während der Trocknung im Exsikkator nicht berücksichtigt. Aus Tab. 4.1 ist zu entnehmen, dass Gewichtskonstanz nach etwa sieben Tagen bei einem Trocknungsverlust von knapp 80 % erreicht wird.

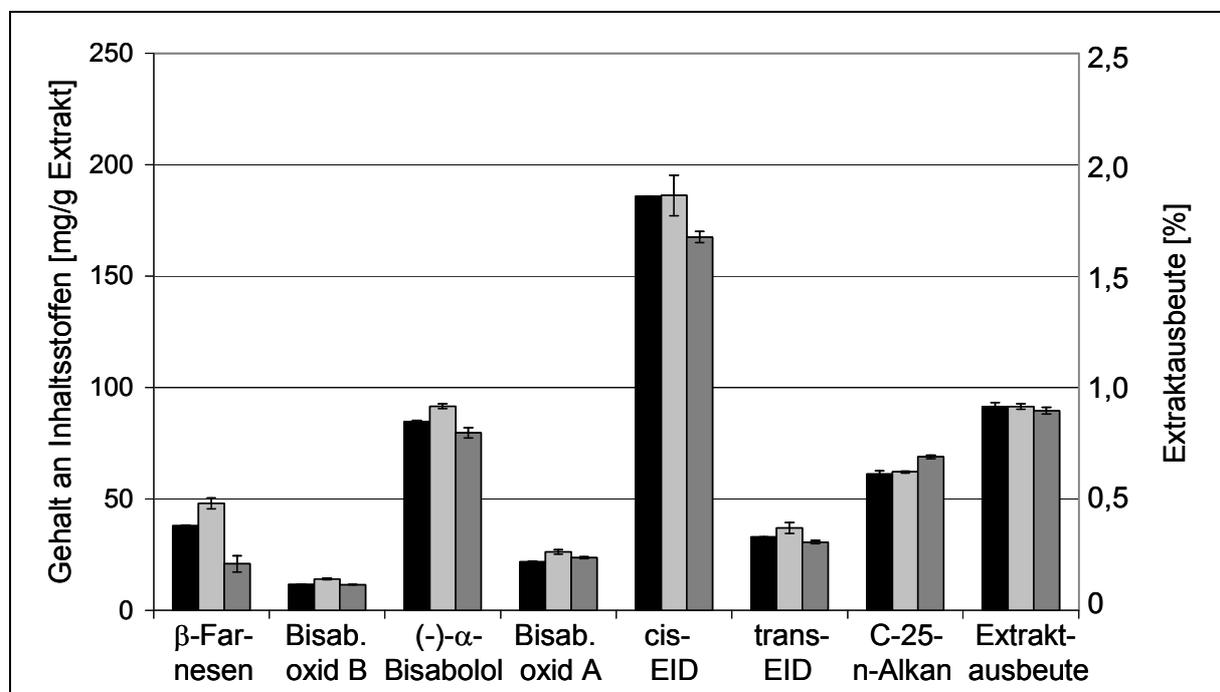


Abb. 4.8 Einfluss weiterer Faktoren auf Gehalt an Inhaltsstoffen und Extraktausbeute (40 °C, 90 bar, 3 h, 8 kg/h): (■) Referenzversuche, (□) langsames Entspannen, (▒) Gefriertrocknung des Extraktes; Fehlerbalken = Spannweite (n = 2)

Abb. 4.8 vergleicht Extraktgehalte und Ausbeute bei langsamer Entspannung des Endabscheiders mit den Referenzversuchen. Es fällt auf, dass β-Farnesen und in geringerem Maße auch (-)-α-Bisabolol von einer langsamen Entspannung profitieren. Für alle anderen Substanzen sowie für die Extraktausbeute sind die Effekte nicht signifikant. Die Gefriertrocknung führt im Fall des β-Farnesens zu Verlusten von bis zu 50 %, cis-EID zeigt 10 % niedrigere Gehalte. Auf Ausbeute und Extraktgehalt der anderen Substanzen ist kein signifikanter Einfluss zu beobachten.

Tab. 4.1 Verlauf der Trocknung eines Extraktes im Exsikkator über Phosphorpentoxid bei Raumtemperatur und Normaldruck unter Lichtschutz

| Tage nach Extraktion | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 9 | 14 | 19 |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Ausbeute [%] | 4,61 ± 0,55 | 1,94 ± 0,57 | 1,33 ± 0,29 | 1,17 ± 0,15 | 1,14 ± 0,11 | 1,10 ± 0,10 | 1,07 ± 0,09 | 1,02 ± 0,07 | 0,99 ± 0,08 | 0,97 ± 0,08 |
| Trocknungsverlust [%] | 0 | 57,5 ± 5,8 | 70,8 ± 2,5 | 74,8 ± 1,0 | 76,5 ± 1,0 | 77,2 ± 0,8 | 77,9 ± 0,9 | 77,9 ± 1,4 | 78,6 ± 1,4 | 78,9 ± 1,5 |

4.3 Aufstellung einer Gesamtextraktionsbilanz unter Berücksichtigung des Zerkleinerungsgrades der Droge

Die Zerkleinerung der Ausgangsdroge erleichtert einerseits den Massentransfer aus dem Drogenmaterial in das Lösungsmittel durch Verkürzung der Diffusionsstrecken, andererseits müssen möglicherweise Verluste aufgrund von Instabilität bzw. Verflüchtigung von Inhaltsstoffen während der Zerkleinerung berücksichtigt werden. Diese Einflüsse können anhand einer Gesamtextraktionsbilanz für die einzelnen Inhaltsstoffe beurteilt werden. Der Gesamtgehalt an relevanten Inhaltsstoffen in der Ausgangsdroge (Sorte Manzana, Ernte 2001) wird durch wiederholte Mazeration mit hohem Lösungsmittelüberschuss ermittelt und als 100 %-Wert gesetzt (siehe Tab. 4.2). Das Droge/Lösungsmittel-Verhältnis beträgt hierbei 1:40, die Extraktion kann als erschöpfend betrachtet werden (Ness und Schmidt 1995). Der Gehalt an (-)- α -Bisabololoxiden liegt unter 1 % bezogen auf (-)- α -Bisabolol, so dass Bisabololoxid A und B in den folgenden Betrachtungen unberücksichtigt bleiben. Der nicht extrahierte Anteil wird durch Mazeration der CO₂-extrahierten Droge bestimmt, der extrahierte Anteil setzt sich aus der Menge im Extrakt und einem Teil, der nicht aus dem Abscheidebehälter entnommen werden kann, zusammen (siehe Abb. 4.9). Dieser nicht entnehmbare Anteil ergibt sich aus der Analyse des Ethanol, der zum Spülen des Abscheidebehälters verwendet wird. Die hier untersuchten Extrakte werden zur Entfernung von mitextrahiertem Wasser gefriergetrocknet.

Tab. 4.2 Gehalt an Inhaltsstoffen in Kamillenblüten der Sorte Manzana, Ernte 2001 [mg/100 g Droge]

| β -Farnesen | (-)- α -Bisabolol | C ₂₅ -n-Alkan | Apig.-7-glucosid | Apigenin | Matricin | trans-EID | cis-EID |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 162,8 ± 1,6 | 355,1 ± 12,5 | 120,8 ± 5,4 | 384,8 ± 8,5 | 8,78 ± 1,4 | 197,5 ± 13,8 | 135,2 ± 4,8 | 526,8 ± 17,4 |

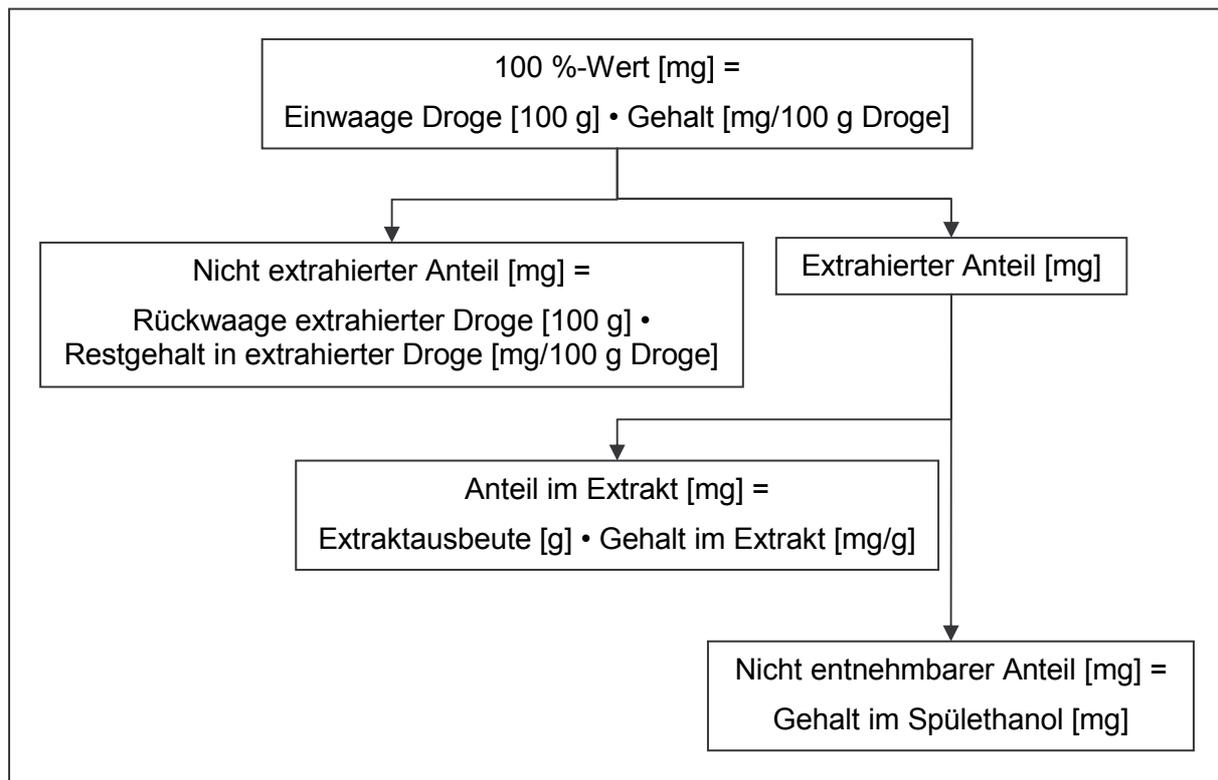


Abb. 4.9 Schematische Darstellung zur Erstellung einer Bilanz des Extraktionsprozesses

Die Partikelgrößenverteilung von unzerkleinerten Kamillenblüten und nach Zerkleinerung mittels Schneidmühle und unter Verwendung eines 4 mm- bzw. eines 1 mm-Siebeinsatzes (grob und fein geschnittene Droge) wird mittels Siebanalyse bestimmt und kann Tab. 4.3 entnommen werden. Vor Zerkleinerung weist die Hauptfraktion eine Partikelgröße $> 3,15$ mm auf, durch die Zerkleinerung findet eine Reduktion auf Partikelgrößen von etwa 0,7 mm (grob geschnitten) bzw. auf Partikelgrößen $< 0,5$ mm (fein geschnitten) statt.

Tab. 4.3 Partikelgrößenverteilung von Kamillenblüten nach Zerkleinerung mittels Schneidmühle

| | $< 0,5$ mm | 0,5–1,4 mm | 1,4–3,15 mm | $> 3,15$ mm |
|------------------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| ganze Droge | $10,9 \pm 4,7$ | $28,0 \pm 4,3$ | $9,9 \pm 0,8$ | $51,2 \pm 8,2$ |
| grob geschnitten | $40,6 \pm 2,7$ | $53,8 \pm 2,1$ | $5,5 \pm 0,6$ | $0,1 \pm 0,0$ |
| fein geschnitten | $60,6 \pm 1,6$ | $39,1 \pm 1,2$ | $0,3 \pm 0,2$ | 0,0 |

Abb. 4.11 stellt die Bilanz des Extraktionsprozesses am Beispiel verschiedener Inhaltsstoffgruppen auf. β -Farnesen, (-)- α -Bisabolol, Matricin und die En-In-Dicycloether sind Bestandteile des ätherischen Kamillenöls, das C_{25} -n-Alkan ist eine Komponente der Cuticularwachse, Apigenin-7-glucosid und Apigenin sind Vertreter der Flavonoide. Strukturformeln dieser Inhaltsstoffe sind in Abb. 4.10 abgebildet.

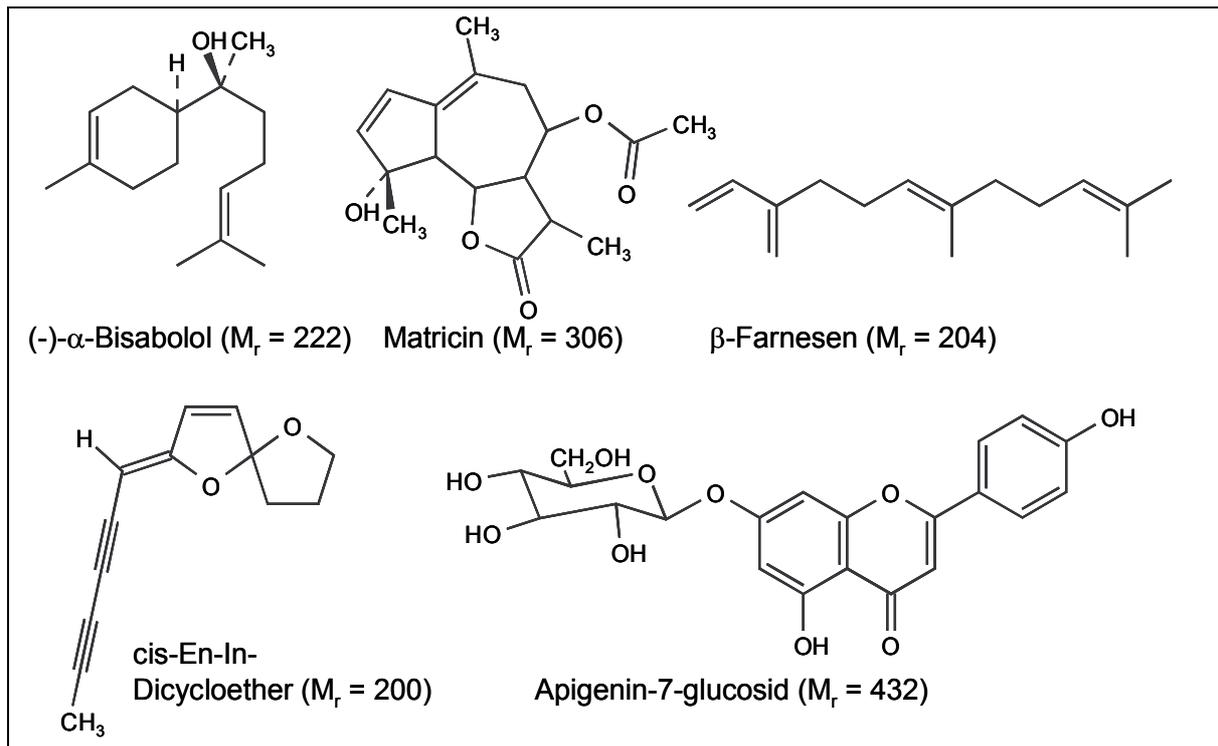


Abb. 4.10 Strukturformeln ausgewählter Kamilleninhaltsstoffe

Für alle Substanzen ist ein Anstieg des extrahierten Anteils bei zunehmendem Zerkleinerungsgrad offensichtlich. Dabei bleibt der Teil, der im Spülethanol wiedergefunden wird, nahezu konstant und beträgt 5–20 % bezogen auf die Gesamtmenge an Inhaltsstoff. Der nicht extrahierte Anteil nimmt entsprechend bei geringerem Zerkleinerungsgrad zu, allerdings kompensiert dies nicht die geringeren Extraktausbeuten, so dass Defizite in der Bilanz auftreten. Hinsichtlich der Extrahierbarkeit und der Stabilität kann eine Einteilung in drei verschiedene Substanzgruppen vorgenommen werden.

Zur ersten Gruppe sind (-)- α -Bisabolol und das C_{25} -n-Alkan zu zählen. Die Gesamtwiederfindungsrate beträgt für die fein geschnittene Droge 100 %, für grob geschnittene bzw. ganze Droge ergibt sich ein Defizit in der Gesamtbilanz von 10–20 %. Dabei liegt der extrahierte Anteil bei 60–95 %, die Restgehalte in der extrahierten Droge betragen 5–20 %.

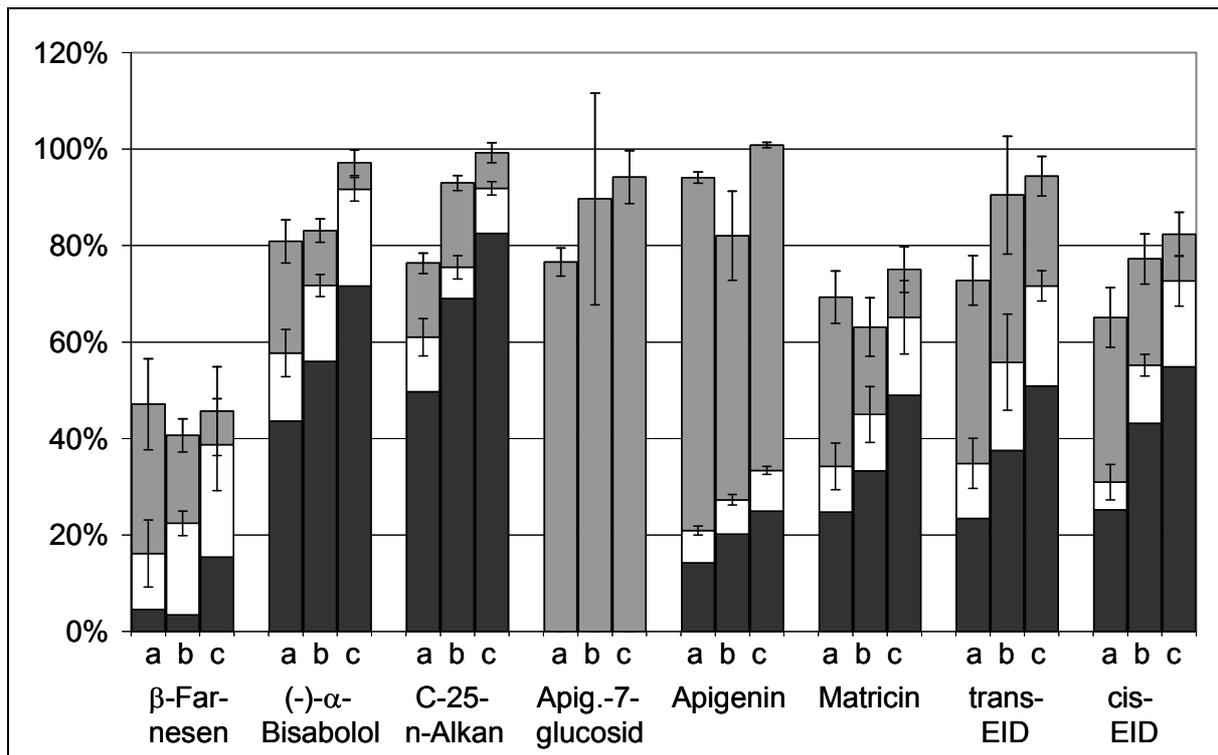


Abb. 4.11 Bilanz eines Extraktionsprozesses in Abhängigkeit vom Zerkleinerungsgrad:
 (■) Anteil im Extrakt, (□) Anteil im Spülethanol, (▒) nicht extrahierter Anteil;
 (a) ganze, (b) grob geschnittene, (c) fein geschnittene Droge;
 Fehlerbalken oben: Vertrauensbereich der Summe aller Fraktionen
 Fehlerbalken unten: Vertrauensbereich des extrahierten Anteils (n = 3)

In der zweiten Gruppe geht die Gesamtbilanz für die fein geschnittene Droge ebenfalls auf. Die Wiederfindung im extrahierten Anteil liegt aber deutlich niedriger. Hierzu sind Apigenin-7-glucosid und Apigenin zu zählen. Apigenin-7-glucosid wird mit reinem CO₂ nicht extrahiert, durch einmalige Lösungsmittelmazeration der CO₂-extrahierten Droge werden aber in Abhängigkeit vom Zerkleinerungsgrad der Droge 75–95 % des Inhaltsstoffes wiedergefunden. Apigenin zeigt Ausbeuten im extrahierten Anteil von 20–30 %, in der CO₂-extrahierten Droge werden 55–75 % gefunden, so dass Gesamtsummen von 80–100 % resultieren.

β-Farnesen, Matricin und die En-In-Dicycloether gehören zur dritten Gruppe. Hier treten auch bei fein geschnittener Droge größere Bilanzdefizite von 20 bis 50 % auf, die auf Verluste vor und während Extraktion und Trocknung zurückzuführen sind. Der trans-EID nimmt in dieser Reihe eine Ausnahmestellung ein, da seine Ausbeute mit 30–70 % der Ausbeute von cis-EID und Matricin entspricht, trotzdem liegt die Gesamtwiederfindung 10–20 % höher. β-Farnesen wird nur zu insgesamt 50 % in Extrakt und in extrahierter Droge wiedergefunden. Dabei fallen vor allem die hohen Anteile im Spülethanol auf, die bezogen auf die gesamt extrahierte

Menge bei 60–85 % liegen, während der nicht entnehmbare Anteil für die anderen Inhaltsstoffe bei 10–30 % liegt.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

4.4.1 Optimierung der Extraktionsparameter

4.4.1.1 Extraktionsdruck

Bereits kleine Änderungen des Extraktionsdruckes im Bereich des kritischen Druckes von CO₂ bewirken große Dichteänderungen des Lösungsmittels (siehe Abb. 2.3, S. 9) und haben damit entscheidenden Einfluss auf dessen Lösungskapazität. Damit kann die Ausbeute an erwünschten Inhaltsstoffen durch eine verbesserte Löslichkeit gesteigert werden. Allerdings wird auch die Extraktion von unerwünschten, schwerer löslichen Begleitkomponenten erleichtert, weshalb eine Abnahme der Selektivität für die vergleichsweise gut löslichen Kamilleninhaltsstoffe zu erwarten ist. Dies wird experimentell bestätigt (siehe Abb. 4.2 und Abb. 4.3). Die Ausbeutesteigerung an untersuchten Kamilleninhaltsstoffen fällt deutlich geringer aus als die Zunahme der Gesamtextraktausbeute. Daher muss sie zum größten Teil durch die Extraktion von analytisch nicht erfassten Begleitsubstanzen zustande kommen, was sich auch in geringeren Gehalten der Inhaltsstoffe im Extrakt niederschlägt. Bei den Begleitsubstanzen kann es sich um höhermolekulare oder vergleichsweise polarere Substanzen handeln, die in CO₂ niedriger Dichte keine ausreichende Löslichkeit aufweisen. Dafür kommen z. B. Phenylcarbonsäuren wie Anissäure und Vanillinsäure in Frage (Reichling et al. 1979), sowie Flavonaglyka wie Apigenin (Scalia et al. 1999) oder methoxylierte Flavonaglyka (Exner et al. 1981).

Die Löslichkeit strukturell verschiedener Substanzen in überkritischem CO₂ verbessert sich mit abnehmendem Molekulargewicht, zunehmendem Dampfdruck und bei Fehlen von polaren Strukturelementen wie z. B. Sauerstoff-Atomen (Stahl und Gerard 1985, da Cruz Francisco und Sivik 2002). Die Strukturformeln der untersuchten Kamilleninhaltsstoffe sind in Abb. 4.10 dargestellt, zum Vergleich sind in Abb. 4.12 strukturverwandte Substanzen abgebildet, deren Löslichkeit in überkritischem CO₂ bei 40 °C bekannt und in Tab. 4.4 angegeben ist.

Tab. 4.4 Löslichkeitsdaten von den Kamilleninhaltsstoffen strukturell ähnlichen Verbindungen bei 40 °C und 90 bzw. 150 bar

| Substanz | Autoren | Löslichkeit [%, m/m] | |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| | | 90 bar | 150 bar |
| Limonen | Stahl et al. (1987) | 6,5 | > 17 |
| Valeranon | Stahl et al. (1987) | 0,5 | > 10 |
| Artabsin | Stahl et al. (1987) | 0,035 | 0,15 |
| C ₂₈ -n-Alkan | Reverchon et al. (1993) | 0,017 | 0,092 |
| Wasser | King et al. (1992) | 0,16 | 0,21 |
| 3,4-Dihydroxybenzoesäure | Murga et al. (2002) | ~ 1·10 ⁻⁵ | 3,7·10 ⁻⁵ |

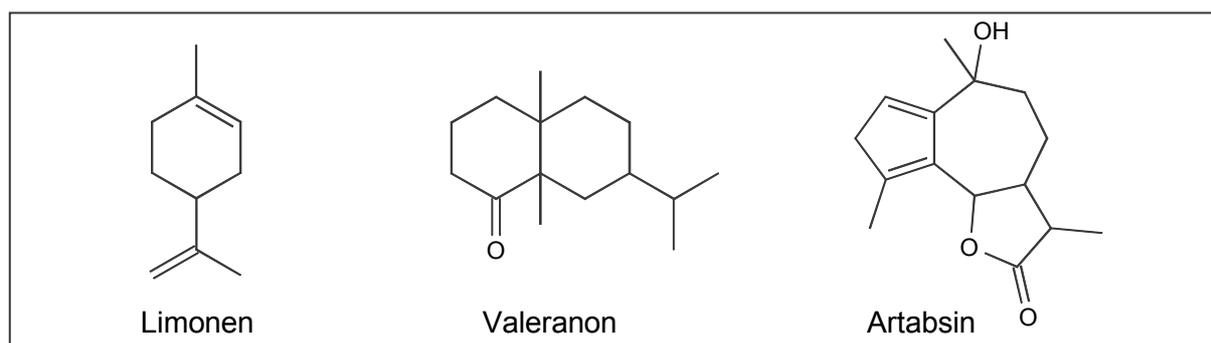


Abb. 4.12 Strukturformeln einiger in Tab. 4.4 aufgelisteter Substanzen

Die Löslichkeit von β -Farnesen, einem unsubstituierten Sesquiterpen, sollte demzufolge zwischen den Werten für Limonen und Valeranon liegen. (-)- α -Bisabolol, ein Sesquiterpenalkohol, hat ein dem Valeranon entsprechendes Molekulargewicht, aber aufgrund einer freien Hydroxylgruppe einen etwas geringen Dampfdruck (Stahl und Gerard 1985) und dürfte demzufolge eine etwas geringere Löslichkeit aufweisen. Artabsin ist strukturell ähnlich aufgebaut wie Matricin, wobei letzteres aufgrund einer zusätzlichen Estergruppierung ein höheres Molekulargewicht und eine geringere Polarität besitzt. Das C₂₈-n-Alkan steht stellvertretend für die Cuticularalkane, deren mengenmäßig dominierender Vertreter aus 25 C-Atomen aufgebaut ist und daher ein geringeres Molekulargewicht besitzt. Zum Vergleich ist die Löslichkeit von Wasser aufgelistet, das trotz seiner Polarität aufgrund seines geringen Molekulargewichtes und seines Dampfdruckes besser extrahierbar ist als beispielsweise Artabsin. Da in getrocknetem Pflanzenmaterial Restfeuchten von 8–15 % auftreten können, muss mit Co-Extraktion beträchtlicher Mengen an Wasser gerechnet werden. Phenylcarbonsäuren haben

dagegen um 3–4 Zehnerpotenzen schlechtere Löslichkeiten und werden daher nur aufgrund der hohen CO_2 -Durchsätze (24 kg) nach erfolgter Extraktion besser löslicher Substanzen extrahiert.

4.4.1.2 Extraktionsdauer

Da die Selektivität des Lösungsmittels bei bzgl. Temperatur *und* Druck konstanten Extraktionsbedingungen nicht verändert wird, bleibt auch die Löslichkeit aller Kamilleninhaltsstoffe unverändert. Die Anreicherung von Begleitsubstanzen mit zunehmender Extraktionsdauer ist demnach eine Folge des geringeren Sättigungsgrades des überkritischen Gases (siehe Abb. 4.4 und Abb. 4.5). Während zu Beginn hauptsächlich die leicht löslichen Bestandteile des ätherischen Öls sowie sehr lipophile Kohlenwasserstoffe extrahiert werden, verschiebt sich das Verhältnis nach vollständiger Extraktion dieser Substanzen zunehmend zugunsten schwerer löslicher Inhaltsstoffe. Anhand des Verlaufes der Ausbeuten am Beispiel von (-)- α -Bisabolol wird die mit fortschreitender Extraktionsdauer sinkende Extraktionsrate deutlich, die Ausbeutesteigerung pro weiterer 2 h Extraktionszeit nimmt kontinuierlich ab. Die Ausbeute strebt einem Endwert entgegen. Dieser Wert entspricht der Ausbeute, die bei Anwendung hoher Extraktionsdrücke erzielt wird (vgl. Abb. 4.3). Während der initialen Extraktionsphase werden leicht zugängliche Inhaltsstoffe aus zerstörten Zellen ausgewaschen, gleichzeitig findet Diffusion gelöster Substanzen aus intakten Zellen in das überkritische Fluid statt (Sovova et al. 1994). In dieser Phase ist die Extraktionsgeschwindigkeit konstant und v. a. durch die Löslichkeit der Inhaltsstoffe bestimmt. Bei Einsatz unzerkleinerten Drogenmaterials kann auch ein konstanter Massentransferwiderstand die geschwindigkeitsbestimmende Größe sein. Daran schließt sich eine zweite Phase mit kontinuierlich abnehmender Extraktionsgeschwindigkeit an, die auf eine zunehmende Erschöpfung des Drogenmaterials zurückzuführen ist.

4.4.1.3 CO_2 -Massenfluss

Die Untersuchung verschiedener CO_2 -Massenflussraten ergibt eine Verbesserung des Massentransfers von der Drogenmatrix in das Lösungsmittel bei einer langsameren Flussrate (4 kg CO_2 /h) sowie bei Durchführung einer stationären Zwischenmazeration. Abb. 4.13 zeigt die Lokalisation des ätherischen Öls in Kamillenblüten. Über den sezernierenden Zellen hebt sich die Cuticula blasenartig ab, darunter befindet sich das ätherische Öl im subcuticulären Raum. Die Zerkleinerung der Droge führt lediglich zur Zerstörung eines gewissen Anteils der Zellen. Der Übertritt von Substanzen, die durch Diffusion aus intakten Zellen bzw. durch eine

Cuticularbarriere in das überkritische Fluid gelangen, wird durch langsamere CO₂-Flussraten und demzufolge eine längere Verweilzeit des Lösungsmittels im Extraktor begünstigt (Mira et al. 1996). Eine stationäre Zwischenmazeration bewirkt die Quellung der Zellstrukturen, daraus resultiert ein geringerer Massentransferwiderstand. Beide Maßnahmen führen zu höheren Ausbeuten an erwünschten Inhaltsstoffen, da deren Konzentration im Extrakt nahezu konstant bleibt.

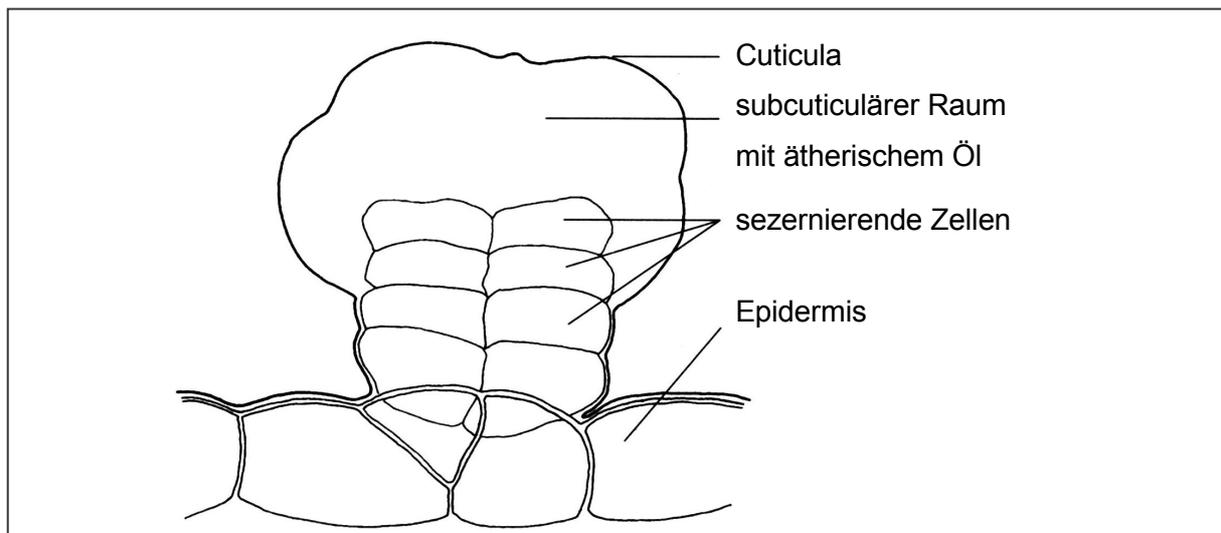


Abb. 4.13 Drüsen- oder Schuppe der Kamille in Seitenansicht (nach Stahl-Biskup und Reichling 1998)

4.4.1.4 Sonstige Einflussparameter

β -Farnesen besitzt im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen keine Sauerstofffunktion und weist mit 204 g/mol das geringste Molekulargewicht auf. Im Gaschromatogramm erscheint es als erste Substanz fünf Minuten vor (-)- α -Bisabolol bei ca. 160 °C (siehe Abb. 3.1, S. 18). Der daraus ableitbare hohe Dampfdruck bewirkt eine gewisse Restlöslichkeit von β -Farnesen auch in gasförmigem CO₂ (Stahl et al. 1987). Somit ist diese Substanz besonders gefährdet, bei einer schnellen Entspannung des Abscheidebehälters im Gasstrom ausgetragen zu werden. Da allerdings die wertbestimmenden Inhaltsstoffe kaum Verluste aufweisen, wird die schnelle Entspannung als Standardmethode vorgezogen, da das dabei entstehende Trockeneis den Extrakt vorübergehend einschließt und damit eine einfache Entnahme des Extraktes gewährleistet ist.

Die Gefriertrocknung führt ebenfalls v. a. bei β -Farnesen zu größeren Verlusten. Da β -Farnesen ausschließlich als analytische Leitsubstanz dient und keine pharmakologische

Wirksamkeit besitzt, wird der schnelleren Methode der Vorzug gegeben. Während durch Trocknung im Exsikkator Gewichtskonstanz erst nach 2–3 Wochen erreicht ist, kann dies mittels Gefriertrocknung innerhalb von 24 Stunden erreicht werden. Auf Aspekte der Stabilität von Matricin in Abhängigkeit von der Trocknungsart wird in Kapitel 6 ausführlich eingegangen.

4.4.2 Gesamtextraktionsbilanz und Einfluss des Zerkleinerungsgrades

Anhand der Gesamtbilanz kann der unter 4.4.1.3 bereits diskutierte Effekt der Zerkleinerung der Droge sichtbar gemacht werden. Die Extraktionsdauer von 3 h reicht bei einem Massenfluss von 8 kg/h bei fein geschnittenem Drogenmaterial gerade aus, um eine nahezu vollständige Extraktion aller betrachteten Substanzen zu erzielen. Defizite in der Gesamtbilanz, die bei (-)- α -Bisabolol und C_{25} -n-Alkan bei ganzer und grob geschnittener Droge auftreten, zeigen, dass sowohl die CO_2 -Extraktion als auch die Mazeration trotz hohem Lösungsmittelüberschuss nicht zur vollständigen Extraktion der Inhaltsstoffe führen.

Die Extraktionsbilanz lässt darüber hinaus Aussagen über die Stabilität der Kamilleninhaltsstoffe zu. Treten Verluste durch die Zerkleinerung auf, sollte sich dies in der Bilanz in geringeren Wiederfindungsraten bei fein geschnittener Droge niederschlagen. Bei allen untersuchten Inhaltsstoffen nehmen die Wiederfindungsraten mit zunehmender Zerkleinerung zu, daher ist ein negativer Einfluss der Zerkleinerung auf die Stabilität auszuschließen. Verluste durch Instabilität oder Verflüchtigung während und nach der Extraktion machen sich in Bilanzdefiziten unabhängig vom Zerkleinerungsgrad bemerkbar.

Sowohl für (-)- α -Bisabolol und C_{25} -n-Alkan als auch für Apigenin und Apigenin-7-glucosid beträgt die Gesamtwiederfindung bei fein geschnittener Droge etwa 100 %. Daher kann einerseits ein negativer Einfluss der Zerkleinerung ausgeschlossen werden, andererseits können diese Substanzen insgesamt als stabil unter Extraktions- und Trocknungsbedingungen betrachtet werden. Die hohen Restgehalte an Apigenin (55–73 %) und besonders an Apigenin-7-glucosid (77–95 %) in CO_2 -extrahierter Droge zeigen aber, dass reines CO_2 unter diesen Bedingungen aufgrund seiner Lipophilie kein geeignetes Lösungsmittel zur Extraktion dieser Substanzen ist.

Im Falle des Matricins, der En-In-Dicycloether und des β -Farnesens treten größere Verluste auf, die auf Stabilitätsprobleme durch Zersetzungsreaktionen und Verflüchtigung zurückzuführen sind. Auf die Problematik der Stabilität von Matricin wird in Kapitel 6 explizit eingegangen. Die beiden En-In-Dicycloether sind bekannt als lichtempfindliche Substanzen, die zu Isomerisierung von der cis- zur trans-Form neigen (Grünhagen 1994). Die höheren Wieder-

findungsraten der trans-Form insbesondere bei der Restgehaltsbestimmung sind ein Indiz für die einsetzende Isomerisierung während des Extraktionsprozesses. β -Farnesen zeigt ein gegenüber Matricin und den En-In-Dicycloethern abweichendes Verhalten. Die Gesamt-wiederfindungsrate ist mit 50 % mit Abstand am geringsten. Die im Vergleich zum insgesamt extrahierten Anteil hohen Mengen an β -Farnesen im Spülethanol lassen jedoch den Schluss zu, dass die Verluste nicht während der Extraktion auftreten. Wie bereits in Kapitel 4.4.1.4 diskutiert, ist die Ursache eine Verflüchtigung unter Vakuum während der Gefriertrocknung. Zur Abschätzung der Extrahierbarkeit von β -Farnesen können die Wiederfindungsraten in CO_2 -extrahierter Droge herangezogen werden. Diese liegen bei 5–40 %, woraus auf einen extrahierten Anteil von 60–95 % geschlossen werden kann.

4.5 Zusammenfassung

Die Prozessoptimierung erfordert eine Abwägung zwischen der Qualität des Extraktes und ökonomischen Aspekten. Während die höchste Anreicherung wertbestimmender Inhaltsstoffe im CO_2 -Extrakt bei niedriger Lösungsmitteldichte (40 °C, 90 bar, $\rho = 0,484 \text{ kg/l}$) und geringer Extraktionszeit (1 h) erzielt wird, liegen die Ausbeuten unter diesen Bedingungen bei maximal 60 % bezogen auf die Mazeration als Referenzmethode. Da im Sinne einer Standardisierung eine möglichst quantitative Beschreibung der Extraktbestandteile erwünscht ist, sollte der Gehalt an analytisch nicht erfassten Begleitsubstanzen so niedrig wie möglich sein. Daher bietet sich die Nutzung der hohen Selektivität des CO_2 für die Bestandteile des ätherischen Öls bei 40 °C und 90 bar an. Um bei nahezu gleicher Selektivität akzeptable Ausbeuten zu erhalten, kann die Extraktionszeit auf 3 h verlängert sowie eine weitgehende Zerkleinerung der Droge vorgenommen werden. Ein negativer Effekt der Zerkleinerung auf die Stabilität der Inhaltsstoffe kann nicht festgestellt werden. Die Reduktion des CO_2 -Massenflusses sowie eine stationäre Zwischenmazeration führen zu einer Verlängerung der Prozesszeiten um 60-100 %. Die nur geringfügige Steigerung der Ausbeute rechtfertigt diese Maßnahmen aus ökonomischer Sicht nicht. Eine schnelle Entspannung des Abscheidebehälters erleichtert die Entnahme des in festem CO_2 eingeschlossenen Extraktes. Die anschließende Gefriertrocknung ist ein schonendes und schnelles Verfahren, das allerdings zu Verlusten an β -Farnesen – dem flüchtigsten, aber pharmakologisch nicht wertbestimmenden Kamilleninhaltsstoff – führen kann. In Tab. 4.5 sind die optimierten Bedingungen zur Extraktion lipophiler Inhaltsstoffe aus Kamillenblüten zusammengestellt.

Tab. 4.5 Optimierte Bedingungen zur Extraktion lipophiler Inhaltsstoffe aus Kamillenblüten

| | |
|------------------------------|--|
| Zerkleinerung der Droge | fein geschnitten (60 % < 0,5 mm) |
| Extraktionsdruck | 90 bar |
| Extraktionstemperatur | 40 °C |
| Extraktionsdauer | 3 h |
| Dichte des CO ₂ | 0,484 kg/l |
| CO ₂ -Massenfluss | 8 kg/h |
| Entnahme des Extraktes | in Trockeneis eingeschlossen nach schneller Entspannung des Abscheidebehälters |
| Trocknung des Extraktes | Gefriertrocknung |

Durch die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse lässt sich eine konstante, hohe Extraktqualität erreichen. Die lipophilen Kamilleninhaltsstoffe sind gegenüber einem mittels Dichlormethan/Methanol hergestellten Trockenextrakt um den Faktor 8, gegenüber dem getrockneten Pflanzenmaterial um den Faktor 40-60 angereichert. Gleichzeitig entfallen die Schritte einer Lösungsmittelrückgewinnung und es verbleiben keinerlei toxikologisch bedenkliche Rückstände im Extrakt.

Ein Vergleich der Gehalte an lipophilen, pharmakologisch wirksamen Kamilleninhaltsstoffen eines CO₂-Extraktes mit konventionellen Extrakten ist in Tab. 4.6 gegeben. Die Herstellungsbedingungen des CO₂-Extraktes entsprechen den in Tab. 4.5 zusammengefassten Ergebnissen der Prozessoptimierung. Der CO₂-Extrakt enthält die 270fache Menge an (-)- α -Bisabolol, die 730fache Menge an cis-EID und die 500fache Menge an trans-EID verglichen mit einem ethanolischen Extrakt. Letzterer steht repräsentativ für die Mehrzahl der im Handel befindlichen Kamillenpräparate, die mittels Ethanol/Wasser-Mischungen als Auszugsmittel hergestellt werden. Ein Vergleich des Matricingehaltes ist problematisch, da Matricin in polaren Lösungsmitteln einer schnellen Zersetzung unterliegt (siehe Kapitel 6, S. 67). Der Propylenglykol-Extrakt enthält dem ethanolischen Extrakt entsprechende Mengen an (-)- α -Bisabolol, während die En-In-Dicycloether deutlich stärker angereichert sind. Dennoch liegen die Gehalte im CO₂-Extrakt 90- (cis-EID) bzw. 130-mal (trans-EID) höher. Bisabololoxide sind in diesem CO₂-Extrakt nicht nachweisbar, da der Gehalt in der Ausgangsdroge weniger als 1 % bezogen auf (-)- α -Bisabolol beträgt. Obgleich die Qualität der Ausgangsdroge einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der Extrakte hat, zeigt dieser Vergleich die

Überlegenheit der CO₂-Extraktion für die Herstellung von hoch angereicherten Kamillenextrakten. Ein auf diese Weise gewonnener Spezialextrakt enthält therapeutisch relevante Konzentrationen an lipophilen Kamilleninhaltsstoffen, deren antiphlogistische Wirksamkeit durch in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen bestätigt ist (Ammon und Kaul 1992, Ammon und Sabieraj 1996).

Tab. 4.6 Vergleich des Gehaltes an lipophilen, pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffen in einem CO₂-Extrakt und in konventionellen Extrakten

| Inhaltsstoff | Gehalt im Extrakt [mg/100 g] | | |
|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---|
| | CO ₂ -Extrakt ³ | ethanolischer Extrakt ⁴ | propylenglykolischer Extrakt ⁵ |
| (-)- α -Bisabolol | 21914 \pm 1529 | 78,86 \pm 0,30 | 82,1 |
| Bisabololoxid A | n. d. | 33,34 \pm 0,13 | 16,2 |
| Bisabololoxid B | n. d. | 10,42 \pm 0,13 | 1,8 |
| Matricin | 8049 \pm 908 | 3,03 \pm 0,03 | 36,5 |
| cis-EID | 24899 \pm 1583 | 34,71 \pm 0,08 | 283,0 |
| trans-EID | 6396 \pm 105 | 12,95 \pm 0,04 | 49,4 |

³ verwendete Droge: Manzana (Ernte 2001)

⁴ Perkamillon®, Auszugsmittel: 48 Vol.-% Ethanol (Schmidt und Vogel 1992)

⁵ Auszugsmittel: Propylenglykol (Vogel 1992)

Kapitel 5

In-line-Einschluss von Kamilleninhaltsstoffen in β -Cyclodextrin

5.1 Allgemeines

Das β -Cyclodextrin-Molekül (β -CD) ist ein cyclisches Oligosaccharid, bestehend aus sieben α -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten (Freudenberg und Meyer-Delius 1938, Freudenberg et al. 1947), das die Fähigkeit besitzt, Einschlussverbindungen mit Gastkomponenten zu bilden (Freudenberg und Cramer 1950). β -CD lässt sich durch enzymatischen Abbau der Stärke gewinnen, daneben entstehen auch α -CD und γ -CD, die aus sechs bzw. acht Glucosemolekülen aufgebaut sind (Freudenberg et al. 1947). Die Glucoseeinheiten bilden einen konischen Hohlkörper, dessen zentrale Kavität durch Gerüstkohlenstoffatome und Sauerstoffatome in Etherbrücken begrenzt wird und daher vorwiegend apolare Wechselwirkungen eingehen kann (Abb. 5.1). Die primären und sekundären Hydroxylgruppen ragen nach außen, verleihen dem Molekül hydrophile Eigenschaften und stabilisieren die Struktur durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Trotz der hydrophilen Struktur ist die Wasserlöslichkeit bei Raumtemperatur mit 1,85 g/100 ml relativ gering.

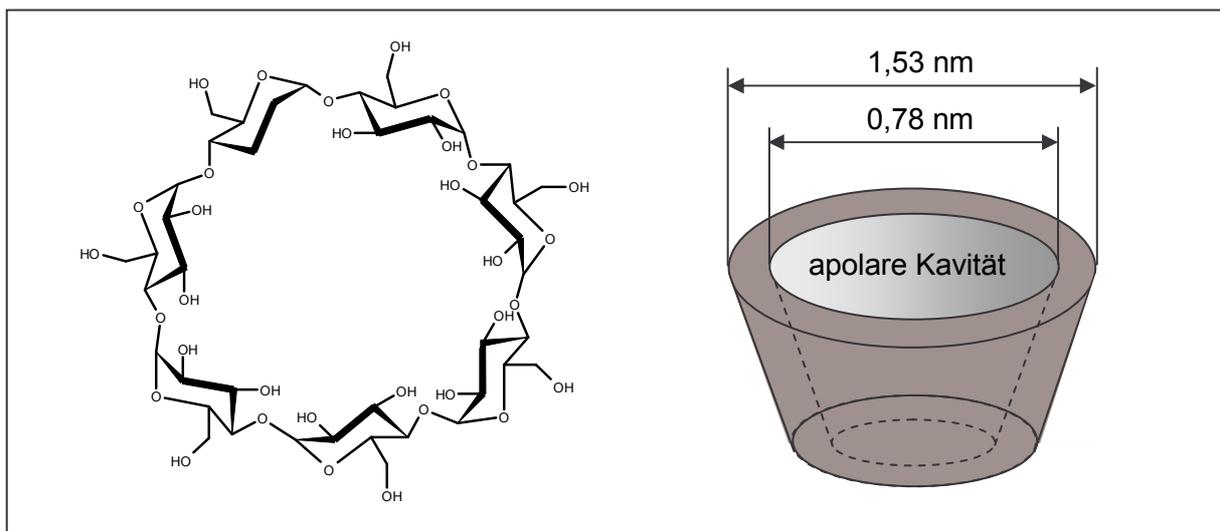


Abb. 5.1 Molekulare Struktur und dreidimensionale Anordnung von β -CD

Die Bildung von Einschlussverbindungen mit β -CD erfolgt ohne die Ausbildung von kovalenten Bindungen und kann bereits in wässriger Lösung stattfinden. Die Haupttriebkraft der

Komplexbildung ist der Entropiegewinn, wenn Wassermoleküle aus ihrer energetisch ungünstigen Position in der apolaren Kavität durch ein Gastmolekül mit höherer Affinität verdrängt werden (Szejtli 1998, Loftsson 1999). Ein Gastmolekül dringt dazu ganz oder mit einem unpolaren Molekülteil geeigneter Größe in den Hohlraum ein und geht Wechselwirkungen mit dem β -CD-Molekül ein, die im wesentlichen auf van-der-Waals- und Dispersionskräften beruhen, auch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken konnte gezeigt werden (Komiya und Bender 1978). In wässriger Lösung besteht ein dynamisches Gleichgewicht freier und gebundener Gastmoleküle, dessen Lage durch eine substanzspezifische Stabilitätskonstante bestimmt ist (siehe Gl. 5.1 und 5.2).



$$K_s = \frac{[\text{CD-Gast}]}{[\text{CD}] \cdot [\text{Gast}]} \quad (5.2)$$

| | |
|--------------------|--|
| K_s | Stabilitätskonstante $[(\text{mol/l})^{-1}]$ |
| $[\text{CD}]$ | Stoffmengenkonzentration Cyclodextrin $[\text{mol/l}]$ |
| $[\text{Gast}]$ | Stoffmengenkonzentration Gast $[\text{mol/l}]$ |
| $[\text{CD-Gast}]$ | Stoffmengenkonzentration Komplex $[\text{mol/l}]$ |

Die Herstellung von Einschlussverbindungen kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. Wasserlösliche Substanzen werden direkt in meist heißen, konzentrierten wässrigen Lösungen der β -CD in äquimolaren Mengen oder bis zum zehnfachen Überschuss gelöst. Die Einschlussverbindungen kristallisieren sofort oder beim langsamen Abkühlen oder Eindampfen (Lösungs- oder Copräzipitationsmethode). Nicht wasserlösliche Substanzen können in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst und mit der β -CD-Lösung geschüttelt werden, wobei sich Kristalle als Präzipitat bilden. Anhaftende Substanzreste müssen durch Waschen mit einem organischen Lösungsmittel entfernt werden. Das Knet-Verfahren arbeitet mit einem wässrigen oder wässrig-ethanolischen Brei aus 20–80 % β -CD, dem die flüssige oder gelöste Gastkomponente zugegeben wird. Beim Verrühren nimmt die Viskosität langsam zu, es entsteht ein Teig, der sich trocknen und waschen lässt.

β -CD-Einschlussverbindungen finden vielfältige Anwendung in der pharmazeutischen Forschung und Industrie. Sie können eine Löslichkeitsverbesserung von Arzneistoffen bewirken, zur Stabilitätsverbesserung beitragen, die Flüchtigkeit von Wirkstoffen reduzieren und flüssige Substanzen in eine pulverförmige Form überführen (Szente und Szejtli 1988). Der intensive Geruch eines hoch konzentrierten CO_2 -Extraktes wird durch Einschluss in β -CD reduziert (Schmidt et al. 1999). Darüber hinaus dienen sie als Enzymmodelle für die Hydrolyse von Estern oder Amiden und für Decarboxylierungsreaktionen (Tee et al. 1990, Fernandez et

al. 2001). Eine Reihe von Übersichtsarbeiten beschreibt die Vielseitigkeit der Einsatzmöglichkeiten von Cyclodextrinen und die Möglichkeiten zur Herstellung und Charakterisierung der Komplexe (Frömming 1973, Saenger 1980, Hedges 1998, Szejtli 1998, Loftsson 1999).

5.2 Literaturübersicht

Der Einschluss von ätherischem Kamillenöl in β -CD wird erstmals von Szente et al. (1981) beschrieben. Dabei zeigt sich eine deutliche Verbesserung der Kurzzeitstabilität von En-In-Dicycloethern, (-)- α -Bisabolol und Chamazulen unter Temperatur- und Sauerstoffeinfluss. Thoß et al. (1993) schließen aus ihren Untersuchungen an Komplexen aus Kamillenöl und β -CD bzw. γ -CD, dass das Chamazulenmolekül für die Ausbildung eines stabilen Komplexes mit β -CD zu groß ist, und die Seitenketten (Methyl- und Ethylgruppen) keine ausreichenden Wechselwirkungen eingehen können. Hingegen bleibt der Komplex mit γ -CD nach Trocknung und Lagerung blau gefärbt, dies ist ein Hinweis auf die Stabilität von Chamazulen. Ein Kamillenöl/ β -CD-Komplex wird in verschiedene Arzneiformen wie Zäpfchen (Szente et al. 1984), Puder oder Tabletten eingearbeitet (Szejtli et al. 1979). Schmidt et al. (1999) und Waleczek et al. (2002) beschreiben β -CD-Einschlussverbindungen mit einem Kamillen-CO₂-Extrakt als Gastkomponente, die den wirksamen Bestandteil einer halbfesten Arzneiform darstellt.

Die Bildung von β -CD-Einschlussverbindung unter Einsatz von überkritischem CO₂ wird in der Literatur durch Einsatz verschiedener experimenteller Anordnungen beschrieben. Van Hees et al. (1999) untersuchen die Bildung eines Piroxicam/ β -CD-Komplexes in überkritischem CO₂, indem eine physikalische Mischung der beiden Komponenten statisch unter Druck gesetzt wird. Auf diese Weise erzielen sie Einschlussraten von über 90 % bei 150 °C und 300-450 bar. Ebenfalls eine statische Methode beschreiben Perrut et al. (2002) zur Herstellung von Komplexen mit Hydroxypropyl- β -CD und Prednisolon bei 40 °C und 280 bar. Ein Ibuprofen/Methyl- β -CD-Komplex kann dadurch hergestellt werden, dass mit Ibuprofen beladenes CO₂ bei 35 °C und 130-220 bar durch ein Methyl- β -CD-Bett geleitet wird (Charoenchaitrakool et al. 2002). Mit einer ähnlichen Anordnung stellen Kamihira et al. (1990) bei 10-40 °C und 20-60 bar Einschlussverbindungen aus Cyclodextrinen und aromatischen Verbindungen wie Geraniol und Senföl her. Adda und Lorne (1991) verwenden β -CD als Auffangmedium für den ankommenden Extrakt im Abscheidebehälter einer Hochdruckextraktionsanlage, mit dem Ziel, die Wiederfindung flüchtiger Substanzen zu verbessern.

5.3 Herstellung und Analytik von In-line-Einschlussverbindungen eines Kamillen-CO₂-Extraktes mit β -Cyclodextrin

Die Herstellung einer Einschlussverbindung aus einem Kamillen-CO₂-Extrakt und β -CD erfolgt mit dem Ziel, den zähfließenden, lipophilen CO₂-Extrakt in eine gut handhabbare, pulverförmige Form zu überführen. Ferner soll der Einfluss von β -CD auf die Stabilität von Matricin in einem solchen Komplex untersucht werden (siehe Kapitel 6). Der In-line-Einschluss kombiniert die CO₂-Extraktion mit der Herstellung einer Einschlussverbindung in einem Verfahrensschritt (siehe Abb. 5.3). Die Extraktion erfolgt bei 40 °C, 90 bar, 8 kg CO₂/h über 3 h, es werden jeweils 210 g grob geschnittene Kamillenblüten der Sorte Manzana (Ernte 2001) eingesetzt. Die Komplexbildung findet dabei während einer Extraktionszeit von 3 h in flüssigem CO₂ bei ca. 8 °C und 40 bar statt. Unter diesen Bedingungen weisen Bestandteile des ätherischen Öls noch vergleichsweise hohe Löslichkeiten auf (Stahl et al. 1987), liegen also zumindest teilweise in gelöster Form vor. Die Löslichkeit von β -CD in flüssigem CO₂ ist nicht bekannt, dürfte aber aufgrund der Molekülstruktur mit zahlreichen Hydroxylgruppen und einem hohen Molekulargewicht ($M_r = 1135$) nur sehr gering sein. Die Komplexbildung erfolgt demnach analog der Knetmethode aus gelösten Gastmolekülen und größtenteils suspendiertem β -CD. Das System im Endabscheidebehälter wird durch adäquate Wärmezufuhr bezüglich des Zustandes von CO₂ an der Phasengrenze flüssig/gasförmig gehalten (siehe Kapitel 8.4.1, S. 107). Durch die Einleitung von ankommendem extraktbeladenem CO₂ in die Flüssigphase über ein Tauchrohr und das kontinuierliche Verdampfen von CO₂ aus dieser Flüssigphase ergeben sich Turbulenzen, die eine intensive Durchmischung von Cyclodextrin und gelöstem Extrakt ermöglichen (siehe Abb. 5.2).

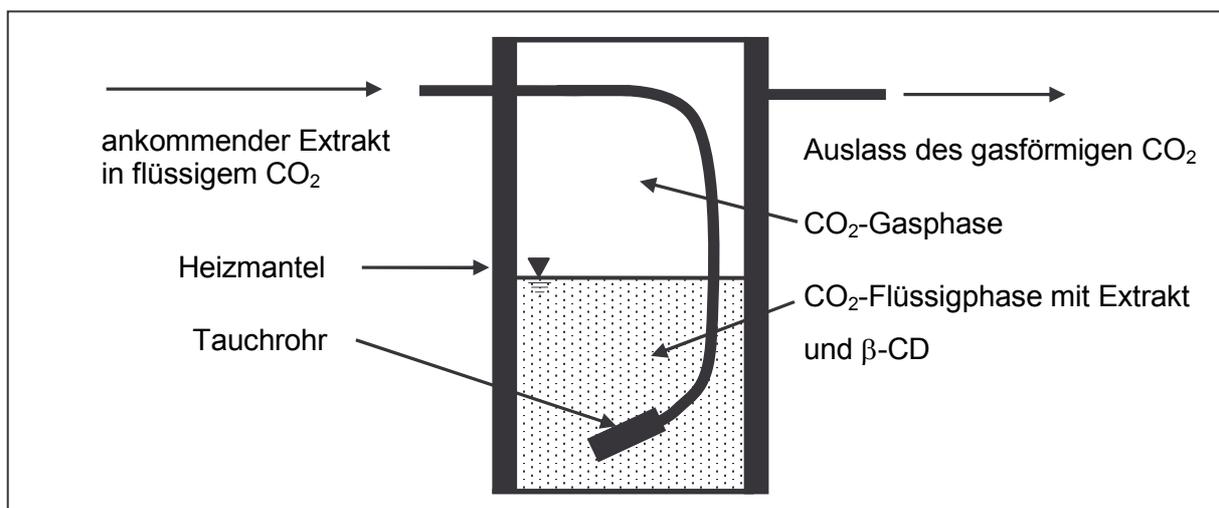


Abb. 5.2 Schematische Darstellung der Verhältnisse im Endabscheider

Die Massenverhältnisse sind in Anlehnung an die Ergebnisse von Waleczek (2002) gewählt, die bei Komplexen aus einem Kamillen-CO₂-Extrakt und β-CD hohe Einschlußraten ab einem Massenverhältnis von etwa 7:1 (β-CD:Extrakt) findet. Aus dem Gehalt im Extrakt und dem Molekulargewicht des jeweiligen Inhaltsstoffes lassen sich die molaren Verhältnisse β-CD:Extraktbestandteil berechnen (Tab. 5.1).

Im Anschluss an die Extraktion folgt analog den reinen CO₂-Extrakten die Gefriertrocknung zur Entfernung von mitextrahiertem Wasser. Nach Homogenisierung resultiert ein freifließendes Pulver, das in Abhängigkeit vom Massenverhältnis β-CD:Extrakt hellgelb (8:1) bis kräftig gelb (2:1) ist. Der intensive, charakteristische Kamillengeruch eines reinen CO₂-Extraktes ist durch die Komplexbildung deutlich reduziert.

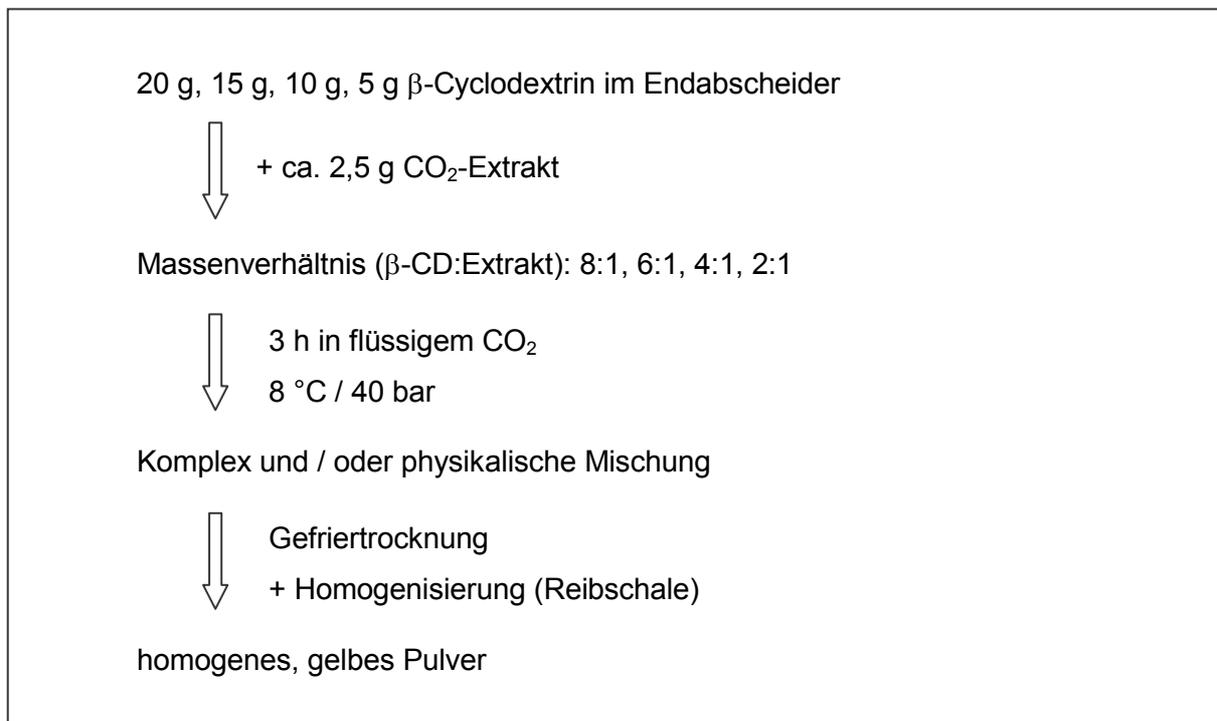
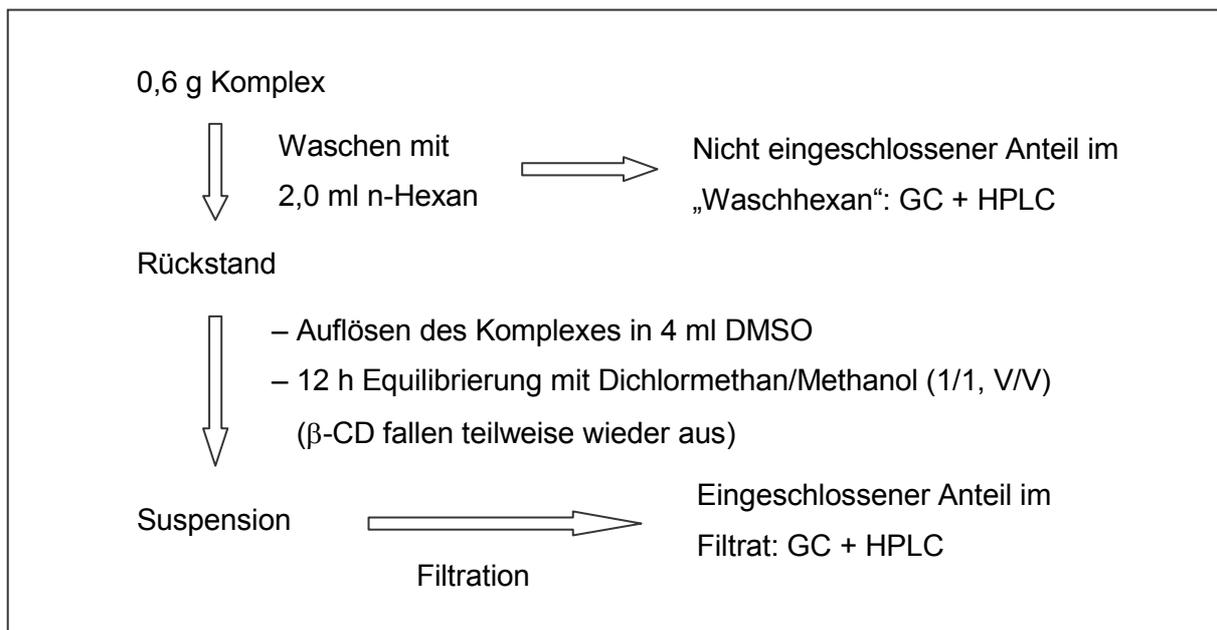


Abb. 5.3 Schema der Herstellung von In-line-Einschlussverbindungen eines Kamillen-CO₂-Extraktes mit β-Cyclodextrin

Tab. 5.1 Resultierende molare Verhältnisse β -CD:Extraktbestandteil bei unterschiedlichen Massenverhältnissen β -CD:CO₂-Extrakt

| Massenverhältnis | 2:1 | 4:1 | 6:1 | 8:1 |
|--------------------------|--|------|------|------|
| Extraktbestandteil | Molare Verhältnisse β -CD:Extraktbestandteil | | | |
| β -Farnesen | 7,7 | 15,5 | 23,2 | 31,0 |
| (-)- α -Bisabolol | 2,4 | 4,8 | 7,2 | 9,6 |
| C ₂₅ -n-Alkan | 8,7 | 17,4 | 26,1 | 34,8 |
| Matricin | 9,6 | 19,2 | 28,8 | 38,4 |
| trans-EID | 8,2 | 16,3 | 24,5 | 32,6 |
| cis-EID | 1,8 | 3,6 | 5,5 | 7,3 |

Die Analytik der Kamillen-CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplexe erfolgt nach der von Waleczek et al. (2002) entwickelten Methode (Abb. 5.4). Die Komplexe müssen entsprechend der Knetmethode von lose an der Oberfläche adhärenierten Extraktresten befreit werden (Loftsson 1999). Dies geschieht durch einen Waschschriff mit n-Hexan, in welchem β -CD und β -CD-Komplexe unlöslich sind, die lipophilen Kamilleninhaltsstoffe aber eine gute Löslichkeit aufweisen. Der Gehalt an Kamilleninhaltsstoffen im sog. „Waschhexan“ repräsentiert den nicht im Komplex eingeschlossenen Anteil. Der Rückstand aus β -CD und β -CD-Komplex wird zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) vollständig gelöst. Da die direkte Analytik der DMSO-Phase mittels GC und HPLC nicht möglich ist, schließt sich eine Equilibrierung mit Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) an. Dabei fällt reines β -CD teilweise wieder aus, während die Kamilleninhaltsstoffe in Lösung bleiben. Nach Filtration kann der komplexierte Anteil an Extraktbestandteilen im Filtrat bestimmt werden, der Filtrerrückstand sollte weiß und damit frei von Extraktresten sein. Der Gesamtgehalt der Kamilleninhaltsstoffe ergibt sich aus der Summe von eingeschlossenem und nicht eingeschlossenem Anteil, die Einschlußrate stellt das Verhältnis aus eingeschlossenem Teil und der Summe beider Anteile dar.

Abb. 5.4 Analytik der In-line-Einschlussverbindungen mit β -Cyclodextrin

5.4 Gesamtgehalt und Einschussrate von Kamilleninhaltsstoffen im CO_2 -Extrakt/ β -CD-Komplex

Die Gesamtmenge an Extraktbestandteilen als Summe aus eingeschlossenem und nicht eingeschlossenem Anteil wird mit dem Gehalt eines reinen CO_2 -Extraktes verglichen, der unter identischen Bedingungen hergestellt ist. Die Umrechnung des Gehaltes im Komplex auf den Gehalt im Extrakt erfolgt gemäß den Gleichungen 5.3 und 5.4. Die unbekannte Ausbeute an reinem Extrakt wird in vier Vorversuchen ermittelt ($m_{\text{Ex}} = 2,58 \pm 0,16 \text{ g}$).

$$m_{\text{ges}} = w_{\text{Ko}} \cdot m_{\text{Ko}} \quad (5.3)$$

$$w_{\text{Ex}} = \frac{m_{\text{ges}}}{m_{\text{Ex}}} \quad (5.4)$$

| | |
|------------------|---|
| m_{ges} | Gesamtmenge des Inhaltsstoffes [mg] |
| w_{Ko} | Gehalt des Inhaltsstoffes im Komplex [mg/g Komplex] |
| w_{Ex} | Gehalt des Inhaltsstoffes im Extrakt [mg/g Extrakt] |
| m_{Ko} | Gesamtausbeute des Komplexes [g] |
| m_{Ex} | Gesamtausbeute des Extraktes [g] |

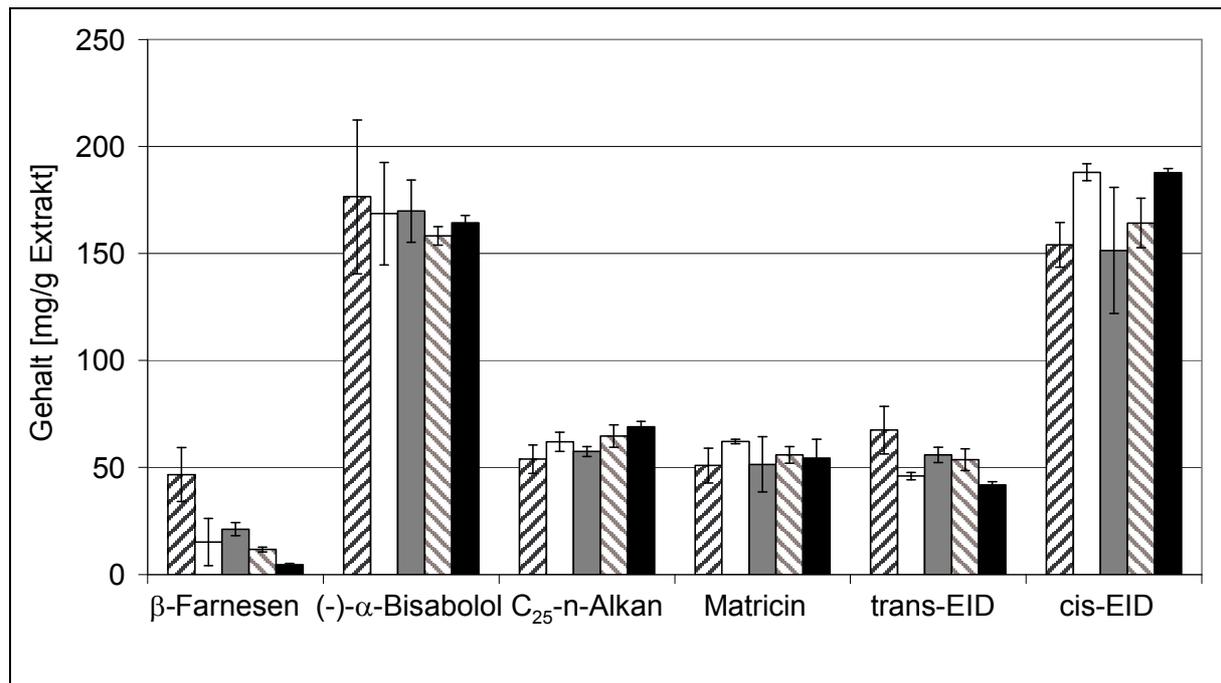


Abb. 5.5 Gehalt an Kamilleninhaltsstoffen in CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplexen in Abhängigkeit vom Verhältnis β -CD:Extrakt und im Vergleich zu einem reinen CO₂-Extrakt; (▨) 8:1, (□) 6:1, (■) 4:1, (▩) 2:1, (■) reiner CO₂-Extrakt

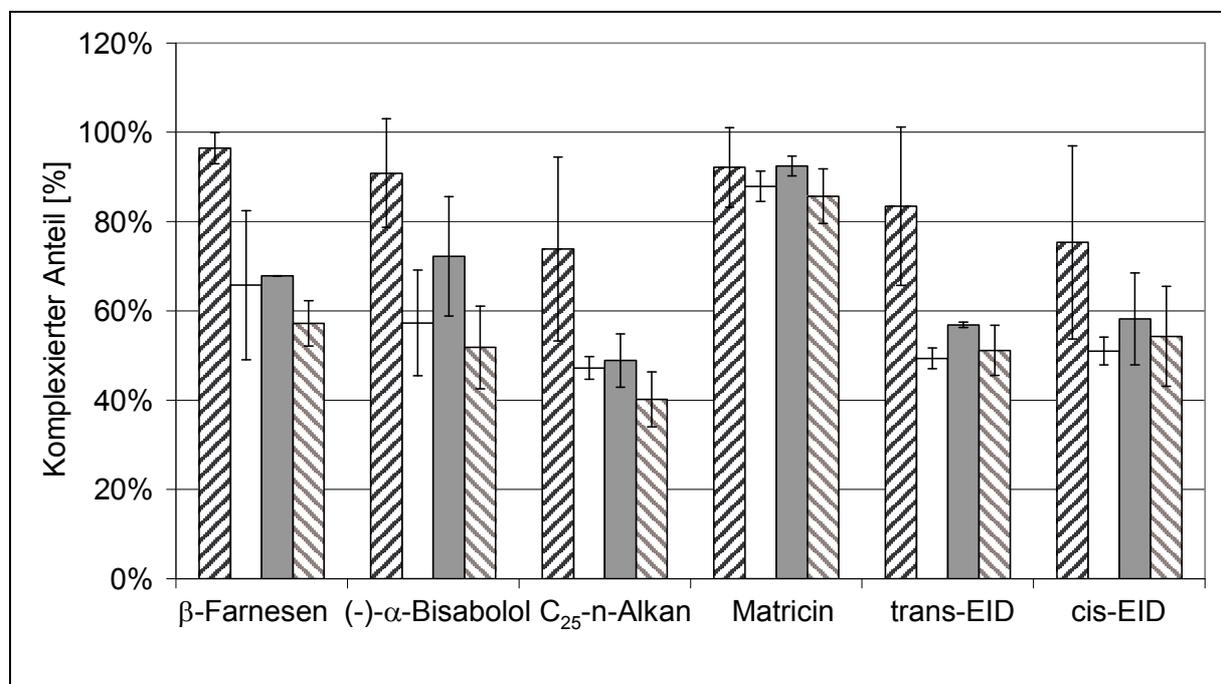


Abb. 5.6 Einschussraten der Kamilleninhaltsstoffe in β -CD in Abhängigkeit vom Verhältnis β -CD:Extrakt; (▨) 8:1, (□) 6:1, (■) 4:1, (▩) 2:1

Für (-)- α -Bisabolol, C₂₅-n-Alkan, Matricin und die EID gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Gehalt im β -CD-Komplex und dem Gehalt eines reinen CO₂-Extraktes (siehe Abb. 5.5). Größere Schwankungen bei den EID deuten auf eingetretene Isomerisierungsreaktionen hin, ein hoher Gehalt an cis-EID geht jeweils mit einem niedrigen Gehalt an trans-EID einher und umgekehrt. Einzig β -Farnesen weist deutlich höhere Gehalte im Komplex auf. Diese betragen bei einem β -CD:Extrakt-Verhältnis von 8:1 das 10fache des Gehaltes im CO₂-Extrakt und nehmen mit abnehmender β -CD-Menge auf etwa das 2,5fache ab.

Die Einschussraten der Kamilleninhaltsstoffe sind in Abb. 5.6 dargestellt. Bei einem β -CD:Extrakt-Verhältnis von 8:1 resultieren für alle betrachteten Inhaltsstoffe hohe Einschussraten zwischen 74 % (C₂₅-n-Alkan) und 96 % (β -Farnesen). Eine Reduktion der β -CD-Menge bewirkt eine Abnahme der Einschussrate auf 40-60 % für C₂₅-n-Alkan und EID und auf 50-70 % für β -Farnesen und (-)- α -Bisabolol. Matricin zeigt ein davon abweichendes Verhalten, die Einschussraten liegen konstant hoch zwischen 85-93 %, unabhängig von der eingesetzten Menge an β -CD.

5.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Problematik der Verluste an β -Farnesen aufgrund seiner Flüchtigkeit während der Entspannung des Abscheidebehälters und der Gefriertrocknung wurde bereits in Kapitel 4.4.1.4 (S. 50) diskutiert. β -CD wirkt einerseits als Auffangmedium im Endabscheider und erhöht damit die Ausbeute an flüchtigen Substanzen (Adda und Lorne 1991), andererseits verhindert es die Verflüchtigung von β -Farnesen während der Gefriertrocknung. Der Gehalt bei Einsatz von 20 g β -CD (β -CD:Extrakt = 8:1) ist vergleichbar mit dem Gehalt eines Extraktes, der nach langsamer Entspannung im Exsikkator bei Umgebungsdruck und Raumtemperatur getrocknet wird (siehe Abb. 4.8, S. 42). Berücksichtigt man dies bei der Aufstellung einer Gesamtbilanz, so ergeben sich auch für β -Farnesen Wiederfindungsraten im extrahierten Anteil von 70-85 % und insgesamt von 90-95 % (vgl. Abb. 4.11, S. 46).

Die Hexan-Waschmethode erweist sich als geeignet zur Analytik der Kamillen-CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplexe. Es können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gehalten im reinen CO₂-Extrakt und im Komplex festgestellt werden. Die Ausnahmestellung des β -Farnesens in dieser Hinsicht wurde bereits diskutiert. Indirekt kann durch diese Methode der Beweis erbracht werden, dass ein Einschluss von Kamilleninhaltsstoffen stattgefunden hat. Dazu muss eine Sättigung des n-Hexans mit gelösten Substanzen ausgeschlossen werden. Dieser Schluss ist für β -CD:Extrakt-Verhältnisse von 4:1, 6:1 und 8:1 zulässig, da sich bei

einem Verhältnis von 2:1 eine 2- bis 15-mal höhere Löslichkeit der Inhaltsstoffe ergibt (Tab. 5.2). β -Farnesen ist in Tab. 5.2 nicht berücksichtigt, da stark unterschiedlicher Gesamtmenge – bedingt durch die Instabilität während der Gefriertrocknung – die Aufstellung gelöster Absolutmengen im Waschhexan verzerren.

Pro fixer Komplexmenge (0,6 g) wird ein konstantes Volumen n-Hexan (2,0 ml) für den Waschschrift eingesetzt. Demzufolge steht zum Lösen der Inhaltsstoffe bei einem β -CD:Extrakt-Verhältnis von 2:1 weniger n-Hexan pro Extraktmenge zur Verfügung als bei einem höheren Verhältnis. Da trotz einem zunehmenden Lösungsmittel:Extrakt-Verhältnis die absolut gelöste Menge aller Inhaltsstoffe kontinuierlich abnimmt, muss dies im Umkehrschluss auf einen Einschluss dieser Inhaltsstoffe in β -CD zurückzuführen sein.

Tab. 5.2 Gelöste Menge an Kamilleninhaltsstoffen im Waschhexan in Abhängigkeit vom β -CD:Extrakt-Verhältnis

| β -CD:Extrakt [g/g] | 2:1 | 4:1 | 6:1 | 8:1 |
|---------------------------|---|------|------|------|
| n-Hexan:Extrakt [ml/g] | 10:1 | 17:1 | 23:1 | 30:1 |
| Extraktbestandteil | gelöste Menge [mg] in 2 ml n-Hexan (Waschhexan) | | | |
| (-)- α -Bisabolol | 15,25 | 5,66 | 6,17 | 1,07 |
| C ₂₅ -n-Alkan | 7,73 | 3,52 | 2,80 | 0,94 |
| Matricin | 1,60 | 0,46 | 0,64 | 0,26 |
| trans-EID | 5,25 | 2,89 | 1,99 | 0,74 |
| cis-EID | 15,01 | 7,60 | 7,89 | 2,52 |

Die unterschiedliche Affinität der Inhaltsstoffe in die Kavität des β -CD eingeschlossen zu werden, kann verschiedene Ursachen haben. So ergibt sich für Matricin aufgrund seines geringen Gehaltes im Extrakt und seines hohen Molekulargewichts ein hohes molares Verhältnis β -CD:Matricin, welches eine Komplexbildung begünstigt. Da für β -Farnesen, C₂₅-n-Alkan und trans-EID ähnlich hohe Verhältnisse bei deutlich geringerer Einschlussrate vorliegen, müssen auch Molekülform und -größe sowie die Fähigkeit, zwischenmolekulare Wechselwirkungen mit dem β -CD-Molekül einzugehen, eine Rolle spielen. Neben unpolaren van-der-Waals-Kräften können auch Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, die eine Fixierung des Matricinmoleküls am Rand des β -CD-Torus ermöglichen, während ein anderer

Molekülteil in der Kavität des β -CD-Moleküls bindet. Die räumliche Struktur des Matricins (Abb. 5.7) erlaubt möglicherweise das Eindringen eines der beiden 5-Ringsysteme, da eine gewisse Flexibilität des Gastmoleküls die Einnahme einer zum Einschluss geeigneten Konformation ermöglicht. Dies würde erklären, warum Matricin im Gegensatz zu Chamazulen (Thoß et al. 1993) in β -CD eingeschlossen werden kann. Letzteres hat aufgrund eines planaren, starren, über den 5- und 7-Ring ausgedehnten aromatischen Systems und kurzer Seitenketten keine Möglichkeit, ganz oder teilweise in die Kavität des β -CDs einzudringen (Abb. 5.7). Das Molekülvolumen lässt demzufolge nur eine Abschätzung der Möglichkeit einer Komplexbildung zu, während für genauere Vorhersagen der Komplexstabilität auch die Flexibilität eines Moleküls herangezogen werden muss, da dadurch die Güte der Einpassung in die β -CD-Kavität beeinflusst wird (Buchwald 2002). Daraus kann auf die vergleichsweise niedrigen Einschlußraten der EID geschlossen werden, da sie aufgrund zweier Dreifachbindungen eine starre, gestreckte Struktur haben, die keine Möglichkeit zur Ausfüllung des β -CD-Hohlraumes bietet (siehe Abb. 4.10, S. 45). Die Vielzahl von empirischen, theoretischen, thermodynamischen oder strukturechemischen Ansätzen zeigt die Schwierigkeit, allgemeingültige Vorhersagen zur Korrelation von Molekülstruktur und Einschlußraten oder Stabilität von Komplexen zu treffen (Connors 1997).

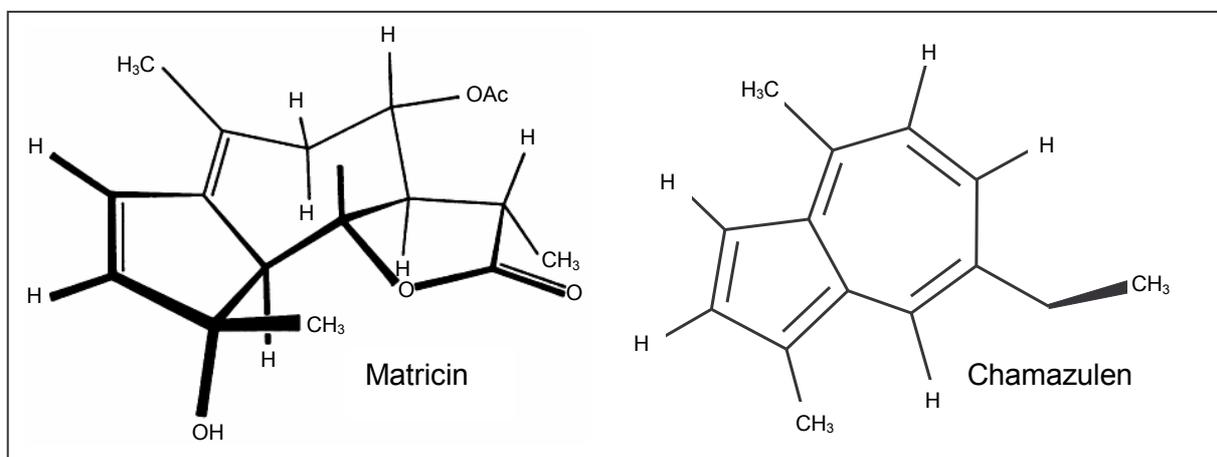


Abb. 5.7 Vergleich der räumlichen Struktur von Matricin mit der Struktur von Chamazulen (nach Flaskamp et al. 1982)

Um hohe Einschlußraten aller Inhaltsstoffe zu erzielen, sollte ein Massenverhältnis β -CD:Extrakt von 8:1 nicht unterschritten werden. Die Reduktion auf 6:1 führt zu signifikant niedrigeren Einschlußraten. Der CO₂-Extrakt stellt ein Vielstoffgemisch dar, das aufgrund seiner Herstellmethode einen Großteil an Substanzen enthält, die bezüglich ihrer Lipophilie und Molekülgröße geeignet sind, in die Kavität eines β -CD-Moleküls eingeschlossen zu wer-

den. Betrachtet man den Extrakt als *eine* Pseudokomponente, die eingeschlossen wird, und legt ein geschätztes durchschnittliches Molekulargewicht von 350 g/mol zugrunde, so bewegt sich das molare Verhältnis β -CD:Gast-Komponente zwischen 0,6:1 und 2,5:1. Der nur geringe Überschuss an β -CD erklärt die deutliche Abhängigkeit der Einschussraten vom gewählten Massenverhältnis.

5.6 Zusammenfassung

Die Koppelung von CO_2 -Extraktion und Einschluss des Extraktes in β -CD in einem Verfahrensschritt ist möglich. Der In-line-Einschluss erfolgt während der Extraktion im Abscheidebehälter in flüssigem CO_2 bei ca. 8 °C und 40 bar. Bei dieser Verfahrensweise verlängert sich weder der zeitliche Aufwand noch ist der Einsatz von Lösungsmitteln oder ein zusätzlicher maschineller Aufwand zur Komplexherstellung notwendig. Die Hexan-Waschmethode nach Waleczek (2002) zur Analytik der CO_2 -Extrakt/ β -CD-Einschlussverbindung ist für eine getrennte Erfassung von eingeschlossenem und nicht eingeschlossenem Anteil geeignet. Daraus lassen sich die prozentualen Einschussraten sowie die Gesamtwiederfindung der Inhaltsstoffe ermitteln. Der Gehalt an (-)- α -Bisabolol, C_{25} -n-Alkan, Matricin und EID in einem CO_2 -Extrakt/ β -CD-Komplex entspricht dem Gehalt eines reinen CO_2 -Extraktes. β -Farnesen wird durch Einschluss in β -CD vor einer Verflüchtigung während der Gefriertrocknung geschützt. Die Extraktgehalte sind in Abhängigkeit von der β -CD-Menge 2- bis 10-mal so hoch wie die eines gefriergetrockneten, reinen CO_2 -Extraktes. Die Einschussraten der Kamilleninhaltsstoffe variieren in Abhängigkeit vom gewählten Massenverhältnis β -CD:Extrakt und dem jeweiligen Inhaltsstoff zwischen 40 und 100 %. Insbesondere werden bei einem Massenverhältnis von 8:1, das einem geschätzten molaren Verhältnis von 2,5:1 entspricht, Einschussraten von 70-100 % erreicht. Der Einschluss von Matricin erfolgt unabhängig von der β -CD-Menge, die Einschussraten liegen konstant hoch zwischen 85 und 93 %.

Kapitel 6

Stabilitätsuntersuchungen von Matricin in überkritischen CO₂-Extrakten

6.1 Literaturübersicht

Matricin ist ein genuin in der Kamille vorkommendes Proazulen, das sich in saurer wässriger Lösung, bei der Wasserdampfdestillation von Kamillenblüten oder auch nur beim Erhitzen zum blau gefärbten Chamazulen zersetzt (Herout 1959). Auch in polaren Lösungsmitteln wie Ethanol/Wasser-Mischungen findet ein schneller Abbau sowohl des Matricins als auch des Zersetzungsproduktes Chamazulen statt. Nach sechs Wochen Lagerzeit sind Extrakte aus 45 %igem bzw. 70 %igem Ethanol azulenfrei (Gstirner und Berniker 1958, Isaac et al. 1959). Matricin selbst weist in wässrig-alkoholischen Extrakten eine Halbwertszeit von zwei (40 %iges Methanol) bis sechs Tagen (50 %iges Ethanol) auf (Ghassemi-Dehkordi 1988). Die Isolierung von Matricin erfolgt daher aus einem Petroletherextrakt (Cekan et al. 1954) oder aus Chloroformextrakten (Stahl und Schild 1981, Ness 1995). Die Extraktion mit überkritischem CO₂ bietet die Möglichkeit, matricinhaltige Kamillenextrakte bei niedrigen Temperaturen (40 °C) ohne den Einsatz organischer Lösungsmittel zu gewinnen (Stahl und Schütz 1978, Scallia et al. 1999). Die Autoren verwenden in ihren Arbeiten aber keine selektive Matricin-Analytik, die Erfassung erfolgt nach Konversion zu Chamazulen. Aus diesem Grund sind bislang keine Untersuchungen zur Ausbeute an Matricin, seiner Stabilität während der Extraktion und in CO₂-Extrakten bekannt. Obwohl Matricin eine dem (-)- α -Bisabolol entsprechende und dem Chamazulen deutlich überlegene antiphlogistische Wirkung aufweist, beschreibt eine Vielzahl weiterer Autoren (siehe Kapitel 4.1, S. 32) die überkritische Extraktion von Kamillenblüten, ohne auf das Verhalten von Matricin einzugehen.

Abb. 6.1 zeigt den Zersetzungsmechanismus von Matricin im sauren pH-Bereich, der über eine Esterhydrolyse und Abspaltung der Essigsäure, eine Dehydratisierung und Spaltung des Lactonringes zur Chamazulencarbonsäure und zuletzt nach Decarboxylierung zum Chamazulen führt. Dadurch kann ein System konjugierter Doppelbindungen ausgebildet werden, das sich über den 5- und 7-Ring erstreckt. Chamazulen selbst ist in wässriger Lösung bei niedrigen pH-Werten instabil, und es kommt zum sog. „Vergrünungsprozess“. Dabei finden Autoxidationsprozesse (Stahl 1957) und Polymerisationen (Ghassemi-Dehkordi 1988) statt, der Gehalt an Chamazulen sinkt beträchtlich, und die Lösungen verändern ihre Farbe vom typischen Azulen-Blau nach grün bis grün-gelb.

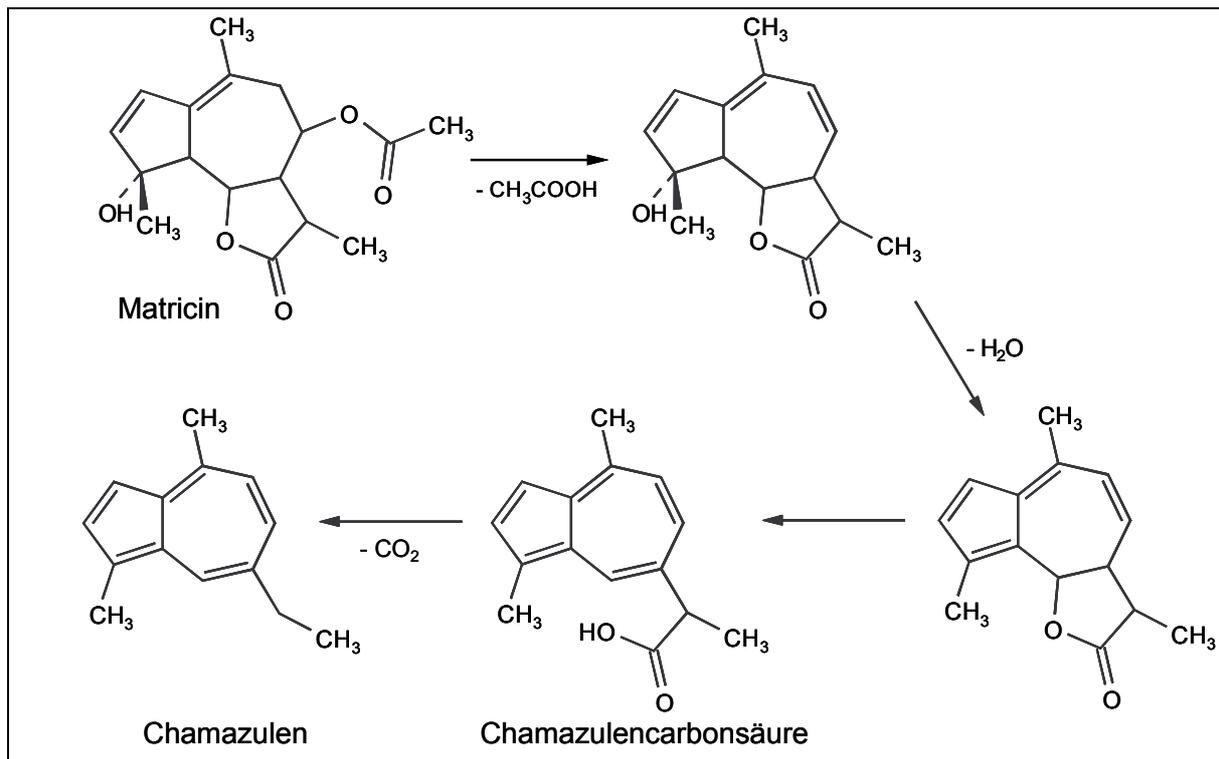


Abb. 6.1 Zersetzungsmechanismus von Matricin im sauren pH-Bereich

Die pH-Abhängigkeit der Zersetzung von Matricin untersucht Ness (1995). Der in Abb. 6.1 dargestellte Zersetzungsmechanismus gilt demzufolge nur im sauren pH-Bereich. Im alkalischen pH-Bereich wird unter Abspaltung von Essigsäure und Wasseraufnahme das 8-Desacetylmaticin gebildet. Allerdings findet in allen wässrigen, ungepufferten, matricinhaltigen Lösungen ein pH-Wert-Abfall statt, da bei der Zersetzung durch Hydrolyse von Estern Säuren gebildet werden. So verläuft die Zersetzung von Matricin im neutralen Bereich bei pH 7 zunächst relativ langsam, nach fünf Tagen beträgt der Gehalt noch mehr als 50 % der Ausgangsmenge. Die Zersetzungsgeschwindigkeit nimmt danach deutlich zu, was auf den Abfall des pH-Wertes bis zu diesem Zeitpunkt auf einen Wert von pH 5 zurückzuführen ist. Gleichzeitig erreicht der Gehalt an Chamazulencarbonsäure ein Maximum. Nach insgesamt sieben Tagen ist kein Matricin mehr nachweisbar. Sehr viel schneller verläuft die Zersetzung bei niedrigeren pH-Werten. Bei pH 4 ist Matricin nach 12 Stunden, bei pH 5 nach etwa drei Tagen vollständig abgebaut. Die Anpassung der Zersetzungsgeschwindigkeit an eine Kinetik erster Ordnung ergibt ein Stabilitätsoptimum von Matricin bei pH 8 und eine Zunahme der Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten um mehr als zwei Zehnerpotenzen bei pH 4.

6.2 Einfluss der Trocknungsart von CO₂-Extrakten auf die Stabilität von Matricin

Der Einfluss der Trocknungsart von Kamillen-CO₂-Extrakten wurde bereits bei der Optimierung der Extraktionsparameter in Kapitel 4.2.4 (S. 41) untersucht. Dabei zeigt sich, dass beträchtliche Verluste während der Gefriertrocknung besonders bei sehr flüchtigen Inhaltsstoffen wie β -Farnesen auftreten. Demgegenüber steht das Verhalten von Matricin, das bezüglich seiner Instabilität unter den Kamilleninhaltsstoffen eine Sonderstellung einnimmt. Während für (-)- α -Bisabolol, EID und C₂₅-n-Alkan bei möglichst schonender Trocknung im Exsikkator bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck geringfügig höhere Gehalte als nach Gefriertrocknung resultieren, nimmt der Gehalt an Matricin innerhalb eines Tages auf etwa $\frac{1}{4}$ der Ausgangsmenge ab. Nach sieben Tagen ist Matricin in CO₂-Extrakten, die im Exsikkator getrocknet werden, nicht mehr nachweisbar (Tab. 6.1). Die Farbe des Extraktes verändert sich in dieser Zeit von gelb über orange nach grün, ein Zeichen für die Entstehung des blauen Chamazulens, das mit dem gelben Extrakt die Mischfarbe Grün bildet, sowie weiterer Abbauprodukte.

Tab. 6.1 Matricingehalt eines CO₂-Extraktes während der Trocknung im Exsikkator bei Raumtemperatur

| Zeit nach Extraktion | 2 Stunden | 1 Tag | 2 Tage | 3 Tage | 5 Tage | 7 Tage |
|----------------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|--------|
| Matricin-gehalt [%] | 100,0 | 27,5 ± 6,7 | 18,3 ± 2,5 | 13,4 ± 1,6 | 9,6 ± 1,1 | n. d. |

Nach Gefriertrocknung kann Matricin in CO₂-Extrakten durch Lagerung bei -30 °C über sechs Monate stabilisiert werden. Bei +5 °C findet eine geringe Abnahme auf 80-90 % des Anfangsgehaltes statt. Die Lagerung bei Raumtemperatur führt innerhalb von vier Monaten, die Lagerung bei +30 °C innerhalb von drei Monaten zum vollständigen Abbau von Matricin (Abb. 6.2).

Dabei fällt auf, dass die Abnahme in Extrakten, die aus fein geschnittener Droge gewonnen werden, schneller verläuft, wenngleich die Unterschiede nicht signifikant sind. Um den Einfluss des Restwassergehaltes in CO₂-Extrakten auf die Stabilität von Matricin zu untersuchen, werden die Wassergehalte mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt und den entsprechenden Matricingehalten gegenübergestellt (Tab. 6.2). Eine pH-Wert-Messung in co-extra-

hiertem Wasser, das nach Separation aus der lipophilen Extraktmatrix abgenommen werden kann, ergibt einen pH-Wert zwischen 2,8 und 4,3.

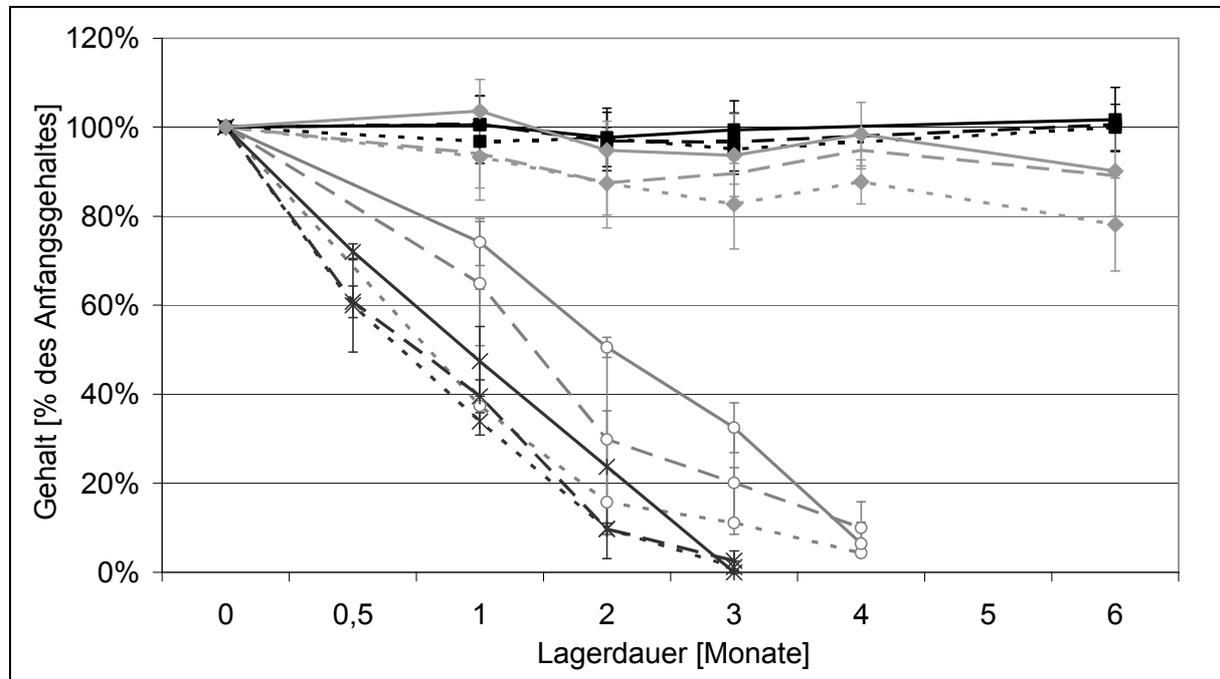


Abb. 6.2 Matricingehalte in CO₂-Extrakten in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und dem Zerkleinerungsgrad der Droge

(—) ganze Droge; (— —) grob geschnitten; (- - -) fein geschnitten
 (■) -30 °C; (◆) +5 °C; (○) Raumtemperatur; (*) +30 °C

Die Korrelation zwischen Restwassergehalt und Zersetzung von Matricin wird besonders bei Extrakten aus fein geschnittener Droge deutlich. Ein Wassergehalt von 0,55 % führt zu einer Abnahme des Matricingehaltes auf etwa 40 % nach 2 Monaten bei Raumtemperatur. Dagegen sind in Extrakten, die den 3- bis 6fachen Wassergehalt aufweisen, zum gleichen Zeitpunkt nur noch 5,1 bzw. 2,3 % des Anfangswertes an Matricin enthalten. Die Lagerung bei +5 °C verzögert den Abbau, derselbe Trend bleibt jedoch erkennbar. In einer ähnlichen Größenordnung liegen die Wasser- und Matricingehalte der restlichen untersuchten Extrakte. Dabei bewegen sich die Matricingehalte nach Lagerung bei Raumtemperatur bei niedrigen Wassergehalten (0,5–0,9 %) zwischen 40 und 52 %, Wassergehalte, die über 1,4 % liegen, bewirken eine drastische Beschleunigung des Matricin-Abbaus auf Gehalte von 2–5 % nach zwei Monaten.

Tab. 6.2 Gegenüberstellung von Wasser- und Matricingehalt einzelner CO₂-Extrakte nach zweimonatiger Lagerung bei Raumtemperatur (RT) und bei +5 °C

| Zerkleinerungsgrad | Wassergehalt [%] | Matricingehalt [% des Anfangsgehaltes] | |
|--------------------|------------------|--|-----------------|
| | | RT, 2 Monate | +5 °C, 2 Monate |
| fein geschnitten | 0,55 ± 0,03 | 39,9 | 94,1 |
| fein geschnitten | 1,97 ± 0,04 | 5,1 | 85,3 |
| fein geschnitten | 3,42 ± 0,06 | 2,3 | 78,1 |
| grob geschnitten | 0,58 ± 0,05 | 41,7 | 91,5 |
| grob geschnitten | 0,50 ± 0,06 | 42,6 | 87,4 |
| grob geschnitten | 1,40 ± 0,16 | 5,2 | 73,4 |
| ganze Droge | 0,61 ± 0,01 | 52,5 | 91,3 |
| ganze Droge | 0,66 ± 0,01 | 48,1 | 91,5 |
| ganze Droge | 0,89 ± 0,03 | 51,1 | 101,5 |

6.3 Stabilität von Matricin in einem CO₂-Extrakt/β-CD-Komplex

Im Folgenden wird die Stabilität von Matricin als Bestandteil von CO₂-Extrakt/β-CD-Komplexen untersucht. Die Einschussraten unmittelbar nach Herstellung der Komplexe werden mittels der Hexan-Wasch-Methode bestimmt und sind unter 5.4 (S. 61) angegeben und diskutiert. Nach einmonatiger Lagerung bei -30 °C, Raumtemperatur und +30 °C wird die Bestimmung der Einschussraten wiederholt. Abb. 6.3 und Abb. 6.4 zeigen die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Lagertemperatur beim höchsten (8:1) und niedrigsten (2:1) Verhältnis von β-CD:Extrakt.

Weder bei hohen Massenverhältnissen β-CD:Extrakt (8:1) noch bei niedrigen (2:1) kann ein Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Einschussraten festgestellt werden. Die etwa 10-20 % niedrigeren Einschussraten des C₂₅-n-Alkans und der EID, die bei Verwendung von 20 g β-CD bereits unmittelbar nach Herstellung der Komplexe festgestellt werden (Abb. 5.6, S. 62), bestätigen sich, allerdings kann aufgrund von hohen Streuungen keine Signifikanz dieser Unterschiede gezeigt werden.

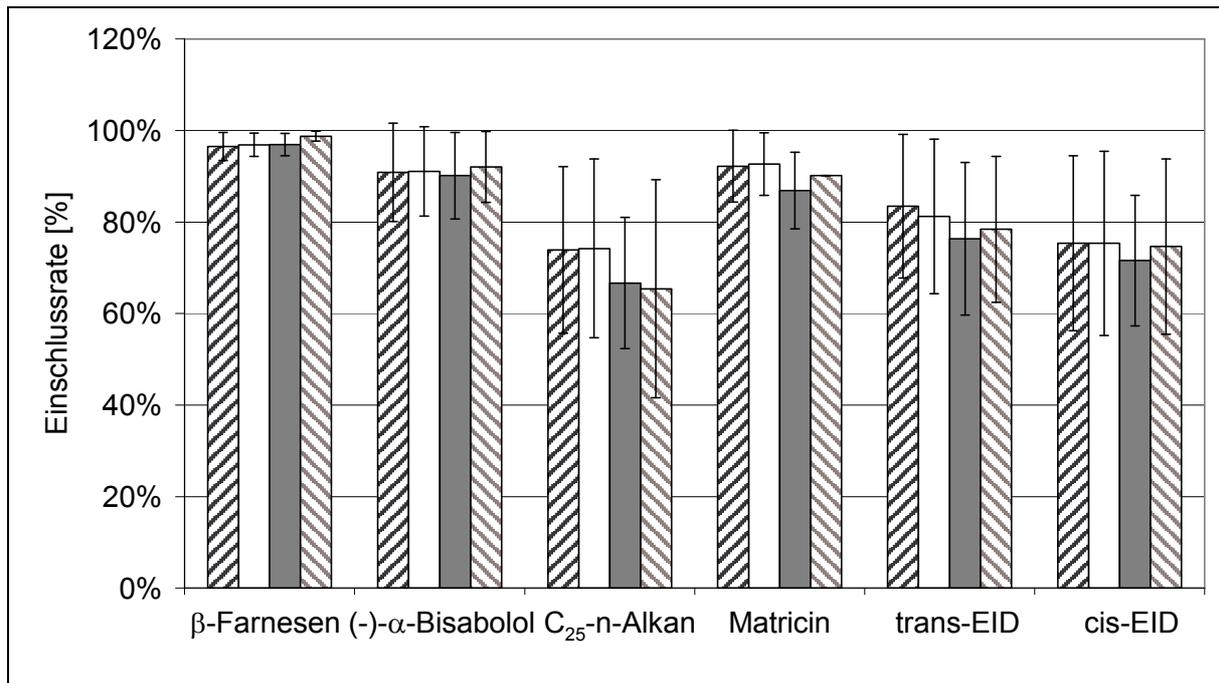


Abb. 6.3 Einschlussraten in Kamillen-CO₂-Extrakt/β-CD-Komplexen nach einmonatiger Lagerung (Verhältnis β-CD:Extrakt = 8:1, 20 g β-CD);
 (▨) Anfangswert; (□) -30 °C; (■) Raumtemperatur; (▩) +30 °C

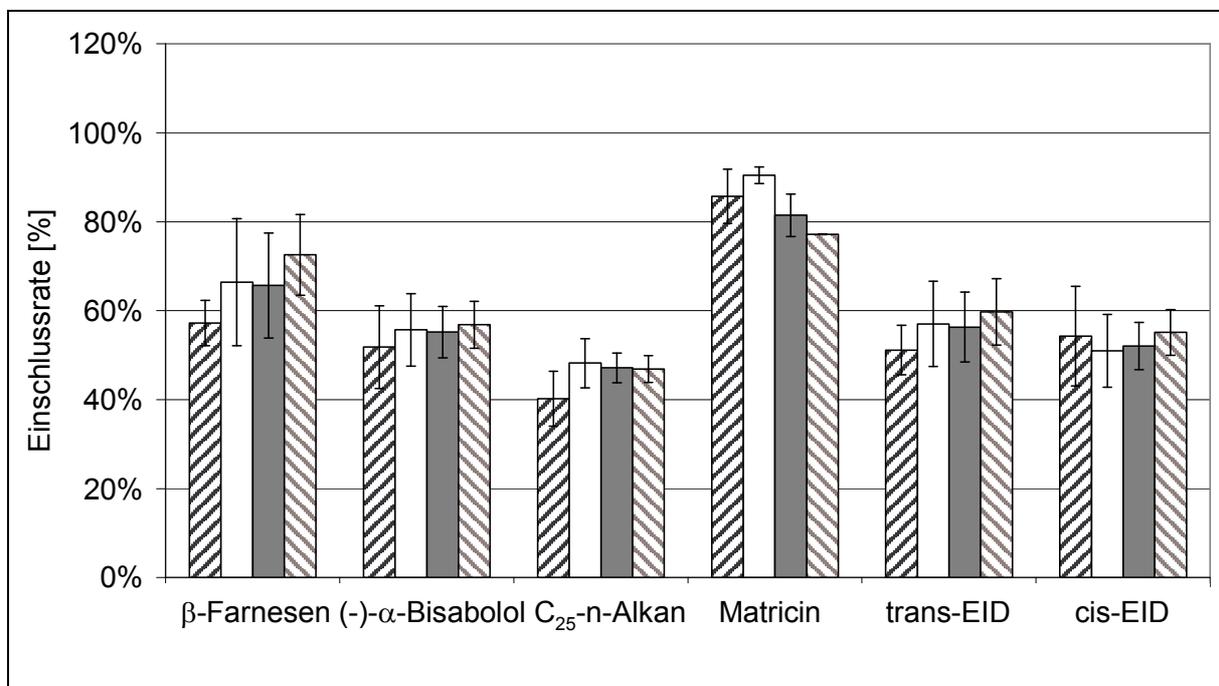


Abb. 6.4 Einschlussraten in Kamillen-CO₂-Extrakt/β-CD-Komplexen nach einmonatiger Lagerung (Verhältnis β-CD:Extrakt = 2:1, 5 g β-CD);
 (▨) Anfangswert; (□) -30 °C; (■) Raumtemperatur; (▩) +30 °C

Die Bestimmung des Matricingehaltes als Summe aus eingeschlossenem und nicht eingeschlossenem Anteil in CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplexen nach einmonatiger Lagerung ergibt keine Stabilitätsverbesserung im Vergleich zu einem reinen CO₂-Extrakt (Abb. 6.5). Bei einer Lagertemperatur von -30 °C sind sowohl CO₂-Extrakt als CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplex stabil. Nach einmonatiger Lagerung bei Raumtemperatur nimmt der Gehalt an Matricin in einem reinen CO₂-Extrakt auf durchschnittlich 65 % ab, ein signifikanter Unterschied zum Matricingehalt in β -CD-Komplexen (43-82 %) kann aufgrund großer Streuungen nicht festgestellt werden. Eine weitere Erhöhung der Lagerungstemperatur auf +30 °C führt nach einem Monat zu einer Abnahme des Matricingehaltes auf etwa 40 % in reinen CO₂-Extrakten, wohingegen die Einschlussverbindungen nur in einem Fall (β -CD:Extrakt = 6:1) ähnliche Mengen Matricin (34,7 %) enthalten, die anderen Matricingehalte liegen unter 10 %.

Der ursprüngliche Wassergehalt des eingesetzten β -CD liegt bei 13,7 %, nach Gefriertrocknung enthalten die β -CD-Komplexe unabhängig vom gewählten Massenverhältnis noch 6,7 % \pm 0,8 % Wasser (n = 12, je n = 3 pro Massenverhältnis). Die Separation eines Teils des co-extrahierten Wassers, die bei reinen CO₂-Extrakten zu beobachten ist, findet bei Einsatz von β -CD nicht statt, da Cyclodextrine und entsprechend auch die Einschlussverbindungen aufgrund ihrer Hydrophilie eine zu große Affinität zu Wasser haben.

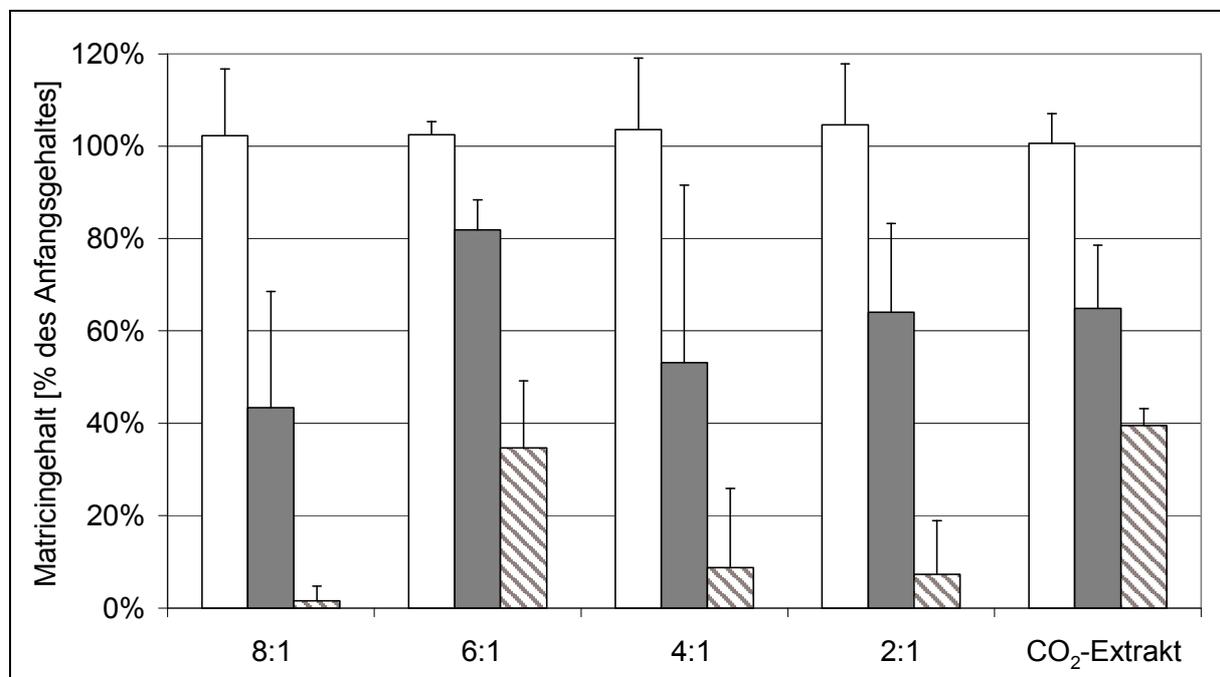


Abb. 6.5 Matricingehalt in CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplexen nach einmonatiger Lagerung in Abhängigkeit vom Verhältnis β -CD:Extrakt und im Vergleich zu einem reinen CO₂-Extrakt; (□) -30 °C; (■) Raumtemperatur; (▨) +30 °C

6.4 Diskussion der Ergebnisse

Die Anwesenheit von Wasser in CO₂-Extrakten hat entscheidenden Einfluss auf die Stabilität von Matricin. Da in getrockneter Kamillendroge Restwassergehalte von 8-15 % vorliegen, stellt Wasser mit ca. 20-25 g pro Extraktionsansatz die größte Menge eines extrahierbaren Inhaltsstoffes dar. Eine Löslichkeit von 0,16 % (King et al. 1992) erlaubt bei einem Lösungsmitteldurchsatz von 24 kg CO₂ die Extraktion von bis zu 40 g Wasser, wenn es als alleinige Komponente vorliegt. Neben der Extraktion anderer lipophiler Inhaltsstoffe werden bei einer Extraktion unter Referenzbedingungen ca. 10-14 g Wasser extrahiert, entsprechend 80-85 % der Gesamtmenge an Extrakt. Obgleich eine Trocknung im Exsikkator im Hinblick auf die Flüchtigkeit der Bestandteile des ätherischen Öls gegenüber einer Gefriertrocknung Vorteile hat, kann sie für Matricin nicht eingesetzt werden. Der Kontakt mit Wasser führt innerhalb von sieben Tagen zur vollständigen Zersetzung dieses hydrolyseempfindlichen Inhaltsstoffes. Die rasche Zersetzung wird durch den pH-Wert des co-extrahierten Wassers begünstigt, der bereits unmittelbar nach Extraktion deutlich im sauren Bereich liegt (2,8-4,3). Ein Vergleich mit den Daten von Ness (1995) ergibt im CO₂-Extrakt trotz niedrigerem pH-Wert erwartungsgemäß eine langsamere Zersetzung, da keine wässrige Lösung vorliegt, sondern lipophiler Extrakt und Wasser nebeneinander. Für den niedrigen pH-Wert des Wassers kommen unterschiedliche Ursachen in Frage.

Der pH-Wert von Wasser sinkt in Kontakt mit CO₂ infolge der Bildung von Kohlensäure. Toews et al. (1995) führen direkte Messungen des pH-Wertes von CO₂-gesättigtem Wasser bei unterschiedlichen Druck- und Temperaturbedingungen durch. Dieser variiert in engen Grenzen zwischen 2,80-2,95 bei 25-70 °C und 70-200 bar. Als Folge dieses niedrigen pH-Wertes kann bereits während der Extraktion die Zersetzung des Matricins einsetzen, die ihrerseits wiederum über die Bildung von Chamazulencarbonsäure verläuft, den pH-Wert erniedrigt und die Reaktion autokatalytisch beschleunigt (siehe Abb. 6.1). Ein weiterer Aspekt ist die bei niedrigen pH-Werten zurückgedrängte Dissoziation von Pflanzensäuren, deren geringe Löslichkeit in überkritischem CO₂ dadurch verbessert wird. Nach Sublimation des CO₂ kann ein ansteigender pH-Wert zur Dissoziation der Säuren führen. Im Falle der Kamille sind nennenswerte Mengen an Anissäure, Vanillinsäure sowie geringere Mengen an Syringasäure und Kaffeesäure nachgewiesen (Reichling et al. 1979).

Durch eine Gefriertrocknung kann die Entfernung des Wassers auf schonende Weise innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden. Die resultierenden Restwassergehalte weisen eine große Streuung auf (0,5-3,5 %), die möglicherweise auf Einschlüsse von Wasser innerhalb der Extraktmatrix zurückzuführen sind. Eine Lagerung bei -30 °C stoppt die kinetischen

Zersetzungsprozesse. Sobald diese allerdings bei höheren Temperaturen initiiert werden, findet eine kontinuierliche Abnahme des Matricingehaltes statt. Die Halbwertszeit von Matricin in CO₂-Extrakten beträgt bei +30°C bzw. bei Raumtemperatur 6-8 Wochen. Dies ist eine deutliche Verbesserung gegenüber Extrakten, die mit Ethanol/Wasser-Mischungen hergestellt werden mit Halbwertszeiten von etwa sieben Tagen. Hohe Streuungen der Matricingehalte während der Stabilitätsuntersuchung insbesondere bei +5 °C deuten auf eine bereits fortgeschrittene Zersetzung einzelner Extrakte hin, während die Vergleichsextrakte aufgrund geringerer Wassergehalte stabil sind. Die Tendenz einer beschleunigten Zersetzung von Matricin in Extrakten aus fein geschnittener Droge kann möglicherweise auf eine verbesserte Extraktion von Wasser aufgrund des geringeren Massentransferwiderstandes zurückgeführt werden.

Der positive Einfluss einer Komplexbildung mit β -CD auf die Stabilität von (-)- α -Bisabolol, EID und Chamazulen ist in der Literatur mehrfach beschrieben (siehe Kapitel 5.2, S. 57). Da entweder destilliertes Kamillenöl eingesetzt oder analytisch keine Unterscheidung zwischen Chamazulen und Matricin getroffen wird, liegen keine Daten zum Einfluss von β -CD auf die Stabilität von Matricin vor. Trotz hoher Einschussraten, die durch Untersuchungen nach einmonatiger Lagerung bestätigt werden, wird Matricin in β -CD-Komplexen gegenüber reinen CO₂-Extrakten schneller abgebaut. Wieder kann der Einfluss des Wassergehaltes sowohl von β -CD als auch des Extraktes als Ursache herangezogen werden. Ein lipophiler CO₂-Extrakt zeigt wenig Affinität zum co-extrahierten Wasser, weshalb eine teilweise Separation eintritt. Dies ist aufgrund der Hydrophilie der Cyclodextrine bei β -CD-Komplexen nicht der Fall, entsprechend sind bereits vor der Gefriertrocknung ein höherer Wassergehalt und ein intensiverer Kontakt zwischen Wasser und Inhaltsstoffen gegeben. Nach Gefriertrocknung liegen die Restwassergehalte zwischen 6 und 8 % im Vergleich zu 0,5-3,5 in CO₂-Extrakten. In Gegenwart von Wasser stellt sich gemäß der Stabilitätskonstanten des Komplexes ein Gleichgewicht zwischen freien und eingeschlossenen Inhaltsstoffen ein (Gl. 5.2). Freie, gelöste Matricinmoleküle sind dem hydrolytischen Angriff besonders ausgesetzt und werden dem Gleichgewicht entzogen, wodurch sich weitere Moleküle lösen können.

Einen anderen Ansatz zur Erklärung der verschlechterten Stabilität von Matricin in β -CD-Komplexen liefern verschiedene Untersuchungen, die katalytische Eigenschaften von Cyclodextrinen und deren Anwendbarkeit als Enzymmodelle beschreiben. So werden beispielsweise racemische Mandelsäureester in Gegenwart von Cyclodextrin 1,4-mal schneller hydrolysiert als ohne Cyclodextrin (Cramer und Dietsche 1959). Straub und Bender (1972) untersuchen Decarboxylierungsreaktionen von Benzoylessigsäuren. In Kombination mit β -CD fin-

det für alle untersuchten Substanzen über den gesamten pH-Bereich eine Beschleunigung dieses Reaktionstypes statt. Die Zersetzung von Matricin (Abb. 6.1) beinhaltet sowohl die Hydrolyse eines Essigsäureesters und eine Spaltung des Lactonringes als auch eine Decarboxylierungsreaktion. Ein beschleunigter Abbau von Matricin in einem β -CD-Komplex kann daher trotz oder sogar aufgrund hoher Einschussraten erklärt werden.

6.5 Zusammenfassung

Matricin wird aufgrund seiner Hydrolyseempfindlichkeit in Gegenwart von Wasser in CO_2 -Extrakten innerhalb von wenigen Tagen vollständig zersetzt. Der niedrige pH-Wert des co-extrahierten Wassers beschleunigt den Abbau von Matricin. Eine Ursache für das Absinken des pH-Wertes während der Extraktion ist die Sättigung des Wassers mit CO_2 und infolgedessen die Bildung von Kohlensäure. Ferner können extrahierte Pflanzensäuren sowie die durch eine Zersetzung von Matricin gebildete Chamazulencarbonsäure einen Abfall des pH-Wertes bewirken. Die Gefriertrocknung bietet eine Möglichkeit, CO_2 -Extrakte schnell und schonend zu trocknen. Die Halbwertszeit von Matricin in CO_2 -Extrakten beträgt bei 20-30 °C zwischen sechs und acht Wochen, durch kühle Lagerung kann eine Stabilisierung über sechs Monate erreicht werden.

Trotz hoher Einschussraten von Matricin als Bestandteil eines CO_2 -Extraktes in β -Cyclodextrin, ist eine weitergehende Stabilisierung nicht möglich. Einerseits kann dafür der intensivierte Kontakt mit Wasser durch die Hydrophilisierung des CO_2 -Extraktes im β -CD-Komplex verantwortlich gemacht werden, es resultieren höhere Wassergehalte vor und nach der Gefriertrocknung. Andererseits werden β -CD-Moleküle als Enzymmodelle eingesetzt, da sie unter anderem die Hydrolyse von Estern und Decarboxylierungsreaktionen katalysieren. Beides sind Schritte der Matricinzersetzung und erklären dessen negativ beeinflusste Stabilität in Gegenwart von β -CD.

Kapitel 7

Extraktion hydrophiler Inhaltsstoffe und fraktionierte CO₂-Extraktion

7.1 Literaturübersicht

Die Extraktion von hydrophilen Pflanzeninhaltsstoffen wie Flavonoiden und Flavonoidglykosiden mit überkritischem CO₂ aus unterschiedlichen Matrices ist in der Literatur von verschiedenen Autoren, allerdings ausschließlich im analytischen Maßstab beschrieben. Chandra und Nair (1996) gelingt die Extraktion von Isoflavon-Aglyka aus Soja-Produkten. Eine maximale Ausbeute von 93 % erzielen sie bei 50 °C, 600 bar und 20 % Methanol als Schleppmittel. Isoflavon-Glykoside können unter den gewählten Bedingungen nicht im CO₂-Extrakt nachgewiesen werden. Eine Korrelation der Ausbeuten mit der Struktur von phenolischen Substanzen stellen Tena et al. (1998) auf. Unter optimierten Bedingungen (90 °C, 350 bar, 5 % MeOH) findet eine quantitative Extraktion von Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht und maximal zwei bis drei polaren funktionellen Gruppen statt. Als Modellsubstanzen werden p-Hydroxyzimtsäure, Salicylsäure und trans-Resveratrol von einer gespiketen SiO₂-Matrix extrahiert. Gallussäure, die im Vergleich zu Salicylsäure zwei zusätzliche Hydroxylgruppen aufweist, wird nur zu 40 % extrahiert, Quercetin – ein Flavonoid mit fünf Hydroxylgruppen – wird „kaum“ extrahiert, Myricetin mit sechs Hydroxylgruppen ist nicht im Extrakt enthalten. Flavonoid-Aglyka aus Blättern von *Ginkgo biloba* werden bei 60 °C, 312 bar und einer Schleppmittelkonzentration von 24 % Ethanol zu 29 % extrahiert. Referenzmethode ist eine Soxhletextraktion mit 95 %igem Ethanol (Chiu et al. 2002).

Angaben zur Optimierung der Extraktionsbedingungen im Hinblick auf die Gesamtextraktausbeute ohne Aussagen über die Effizienz des Extraktionsverfahrens für einzelne Inhaltsstoffe finden sich für eine Reihe weiterer Flavonoide und Matrices (siehe Tab. 7.1).

Insgesamt sind zur Extraktion von Flavonoiden meist hohe Temperaturen erforderlich. Um eine ausreichende Gasdichte zu erhalten, muss ein entsprechend hoher Extraktionsdruck gewählt werden. Darüber hinaus ist der Einsatz eines Schleppmittels in höheren Konzentrationen (10–25 %) notwendig. Methanol wird meist aufgrund seiner Polarität dem lipophileren Ethanol vorgezogen.

Tab. 7.1 Literaturstellen zur Optimierung der Extraktion von Flavonoiden

| Autoren | Jahr | Matrix | Zielsubstanzen | Optimum |
|-----------------|------|----------------------------------|---|--|
| Moraes et al. | 1997 | Passionsblumenblätter | Flavonoid-Glykoside | 70 °C / 101 bar / 15 % MeOH |
| Le Floch et al. | 1998 | Olivenblätter | Flavonoid-Aglyka weitere Phenole | 100 °C / 334 bar / 10 % MeOH |
| Lin et al. | 1999 | Scutellaria (Helmkraut)-Wurzel | Flavonoid-Aglyka Flavonoid-Glykoside | 50 °C / 200 bar / 15 % MeOH/H ₂ O |
| da Costa et al. | 1999 | Wurzelrinde von Maclura pomifera | Flavanone Xanthone | 80 °C / 405 bar / 20 % MeOH |
| Senorans et al. | 2001 | Orangensaft | Flavonoid-Aglyka | 40 °C / 160 bar (Gegenstromextraktion) |
| Yang et al. | 2002 | Ginkgo Biloba Blätter | Flavonoid-Aglyka Terpen-Lactone | 60 °C / 300 bar 5 % EtOH |

7.2 Fraktionierte Extraktion mit lipophilem Vorextraktionsschritt

Die Extraktion von Kamillenblüten mit reinem CO₂ bei 40 °C und 90 bar führt zu Extrakten, die an lipophilen Inhaltsstoffen hoch angereichert sind. Flavonoide wie Apigenin-7-glucosid und Apigenin werden nicht oder nur unzureichend extrahiert. Da diese hydrophilen Inhaltsstoffe aber sowohl zur spasmolytischen (Achtterrath-Tuckermann 1980) als auch zur antiphlogistischen Wirkung (Della Loggia et al. 1990) der Kamille beitragen, ist es wünschenswert Extrakte herzustellen, die einen hohen Gehalt an Flavonoiden aufweisen. Dies kann durch Mazeration oder Perkolation mit organischen Lösungsmitteln geeigneter Polarität, z. B. Ethanol/Wasser-Mischungen erreicht werden. Nachteilig bei diesen Verfahren sind die geringe Selektivität des Lösungsmittels sowie der hohe Lösungsmittelverbrauch. Die fraktionierte CO₂-Extraktion stellt ein alternatives Verfahren dar, das zunächst in einem lipophilen Vorextraktionsschritt mit reinem CO₂ geringer Dichte die Bestandteile des ätherischen Öls auf schonende Weise abtrennt und im Extrakt anreichert. Daran schließt sich ein weiterer Extraktionsschritt an, in dem Ethanol oder Methanol als Cosolventien dem CO₂ zugegeben werden, wodurch die Extraktion hydrophiler Komponenten möglich wird.

Für die Durchführung der fraktionierten Extraktionen werden grob geschnittene Kamillenblüten der Sorte Manzana (Ernte 2001) verwendet. Die Bedingungen der Schlepplmittelextraktion sind in Tab. 7.2 angegeben. Eine zunehmende Lösungskapazität des modifizierten CO₂ wird durch Variation von Schlepplmittelvolumen, Extraktionsdruck, Art des Schlepplmittels und Extraktionstemperatur erzielt. Die Ausbeuten an Apigenin und Apigenin-7-glucosid im Schlepplmittelextrakt sind in Abb. 7.1 dargestellt. Referenzmethode zur Bestimmung des Gesamtgehaltes dieser Substanzen in Kamillenblüten ist die zweifache Mazeration mit Methanol bei einem Droge:Lösungsmittel-Verhältnis von 1:40 (Vogel 1992).

Das Flavonoid-Aglykon Apigenin zeigt das erwartete Verhalten einer steigenden Ausbeute unter den gewählten Bedingungen (Extrakte Nr. **1b-6b**). Extrakt **1a-6a** repräsentiert Extraktionen unter Referenzbedingungen ohne den Einsatz eines Schlepplmittels, die jeweils den Extraktionen **1b-6b** vorangestellt sind. Die Zugabe von 8 mol% Ethanol als Schlepplmittel führt zu einer geringen Steigerung der Ausbeute von 27 auf 33 % (Extrakt **1b**), eine Ethanolkonzentration von 15 mol% bewirkt eine weitere Zunahme auf 42 % (Extrakt **2b**).

Tab. 7.2 Bedingungen der Schlepplmittelextraktion nach lipophilem Vorextraktionsschritt (SM = Schlepplmittel)

| Nr. | Druck [bar] | Temperatur [°C] | Volumen SM [l] | Stoffmengenanteil SM [%] | Massenfluss ⁶ [kg/h] | Dichte CO ₂ [kg/m ³] | Dichte CO ₂ /SM [kg/m ³] |
|-------|------------------|-----------------|----------------|--------------------------|---------------------------------|---|---|
| 1a-6a | 90 | 40 | – | – | 8,0 | 490 | – |
| 1b | 90 | 40 | 1 l EtOH | 8,1 % | 8,6 | 533 | 728 |
| 2b | 90 | 40 | 2 l EtOH | 15,0 % | 9,5 | 542 | 770 |
| 3b | 250 | 40 | 2 l EtOH | 15,7 % | 9,4 | 887 | 864 |
| 4b | 90 | 40 | 2 l MeOH | 14,5 % | 9,3 | 550 | 780 |
| 5b | 250 | 40 | 2 l MeOH | 18,5 % | 9,4 | 885 | 896 |
| 6b | 380 ⁷ | 60 | 2 l MeOH | 18,2 % | 9,3 | 876 | 888 |

⁶ Massenfluss während der Schlepplmittelzudosierung

⁷ Um eine Temperaturerhöhung auf 60 °C bei gleich bleibender Dichte des CO₂ zu realisieren, wird der Extraktionsdruck auf 380 bar angepasst.

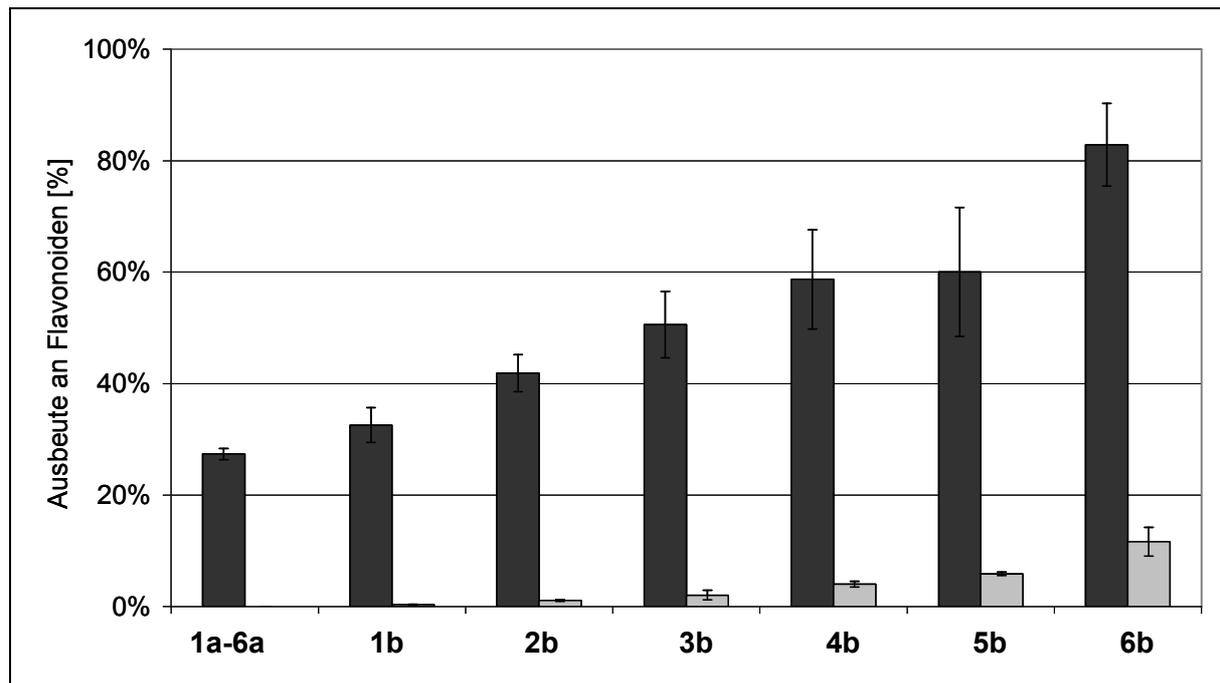


Abb. 7.1 Ausbeute an Apigenin und Apigenin-7-glucosid im Schlepmittelextrakt bezogen auf die Ausbeute einer Mazeration mit Methanol; (■) Apigenin, (□) Apigenin-7-glucosid; Zuordnung der experimentellen Bedingungen siehe Tab. 7.2; Fehlerbalken = Spannweite (n = 2)

Eine Erhöhung des Extraktionsdruckes von 90 auf 250 und damit einhergehend die deutliche Zunahme der Dichte des modifizierten Extraktionsfluids von 770 kg/m^3 auf 864 kg/m^3 führt zu einer Apigenin-Ausbeute von 50 % (Extrakt **3b**). Der direkte Vergleich von Ethanol und Methanol als Cosolventien zeigt eine signifikante Ausbeutesteigerung bei Verwendung von Methanol (Extrakte **2b** und **4b** bzw. **3b** und **5b**). Um den Effekt einer Temperaturerhöhung auf 60 °C bei konstanter CO_2 -Dichte beurteilen zu können, wird der Extraktionsdruck bei Extrakt **6b** auf 380 bar erhöht. Durch diese Maßnahme wird die Ausbeute um weitere 20 % auf 83 % gesteigert. Die Ausbeute an Apigenin-7-glucosid kann selbst durch Kombination aller beschriebenen Maßnahmen in Extrakt **6b** nur auf maximal 9 % gesteigert werden.

7.3 Fraktionierte Schlepmittelextraktion

Die fraktionierte Schlepmittelextraktion verzichtet auf einen lipophilen Vorextraktionsschritt und dient der Untersuchung der Extrahierbarkeit von Apigenin-7-glucosid. Um eine Sättigung des überkritischen Fluids auszuschließen werden drei aufeinander folgende Extraktionen desselben Drogenmaterials mit Methanol als Cosolvens durchgeführt, und der jeweils anfallende Extrakt wird nach jeder Extraktion entnommen und analysiert. Um zusätzlich den Mas-

sentransferwiderstand so gering wie möglich zu halten, werden fein geschnittene Kamillenblüten der Sorte Manzana (Ernte 2001) eingesetzt. Die Extraktionen **7a** und **7b** werden unter identischen Bedingungen bei 60 °C und 380 bar durchgeführt. Daran schließt sich eine Extraktion **7c** bei 100 bar und 70 °C an (Tab. 7.3). Diese Bedingungen liegen bezüglich des Lösungsmittelgemisches CO₂/Methanol im Zweiphasengebiet der binären Mischung. Die Dichte des reinen CO₂ beträgt aufgrund der hohen Temperatur und des niedrigen Druckes nur 258 kg/m³. Während der Zugabe von Methanol erhöht sie sich auf 371 kg/m³, liegt aber immer noch deutlich unter der kritischen Dichte von reinem CO₂ (470 kg/m³).

Tab. 7.3 Bedingungen der fraktionierten Schleppmittelextraktion

| Nr. | Druck [bar] | Temperatur [°C] | Volumen SM [l] | Stoffmengenanteil SM [%] | Massenfluss ⁸ [kg/h] | Dichte CO ₂ [kg/m ³] | Dichte CO ₂ /SM [kg/m ³] |
|-----|-------------|-----------------|----------------|--------------------------|---------------------------------|---|---|
| 7a | 380 | 60 | 2 l MeOH | 17,9 % | 9,5 | 877 | 885 |
| 7b | 380 | 60 | 2 l MeOH | 17,7 % | 9,1 | 876 | 886 |
| 7c | 100 | 70 | 2 l MeOH | 19,3 % | 9,3 | 258 | 371 |

In Tab. 7.4 sind die Ergebnisse der fraktionierten Schleppmittelextraktion im Hinblick auf die Gesamtextraktausbeute und die Extrahierbarkeit von Apigenin-7-glucosid dargestellt. Die Extraktion **7a** liefert eine der Extraktion **6b** vergleichbare Ausbeute an Apigenin-7-glucosid von ca. 9 %. Die Wiederholung der Extraktion mit dem bereits einmal extrahierten Drogenmaterial unter gleichen Bedingungen bringt eine Steigerung der Ausbeute auf 11 %, die aber nicht signifikant ist (**7b**). Die Ausbeute an Apigenin-7-glucosid bezieht sich in einer Folgeextraktion jeweils auf die noch zur Verfügung stehende Menge in der Droge. Im Vergleich zur ersten Extraktion sinkt die Ausbeute von 7,24 auf 2,29 %, damit geht ein Anstieg des Apigenin-7-glucosid-Gehaltes im Extrakt von 4,66 auf 19,5 mg/g einher. Die anschließende Extraktion im Zweiphasengebiet (**7c**) bewirkt schließlich die Anreicherung auf 43,2 mg/g Extrakt und eine Ausbeute an Apigenin-7-glucosid von 95,2 %.

⁸ Massenfluss während der Schleppmittelzudosierung

Tab. 7.4 Gesamtextraktausbeute und Ausbeute bzw. Gehalt an Apigenin-7-glucosid bei fraktionierter Schlepplmittelextraktion

| Nr. | Phasen | Gesamtextrakt- ausbeute ⁹ [%] | Apigenin-7-glucosid | |
|-----|-----------------------------|---|------------------------------------|---------------------------|
| | | | Gehalt ⁹ [mg/g Extrakt] | Ausbeute ⁹ [%] |
| 7a | einphasig (überkritisch) | 7,24 ± 0,03 | 4,66 ± 0,55 | 8,78 ± 1,08 |
| 7b | einphasig (überkritisch) | 2,29 ± 0,02 | 19,5 ± 3,87 | 11,2 ± 2,35 |
| 7c | zweiphasig | 9,65 ± 1,32 | 43,2 ± 0,76 | 95,2 ± 1,68 |

7.4 Herstellung eines Gesamtextraktes mittels Schlepplmittelextraktion

Unter den Extraktionsbedingungen **7c** wird ohne vorangehende Extraktionsschritte ein Gesamtextrakt hergestellt und auf seinen Gehalt sowohl an lipophilen als auch an hydrophilen Inhaltsstoffen untersucht. Die Versuchsbedingungen sind in Tab. 7.5 angegeben (**8**).

Tab. 7.5 Extraktionsbedingungen bei Herstellung eines Gesamtextraktes

| Nr. | Druck [bar] | Tempera- tur [°C] | Volumen SM [l] | Stoffmengen- anteil SM [%] | Massen- fluss ¹⁰ [kg/h] | Dichte CO ₂ [kg/m ³] | Dichte CO ₂ /SM [kg/m ³] |
|-----|----------------|----------------------|-------------------|-------------------------------|--|--|--|
| 8 | 100 | 70 | 2 l MeOH | 23,6 | 9,3 | 259 | 376 |

Die Extraktausbeute beträgt dabei 16,3 %, zum Vergleich sind in Tab. 7.6 die Ausbeuten der Extraktionen **6** und **7** mit Methanol als Schlepplmittel angegeben. Der Vergleich mit einem fraktionierten Extraktionsschema (**7a-b-c**) zeigt, dass die Ausbeute des Gesamtextraktes mit 16,3 % nur geringfügig unter der Summe aller Extraktfraktionen (19,2 %) aus den Versuchen **7** liegt. Die Extraktionszeit beträgt pro Extraktfraktion 3 h, somit ist sie bei Herstellung des Gesamtextraktes insgesamt 6 h kürzer als bei fraktionierter Extraktion. Darüber hinaus wird deutlich, dass etwa 50 % der Extraktausbeute durch eine Schlepplmittelextraktion im einphasigen Zustand des Lösungsmittelgemisches (60 °C, 380 bar) erreicht werden können, wovon wiederum etwa 15 % bei einer Extraktion mit reinem CO₂ erzielt werden.

⁹ Mittelwert ± Spannweite (n = 2)

¹⁰ Massenfluss während der Schlepplmittelzudosierung

Tab. 7.6 Gesamtextraktausbeuten bei CO₂-Extraktion mit Methanol als Schlepptmittel

| Gesamtextraktausbeute [%], Mittelwert ± Spannweite, n = 2 | | | | | |
|---|-------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| Nr. | Droge | a | b | c | Summe |
| 6 | grob | 1,23 ± 0,07 | 5,93 ± 0,26 | | 7,16 ± 0,33 |
| 7 | fein | 7,24 ± 0,03 | 2,29 ± 0,10 | 9,65 ± 1,32 | 19,18 ± 1,45 |
| 8 | fein | 16,31 ± 1,45 | | | 16,31 ± 1,45 |

Zur Beurteilung der Effizienz einer Extraktion im Zweiphasengebiet (Extrakt **8**) werden die Wiederfindungsraten sowohl lipophiler als auch hydrophiler Inhaltsstoffe bezogen auf eine Referenz-Extraktionsmethode bestimmt. Die Referenzmethode ist eine Mazeration mit einem Droge:Lösungsmittel-Verhältnis von 1:40, die als erschöpfend betrachtet werden kann (Ness und Schmidt 1995). Für die Gruppe der lipophilen Inhaltsstoffe wird hierzu Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V), für die Flavonoide reines Methanol als Lösungsmittel eingesetzt. Die durch die Mazeration ermittelten Inhaltsstoff-Ausbeuten werden als 100 %-Wert gesetzt. Die unter den Bedingungen (**8**) im Gesamtextrakt erzielten Ausbeuten werden prozentual auf die Mazeration als Referenzmethode bezogen und sind in Tab. 7.7 angegeben.

Tab. 7.7 Wiederfindungsraten eines Gesamtextraktes (Extrakt **8**) bezogen auf eine Lösungsmittelmazeration

| Wiederfindung [%], Mittelwert ± Spannweite, n = 2 | | | | | | | |
|---|------------------------------------|--|------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| β-Far- nesen ¹¹ | (-)-α-Bi- sabolol ¹¹ | C ₂₅ -n- Alkan ¹¹ | Apigenin ¹² | Apigenin- 7-glucosid ¹² | Matri- cin ¹¹ | trans- EID ¹¹ | cis- EID ¹¹ |
| 82,1 | 100,5 | 111,1 | 134,2 | 92,6 | n. d. | 126,0 | 96,0 |
| ± 6,7 | ± 0,7 | ± 10,7 | ± 16,8 | ± 10,5 | | ± 6,4 | ± 3,2 |

Die Wiederfindungsraten im Gesamtextrakt (Extrakt **8**) betragen zwischen 82 % für β-Far-nesen und 134 % für Apigenin. Matricin ist aufgrund seiner Thermolabilität und Instabilität in polaren Lösungsmitteln in diesem Extrakt nicht nachweisbar.

¹¹ Mazeration mit Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V)

¹² Mazeration mit Methanol

7.5 Diskussion der Ergebnisse

Zur Extraktion hydrophiler Inhaltsstoffe, wie Flavonoide und Flavonoid-Glykoside, ist der Einsatz eines Cosolvens notwendig, um die Polarität von CO₂ zu erhöhen. Die Dielektrizitätskonstante als Maß für die Polarität des Lösungsmittelgemisches hängt dabei von der Konzentration des Schleppmittels und dessen Dielektrizitätskonstante sowie von Druck und Temperatur ab. Die Werte für die verwendeten Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische können anhand von Literaturdaten abgeschätzt werden (siehe Tab. 7.8 und Abb. 7.2). Es wird deutlich, dass der Einfluss von Druck und Temperatur nur gering ist. Die Zugabe von Methanol als Schleppmittel führt erst ab einer Stoffmengenkonzentration von etwa 30 % zu einem deutlichen Anstieg der Dielektrizitätskonstanten.

Tab. 7.8 Dielektrizitätskonstante wichtiger Lösungsmittel

| Lösungsmittel | Dielektrizitätskonstante ¹³ |
|---------------|--|
| Kohlendioxid | 1,45 (22 °C) |
| Ethanol | 25,3 (20 °C) |
| Methanol | 33,0 (20 °C) |
| Wasser | 80,1 (20 °C) |

Mit Ethanol und Methanol in einer Stoffmengenkonzentration von etwa 15 % lassen sich in Abhängigkeit vom Extraktionsdruck bei 40 °C zwischen 40 und 60 % des verfügbaren Apigenins extrahieren. Die Erhöhung der Extraktionstemperatur auf 60 °C verursacht einen deutlichen Anstieg der Ausbeute an Apigenin. Wie bereits in Abb. 2.2 (S. 8) exemplarisch am Beispiel der Löslichkeit von Quarz in überkritischem Wasser gezeigt, führt eine Temperaturerhöhung bei konstanter Dichte des überkritischen Fluids immer zu einem Anstieg der Löslichkeit eines Stoffes, da dessen Dampfdruck erhöht wird und die Lösungskapazität des Solvens gleich bleibt. Die beschriebenen Extraktionsbedingungen reichen aus, um akzeptable Ausbeuten an Apigenin zu erzielen (83 %), das hydrophilere Apigenin-7-glucosid hingegen ist nur zu 9 % extrahierbar. Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass aufgrund der geringen Mengen an Apigenin in Kamillenblüten (siehe Tab. 4.2, S. 43) eine Hydrolyse von

¹³ Daten aus Lide (1999)

Apigenin-7-glucosid zu Apigenin während der Extraktion die prozentuale Ausbeute an Apigenin beeinflussen kann.

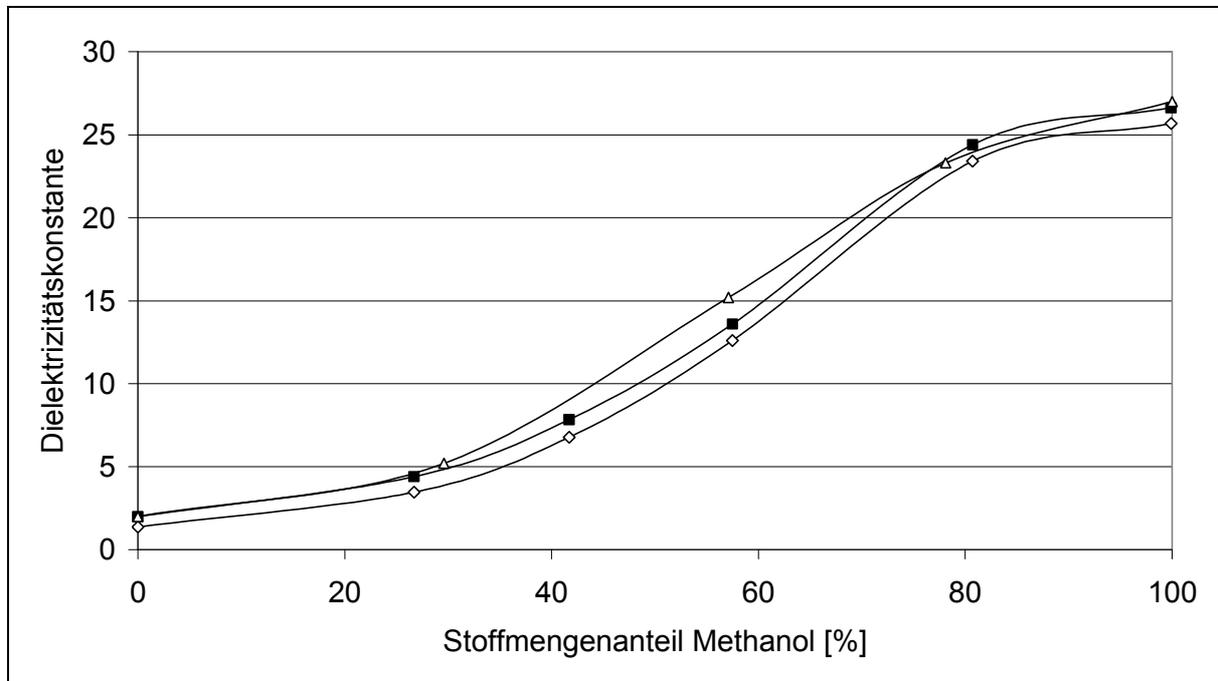


Abb. 7.2 Dielektrizitätskonstante von CO₂/Methanol-Mischungen (Daten aus Roskar et al. 1992); (◇) 65 °C, 125 bar; (■) 65 °C, 275 bar; (△) 50 °C, 275 bar

Die geringe Ausbeute an Apigenin-7-glucosid kann verschiedene Ursachen haben. Aufgrund der hohen Extraktausbeuten, die bei einer Schlepplmittelextraktion erreicht werden, kann eine Sättigung des Fluids mit besser löslichen Substanzen eintreten und somit die Extraktion von Apigenin-7-glucosid zurückgedrängt sein. Dies wird anhand von fraktionierten Schlepplmittelextraktionen untersucht. Dabei sollen im Rahmen einer erschöpfenden Vorextraktion alle leichter löslichen Inhaltsstoffe aus der Matrix abgetrennt werden. Die Reduktion der Gesamtextraktausbeute von 7,2 auf 2,3 % zeigt, dass der Vorextraktionsschritt ca. 75 % der unter diesen Bedingungen extrahierbaren Substanzen erfasst. Die Tatsache, dass die Ausbeute an Apigenin-7-glucosid in der 2. Schlepplmittelextraktion nur um einen nicht signifikanten Betrag gesteigert wird (11,2 gegenüber 8,8 %), widerlegt die Theorie einer Absättigung zuungunsten des Glucosids. Gleichzeitig zeigt das Ergebnis, dass die Ausbeute an Apigenin-7-glucosid eine Folge seiner geringen Löslichkeit unter den gewählten Bedingungen im Extraktionsfluid ist. Die Anreicherung im Extrakt auf eine Konzentration von 19,5 mg/g gegenüber 4,7 mg/g bei der Vorextraktion, ist lediglich eine Folge des geringeren Anteils an Begleitstoffen und ist nicht auf eine bessere Extrahierbarkeit zurückzuführen.

Um den Einfluss der Polarität des Lösungsmittels auf die Ausbeute von Apigenin-7-glucosid zu untersuchen, werden gezielt Extraktionsbedingungen gewählt, die eine Aufspaltung des binären Gemisches $\text{CO}_2/\text{Methanol}$ zur Folge haben. Dadurch erfolgt bei gleicher Gesamtmenge an Methanol eine deutliche Steigerung seiner Stoffmengenkonzentration im Extraktionsfluid. Dies zeigt Abb. 7.3 bei einer Extraktionstemperatur von $70\text{ }^\circ\text{C}$, einer Ausgangskonzentration von $20\text{ mol}\%$ Methanol und einem Extraktionsdruck von 100 bar . Die Aufspaltung folgt dem Hebelgesetz, so dass einerseits zu etwa $2/3$ eine mit Methanol gesättigte Gasphase mit einem Anteil von etwa 5% Methanol entsteht, andererseits ergibt sich zu etwa $1/3$ eine CO_2 -gesättigte Flüssigphase mit einem CO_2 -Anteil von etwa 50% . Dies beeinflusst entscheidend Dielektrizitätskonstante und entsprechend die Polarität des Lösungsmittels. Die Dielektrizitätskonstante erhöht sich von etwa 4 ($60\text{ }^\circ\text{C}$, 380 bar , 20% Methanol) auf ungefähr 10 ($70\text{ }^\circ\text{C}$, 100 bar , 50% Methanol).

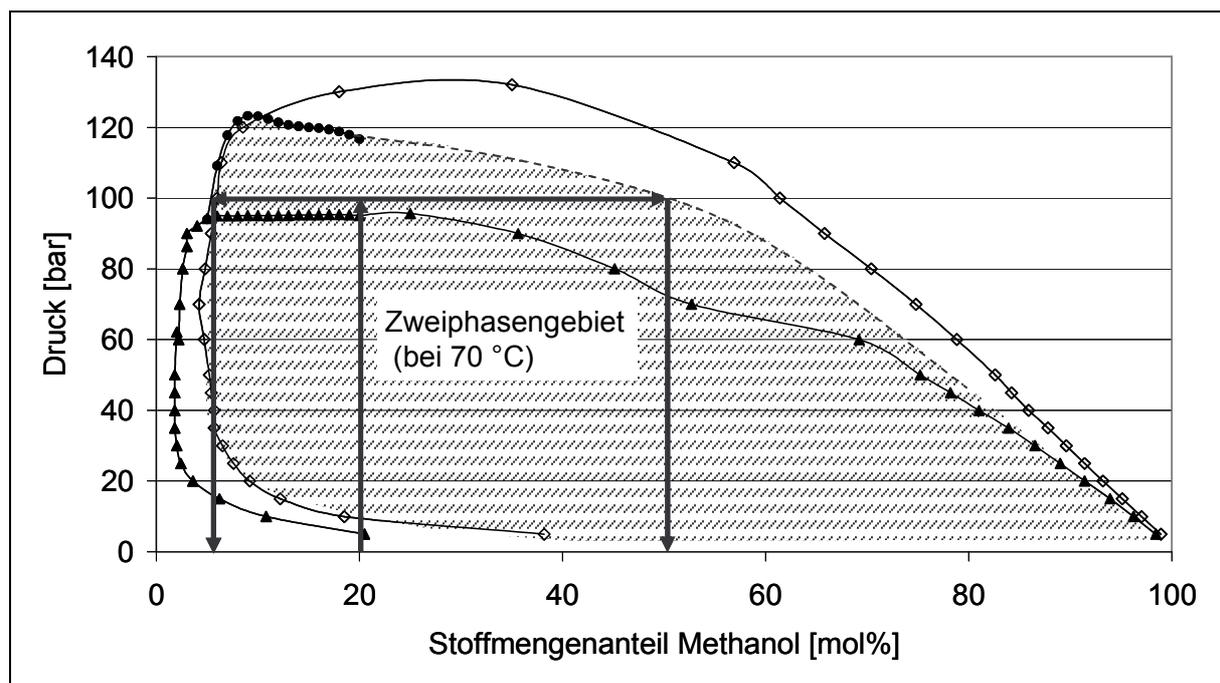


Abb. 7.3 Phasendiagramm der binären Mischung $\text{CO}_2/\text{Methanol}$;
 (\blacktriangle) $50\text{ }^\circ\text{C}$ ¹⁴; (\bullet) $70\text{ }^\circ\text{C}$ ¹⁵; (----) $70\text{ }^\circ\text{C}$, Extrapolation; (\diamond) $75\text{ }^\circ\text{C}$ ¹⁴;
 \longrightarrow Aufspaltung der binären Mischung bei $70\text{ }^\circ\text{C}$, 100 bar , $20\text{ mol}\%$ MeOH
 gemäß dem Hebelgesetz

¹⁴ Daten aus Semenova et al. (1979)

¹⁵ Daten aus Page et al. (1991)

Die Flüssigphase muss als das eigentlich extrahierende Solvens betrachtet werden, zumal die Gasphase unter diesen Bedingungen eine nur sehr geringe Dichte von etwa 370 kg/m^3 aufweist und eine entsprechend niedrige Lösungskapazität besitzt.

Die Ausbeuten an Apigenin-7-glucosid betragen unter diesen Bedingungen 95 % und bestätigen, dass die Extrahierbarkeit ausschließlich eine Funktion der Löslichkeit der Substanz im modifizierten Fluid ist. Weder eine Absättigung des Lösungsmittels noch ein hoher Massentransferwiderstand sind die limitierenden Größen. Die Löslichkeit zeigt wiederum eine strenge Abhängigkeit von der Dielektrizitätskonstanten, welche durch Variation des Extraktionsdruckes nur in Grenzen erhöht werden kann. Hohe Anteile eines polaren Schlepptittels sind notwendig, um akzeptable Ausbeuten zu erhalten.

Eine Extraktion im Zweiphasengebiet ermöglicht die Extraktion sowohl lipophiler als auch hydrophiler Substanzen. Dies zeigt die Zusammensetzung eines so hergestellten Gesamtextraktes. β -Farnesen weist aufgrund seiner Flüchtigkeit und der hohen Extraktionstemperatur die geringste Ausbeute (82 %) auf, cis-EID, (-)- α -Bisabolol, C_{25} -n-Alkan und Apigenin-7-glucosid liegen zwischen 92 und 112 %. Trans-EID und Apigenin können durch Isomerisierung bzw. Deglucosidierung aus cis-EID und Apigenin-7-glucosid gebildet werden, was hohe Wiederfindungsraten von 126 bzw. 134 % erklärt. Bei einem Vergleich der CO_2 -Extraktion mit einer Lösungsmittelmazeration muss berücksichtigt werden, dass die Herstellung der Vergleichsextrakte nicht in einem Schritt erfolgen kann, da jeweils für lipophile und hydrophile Inhaltsstoffe verschiedene Lösungsmittel zur Mazeration eingesetzt werden müssen. Der Lösungsmittelbedarf der Mazerationen überschreitet mit $10,4 \text{ l/260 g}$ Droge dabei den Bedarf der Schlepptittellextraktion mit 2 l/260 g um ein Vielfaches.

In Tab. 7.9 ist der Gehalt an Kamilleninhaltsstoffen in Schlepptittellextrakten im Vergleich zu einem konventionellen ethanolischen Extrakt angegeben. Extrakt **6b** wird durch Extraktion mit einer überkritischen CO_2 /Methanol-Mischung nach einer Vorextraktion mit reinem CO_2 gewonnen. Obwohl durch die Vorextraktion der Gehalt an lipophilen Inhaltsstoffen verringert wird (vgl. Tab. 4.6, S. 54), enthält dieser Extrakt noch die 20fache Menge an (-)- α -Bisabolol und die 80- bis 90fache Menge an En-In-Dicycloethern. Apigenin ist 5-mal, Apigenin-7-glucosid 7-mal so stark angereichert wie in einem konventionellen Extrakt. Ohne Vorextraktionsschritt nimmt der Gehalt an lipophilen Inhaltsstoffen um den Faktor 2-4 zu, dadurch sinkt die Konzentration an Apigenin und Apigenin-7-glucosid (**7a**). Führt man eine erschöpfende Vorextraktion mit überkritischem CO_2 unter Einsatz eines Schlepptittels durch, so können (-)- α -Bisabolol, EID und Apigenin vollständig abgetrennt werden, eine anschließende Extraktion mit einer zweiphasigen CO_2 /Methanol-Mischung reichert selektiv das hydrophile Apige-

nin-7-glucosid im Extrakt an (**7c**). Der Gehalt an Apigenin-7-glucosid ist etwa 30-mal höher als in einem ethanolischen Extrakt. Eine Extraktion im Zweiphasengebiet ohne vorangehende Abtrennung lipophiler Komponenten führt zu einem Gesamtextrakt (**8**), der sowohl lipophile als auch hydrophile Bestandteile in höherer Konzentration als ein herkömmlicher ethanolischer Extrakt enthält.

Tab. 7.9 Selektivität von Schleppmittelextrakten im Vergleich zu einem konventionellen ethanolischen Extrakt

| Inhaltsstoff | Gehalt im Extrakt [mg/100 g] | | | | |
|--------------------------|---|---|---|--|--|
| | CO ₂ + MeOH (6b) ¹⁶ | CO ₂ + MeOH (7a) ¹⁶ | CO ₂ + MeOH (zweiphasig) (7c) ¹⁶ | CO ₂ + MeOH (zweiphasig) (8) ¹⁶ | ethanolischer Extrakt ¹⁷ |
| Vorextraktion | CO ₂ (3 h) | – | CO ₂ + MeOH (6 h) | – | – |
| (-)- α -Bisabolol | 1460 \pm 52 | 5386 \pm 89 | n. d. | 2188 \pm 15 | 78,86 \pm 0,30 |
| cis-EID | 2988 \pm 2 | 7370 \pm 69 | n. d. | 3101 \pm 103 | 34,71 \pm 0,08 |
| trans-EID | 1220 \pm 3 | 2328 \pm 63 | n. d. | 1044 \pm 53 | 12,95 \pm 0,04 |
| Apigenin | 122 \pm 10 | 100 \pm 9 | n. d. | 72 \pm 9 | 23,99 \pm 0,13 |
| Apigenin-7-glucosid | 1031 \pm 230 | 466 \pm 55 | 4329 \pm 76 | 2185 \pm 248 | 151,73 \pm 0,09 |

7.6 Zusammenfassung

Die Kombination aus Extraktionen mit reinem CO₂ und CO₂/Schleppmittel-Gemischen kann durch geeignete Wahl der Extraktionsbedingungen zu unterschiedlichen Inhaltsstoffspektren der hergestellten Kamillenextrakte führen (Abb. 7.4).

So können lipophile Inhaltsstoffe mittels reinem CO₂ (**a**) gegenüber einem durch Mazeration mit Dichlormethan/Methanol hergestellten Trockenextrakt etwa um den Faktor 8, gegenüber der getrockneten Ausgangsdroge um den Faktor 40-60 angereichert werden. Der Vergleich mit einem konventionellen ethanolischen Extrakt ergibt zwischen 100- und 730-mal höhere

¹⁶ Mittelwert \pm Spannweite (n = 2)

¹⁷ Perkamillon®, Auszugsmittel: 48 Vol.-% Ethanol (Schmidt und Vogel 1992)

Konzentrationen im CO₂-Extrakt (siehe Tab. 4.6, S. 54). Dabei ermöglicht das überkritische CO₂ die schonende Extraktion thermolabiler Substanzen unter Inertgasatmosphäre.

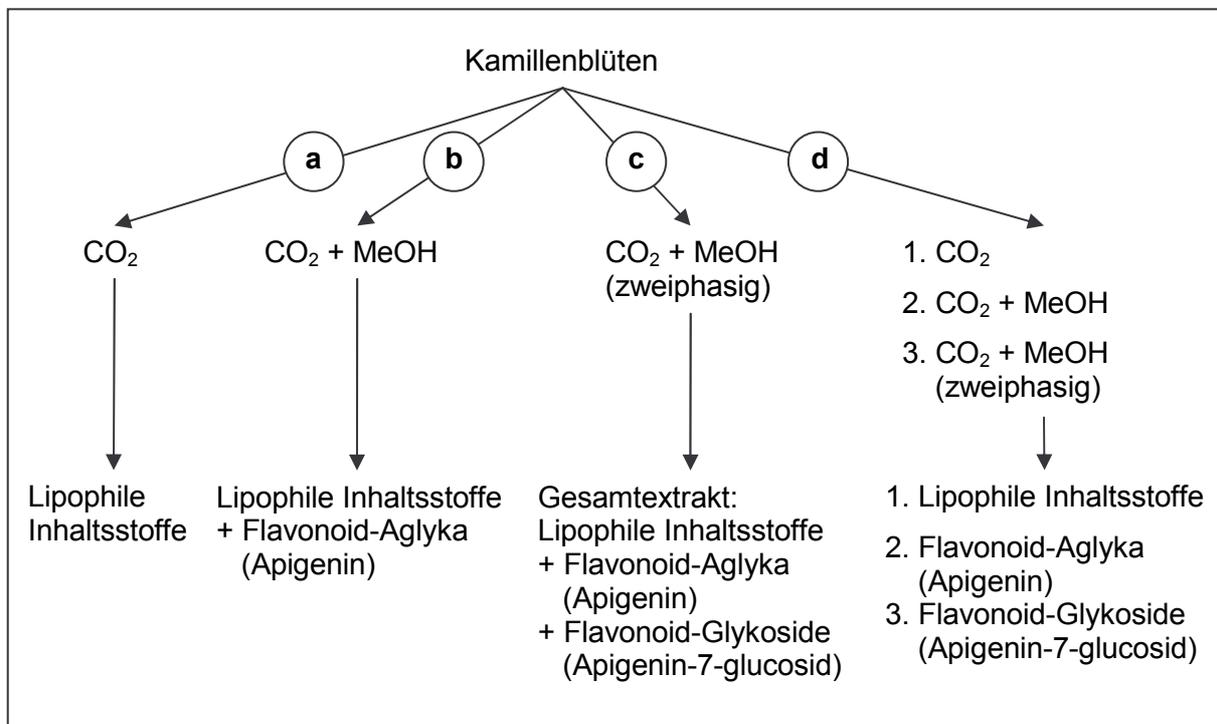


Abb. 7.4 Möglichkeiten zur Anreicherung von Kamilleninhaltsstoffen unter Einsatz von verdichtetem Kohlendioxid

Die Erhöhung der Polarität des Extraktionsfluids durch Zugabe von Methanol als Schlepptittel erlaubt die Extraktion sowohl der lipophilen Inhaltsstoffe als auch der pharmakologisch wirksamen Flavonoid-Aglyka wie Apigenin (**b**), die in reinen CO₂-Extrakten nur in einer Ausbeute von knapp 30 % extrahiert werden (Abb. 7.1, Extrakt **1a-6a**). Apigenin zeigt in verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen eine antiphlogistische Aktivität, welche die der Vergleichsantiphlogistika Indometacin und Phenylbutazon übertrifft (Schilcher 1987). Damit stellt es eine Ergänzung der antiphlogistisch wirksamen Bestandteile des ätherischen Öls dar. Zur spasmolytischen Wirkung von Kamillenextrakten tragen ebenfalls (-)- α -Bisabolol und En-In-Dicycloether sowie in entscheidendem Maße Apigenin bei. Um die Ausbeute der Aglyka zu verbessern, wird von einigen Autoren eine vorangehende fermentative Hydrolyse der weniger wirksamen Glykoside beschrieben (Mauz et al. 1997, Zekovic 2000).

Hydrophilere Substanzen wie Flavonoid-Glykoside erfordern deutlich polarere Lösungsmittel, die durch eine Extraktion im Zweiphasengebiet der binären Mischung CO₂/Methanol in-situ erzeugt werden können. Dabei entsteht eine CO₂-gesättigte Flüssigphase mit einem Methanol-Anteil von 50 mol% und einer deutlich erhöhten Dielektrizitätskonstanten von 10-12. Un-

ter diesen Bedingungen ist die Herstellung eines Gesamtextraktes, der in seinem Inhaltsstoffmuster der nativen Pflanze im Wesentlichen entspricht, in einem Verfahrensschritt möglich (c). Die Kombination eines lipophilen und eines hydrophilen Extraktes entfällt (Mauz et al. 1997, Wüst et al. 1982).

Durch fraktionierte Extraktionsschemata sind selektive Anreicherungen einzelner Inhaltsstoffgruppen möglich (d). So erfolgt nach erschöpfender Vorextraktion der lipophilen Bestandteile mit reinem überkritischem CO₂ eine Anreicherung der mittelpolaren Flavonoid-Aglyka. Durch die anschließende Extraktion im Zweiphasengebiet kann der Gehalt an hydrophilen Inhaltsstoffen wie Apigenin-7-glucosid von etwa 5 mg/g in einem überkritischen Schlepmittelextrakt auf über 40 mg/g gesteigert werden.

Kapitel 8

Experimenteller Teil

8.1 Materialien

8.1.1 Kamillenblüten

Es werden Kamillenblüten der Sorten Mabamille (Ernte 1999, Ch.-B. 9108783) und Manzana (Ernte 2001, Ch.-B. 0105778) verwendet. Die Drogen werden in getrocknetem Zustand, geschnitten (Mabamille) bzw. unzerkleinert (Manzana) von der Firma Martin Bauer geliefert und von der Firma Robugen zur Verfügung gestellt. Die in Papiertüten gelieferten Kamillenblüten werden zusätzlich in schwarze Polyethylenbeutel verpackt und bis zur weiteren Verwendung bei 5 °C gelagert.

8.1.2 Standardsubstanzen

Tab. 8.1 Standardsubstanzen

| Substanz | Bezeichnung | Hersteller/Lieferant |
|--|-------------------------------------|--|
| (-)- α -Bisabolol | Art.-Nr.: 9055.1 Ch.-B.: 4730036 | Fa. Carl Roth |
| cis-En-In-Dicycloether ¹⁸ | Ch.-B.: 039904 | Fa. Robugen |
| trans-En-In-Dicycloether ¹⁸ | Ch.-B.: 049716 | Fa. Robugen |
| Apigenin | Art.-Nr. 1102S Ch.-B.: 01112307 | Fa. Extrasynthèse |
| Apigenin-7-glucosid | Art.-Nr. 5557 Ch.-B. 4504191 | Fa. Carl Roth |
| Matricin | „hochrein“ | isoliert von Ness (1995) Pharm. Technol. Uni Tübingen |
| n-Hexadecan | Art.-Nr.: 9605 Ch.-B.: S2801005 | Fa. Merck |
| Natriumtartrat (2 H ₂ O) | Art.-Nr.: 34803 Ch.-B.: 33410 | Fa. Riedel-de Haën |

¹⁸ Für die Bereitstellung der Substanz danke ich Fa. Robugen

8.1.3 Lösungsmittel und Chemikalien

Tab. 8.2 Lösungsmittel und Chemikalien

| Substanz | Bezeichnung | Hersteller/Lieferant |
|--|--|---|
| <i>Lösungsmittel für die HPLC</i> | | |
| Acetonitril (gradient grade) | Art.-Nr.: 100030 Art.-Nr.: A/0626/17 | Fa. Merck Fa. Fisher |
| Aqua ad injectabilia | Umkehrosiose mit anschließender Destillation | Pharm. Technol. Universität Tübingen |
| Phosphorsäure 85% | Art.-Nr.: 159382 | Fa. Merck |
| Methanol (gradient grade) | Art.-Nr.: 106007 Art.-Nr.: M/4056/17 | Fa. Merck Fa. Fisher |
| Dichlormethan (gradient grade) | Art.-Nr.: 106044 | Fa. Merck |
| n-Hexan (gradient grade) | Art.-Nr.: 104391 | Fa. Merck |
| Dimethylsulfoxid | Art.-Nr.: 109678 | Fa. Merck |
| <i>Pufferlösungen zum Kalibrieren des pH-Meters</i> | | |
| Pufferlösung gebrauchsfertig pH 4,00 | Art.-Nr.: 109435 | Fa. Merck |
| Pufferlösung gebrauchsfertig pH 7,00 | Art.-Nr.: 109477 | Fa. Merck |
| <i>Gase</i> | | |
| Flüssig-CO ₂ (Typ 2.7) in Steigrohrflaschen | Art.-Nr.: 0458 | Fa. Messer Griesheim |
| Synthetische Luft (Typ 5.0) | Art.-Nr.: 0131 | Fa. Messer Griesheim |
| Stickstoff (Typ 5.0) | Art.-Nr.: 0652 | Fa. Messer Griesheim |
| Wasserstoff (Typ 5.0) | Art.-Nr.: 0288 | Fa. Messer Griesheim |
| Helium (Typ 4.6) | Art.-Nr.: 0385 | Fa. Messer Griesheim |

Tab. 8.2 (Fortsetzung)

| <i>Sonstige Chemikalien</i> | | |
|---|-------------------------------------|--------------------|
| β-Cyclodextrin | Cavamax W7 Pharma Ch.-B.: 019822 | Fa. Wacker-Chemie |
| Phosphorpentoxid | Art.-Nr.: 100543 | Fa. Merck |
| Kieselgel (mit Feuchtigkeitsindikator) | Art.-Nr.: 101925 | Fa. Merck |
| Hydranal Composite 2 | Art.-Nr.: 34806 Ch.-B.: 10930 | Fa. Riedel-de Haën |
| Hydranal Composite 5 | Art.-Nr.: 34805 Ch.-B.: 2185A | Fa. Riedel-de Haën |
| Formamid | Art.-Nr.: 33272 Ch.-B.: 20210 | Fa. Riedel-de Haën |

8.1.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Tab. 8.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Bezeichnung | Hersteller/Lieferant |
|--|----------------------|-------------------------|
| Membranfilter, 0,2 µm Celluloseacetat Ø 25 mm | Art.-Nr.: 11107-25-N | Fa. Sartorius |
| Membranfilter, 0,45 µm regenerierte Cellulose Ø 25 mm | Art.-Nr.: 18406-25-N | Fa. Sartorius |
| Membranfilter, 0,2 µm regenerierte Cellulose Ø 47 mm | Art.-Nr.: 18407-47-N | Fa. Sartorius |
| Rundfilter Sorte 595 Ø 110 mm | Art.-Nr.: 311610 | Fa. Schleicher & Schüll |
| Vials für HPLC-Proben | Art.-Nr.: 218A1103 | Fa. Bender & Hobein |
| Septen (HPLC) | Art.-Nr.: 275A1361 | Fa. Bender & Hobein |
| Vials für GC-Proben | Art.-Nr.: 702 01 | Fa. Macherey-Nagel |
| Bördelkappen | Art.-Nr.: 702 56 | Fa. Macherey-Nagel |

8.1.5 Geräte zur allgemeinen Verwendung

Tab. 8.4 Geräte zur allgemeinen Verwendung

| Gerät | Hersteller/Lieferant |
|--|----------------------|
| Laborwaage Mettler AE200 | Fa. Mettler-Toledo |
| Laborwaage Mettler PC1616 Delta Range | Fa. Mettler-Toledo |
| Laborwaage Mettler PM4600 Delta Range | Fa. Mettler-Toledo |
| Laborwaage Mettler AT 261 Delta Range | Fa. Mettler-Toledo |
| pH-Meter 761 Calimatic | Fa. Knick |
| Umkehrosmose-Anlage Hemo-RO | Fa. Millipore |
| Muldestor | Fa. Wagner & Munz |
| Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H | Fa. Bandelin |
| Ultra Turrax T25 | Fa. IKA-Werke |
| Gefriertruhe (-70 °C) | Fa. GFL |
| Gefrierschrank Siemens Öko Plus (-30 °C) | Fa. Siemens |
| Kühlschrank Liebherr Premium (+5 °C) | Fa. Liebherr |
| Trockenschrank BKE 40 (+30 °C) | Fa. Memmert |
| Vakuumtrockenschrank VDL 53 | Fa. Binder |
| Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor-R | Fa. Büchi |
| Schneidmühle Pulverisette | Fa. Fritsch |

8.2 Datenverarbeitung

Rechner: Athlon 1400 MHz, 256 MB RAM, 40 GB Festplatte

Tab. 8.5 Allgemein verwendete Software

| <i>Software</i> | <i>Hersteller/Lieferant</i> |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Windows XP | Fa. Microsoft |
| Microsoft Word XP für Windows | Fa. Microsoft |
| Microsoft Excel XP für Windows | Fa. Microsoft |
| Microsoft Powerpoint XP für Windows | Fa. Microsoft |
| C-Design 3.0f | Fa. FoBaSoft |
| Isis Draw 2.4 | Fa. MDL |
| VCH Biblio für Windows 32 Bit | Fa. Wiley-VCH |

8.3 Analytik

8.3.1 Gaschromatographie (GC)

8.3.1.1 Beschreibung der Methode

| | | |
|----------|---|-------------------------------------|
| Geräte | Gaschromatograph HP 5890 Serie II, Fa. Hewlett-Packard Autoinjektor HP 7637A mit Probenhalter, Fa. Hewlett-Packard Integrator HP 3392A, Fa. Hewlett-Packard | |
| Injektor | Typ | HP Split/Splitless Kapillar-Einlass |
| | Temperatur | 250 °C |
| | Split | 1:10 |
| Detektor | Typ | Flammenionisationsdetektor (FID) |
| | Temperatur | 250 °C |
| | Wasserstoff | Fluss 2 ml/min |
| | Synthetische Luft | 400 ml/min |
| | Auxiliary Gas | 30 ml/min Stickstoff (5.0) |

| | | |
|--------------------|--|--|
| Säule | Optima® δ -3, 30 m x 0,25 mm I.D. Polysiloxan Kapillarsäule Art.-Nr.: 726420.30 (Fa. Macherey-Nagel) | |
| | Filmdicke | 0,25 μ m |
| Trägergas | Typ | Wasserstoff 5.0 |
| | Total flow | 20 ml/min |
| | Detektorausgang | 2 ml/min (entspricht einem Split von 1:10) |
| Einspritzvolumen | 5 μ l | |
| Temperaturprogramm | 120–170 °C | 7 °C/min |
| | 170–194 °C | 3 °C/min |
| | 194–300 °C | 5 °C/min |
| | 300 °C | 10 min |

Die Auswertung erfolgt über das Peakflächenverhältnis (-)- α -Bisabolol zu n-Hexadecan als internem Standard. Zur Responsefaktorbestimmung wird eine Lösung verwendet, die (-)- α -Bisabolol und n-Hexadecan enthält. Es werden jeweils sechs Einzelbestimmungen durchgeführt und Mittelwert und relative Standardabweichung berechnet.

β -Farnesen und die C_{25} -, C_{27} -, C_{29} - und C_{31} -n-Alkane werden als (-)- α -Bisabolol berechnet. Die Identifizierung dieser Substanzen erfolgt durch Vergleich des GC-Musters mit Chromatogrammen aus der Literatur (Ness 1995, Reverchon und Senatore 1994, Grünhagen, 1994). Die Responsefaktoren von Bisabololoxid A (1,50) und B (1,58) werden unter Verwendung identischer Geräte und Methoden nach Waleczek (2002) bestimmt.

8.3.1.2 Probenvorbereitung und Standardlösungen

Herstellung der internen Standardlösung

275–280 mg n-Hexadecan, genau gewogen, werden in einem 500,0 ml Messkolben in n-Hexan gelöst. Daraus resultiert eine Lösung mit einem Gehalt von 0,55–0,56 mg/ml.

Herstellung der Standardlösung zur Bestimmung der Wiederfindungsrate

12,10 mg (-)- α -Bisabolol werden in 25,0 ml Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst. Daraus resultiert eine Lösung mit einem Gehalt von 0,484 mg/ml.

Probenvorbereitung von Mazeraten

Die Extrakte (siehe 8.5) werden durch einen Papier-Rundfilter (Typ 595 Ø 110 mm) in einen Messkolben filtriert, 4,0 ml interne Standardlösung zugegeben und mit Lösungsmittel auf 100,0 ml aufgefüllt. Für Mazerate zur Bestimmung von lipophilen Inhaltsstoffen wird Dichlormethan/ Methanol (1/1, V/V) als Lösungsmittel verwendet, für Mazerate zur Bestimmung von hydrophilen Inhaltsstoffen wird Methanol eingesetzt. Nach Filtration durch einen Membranfilter (regenerierte Cellulose, 0,45 µm Porenweite, Fa. Sartorius) werden die Extrakte direkt als Probenlösung eingesetzt.

Probenvorbereitung von CO₂-Extrakten

50–100 mg Extrakt, genau gewogen, werden in einem Messkolben im jeweiligen Lösungsmittel gelöst, 2,0 ml interne Standardlösung zugegeben und auf 50,0 ml aufgefüllt. Für Extrakte, die mit reinem CO₂ hergestellt sind, wird als Lösungsmittel Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) verwendet, für Schlepptextextrakte wird Methanol eingesetzt. Die erhaltenen Lösungen werden nach Filtration durch einen Membranfilter (regenerierte Cellulose, 0,45 µm Porenweite, Fa. Sartorius) direkt als Probenlösung eingesetzt.

Probenvorbereitung zur Bestimmung des nicht entnehmbaren Anteils im Abscheidebehälter

Die durch Ausspülen des Abscheidebehälters mit Ethanol gewonnene Suspension wird am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird durch wiederholtes Spülen mit Dichlormethan/Methanol (1:1, V/V) quantitativ in einen 100,0 ml Messkolben überführt. 10,0 ml dieser Lösung werden nach Zugabe von 4,0 ml interner Standardlösung mit Dichlormethan/Methanol (1:1, V/V) auf 100,0 ml aufgefüllt.

8.3.1.3 Kalibrierung und Validierung

Kalibrierung

a) (-)- α -Bisabolol

120,98 mg (-)- α -Bisabolol werden in einem 250,0 ml Messkolben in Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst. Daraus resultiert eine Stammlösung mit einem Gehalt von 48,392 mg/100 ml. 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 und 50 ml dieser Stammlösung werden nach Zugabe von 4,0 ml interner Standardlösung zu je 100,0 ml im Messkolben mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

b) n-Hexadecan

22,11 mg n-Hexadecan werden in 100,0 ml Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst. 1, 5, 10, 15, 20 und 25 ml dieser Stammlösung werden zu je 100,0 ml im Messkolben mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

Richtigkeit (Ermittlung der Wiederfindungsrate)

49,7 mg eines CO₂-Extraktes und 4,0 ml interne Standardlösung werden in Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) in einem Messkolben gelöst und auf 100,0 ml aufgefüllt. Hieraus resultiert ein Gehalt von 8,469 mg (-)- α -Bisabolol/100 ml (entspricht 100,00 %). 9,0 ml dieser Lösung werden mit Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) zu 10,0 ml verdünnt, entsprechend 90,00 % (-)- α -Bisabolol. Des Weiteren werden je 1,0 ml einer (-)- α -Bisabolol-Standardlösung mit einem Gehalt von 0,484 mg/ml mit obiger Lösung auf 50,0 ml bzw. 25,0 ml aufgefüllt, so dass Untersuchungslösungen mit 109,43 % bzw. 118,86 % (-)- α -Bisabolol resultieren. Es werden jeweils acht Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

Methodenpräzision

Aus jeweils 3 g Kamillendroge wird sechsmal unabhängig voneinander ein Extrakt hergestellt, filtriert (siehe 8.5) und in je drei Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet.

Systempräzision

Ein Kamillenextrakt, hergestellt mit Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V), wird achtmal injiziert. Der Mittelwert und die relative Standardabweichung werden für (-)- α -Bisabolol berechnet.

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wird graphisch aus dem unteren Ende der Kalibriergeraden und dem 95 %-Konfidenzintervall der Kalibriergeraden ermittelt (Ermer und Kibat 1998).

Nachweisgrenze

Es wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie bei der Dämpfung „-2“ (größte Empfindlichkeit des Ausgangssignals) bestimmt. Die mittlere Höhe dieses Signals wird mit 3 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet (Renger et al. 1994).

8.3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

8.3.2.1 Beschreibung der Methode zur Bestimmung von Matricin, cis- und trans-En-In-Dicycloether (lipophile Inhaltsstoffe)

| | |
|-------------------|--|
| Geräte | HPLC-Pumpe Modell 616 mit 600S Controller und integrierter Entgasungseinheit, Fa. Waters Auto Injektor SIL-9A, Fa. Shimadzu UV-Detektor SPD-6A, Fa. Shimadzu Software zur Datenauswertung LC10, Fa. Shimadzu |
| Analytische Säule | CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18, 250 x 4,6 mm Art.-Nr. 2017020, Fa. Macherey-Nagel |
| Vorsäule | CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18, 8 x 4 mm Art.-Nr. 721602.40, Fa. Macherey-Nagel |
| Mobile Phase | A) Acetonitril/Methanol/Wasser (12/48/50, V/V) B) Methanol |

Die Komponenten des Fließmittelgemisches werden mithilfe einer Filtrationseinheit aus Glas (Fa. Sartorius) durch einen Membranfilter (regenerierte Cellulose, 0,2 µm Porenweite, Fa. Sartorius) einzeln filtriert, abgewogen und gemischt. Anschließend werden die Fließmittel 30 min im Ultraschallbad entgast. Vor Verwendung wird erneut 30 min lang und während der Analysen kontinuierlich bei einem Druck von 4 bar mit Helium (Typ 4.6) entgast. Das Fließmittelgemisch wird im Wasserbad auf 25 °C temperiert.

| | | |
|--------------------|------------|------------|
| Gradientenprogramm | 0–15 min | 100 % A |
| | 15–18 min | 100–50 % A |
| | 18–30 min | 50–30 % A |
| | 30–35 min | 30 % A |
| | 35–38 min | 30–100 % A |
| | 38–45 min | 100 % A |
| Flussrate | 1,0 ml/min | |
| Einspritzvolumen | 20 µl | |
| Detektion | UV 244 nm | |

Die Berechnung der Konzentration erfolgt über die Peakfläche aus dem arithmetischen Mittel dreier Einzelbestimmungen nach der Methode des externen Standards.

8.3.2.2 Beschreibung der Methode zur Bestimmung von Apigenin und Apigenin-7-glucosid (hydrophile Inhaltsstoffe)

Die Bestimmung erfolgt nach der HPLC-Methode zur Bestimmung von Matricin und den En-In-Dicycloethern (siehe 8.3.2.1) mit folgenden Änderungen:

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Mobile Phase | A) Acetonitril/Phosphorsäure (1000/2, V/V) | |
| | B) Wasser/Phosphorsäure (1000/2, V/V) | |
| Gradientenprogramm | 0–15 min | 22 % A |
| | 15–20 min | 50 % A |
| | 20–25 min | 50–75 % A |
| | 25–30 min | 75–22 % A |
| | 35–45 min | 22 % A |
| Flussrate | 1,2 ml/min | |
| Detektion | UV 335 nm | |

8.3.2.3 Probenvorbereitung und Standardlösungen

Standardlösungen zur Bestimmung der Wiederfindungsrate

a) Matricin

6,50 mg Matricin werden in einem 50,0 ml Messkolben in Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst. Unter Berücksichtigung der Reinheit von 97,39 % (\bar{x} aus $n = 3$), die mittels DSC bestimmt wird (siehe 8.3.6), weist diese Lösung einen Gehalt von 0,1265 mg/ml auf.

b) cis-En-In-Dicycloether

14,08 mg cis-En-In-Dicycloether werden in einem 25,0 ml Messkolben in Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst. Unter Berücksichtigung der Reinheit von 99,07 %, die im überladenen Chromatogramm durch Bestimmung des Peakflächenverhältnisses cis-EID zu Gesamtfläche ermittelt wird, resultiert eine Lösung mit einem Gehalt von 0,5579 mg/ml.

c) Apigenin

6,54 mg Apigenin werden in einem 100,0 ml Messkolben in Methanol gelöst. Daraus resultiert eine Lösung mit einem Gehalt von 0,0654 mg/ml.

d) Apigenin-7-glucosid

26,93 mg Apigenin-7-glucosid werden in einem 25,0 ml Messkolben in Methanol gelöst. Daraus resultiert eine Lösung mit einem Gehalt von 1,0772 mg/ml.

Probenvorbereitung von Mazeraten

Die Mazerate (siehe 8.5) werden in einen Messkolben filtriert und mit Lösungsmittel auf 100,0 ml aufgefüllt. Für die Bestimmung von lipophilen Inhaltsstoffen wird Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) als Lösungsmittel verwendet, zur Bestimmung von hydrophilen Inhaltsstoffen wird Methanol eingesetzt. Nach Filtration durch einen Membranfilter (regenerierte Cellulose, 0,45 µm Porenweite, Fa. Sartorius) werden die Lösungen direkt als Probenlösung eingesetzt.

Probenvorbereitung von CO₂-Extrakten

50–100 mg Extrakt, genau gewogen, werden in einem Messkolben im jeweiligen Lösungsmittel gelöst und auf 50,0 ml aufgefüllt. Für Extrakte, die mit reinem CO₂ hergestellt sind, wird als Lösungsmittel Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) verwendet, für Schlepmittelextrakte wird Methanol eingesetzt. Die erhaltenen Lösungen werden nach Filtration durch einen Membranfilter (regenerierte Cellulose, 0,45 µm Porenweite, Fa. Sartorius) direkt als Probenlösung eingesetzt.

Probenvorbereitung zur Bestimmung des nicht entnehmbaren Anteils im Abscheidebehälter

Die durch Ausspülen des Abscheidebehälters mit Ethanol gewonnene Suspension wird am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird durch wiederholtes Spülen mit Dichlormethan/Methanol (1:1, V/V) quantitativ in einen 100,0 ml Messkolben überführt. 10,0 ml dieser Lösung werden mit Dichlormethan/Methanol (1:1, V/V) auf 100,0 ml aufgefüllt und als Probenlösung eingesetzt.

8.3.2.4 Kalibrierung und Validierung

Kalibrierung

a) Matricin

19,60 mg Matricin werden in Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst und auf 250,0 ml aufgefüllt. Unter Berücksichtigung der Reinheit von 97,39 % weist diese Stammlösung einen Gehalt von 7,636 mg/100 ml auf. 5, 10, 15, 20, 25 und 30 ml dieser Stammlösung werden zu je 50,0 ml im Messkolben mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

b) cis-En-In-Dicycloether

16,99 mg cis-En-In-Dicycloether werden in einem 50,0 ml Messkolben in Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst. Unter Berücksichtigung der Reinheit von 99,07 % resultiert eine

Stammlösung mit einem Gehalt von 33,664 mg/100 ml. 2, 4, 6 und 8 ml dieser Stammlösung werden zu 10,0 ml im Messkolben mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt. Je Verdünnung und Stammlösung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

c) trans-En-In-Dicycloether

5,25 mg trans-En-In-Dicycloether werden in einem 25,0 ml Messkolben in Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst. Unter Berücksichtigung der Reinheit von 93,21 %, die im überladenen Chromatogramm durch Bestimmung des Peakflächenverhältnisses trans-EID zu Gesamtfläche ermittelt wird, resultiert eine Stammlösung mit einem Gehalt von 19,574 mg/100 ml. 1, 2, 3, 4 und 5 ml dieser Stammlösung werden im Messkolben zu 20,0 ml mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

d) Apigenin

6,54 mg Apigenin werden in einem 100,0 ml Messkolben in Methanol gelöst. 1, 2, 4, 6, 8 und 10 ml dieser Stammlösung werden im Messkolben zu 25,0 ml mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

e) Apigenin-7-glucosid

35,06 mg Apigenin-7-glucosid werden in einem 50,0 ml Messkolben in Methanol gelöst. 1, 5, 10 und 15 ml werden im Messkolben zu 100,0 ml mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt, 10 ml werden zu 50,0 ml verdünnt. Je Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

Richtigkeit (Ermittlung der Wiederfindungsrate)

a) Matricin

28,9 mg eines CO₂-Extraktes werden in 100,0 ml Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst, woraus ein Gehalt von 1,955 mg Matricin/100 ml resultiert (entspricht 100,00 %). 9,0 ml des Extraktes werden mit Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) zu 10,0 ml verdünnt, entsprechend 90,00 % Matricin. Des Weiteren werden je 1,0 ml einer Matricin-Standardlösung mit einem Gehalt von 0,1265 mg/ml mit obiger Lösung auf 50,0 ml bzw. 25,0 ml aufgefüllt, so dass Untersuchungslösungen mit 110,94 % bzw. 121,88 % Matricin resultieren. Es werden jeweils sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

b) En-In-Dicycloether

52,1 mg eines CO₂-Extraktes werden in 100,0 ml Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) gelöst, dies entspricht einem Gehalt von 9,398 mg cis-EID/100 ml und 2,229 mg trans-EID/100 ml. Analog zur Wiederfindung Matricin wird dieser Extrakt 9 + 1 verdünnt, entsprechend 90,00 % En-In-Dicycloether. Weiter werden je 1,0 ml einer cis-EID-Standardlösung mit einem Gehalt von 0,5579 mg/ml mit obiger Lösung auf 50,0 ml bzw. 25,0 ml aufgefüllt, so dass Untersuchungslösungen mit 109,87 % bzw. 119,75 % cis-EID resultieren. Es werden jeweils sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

c) Apigenin

Es werden 100 ml Kamillenextrakt durch Mazeration mit Methanol hergestellt (siehe 8.5), der Gehalt beträgt 0,9847 mg Apigenin/100 ml (entspricht 100,00 %). Analog zur Wiederfindung Matricin wird dieser Extrakt 9 + 1 verdünnt (entspricht 90,00 %). Je 1,0 ml einer Apigenin-Standardlösung mit einem Gehalt von 0,0654 mg/ml werden mit obigem Extrakt auf 50,0 ml bzw. 25,0 ml aufgefüllt, so dass Untersuchungslösungen mit 111,28 % bzw. 122,57 % Apigenin resultieren. Es werden jeweils sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

d) Apigenin-7-glucosid

Es werden 100 ml Kamillenextrakt durch Mazeration mit Methanol hergestellt (siehe 8.5), der Gehalt beträgt 11,885 mg Apigenin-7-glucosid/100 ml (entspricht 100,00 %). Analog zur Wiederfindung Matricin wird dieser Extrakt 9 + 1 verdünnt (entspricht 90,00 %). Je 1,0 ml einer Apigenin-Standardlösung mit einem Gehalt von 1,077 mg/ml werden mit obigem Extrakt auf 50,0 ml bzw. 25,0 ml aufgefüllt, so dass Untersuchungslösungen mit 116,12 % bzw. 132,25 % Apigenin-7-glucosid resultieren. Es werden jeweils sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

Methodenpräzision

Aus jeweils 3 g Kamillendroge wird sechsmal unabhängig voneinander ein Extrakt hergestellt, filtriert (siehe 8.5) und in je drei Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet.

Systempräzision

a) Lipophile Inhaltsstoffe

Ein Kamillenextrakt, hergestellt mit Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V), wird sechsmal injiziert. Der Mittelwert und die relative Standardabweichung werden für Matricin und cis-En-In-Dicycloether berechnet.

b) Hydrophile Inhaltsstoffe

Ein Kamillenextrakt, hergestellt mit Methanol, wird sechsmal injiziert. Der Mittelwert und die relative Standardabweichung werden für Apigenin und Apigenin-7-glucosid berechnet.

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wird graphisch aus dem unteren Ende der Kalibriergeraden und dem 95 %-Konfidenzintervall der Kalibriergeraden ermittelt (Ermer und Kibat 1998).

Nachweisgrenze

Es wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie beider Verfahren (8.3.2.1 und 8.3.2.2) bei der Dämpfung „-2“ (größte Empfindlichkeit des Ausgangssignals) bestimmt. Die mittlere Höhe dieses Signals wird mit 3 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet (Renger et al. 1994).

8.3.3 Bestimmung der Einschussrate des CO₂-Extraktes in β-CD-Komplexe

Die Komplexe werden nach der Gefriertrocknung unter gelindem Druck in einer Reibschale homogenisiert. 0,6 g Komplex, genau gewogen, werden in einem verschraubbaren 15 ml-Zentrifugenglas mit 2,0 ml n-Hexan versetzt und leicht geschüttelt. Nach Sedimentation unlöslicher Bestandteile wird die n-Hexan-Phase mit einer Pipette abgenommen und in einen Messkolben überführt. 1,0 ml interne Standardlösung wird zugegeben, und mit Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) auf 25,0 ml aufgefüllt. Die Lösung wird nach Filtration durch einen Membranfilter (regenerierte Cellulose, 0,45 µm Porenweite, Fa. Sartorius) als Probenlösung für HPLC und GC (8.3.2.1 und 8.3.1.1) eingesetzt (nicht eingeschlossene Inhaltsstoffe).

Der so gewaschene Komplex wird in 4,0 ml Dimethylsulfoxid gelöst, mit 10 ml Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) aufgefüllt und im verschlossenen Glas 12 Stunden equilibriert, dabei fällt reines β-CD teilweise wieder aus. Die resultierende Suspension wird durch einen Papier-Rundfilter (Typ 595 Ø 110 mm) filtriert und der Filtrerrückstand mehrmals mit Lösungsmittel nachgewaschen. Nach Zugabe von 2,0 ml interner Standardlösung wird in einem Messkolben auf 50,0 ml mit Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V) aufgefüllt, und die Lösung nach Filtration durch einen Membranfilter (regenerierte Cellulose, 0,45 µm Porenweite, Fa. Sartorius) als Probenlösung für HPLC und GC (8.3.2.1 und 8.3.1.1) eingesetzt (eingeschlossene Inhaltsstoffe).

8.3.4 Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl-Fischer

| | | |
|---------|---|------------------------------|
| Geräte | Titrierstand Modell 703, Fa. Deutsche Metrohm Zentraleinheit SM-Titrino 702, Fa. Deutsche Metrohm Software zur Datenauswertung: MetroData, Fa. Deutsche Metrohm | |
| Methode | Titriermedium | Methanol/Formamid (2:1, V/V) |
| | Titrans | Hydranal Composite 2 bzw. 5 |
| | Titrationendpunkt | 210 mV |
| | Beginn des Regelbereiches | 250 mV |
| | Maximaldosierrate | 3000 µl/min |
| | Minimaldosierrate | 2 µl/min |
| | Stopkriterium | Drift |
| | Stopdrift | 12 µl/min |
| | Pause | 60 s |
| | I (pol) | 40 µA |

Titerbestimmung und Titrationsen

Zur Titerbestimmung von Hydranal-Composite 2 bzw. 5 wird der Wassergehalt von ca. 25 bzw. 60 mg Natriumtartrat-2-hydrat (enthält 15,66 % Kristallwasser), genau gewogen, durch dreifache Titration bestimmt.

Zur Bestimmung des Wassergehaltes von Kamillendroge werden ca. 100 mg Droge, genau gewogen, vor Beginn der Titration 60 s mittels Ultra-Turrax dispergiert. Die Titration erfolgt mit Hydranal-Composite 5. Aus jeweils drei Einzelbestimmungen werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Die Bestimmung des Wassergehaltes von CO₂-Extrakten und CO₂-Extrakt/β-CD-Komplexen erfolgt durch Titration von ca. 300 mg Extrakt bzw. ca. 80 mg Komplex, genau gewogen, mit Hydranal Composite 2. Aus jeweils drei Einzelbestimmungen werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

8.3.5 pH-Wert-Messungen

Zur pH-Wert-Messung wird ein Knick pH-Meter 761 Calimatic (temperaturkompensiert, Fa. Knick) eingesetzt. Vor jeder Messung wird eine 2-Punkt-Kalibrierung mit Pufferlösungen von pH 4,00 und pH 7,00 (Fa. Merck) durchgeführt. Das vom Extrakt separierte Wasser wird bei Raumtemperatur direkt vermessen.

8.3.6 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Das Verfahren wird im Rahmen dieser Arbeit zur Reinheitsbestimmung von Matricin eingesetzt, welches von Ness (1995) isoliert wurde.

| | | |
|-------------|-------------------------------|--|
| Gerät | Basissystem | Mettler TA 8000 (Fa. Mettler-Toledo) |
| | Messzelle | DSC 820 |
| | Prozessor | TSA 811 |
| | Software | TA 8000 Thermoanalysensystem, Vers. 4.01 |
| | Probentiegel | Standardaluminiumtiegel, 40 µl, mit perforiertem Deckel |
| | Referenztiegel | Standardaluminiumtiegel, 40 µl, leer, mit perforiertem Deckel |
| Methode | DSC Purity Analysis | |
| | Spülgas | Stickstoff (Typ 5.0, Fa. Messer Griesheim) |
| | Kühlmittel | flüssiger Stickstoff |
| | Temperaturbereich | 130–180 °C |
| | Heizrate | 2 K/min |
| | Einwaage | ca. 2,5 mg (genau gewogen) |
| | Einstellungen im Purity-Modus | |
| Type | Peak | |
| Probability | 90 % | |
| Points | 30 | |
| Start | 10 % | |
| End | 50 % | |
| Molar Mass | 306,36 g/mol | |

Die Proben werden in ein tariertes Tiegelunterteil eingefüllt und mit einem teflonbeschichteten Metallstift an den Boden angepresst, um einen besseren Wärmeübergang zu gewährleisten.

ten. Anschließend werden sie mit einem gelochten Deckel verkrimpt. Das exakte Probengewicht wird auf einer Analysenwaage (Typ AT 261 Delta Range, Fa. Mettler Toledo) bestimmt.

8.3.7 Siebanalyse der Kamillendroge

| | |
|---------------|---|
| Gerät | Laborsiebmaschine RETAC 3D, Fa. Retsch |
| Analysensiebe | lichte Maschenweiten: 500, 710, 1400 und 3150 μm |
| Einwaage | ca. 25 g, genau gewogen |
| Siebzeit | 5 min |

Die Droge wird bei 60 % der maximalen Rüttelintensität gesiebt und anschließend werden die Rückstände gewogen.

8.4 Extraktion von Kamillenblüten mit überkritischem CO_2

8.4.1 Beschreibung der Hochdruckextraktionsanlage

Die Extraktionsversuche werden auf einer Hochdruckanlage der Fa. Sitec im Pilotmaßstab durchgeführt. Die Anlage arbeitet diskontinuierlich im Batchverfahren, wobei CO_2 als verdichtetes Gas im Kreislauf geführt wird. Ein separates Schleppmittelsystem erlaubt die kontinuierliche Zudosierung eines zweiten Lösungsmittels. Abb. 8.1 zeigt ein vereinfachtes Fließschema der Extraktionsanlage. Die Auslegung der Anlage ist Tab. 8.6 zu entnehmen, ausgewählte Komponenten sind in Tab. 8.7 aufgelistet.

Bei Betrieb mit reinem CO_2 wird dieses in flüssigem Zustand aus Steigrohrgasflaschen entnommen und gelangt über einen Kondensator (**8**) in den gekühlten CO_2 -Vorratstank (**1**). Um bei Druckerniedrigung in der Ansaugphase der Hochdruckpumpe (**3**) ein partielles Verdampfen des CO_2 (Kavitation) zu vermeiden, wird der flüssige Zustand durch weitere Abkühlung im Unterkühler (**2**) sichergestellt. Dies ist notwendig, da sich das CO_2 im Vorratstank bezüglich der Zustandsgrößen Druck und Temperatur an der Phasengrenze flüssig/gasförmig befindet (siehe Abb. 2.5, S. 15). Die Kühlung von Vorratstank, Kondensator und Unterkühler erfolgt durch ein Kälteaggregat mit HFKW 134a als Kühlmittel.

Der Extraktionsdruck wird über ein pneumatisches, stetig regelndes Ventil (**a**) konstant gehalten, welches sich hinter dem Extraktionsbehälter (**5**) befindet. Regelkreise aus Temperaturfühler, Regler und Magnetventil an Ein- und Ausgang des Extraktionsbehälters steuern die Zufuhr von Heizmedium zum Wärmetauscher (**4**) und Extraktionsbehälter, so dass die gewählte Temperatur bereits bei Eintritt des CO_2 in den Extraktionsbehälter realisiert ist. Der Massenfluss und die Dichte des CO_2 werden unmittelbar vor dem Extraktionsbehälter ge-

messen. Die Extraktionshülsen, welche das zu extrahierende Gut aufnehmen, werden durch Metallsinterplatten verschlossen, um nicht gelöste Bestandteile zurückzuhalten und einen gleichmäßigen CO_2 -Strom durch das Drogenbett zu bewirken. Nachdem das mit Extraktivstoffen beladene CO_2 den Extraktionsbehälter verlässt, kann durch Änderung von Druck und/oder Temperatur in einem Zwischenabscheider (**6**) die Abtrennung bestimmter Extraktfraktionen erreicht werden. Die Möglichkeit der Zwischenabscheidung wird im Rahmen dieser Arbeit nicht genutzt.

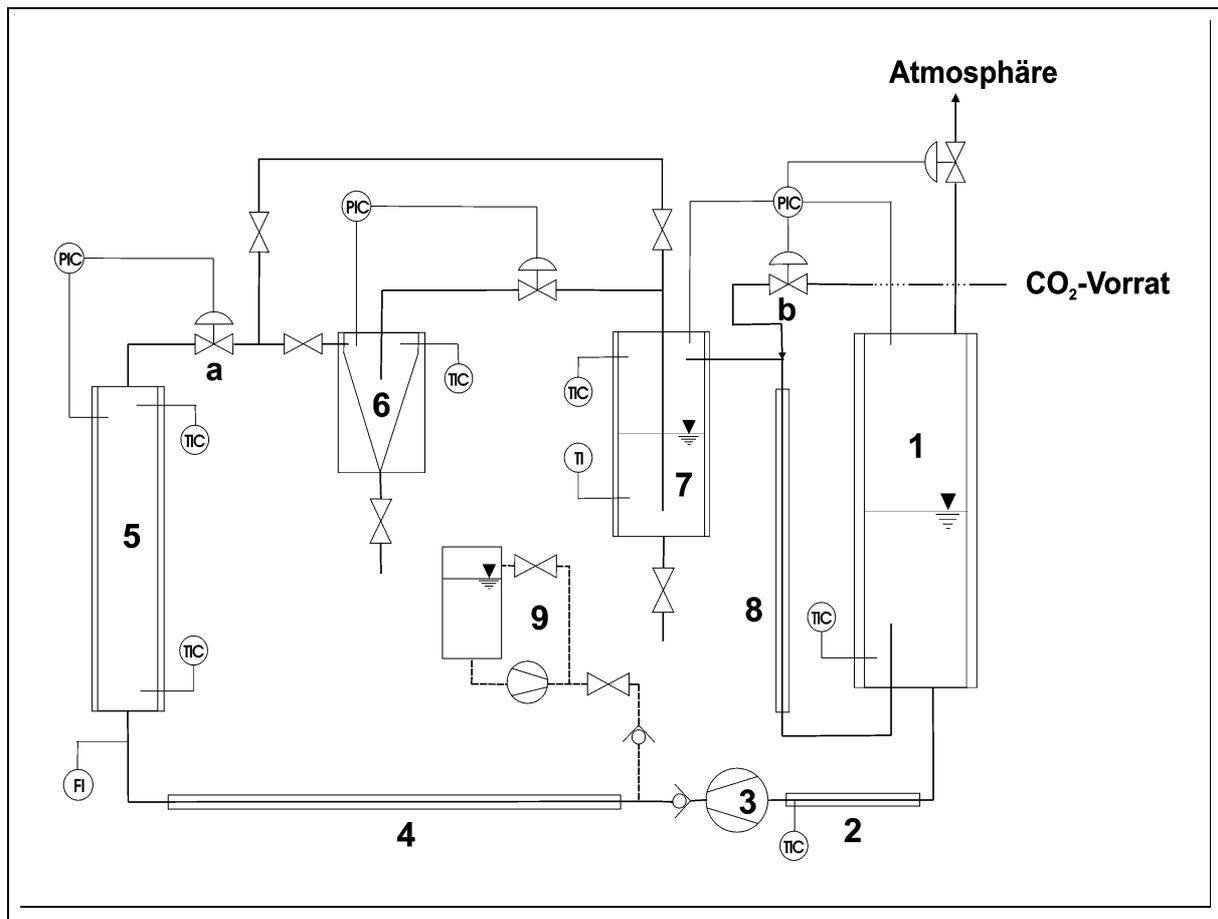


Abb. 8.1 Fließschema der verwendeten Extraktionsanlage;  Ventil;  pneumatisches Druckregelventil;  Rückschlagventil; FI (flow indicator) = Flussmesser; TI(C) (temperature indicator (-controller)) = Temperaturmesser (-regler) PI(C) (pressure indicator (-controller)) = Druckmesser (-regler)

Unter Umgehung der Zwischenabscheidestufe erfolgt in einem Schritt die vollständige Trennung von CO_2 und Extraktivstoffen im Endabscheider (**7**). Die dazu notwendige Druckreduktion in den unterkritischen Zustand erfolgt hinter Ventil (**a**), sie bewirkt eine starke Abkühlung und infolgedessen eine Verflüssigung des Extraktionsgases (Joule-Thomson-Effekt, siehe

Gl. 2.5, S. 14). Dadurch bildet sich im Endabscheider ein Niveau an flüssigem CO_2 aus. In diese Flüssigphase wird der Extrakt über ein Tauchrohr eingeleitet. Da in flüssigem CO_2 die Extraktivstoffe noch Restlöslichkeiten aufweisen können, erfolgt die eigentliche Trennung durch Verdampfen des CO_2 im Endabscheider. Zur Regelung der dazu notwendigen Wärmezufuhr bestehen zwei Möglichkeiten. Einerseits kann das Volumen an flüssigem CO_2 im Endabscheider mittels einer Niveausonde auf halber Füllhöhe konstant gehalten werden. Andererseits kann die Temperatur in der Gasphase auf einen konstanten Wert geregelt werden, der 3–4 °C oberhalb der Verdampfungstemperatur des CO_2 bei dem gewählten Abscheidedruck liegen sollte. Durch beide Varianten ist gewährleistet, dass kein flüssiges und möglicherweise noch extraktbeladenes Gas den Endabscheider verlässt, und dass genügend flüssiges CO_2 vorliegt, um den Extrakt bei möglichst tiefen Temperaturen aufzunehmen.

Verdampftes CO_2 wird über einen Kondensator **(8)** wieder verflüssigt und dem CO_2 -Vorratstank **(1)** zugeführt. Damit ist der Lösungsmittelkreislauf geschlossen. Der Druck in Endabscheider und Vorratstank ist durch den Abscheidedruck vorgegeben, welcher über ein pneumatisches Druckregelventil **(b)** konstant gehalten wird. Die korrespondierende Abscheidetemperatur stellt sich aufgrund des Gleichgewichtes von Gas- und Flüssigphase gemäß dem Phasendiagramm von CO_2 und der Gibbs'schen Regel ein (siehe Abb. 2.1, S. 6 und Gl. 2.3, S. 11).

Bei Schlepptextextraktionen wird das zweite Lösungsmittel aus einem Reservoir dem CO_2 -Kreislauf mittels einer separaten Pumpe zudosiert **(9)**, anschließend passiert das Lösungsmittelgemisch den Wärmetauscher. Rückschlagventile hinter der Schlepptextpumpe sowie hinter der CO_2 -Hochdruckpumpe verhindern den Rückfluss von Lösungsmittel. Unter Abscheidebedingungen, die im Zweiphasengebiet der binären Mischung CO_2 /Schlepptextmittel liegen, wird das Lösungsmittelgemisch wieder in seine beiden Komponenten aufgetrennt. Während CO_2 verdampft, muss das Schlepptextmittel kontinuierlich aus dem Endabscheider abgelassen werden, um ein Volllaufen des Abscheidebehälters und damit den Übergang des Extraktes in den CO_2 -Kreislauf zu vermeiden.

Die Anlage ist durch Berstscheiben gegen Überdruck gesichert. Im Hochdruckbereich (Pumpen, Extraktionsbehälter, Zwischenabscheider) beträgt der Berstdruck 550 bar, im Niederdruckbereich (Vorratstank und Endabscheider) 100 bar.

Tab. 8.6 Auslegung der Hochdruckextraktionsanlage

| | |
|-----------------------------|---|
| Lösungsmittel | CO ₂ und weitere, nicht brennbare Gase, die sich unter ähnlichen Bedingungen kondensieren lassen |
| Extraktionsdruck | 75–500 bar |
| Volumenfluss Lösungsmittel | max. 20 l/h |
| Volumenfluss Schleppmittel | max. 2 l/h (bei einer Viskosität von 1 mPa·s) |
| Extraktionstemperatur | Umgebungstemperatur bis +80 °C |
| Abscheidedruck | 40–70 bar |
| Abscheidetemperatur | Umgebungstemperatur bis +60 °C |
| Volumen Extraktionsbehälter | 1,2 bzw. 3,3 l |

Tab. 8.7 Ausgewählte Komponenten der Hochdruckextraktionsanlage

| Komponente | Typ | Hersteller |
|--|------------------|-----------------|
| Hochdruckpumpe | EH-M-210V1 | Fa. Lewa |
| Membrandosierpumpe im Schleppmittelsystem | EK-M-2101V | Fa. Lewa |
| Kälteaggregat | SC 21/21 GXT2 | Fa. Danfoss |
| Kühlthermostat (Pumpenkopfkühlung) | Minichiller cc | Fa. Peter Huber |
| Kälte-/Wärmethermostat (Zwischenabscheidung) | Ministat cc | Fa. Peter Huber |
| Heizthermostat (Extraktionsbehälter, Wärmetauscher) | E203 | Fa. Lauda |
| Heizthermostat (Abscheidebehälter) | E103 | Fa. Lauda |
| Massendurchflussmesser | Mass 2100 DI 1,5 | Fa. Danfoss |
| pneumatische Regelventile | 80037-IP | Fa. Kämmer |
| Messdatenerfassung (Analog-Digital-Wandler) | Adam 4017 | Fa. Advantech |
| Software | Visidaq 3.11 | Fa. Advantech |

8.4.2 Optimierung der Extraktionsbedingungen

Für die Optimierung der Extraktionsbedingungen werden je 200 g Kamillenblüten der Sorte Mabamille verwendet, die bereits geschnitten geliefert wird. Es wird jeweils ein Extraktionsparameter variiert, für die anderen Parameter werden die Referenzbedingungen beibehalten.

Tab. 8.8 Bedingungen der Extraktionsversuche

| | |
|--|--|
| Volumen der Extraktionshülse | 1,2 l |
| Gesamtmenge CO ₂ | 24 kg |
| Extraktionstemperatur | 40 °C |
| Abscheidedruck | 40 bar |
| Abscheidetemperatur | 8 °C |
| Solltemperatur des Kondensators | 3 °C |
| Solltemperatur des Unterkühlers | -10 °C |
| Extraktionsdruck und resultierende Dichte des CO ₂ | 90 ¹⁹ , 150, 200 bar 490 , 780, 840 kg/m ³ |
| Extraktionsdauer | 1, 3 , 5, 7 h |
| CO ₂ -Massenfluss und angepasste Extraktionsdauer ²⁰ | 4, 8 , 12 kg/h 6, 3 , 2 h |
| stationäre Zwischenmazeration | 1 h Extraktion – 2 h stationär unter Druck – 2 h Extraktion (Gesamtextraktionsdauer: 3 h) |
| Entspannen des Abscheidebehälters | schnell (Bildung von Trockeneis) langsam |

Die Extraktionsdauer wird gemessen, sobald CO₂ durch das Drogenbett strömt. Das CO₂-Niveau im Endabscheider wird mittels Temperaturregelung konstant gehalten. Nach Ablauf der Extraktionsdauer wird der Abscheidebehälter schnell auf Umgebungsdruck entspannt. Hierbei wird durch starke Abkühlung des CO₂ der Extrakt in entstehendes Trockeneis eingefroren und kann entnommen werden. Die Temperaturregelung des Heizmantels muss vorher

¹⁹ Referenzbedingungen sind **fett** gedruckt

²⁰ Bei verändertem CO₂-Massenfluss wird die Extraktionsdauer so angepasst, dass die Gesamtmenge CO₂ konstant bleibt.

ausgeschaltet werden, um die Bildung des Trockeneises zu gewährleisten. Extraktreste, die an den Wandungen des Abscheidebehälters haften, werden so weit wie möglich entnommen. Nach ca. 2 Stunden ist die Sublimation des festen CO₂ abgeschlossen, und der Extrakt wird gemäß den unter 8.6 beschriebenen Verfahren getrocknet.

Nicht entnehmbare Restmengen an Extrakt werden durch mehrmaliges Spülen des Abscheidebehälters mit Ethanol in einen Rundkolben überführt und gemäß 8.3.1.2 und 8.3.2.3 aufgearbeitet.

Zur Bestimmung des Restgehaltes an Inhaltsstoffen im CO₂-extrahierten Drogenmaterial wird daraus eine Probe entnommen und gemäß 8.5 extrahiert.

8.4.3 In-line-Einschluss von Kamilleninhaltsstoffen in β -Cyclodextrin

210 g Kamillenblüten der Sorte Manzana werden bei den in Tab. 8.8 aufgeführten Referenzbedingungen extrahiert. Die Zerkleinerung der Droge erfolgt unmittelbar vor der Extraktion mittels einer Schneidmühle (Fa. Fritsch) unter Verwendung des 4 mm-Quadratloch-Siebeinsatzes. Vor Beginn einer Extraktion werden 5, 10, 15 oder 20 g β -CD in den Endabscheider gegeben. Die resultierenden CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplexe werden nach Sublimation des CO₂ gefriergetrocknet (siehe 8.6.2).

8.4.4 Einfluss des Zerkleinerungsgrades auf die Extraktionsbilanz

Kamillenblüten der Sorte Manzana werden als ganze Droge oder zerkleinert eingesetzt. Die Zerkleinerung erfolgt mittels Schneidmühle (Fa. Fritsch) und Verwendung des 4 mm-Quadratloch- bzw. des 1 mm-Trapezloch-Siebeinsatzes zur Herstellung von grob bzw. fein geschnittener Droge. 200 g ganze Droge, 210 g grob und 260 g fein geschnittene Droge werden unter den in Tab. 8.8 beschriebenen Referenzbedingungen extrahiert. Die Extrakte werden nach Sublimation des CO₂ gefriergetrocknet (siehe 8.6.2).

8.4.5 Extraktion unter Zusatz von Schleppmittel

8.4.5.1 Fraktionierte Extraktion mit lipophilem Vorextraktionsschritt

210 g grob geschnittene Kamillenblüten der Sorte Manzana werden einem fraktionierten Extraktionsschema unterworfen. Der Vorextraktionsschritt entspricht einer CO₂-Extraktion unter Referenzbedingungen (siehe 8.4.2). Nach Beendigung der Vorextraktion wird der Extrakt entnommen und nach Sublimation des CO₂ gefriergetrocknet. Der Extraktionsbehälter mit

der vorextrahierten Droge wird auf Umgebungsdruck entspannt, 10 g extrahiertes Drogenmaterial werden entnommen und zur Bestimmung des Restgehaltes an Inhaltsstoffen wie unter 8.5 beschrieben mit Lösungsmittel mazeriert.

Die anschließende Schleppmittelextraktion wird über weitere 3 h durchgeführt, wobei die Zudosierung des Schleppmittels nach 15 bis 20 min gestartet wird und in Abhängigkeit des Extraktionsdruckes 60 bis 70 min dauert. Der Massenfluss des reinen CO₂ wird auf etwa 8 kg/h eingestellt. Die Bedingungen der Schleppmittelextraktionen sind in Tab. 8.9 zusammengestellt.

Tab. 8.9 Bedingungen der Schleppmittelextraktionen nach lipophiler Vorextraktion (SM = Schleppmittel)

| Druck [bar] | Temperatur [°C] | Volumen SM [l] | Stoffmengenanteil SM [%] | Massenfluss ²¹ [kg/h] | Dichte CO ₂ [kg/m ³] | Dichte CO ₂ /SM [kg/m ³] |
|-------------------|-----------------|----------------|--------------------------|----------------------------------|---|---|
| 90 | 40 | 1 l EtOH | 8,1 % | 8,6 | 533 | 728 |
| 90 | 40 | 2 l EtOH | 15,0 % | 9,5 | 542 | 770 |
| 250 | 40 | 2 l EtOH | 15,7 % | 9,4 | 887 | 864 |
| 90 | 40 | 2 l MeOH | 14,5 % | 9,3 | 550 | 780 |
| 250 | 40 | 2 l MeOH | 18,5 % | 9,4 | 885 | 896 |
| 380 ²² | 60 | 2 l MeOH | 18,2 % | 9,3 | 876 | 888 |

Die Schleppmittelextrakte werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei einer Temperatur, die der Extraktionstemperatur entspricht, eingengt und gemäß 8.6.3 getrocknet.

²¹ Massenfluss während der Schleppmittelzudosierung

²² Um eine Temperaturerhöhung auf 60 °C bei gleich bleibender Dichte des CO₂ zu realisieren, wird der Extraktionsdruck auf 380 bar angepasst.

8.4.5.2 Fraktionierte Schlepplmittelextraktion

Die Extraktionen werden mit 260 g fein geschnittenen Kamillenblüten der Sorte Manzana durchgeführt. Das Extraktionsschema (Tab. 8.10) umfasst drei aufeinander folgende hydrophile Schlepplmittelextraktionen mit CO₂/Methanol. Zudosierung des Schlepplmittels, Probenentnahme von extrahiertem Pflanzenmaterial und Aufarbeitung der Schlepplmittelextrakte entsprechen dem unter 8.4.5.1 beschriebenen Vorgehen.

Tab. 8.10 Bedingungen der fraktionierten Schlepplmittelextraktionen

| Druck [bar] | Temperatur [°C] | Volumen SM [l] | Stoffmengenanteil SM [%] | Massenfluss ²³ [kg/h] | Dichte CO ₂ [kg/m ³] | Dichte CO ₂ /SM [kg/m ³] |
|-------------|-----------------|----------------|--------------------------|----------------------------------|---|---|
| 380 | 60 | 2 l MeOH | 17,9 % | 9,5 | 877 | 885 |
| 380 | 60 | 2 l MeOH | 17,7 % | 9,1 | 876 | 886 |
| 100 | 70 | 2 l MeOH | 19,3 % | 9,3 | 258 | 371 |

8.4.5.3 Herstellung eines Gesamtextraktes mittels Schlepplmittelextraktion

260 g fein geschnittene Kamillenblüten der Sorte Manzana werden bei einem CO₂-Massenfluss von 8 kg/h über 3 Stunden extrahiert. Die Zudosierung des Schlepplmittels erfolgt während etwa 60 Minuten. Die sich ergebenden Extraktionsparameter sind in Tab. 8.11 zusammengestellt. Die weitere Verarbeitung des Extraktes erfolgt gemäß 8.4.5.1.

Tab. 8.11 Extraktionsparameter zur Herstellung eines Gesamtextraktes

| Druck [bar] | Temperatur [°C] | Volumen SM [l] | Stoffmengenanteil SM [%] | Massenfluss ¹ [kg/h] | Dichte CO ₂ [kg/m ³] | Dichte CO ₂ /SM [kg/m ³] |
|-------------|-----------------|----------------|--------------------------|---------------------------------|---|---|
| 100 | 70 | 2 l MeOH | 23,6 | 9,3 | 259 | 376 |

²³ Massenfluss während der Schlepplmittelzudosierung

8.5 Extraktion der Kamillenblüten mittels Mazeration und Remazeration

Zur Bestimmung des Restgehaltes an Inhaltsstoffen im Anschluss an eine CO₂-Extraktion werden 5 g Kamillendroge, genau gewogen, mit 100 ml des jeweiligen Lösungsmittels im 250 ml Jodzahlkoben auf dem Magnetrührer 60 Minuten lang bei Raumtemperatur extrahiert. Der Extrakt wird in einen Messkolben filtriert, 4,0 ml der internen Standardlösung werden zugegeben und auf 100,0 ml aufgefüllt.

Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Inhaltsstoffen wird die Droge ebenso extrahiert, anschließend erneut mit 100 ml des Lösungsmittels 60 Minuten lang mazeriert und wie oben beschrieben weiter verarbeitet. Für die Bestimmung des Gehaltes an lipophilen Inhaltsstoffen wird Dichlormethan/Methanol (1/1, V/V), für die Extraktion hydrophiler Inhaltsstoffe Methanol verwendet.

8.6 Trocknung der CO₂-Extrakte

8.6.1 Trocknung im Exsikkator

Die Extrakte werden in braune Glasgefäße überführt, genau gewogen, und offen in einem Exsikkator über Kieselgel und Phosphorpentoxid getrocknet. Die Trocknung erfolgt bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz. Um den Verlauf der Trocknung zu verfolgen, werden die Extrakte zu bestimmten Zeiten gewogen und der Trocknungsverlust bestimmt. Es wird jeweils eine Probe gezogen und der Gehalt an relevanten Inhaltsstoffen bestimmt.

8.6.2 Gefriertrocknung

| | | |
|---------|---|----------------------------|
| Gerät | Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2, Fa. AMSCO Finn-Aqua Julabo Kälte-Umwälzthermostat FP 50 MH, Fa. Julabo Leybold Vakuumpumpe Trivac D8B, Fa. Leybold | |
| Methode | Einfrieren | -30 °C |
| | Haupttrocknung | 0–14 h bei -25 °C |
| | Nachtrocknung | 14–24 h bei +20 °C |
| | Druck | 5,0 x 10 ⁻² hPa |
| | Kondensatortemperatur | -50 °C |

8.6.3 Trocknung von Schleppmittelextrakten

Die am Rotationsverdampfer eingeeengten Extrakte werden in flache Glasschalen ausgegossen. Bei Raumtemperatur unter dem Abzug erfolgt zunächst während 24 Stunden eine Aufkonzentrierung zur zähfließenden Masse, um Blasenbildung und Verspritzen des Extraktes unter Vakuum zu vermeiden. Anschließend werden die Extrakte weitere 24 Stunden im Vakuumtrockenschrank (Fa. Binder) bei 35 °C und etwa 80 mbar getrocknet.

Kapitel 9

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Möglichkeiten der Anwendung von überkritischem CO₂ im Bereich der Naturstoffextraktion anhand der Kamille als Modelldroge untersucht. Kamillenblüten enthalten eine Vielzahl von pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffen mit unterschiedlichsten Eigenschaften im Hinblick auf Polarität und Stabilität und stellen damit eine ideale Matrix dar, um ein breites Spektrum an Einflussgrößen zu untersuchen.

Überkritisches CO₂ ist als lipophiles Solvens geeignet, die Bestandteile des ätherischen Kamillenöls selektiv bei niedrigen Temperaturen zu extrahieren. Anhand von stabilen, lipophilen Inhaltsstoffen wird eine Optimierung des Extraktionsprozesses vorgenommen. Die Ansatzgröße im Technikumsmaßstab ermöglicht eine Betrachtung der Gesamtextraktausbeute, der Ausbeute an Kamilleninhaltsstoffen im Extrakt sowie der in der Droge verbleibenden Restgehalte. Damit kann die Aufstellung einer Bilanz des Extraktionsprozesses vorgenommen werden. Folgende Einflussgrößen werden variiert:

- Vorbehandlung der Droge: Zerkleinerungsgrad (grob und fein geschnitten)
- Extraktionsdruck: 90–200 bar
- Extraktionsdauer: 1–7 h
- CO₂-Massenfluss: 4 kg/h–12 kg/h und stationäre Zwischenmazeration
- Entnahme des Extraktes: schnelles und langsames Entspannen des Endabscheiders
- Trocknung des Extraktes: Trocknung im Exsikkator und Gefriertrocknung

In einem zweiten Schritt soll der lipophile, zähfließende CO₂-Extrakt durch die Kombination von CO₂-Extraktion und In-line-Einschluss in β -Cyclodextrin in einem Verfahrensschritt in eine pulverförmige Substanz überführt werden. Der Einfluss von β -CD auf die Stabilität von Kamilleninhaltsstoffen wird am Beispiel von Matricin, das in herkömmlichen ethanolisch-wässrigen Extrakten einer raschen hydrolytischen Zersetzung unterliegt, untersucht und mit Stabilitätsdaten eines reinen CO₂-Extraktes verglichen.

Um den Anwendungsbereich der Extraktion mit überkritischem CO₂ auf hydrophile Kamilleninhaltsstoffe wie Flavonoide zu erweitern, werden Ethanol und Methanol als Schlepptomittel zur Erhöhung der Polarität des Extraktionsfluides eingesetzt. Am Beispiel von Apigenin wird die Extrahierbarkeit von Flavonoid-Aglyka, am Beispiel von Apigenin-7-glucosid die Extrahierbarkeit von Flavonoid-Glykosiden untersucht und mit einem konventionellen Extrakt verglichen.

Optimierung der Extraktionsparameter

Eine optimale Selektivität für die Bestandteile des ätherischen Kamillenöls bei guter Gesamtausbeute und kurzer Prozesszeit ergibt sich, wenn die Extraktion bei 40 °C, 90 bar und einem CO₂-Massenfluss von 8 kg/h über 3 h durchgeführt wird. Der Einsatz zerkleinerten Drogenmaterials verbessert die Gesamtausbeute ohne einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Kamilleninhaltsstoffe zu haben. Die Extraktentnahme sollte aus Gründen der Handhabbarkeit nach einer schnellen Druckreduktion des Abscheidebehälters erfolgen. Das dabei gebildete Trockeneis schließt den CO₂-Extrakt vorübergehend ein, nach Sublimation verbleibt der lösungsmittelfreie Extrakt. Eine anschließende Gefriertrocknung führt zu Verlusten an β -Farnesen, einem sehr flüchtigen, aber pharmakologisch nicht wertbestimmenden Inhaltsstoff. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Matricins in Gegenwart des co-extrahierten Wassers ist eine Gefriertrocknung allerdings obligatorisch. Zudem reduziert sich die Trocknungszeit von 2-3 Wochen, die bei einer Trocknung im Exsikkator bei Umgebungstemperatur notwendig sind, auf 24 Stunden durch die Gefriertrocknung.

Damit kann die Extraktion der lipophilen Bestandteile der Kamille mit überkritischem CO₂ als schnelle, schonende, gut reproduzierbare Methode eine Alternative zu herkömmlichen Extraktionsverfahren darstellen. Sie führt zu Extrakten hoher Qualität ohne toxikologisch bedenkliche Rückstände an Lösungsmitteln. Ein besonders in der Pädiatrie wünschenswerter Aspekt ist der Verzicht auf Ethanol, das in Mischungen mit Wasser als Extraktionsmittel für die überwiegende Zahl der Kamillenhandelspräparate zur innerlichen Anwendung eingesetzt wird. Der quantitative Vergleich eines unter optimierten Bedingungen hergestellten CO₂-Extraktes mit einem ethanolischen Extrakt ergibt einen 280-mal höheren (-)- α -Bisabololgehalt, einen 500-mal höheren trans-EID- und einen 730-mal höheren cis-EID-Gehalt. Somit liegen die pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe in therapeutisch relevanten Konzentrationen im Extrakt vor.

Stabilität von Matricin in CO₂-Extrakten

Matricin, der im Hinblick auf die Haltbarkeit empfindlichste Inhaltsstoff der Kamille, kann mittels überkritischem CO₂ in den Extrakten angereichert und bei kühler Lagerung (-30 °C bis +5 °C) über sechs Monate in der lipophilen Extraktmatrix stabilisiert werden. Bei Raumtemperatur oder +30 °C erfolgt eine kontinuierliche Abnahme des Matricingehaltes über 3-4 Monate, die auf den nach der Gefriertrocknung im Extrakt verbleibenden Restwassergehalt von 0,5-3,5 % zurückgeführt werden kann. Im Vergleich zu konventionellen Extrakten, die mit

Ethanol/Wasser-Mischungen hergestellt werden, verlängert sich die Halbwertszeit von Matricin bei Raumtemperatur von etwa sieben Tagen auf acht Wochen.

In-line-Einschluss von Kamilleninhaltsstoffen in β -Cyclodextrin

Ein In-line-Einschluss des CO₂-Extraktes in β -CD kombiniert die Verfahrensschritte der CO₂-Extraktion und der Komplexherstellung ohne weiteren apparativen und zeitlichen Aufwand, sowie unter Verzicht auf den Einsatz organischer Lösungsmittel. Die Herstellung der Einschlussverbindung wird erreicht, indem β -CD vor Beginn der Extraktion in den Endabscheidebehälter gegeben wird. Die Bildung der Einschlussverbindung findet während des Extraktionsprozesses in flüssigem CO₂ bei 8 °C und 40 bar statt. Es werden bei einem β -CD:Extrakt-Verhältnis von 8:1 Einschussraten der Kamilleninhaltsstoffe erzielt, die zwischen 70 % und 95 % liegen. Die Reduktion der β -CD-Menge auf Verhältnisse von 6:1, 4:1 und 2:1 geht mit Ausnahme des Matricins für alle Inhaltsstoffe mit einer Reduktion der Einschussraten auf 40-70 % einher. Matricin zeigt dabei innerhalb der gewählten β -CD:Extrakt-Verhältnisse von 2:1 bis 8:1 konstant hohe Einschussraten zwischen 80 und 95 %. Die Komplexbildung ermöglicht es, den zähfließenden CO₂-Extrakt in eine frei fließende, pulverförmige Substanz zu überführen, was eine enorme Verbesserung der Handhabbarkeit mit sich bringt. Gleichzeitig erfolgt eine Reduktion des intensiven, charakteristischen Kamillengeruches, der durch die hohe Konzentration an Inhaltsstoffen im CO₂-Extrakt verursacht wird. Eine weitergehende Stabilisierung von Matricin ist durch den Einschluss in β -CD nicht möglich. Durch die Hydrophilie des β -CD unterbleibt die bei reinen CO₂-Extrakten beobachtete Separation des co-extrahierten Wassers aus der lipophilen Extraktmatrix. Dies macht sich in deutlich erhöhten Restwassergehalten (6-8 %) der CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplexe nach Gefriertrocknung gegenüber reinen CO₂-Extrakten (0,5-3,5 %) bemerkbar. Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der im Vergleich zu einem reinen CO₂-Extrakt beschleunigten Abbauvorgänge des Matricins in Gegenwart von β -CD ist die Möglichkeit einer Katalyse von Schritten der Matricinzersetzungsreaktion. Die Eignung von β -CD als Enzymmodell für Hydrolyse- und Decarboxylierungsreaktionen wird in der Literatur mehrfach beschrieben. Die Stabilität von Matricin in Kamillenextrakten nimmt mit abnehmendem Wassergehalt in folgender Reihenfolge zu: konventionelle ethanolisch-wässrige Extrakte < CO₂-Extrakt/ β -CD-Komplexe < CO₂-Extrakte.

Gewinnung hydrophiler Kamilleninhaltsstoffe durch Schleppmittelextraktion

Schleppmittel erweitern das Anwendungsspektrum der CO₂-Extraktion auf hydrophile Inhaltsstoffe der Kamille wie Flavonoide und Flavonoid-Glykoside. Der Einsatz von Ethanol in Konzentrationen von etwa 15 mol% bei einer Extraktionstemperatur von 40 °C und Drücken zwischen 90 und 250 bar führt zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute an mittelpolaren Substanzen, wie am Beispiel von Apigenin gezeigt wird. Eine Erhöhung der Schleppmittelpolarität durch Verwendung von Methanol und eine gleichzeitige Erhöhung der Extraktionstemperatur und des -druckes auf 60 °C bzw. 380 bar bewirken eine nahezu quantitative Gewinnung von Apigenin. Apigenin-7-glucosid – das hydrophilere Derivat – weist unter diesen Bedingungen eine Ausbeute von etwa 10 % auf. Somit kann eine fraktionierte Extraktion zunächst mit reinem CO₂ zur Abtrennung der Bestandteile des ätherischen Öls durchgeführt werden, eine anschließende Schleppmittelextraktion reichert mittelpolare Substanzen im CO₂-Extrakt an.

Extraktion im Zweiphasengebiet mittels unterkritischer CO₂/Methanol-Mischungen

Um Flavonoid-Glykoside quantitativ zu extrahieren, kann eine CO₂-Extraktion mit Methanol als Schleppmittel im Zweiphasengebiet, also im unterkritischen Bereich der binären Mischung CO₂/Methanol durchgeführt werden. Dies wird bei 70 °C und 100 bar untersucht. Unter diesen Bedingungen findet eine Aufspaltung des Extraktionslösungsmittels in eine mit Methanol gesättigte CO₂-Gasphase und eine CO₂-gesättigte Methanol-Flüssigphase statt. Letztere ist aufgrund eines Methanolanteils von ca. 50 mol% und einer deutlich erhöhten Dielektrizitätskonstante von 10-12 geeignet, Apigenin-7-glucosid als wichtigsten Vertreter der Flavonoid-Glykoside zu extrahieren. Dadurch kann ein Extrakt mit einem Gehalt von 43 mg Apigenin-7-glucosid pro Gramm Trockenextrakt hergestellt werden. Dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 10-12. Ein konventioneller ethanolischer Extrakt weist demgegenüber mit 1,5 mg/g einen um den Faktor 30 geringeren Gehalt an Apigenin-7-glucosid auf.

Die überkritische Extraktion mit einer CO₂/Methanol-Mischung im Zweiphasengebiet ermöglicht darüber hinaus die Herstellung eines Kamillen-Gesamtextraktes in einem Extraktionsschritt. Das Inhaltsstoffspektrum der erhaltenen Extrakte entspricht weitestgehend dem der nativen Pflanze. Sowohl die Bestandteile des ätherischen Öls als auch hydrophile Inhaltsstoffe wie Apigenin-7-glucosid werden quantitativ extrahiert. Die Wiederfindungsrate im Extrakt beträgt 101 % für (-)- α -Bisabolol, 96 % bzw. 126 % für cis- bzw. trans-EID, 93 % für Apigenin-7-glucosid und 134 % für Apigenin. Die deutlich über 100 % liegenden Wiederfindungsraten von trans-EID und Apigenin sind auf die Isomerisierung von cis-EID zu trans-EID sowie auf die Deglucosidierung von Apigenin-7-glucosid zurückzuführen. Um vergleichbare

Ausbeuten mittels Lösungsmittelextraktion zu erzielen, ist mindestens die Anwendung zweier unterschiedlich polarer Solventien notwendig. Die erforderliche Lösungsmittelmenge bei Extraktion mit modifiziertem überkritischem CO₂ reduziert sich im Vergleich zu einer Mazeration auf etwa 20 %. Gegenüber einem herkömmlichen Extrakt auf Ethanol/Wasser-Basis liegen die Konzentrationen der pharmakologisch wirksamen Inhaltsstoffe in diesem Gesamtextrakt zwischen 3- (Apigenin) und 90-mal (cis-EID) höher.

Die CO₂-Extraktion stellt demzufolge ein vielseitiges Instrument zur Herstellung von Pflanzenextrakten dar. Durch geeignete Wahl der Extraktionsbedingungen und gegebenenfalls durch Zusatz eines Schleppmittels lassen sich unterschiedlichste Inhaltsstoffspektren extrahieren, sowie durch fraktionierte Extraktionsschemata selektiv anreichern. Daraus ergeben sich hochwertige Arzneimittel im Sinne einer rationalen Phytotherapie.

Kapitel 10

Literaturverzeichnis

Achterrath-Tuckermann, U.; Kunde, R.; Flaskamp, E.; Isaac, O.; Thiemer, K.

„Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen“

Planta med. **39**, 38-50 (1980)

Adda, J. und Lorne, J.-L.

„Process for the extraction of volatile compounds with supercritical carbon dioxide, and compounds obtained“

United States Patent 5073267 (1991)

Ammon, H. P. T. und Kaul, R.

„Pharmakologie der Kamille und ihrer Inhaltsstoffe“

Dtsch. Apoth. Ztg. **132** Suppl. 27, 1-26 (1992)

Ammon, H. P. T. und Sabieraj, J.

„Kamille – Mechanismus der antiphlogistischen Wirkung von Kamillenextrakten und -inhaltsstoffen“

Dtsch. Apoth. Ztg. **136**, 1821-1834 (1996)

AMWarnV (Arzneimittel-Warnhinweisverordnung)

Bundesgesetzblatt Teil I, S. 22, Januar (1985)

Andrews, T.

„On the continuity of the gaseous and liquid states of matter“

Trans. Roy. Soc. (London) **A159**, 575-590 (1869)

Behr, N.; von Ettingshausen, O.; van der Mei, H.; Wüst, R.

„Verfahren zur Gewinnung von Inhaltsstoffen der Kamille durch Extraktion mit Kohlendioxid“

Ger. Offen. DE 31 05 557 A1 (1982)

Bender, E.

„Equations of state exactly representing the phase behavior of pure substances“

Proc. Symp. Thermophys. Prop. **5**, 227-235 (1970)

Breinlich, J. und Scharnagel, K.

„Pharmakologische Eigenschaften des EN-IN-Dicycloäthers aus Matricaria Chamomilla“

Arzneim.-Forsch. **18**, 429-431 (1968)

Brunner, G.

„Stofftrennung mit überkritischen Gasen (Gasextraktion)“

Chem-Ing-Tech. **59**, 12-22 (**1987**)

Brunner, G.

„Gas extraction“

Steinkopff Verlag, S. 7-21, S. 62, S. 83-113, S. 165-174 Darmstadt (**1994**)

Buchwald, P.

„Complexation thermodynamics of cyclodextrins in the framework of a molecular size-based model for nonassociative organic liquids that includes a modified hydration-shell hydrogen-bond model for water“

J. Phys. Chem. B **106**, 6864-6870 (**2002**)

Buse Gase GmbH & Co.

„Eigenschaften der Kohlensäure“

4. Aufl., S. 4 (**1992**)

Cagniard de la Tour, C.

„Exposé de quelques résultats obtenus par l'action combinée de la chaleur et de la compression sur certains liquides, tels que l'eau, l'alcool, l'éther sulfurique et l'essence de pétrole rectifiée.“

Ann. chim. phys. **2**, 127-132, 178-182 (**1822**)

Carle, R. und Gomaa, K.

„Chamomile: a pharmacological and clinical profile“

Drugs today **28**, 559-565 (**1992a**)

Carle, R. und Gomaa, K.

„Technologische Einflüsse auf die Qualität von Kamillenblüten und Kamillenöl“

Pharm. Ztg. Wiss. **137**, 71-76 (**1992b**)

Cekan, Z.; Herout, V.; Sorm, F.

„Isolation and properties of the pro-chamazulene from *Matricaria chamomilla* L., a further compound of the guaianolide group“

Collect. Czech. Chem. Commun. **19**, 798-804 (**1954**)

Chandra, A. und Nair, M. G.

„Supercritical carbon dioxide extraction of daidzein and genistein from soybean products“

Phytochem. Anal. **7**, 259-262 (**1996**)

Chang, T. und Rousseau, R. W.

„Solubilities of carbon dioxide in methanol and methanol-water at high pressures: experimental data and modeling“

Fluid Phase Equilibr. **23**, 243-258 (1985)

Charoenchaitrakool, M.; Dehghani, F.; Foster, N. R.

„Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- β -cyclodextrin“

Int. J. Pharm. **239**, 103-112 (2002)

Chiu, K.-L.; Cheng, Y.-C.; Chen, J.-H.; Chang, C. J.; Yang, P.-W.

„Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids“

J. Supercrit. Fluids **24**, 77-87 (2002)

Chrastil, J.

„Solubility of solids and liquids in supercritical gases“

J. Phys. Chem. **86**, 3016-3021 (1982)

Connors, K. A.

„The stability of cyclodextrin complexes in solution“

Chem. Rev. **97**, 1325-1357 (1997)

da Costa, C. T.; Margolis, S. A.; Benner, B. A. Jr.; Horton, D.

„Comparison of methods for extraction of flavanones and xanthenes from the root bark of the osage orange tree using liquid chromatography“

J. Chromatogr. A **831**, 167-178 (1999)

Cramer, F. und Dietsche, W.

„Stereospezifische Reaktionen mit Einschlussverbindungen“

Chem. Ber. **92**, 1739-1747 (1959)

da Cruz Francisco, J. und Sivik, B.

„Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide“

J. Supercrit. Fluids **23**, 11-19 (2002)

Della Loggia, R.; Carle, R.; Sosa, S.; Tubaro, A.

„Evaluation of the anti-inflammatory activity of chamomile preparations“

Planta med. **56**, 657-658 (1990)

Dölle, B.; Carle, R.; Müller, W.

„Flavonoidbestimmung in Kamillenextraktpräparaten“

Dtsch. Apoth. Ztg. **125**, 14-19 (1985)

Donsi, G. und Reverchon, E.

„Micronization by means of supercritical fluids: possibility of application to pharmaceutical field“

Pharm. Acta Helv. **66**, 170-173 (1991)

Eggers, R. und Tschiersch, R.

„Development and design of plants for high-pressure extraction of natural products“

in Schneider, G. M.; Stahl, E.; Wilke, G. (Hrsg.) „Extraction with supercritical gases“

Verlag Chemie, Weinheim, 165-189 (1980)

Ermer, J. und Kibat, P.-G.

„Validierung analytischer Verfahren – 2. Teil: Beispiele und Validierung während der Arzneimittelentwicklung“

PZ Prisma **5**, 122-128 (1998)

Europäisches Arzneibuch, 4. Ausgabe, Grundwerk 2002, Amtliche deutsche Ausgabe

„Kamillenblüten – *Matricariae flos*“

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2176-2177 (2002a)

Europäisches Arzneibuch, 4. Ausgabe, Grundwerk 2002, Amtliche deutsche Ausgabe

„Kamillenfluidextrakt – *Matricariae extractum fluidum*“

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2177-2179 (2002b)

Exner, J.; Reichling, J.; Cole, T. C. H.; Becker, H.

„Methylated flavonoid-aglycones from „*Matricariae Flos*“

Planta med. **41**, 198-200 (1981)

Fernandez, M. A.; de Rossi, R. H.; Cervello, E.; Jaime, C.

„Effect of β -cyclodextrin on the hydrolysis of trifluoroacetate esters“

J. Org. Chem. **66**, 4399-4404 (2001)

Flaskamp, E.; Zimmermann, G.; Nonnenmacher, G.; Isaac, O.

„Untersuchungen zur Charakterisierung des Prochamazulens Matrizin aus *Matricaria chamomilla* L.“

Z. Naturforsch. **37b**, 508-511 (1982)

Freudenberg, K. und Cramer, F.

„Über die Schardinger-Dextrine aus Stärke“

Chem. Ber. **83**, 296-304 (**1950**)

Freudenberg, K. und Meyer-Delius, M.

„Über die Schardinger-Dextrine aus Stärke“

Ber. Dtsch. Chem. Ges. **71**, 1596-1600 (**1938**)

Freudenberg, K.; Plankenhorn, E.; Knauber, H.

„Schardinger's dextrins – derived from starch“

Chem. Ind., 731-735 (**1947**)

Frömming, K.-H.

„Einschlussverbindungen und ihre pharmazeutischen Verwendungsmöglichkeiten“

Pharmazie in unserer Zeit **2**, 109-115 (**1973**)

Ghassemi-Dehkordi, N.

„Analytik, Radioisotopenmarkierung und Pharmakokinetik von Matricin und Spiroäthern aus Matricaria recutita L.“

Dissertation, Philipps-Universität Marburg (**1988**)

Gilbert, M. L. und Paulaitis, M. E.

„Gas-liquid equilibrium for ethanol-water-carbon dioxide mixtures at elevated pressures“

J. Chem. Eng. Data **31**, 296-298 (**1986**)

Glasl, H. und Wagner, H.

„Gaschromatographische Untersuchung von Arzneibuchdrogen. 5. Mitteilung: Kamillenblüte – Eine neue Wertbestimmung der Kamillendroge und ihrer Zubereitungen“

Dtsch. Apoth. Ztg. **116**, 45-50 (**1976**)

Gottwald, W.

„Statistik für Anwender“

Wiley-VCH Verlag, Weinheim (**2000**)

Gouw, T. H. und Jentoft, R. E.

„Supercritical fluid chromatography“

J. Chromatogr. **68**, 303-323 (**1972**)

Grant, D. W.

„Column development and technology in gas chromatography“

J. Chromatogr. **122**, 107-128 (**1976**)

Grünhagen, U.

„Kapillargaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen an Kamillenextrakten“

Dissertation, Stuttgart (**1994**)

Gstirner, F. und Berniker, B.

„Vergleichende Untersuchungen zwischen Perkolation und Evakolation zur Gewinnung von Fluidextrakten“

Pharm. Ztg. **103**, 480-483 (**1958**)

Hannay, J. B. und Hogarth, J.

„On the solubility of solids in gases“

Proc. Roy. Soc. **29**, 324-236 (**1879**)

Hawthorne, S. B.

„Analytical-scale supercritical fluid extraction“

Anal. Chem. **62**, 633-642 (**1990**)

Hedges, A. R.

„Industrial applications of cyclodextrins“

Chem. Rev. **98**, 2035-2044 (**1998**)

Hempel, B. und Hirschelmann, R.

„Kamille – Entzündungshemmende Wirkung von Inhaltsstoffen und Zubereitungen in vivo“

Dtsch. Apoth. Ztg. **138**, 4237-4242 (**1998**)

Herout, V.

„Über die Prochamazulene“

Parfuem. Kosmet. **40**, 12-14 (**1959**)

Hitzinger, T.; Höll, P.; Ramadan, M.; Dettmering, D.; Imming, P.; Hempel, B.

„Die alte junge Kamille“

Pharm. Ztg. **148**, 372-380 (**2003**)

Isaac, O.; Schmidt, W.; Schäfer, W.; Buschhaus, W.

„Verfahren zur Extraktion proazulenhaltiger Drogen“

Ger. DE 1 093 951 (**1959**)

Isaac, O.; Schneider, H.; Eggenschwiller, H.

„Beitrag zur Kenntnis des Kamillen-Bisabolols“

Dtsch. Apoth. Ztg. **108**, 293-298 (**1968**)

ICH-Guideline Q2A

„Validation of analytical procedures“

International Conference on Harmonisation **(1994)**

Jakovlev, V.; Isaac, O.; Thiemer, K.; Kunde, R.

„Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. Neue Untersuchungen zur antiphlogistischen Wirkung des (-)- α -Bisabolols und der Bisabololoxide“

Planta med. **35**, 125-140 **(1979)**

Jakovlev, V.; Isaac, O.; Flaskamp, E.

„Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. Untersuchungen zur antiphlogistischen Wirkung von Chamazulen und Matricin“

Planta med. **49**, 67-73 **(1983)**

Jarvis, A. P. und Morgan, E. D.

„Isolation of plant products by supercritical-fluid extraction“

Phytochem. Anal. **8**, 217-222 **(1997)**

Jennings, D. W.; Lee, R.-J.; Teja, A. S.

„Vapor-liquid equilibria in the carbon dioxide + ethanol and carbon dioxide + 1-butanol systems“

J. Chem. Eng. Data **36**, 303-307 **(1991)**

Kaiser, C. S.; Römpf, H.; Schmidt, P. C.

„Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide“

Pharmazie **56**, 907-926 **(2001)**

Kamihira, M.; Asai, T.; Yamagata, Y.; Taniguchi, M.; Kobayashi, T.

„Formation of inclusion complexes between cyclodextrins and aromatic compounds under pressurized carbon dioxide“

J. Ferment. Bioeng. **69**, 350-353 **(1990)**

King, M. B.; Mubarak, A.; Kim, J. D.; Bott, T. R.

„The mutual solubilities of water with supercritical and liquid carbon dioxide“

J. Supercrit. Fluids **5**, 296-302 **(1992)**

Klesper, E.; Corwin, A. H.; Turner, D. A.

„High pressure gas chromatography above critical temperatures“

J. Org. Chem. **27**, 700-701 **(1968)**

Komiyama, M. und Bender, M. L.

„Importance of apolar binding in complex formation of cyclodextrins with adamantanecarboxylate“

J. Am. Chem. Soc. **100**, 2259-2260 (1978)

Kommission E

„Matricariae flos – Kamillenblüten“

Bundesanzeiger Nr. **228**, Dezember **1984**

Lack, E. und Marr, R.

„Estimation of the process parameter for high-pressure (supercritical fluid) carbon dioxide extraction of natural products“

Separ. Sci. Technol. **23**, 63-76 (1988)

Le Floch, F.; Tena, M. T.; Rios, A.; Valcarel, M.

„Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves“

Talanta **46**, 1123-1130 (1998)

Lide, D. R.

„Handbook of Chemistry and Physics“

79. Auflage, Chemical Rubber Company Press Inc., Cleveland USA (1999)

Lim, J. S.; Lee, Y. Y.; Chun, H. S.

„Phase equilibria for carbon dioxide-ethanol-water system at elevated pressures“

J. Supercrit. Fluids **7**, 219-230 (1994)

Lin, M.-C.; Tsai, M.-J.; Wen, K.-C.

„Supercritical fluid extraction of flavonoids from scutellariae radix“

J. Chromatogr. A **830**, 387-395 (1999)

Liong, K. K.; Wells, P. A.; Foster, N. R.

„Diffusion in supercritical fluids“

J. Supercrit. Fluids **4**, 91-108 (1991)

Loftsson, T.

„Pharmaceutical applications of β -cyclodextrin“

Pharm. Technol. Eur. **11**, 20-32 (1999)

Mauz, M.; Hempel, B.; Mauz, J.

„Verfahren zur Herstellung von Pflanzenextrakten“

Ger. Offen. DE 195 44 905 A1 (1997)

Mira, B.; Blasco, M.; Subirats, S.; Berna, A.

„Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel“

J. Supercrit. Fluids **9**, 238-243 (1996)

Modey, W. K.; Mulholland, D. A.; Raynor, M. W.

„Analytical supercritical fluid extraction of natural products“

Phytochem. Anal. **7**, 1-15 (1996)

Moraes, M. L. L.; Vilegas, J. H. Y.; Lancas, F. M.

„Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from passiflora leaves“

Phytochem. Anal. **8**, 257-260 (1997)

Moriyoshi, T.; Kita, T.; Uosaki, Y.

„Static relative permittivity of carbon dioxide and nitrous oxide up to 30 MPa“

Ber. Bunsen. Phys. Chem. **97**, 589-596 (1993)

Murga, R.; Sanz, M. T.; Beltran, S.; Cabezas, J. L.

„Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide“

J. Supercrit. Fluids **23**, 113-121 (2002)

Ness, A.

„Hochdosierte, feste, matricinhaltige Kamillenzubereitungen“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1995)

Ness, A. und Schmidt, P. C.

„Kamillenpräparate – Beispiel für die Stabilisierung von Phytopharmaka“

Dtsch. Apoth. Ztg. **135**, 3598-3610 (1995)

Page, S. H.; Goates, S. R.; Lee, M. L.

„Methanol/CO₂ phase behavior in supercritical fluid chromatography and extraction“

J. Supercrit. Fluids **4**, 109-117 (1991)

Page, S. H.; Sumpter, S. R.; Lee, M. L.

„Fluid phase equilibria in supercritical fluid chromatography with CO₂-based mixed mobile phases: a review“

J. Microcol. Sep. **4**, 91-122 (1992)

Pekic, B.; Zekovic, Z.; Tolic, A.

„Investigation of the extraction kinetics of camomile flowers by supercritical carbon dioxide“

J. Serb. Chem. Soc. **59**, 249-254 (1994)

Pekic, B.; Zekovic, Z.; Tolic, A.

„Study of the extraction of camomile flowers with supercritical carbon dioxide“

J. Serb. Chem. Soc. **60**, 439-443 (1995a)

Pekic, B.; Zekovic, Z.; Petrovic, L.; Tolic, A.

„Behavior of (-)- α -bisabolol and (-)- α -bisabololoxides A and B in camomile flower extraction with supercritical carbon dioxide“

Separ. Sci. Technol. **30**, 3567-3576 (1995b)

Pekic, B.; Zekovic, Z.; Tolic, A.

„Dependence of the camomile flower yield on the carbon dioxide quantity during isothermal supercritical extraction“

J. Serb. Chem. Soc. **62**, 531-533 (1997)

Perrut, M.

„Supercritical fluids applications in the pharmaceutical industry“

S. T. P. Pharma Sci. **13**, 83-91 (2003)

Perrut, M.; Jung, J.; Leboeuf, F.; Fabing, I.

„Procède de fabrication de complexes hôte-client“

WO 02/089851 A1 (2002)

Povh, N. P.; Marques, M. O. M.; Meireles, M. A. M.

„Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla re-cutita* [L.] Rauschert)“

J. Supercrit. Fluids **21**, 245-256 (2001)

Redaelli, C.; Formentini, L.; Santaniello, E.

„Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of apigenin and its glucosides in flowers of *matricaria chamomilla* and chamomile extracts“

Planta med. **42**, 288-292 (1981)

Reichling, J. und Becker, H.

„Ein Beitrag zur Analytik des ätherischen Öls aus Flores Chamomillae“

Dtsch. Apoth. Ztg. **117**, 275-277 (1977)

Reichling, J.; Becker, H.; Exner, J.; Dräger, P.-D.

„Vergleichende Untersuchung verschiedener Handelsmuster von *Matricariae Flos*“

Pharm. Ztg. **124**, 1998-2005 (1979)

Renger, B.; Jehle, H.; Fischer, M.; Funk, W.

„Validierung von Analysenverfahren in der pharmazeutischen Analytik“

Pharm. Ind. **56**, 993-1000 (1994)

Reverchon, E. und Senatore F.

„Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry“

J. Agric. Food Chem. **42**, 154-158 (1994)

Reverchon, E.; Russo, P.; Stassi, A.

„Solubilities of solid octacosane und triacontane in supercritical carbon dioxide“

J. Chem. Eng. Data **38**, 458-460 (1993)

Robugen GmbH

„Chamazulencarbonsäureverbindungen und deren Verwendung“

Ger. Offen. DE 100 65 683 A1 (2001)

Roskar, V.; Dombro, R. A.; Prentice, G. A.; Westgate, C. R.; McHugh, M. A.

„Comparison of the dielectric behavior of mixtures of methanol with carbon dioxide and ethane in the mixture-critical and liquid regions“

Fluid Phase Equilibr. **77**, 241-259 (1992)

Rote Liste 2003

„Arzneimittelverzeichnis des BPI“

Editio Cantor Verlag, Aulendorf/Württemberg (2003)

Saberi, E.

„Eine Methode zur Bestimmung der Proazulene in Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.) und Kamille (*Matricaria recutita* L.)“

Sci. Pharm. **58**, 317-319 (1990)

Saenger, W.

„Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie“

Angew. Chem. **92**, 343-361 (1980)

Scalia, S.; Giuffreda, L.; Pallado, P.

„Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods“

J. Pharm. Biomed. Anal. **21**, 549-558 (1999)

Schilcher, H.

„Die Kamille“

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1987)

Schmidt, P. C. und Vogel, K.

„Kamille – Untersuchungen zur Stabilität von Kamillenhandelspräparaten“

Dtsch. Apoth. Ztg. **132**, 462-468 (1992)

Schmidt, P. C.; Weibler, K.; Soyke, B.

„Kamillenblüten und –extrakte“

Dtsch. Apoth. Ztg. **131**, 175-181 (1991)

Schmidt, P. C.; Stamm, S.; Hempel, B.; Berndt, D.

„Kosmetische und pharmazeutische Mittel auf Basis eines Kamillenextraktes“

Ger. Offen. DE 197 46 284 A1 (1999)

Schneider, G. M.

„Phase equilibria in fluid mixtures at high pressures“

Adv. Chem. Phys. **17**, 1-42 (1970)

Schneider, G. M.

„Physikalisch-chemische Grundlagen der Extraktion mit überkritischen Gasen“

Angew. Chem. **90**, 762-774 (1978)

Semenova, A. I.; Emel'yanova, E. A.; Tsimmerman, S. S.; Tsiklis, D. S.

„Phase equilibria in the methanol-carbon dioxide system“

Russ. J. Phys. Chem. **53**, 1428-1430 (1979)

Senorans, F. J.; Ruiz-Rodriguez, A.; Cavero, S.; Cifuentes, A.; Ibanez, E.; Reglero, G.

„Isolation of antioxidant compounds from orange juice by using countercurrent supercritical fluid extraction (CC-SFE)“

J. Agric. Food Chem. **49**, 6039-6044 (2001)

Smith, A. S.; Shenai, V.; Matthews, M. A.

„Diffusion in supercritical mixtures: CO₂ + cosolvent + solute“

J. Supercrit. Fluids **3**, 175-179 (1990)

Smith, R. L. Jr.; Inomata, H.; Kanno, M.; Arai, K.

„Energy analysis of supercritical carbon dioxide extraction processes“

J. Supercrit. Fluids **15**, 145-156 (1999)

Sovova, H.; Komers, R.; Kucera, J.; Jez, J.

„Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil“

Chem. Eng. Sci. **49**, 2499-2505 (1994)

Soyke, B.

„Stabilisierung von Matricin in festen Kamillenzubereitungen“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1991)

Stahl, E.

„Über die Haltbarkeit des Azulens in galenischen Zubereitungen“

Pharm. Ztg. **102**, 287-291 (1957)

Stahl, E. und Gerard, D.

„Solubility behaviour and fractionation of essential oils in dense carbon dioxide“

Perf. Flavor. **10**, 29-37 (1985)

Stahl, E. und Schild, W.

„Pharmazeutische Biologie, 4 – Drogenanalyse II“

G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 391-395 (1981)

Stahl, E. und Schilz, W.

„Extraktion mit überkritischen Gasen in direkter Kopplung mit der Dünnschicht-Chromatographie“

Chem. Ing. Tech. **48**, 773-778 (1976)

Stahl, E. und Schütz, E.

„Extraktion der Kamillenblüten mit überkritischen Gasen“

Arch. Pharm. **311**, 992-1001 (1978)

Stahl, E.; Schütz, E.; Schilz, W.

„Verfahren zur Extraktion von Kamille mit überkritischen Gasen“

Ger. Offen. DE 27 09 033 (1978)

Stahl, E.; Quirin, K.-W.; Gerard, D.

„Solubilities of soybean oil, jojoba oil and cuticular wax in dense carbon dioxide“

Fette, Seifen, Anstrichmittel **85**, 458-463 (1983)

Stahl, E.; Quirin, K.-W.; Gerard, D.

„Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination“

Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (1987)

- Stahl-Biskup, E. und Reichling, J.
„Anatomie und Histologie der Samenpflanzen“
Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, S. 65 (1998)
- Stransky, K.; Streibl, M.; Ubik, K.; Kohoutová, J.; Novotný, L.
„Die Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffe der Kamille (*Matricaria chamomilla* L.)“
Fette, Seifen, Anstrichmittel **83**, 347-354 (1981)
- Straub, T. S. und Bender, M. L.
„Cycloamyloses as enzyme models. The decarboxylation of benzoylacetic acids“
J. Am. Chem. Soc. **94**, 8881-8888 (1972)
- Subramaniam, B.; Rajewski, R. A.; Snavely, K.
„Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide“
J. Pharm. Sci. **86**, 885-890 (1997)
- Suzuki, K.; Sue, H.; Itou, M.; Smith, R. L.; Inomata, H.; Arai, K.; Saito, S.
„Isothermal vapor-liquid equilibrium data for binary systems at high pressures: carbon dioxide-methanol, carbon dioxide-ethanol, carbon dioxide-1-propanol, methane-ethanol, methane-1-propanol, ethane-ethanol, and ethane-1-propanol systems“
J. Chem. Eng. Data **35**, 63-66 (1990)
- Szejtli, J.
„Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry“
Chem. Rev. **98**, 1743-1753 (1998)
- Szejtli, J.; Szente, L.; Körmöczy, G.; Tetenyi, P.; David, A.; Zilahy, T.; Kelemen, A.; Harshegyi, J.
„Cyclodextrin-Kamillen-Inklusionskomplexe, Verfahren zur Herstellung der Komplexe und die Komplexe enthaltenden Präparate“
Ger. Offen. 29 44 350 (1979)
- Szente, L. und Szejtli, J.
„Stabilization of flavors by cyclodextrins“
ACS Symp. Ser. **370**, 148-157 (1988)
- Szente, L.; Gal-Füzy, M.; Szejtli, J.
„Stabilization of camomile oil with β -cyclodextrin“
Proc. Int. Symp. Cyclodextrins, 431-442 (1981)

Szente, L.; Apostol, I.; Szejtli, J.

„Suppositories containing β -cyclodextrin complexes – Part 1: stability studies“

Pharmazie **39**, 697-699 (1984)

Tee, O. S.; Mazza, C.; Du, X.

„Chain length effects in the cleavage of aryl esters by cyclodextrins. Different transition states for m- and p-nitrophenyl alkanoates“

J. Org. Chem. **55**, 3603-3609 (1990)

Tena, M. T.; Rios, A.; Valcarcel, M.

„Supercritical fluid extraction of t-resveratrol and other phenolics from a spiked solid“

Fresen. J. Anal. Chem. **361**, 143-148 (1998)

Thoß, M.; Schwabe, L.; Frömming, K.-H.

„Cyclodextrin-Einschlußverbindungen von Zitronen-, Orangen-, Hopfen- und Kamillenöl“

Pharm. Ztg. Wiss. **138**, 144-148 (1993)

Tiwari Sandip, B. und Udupa, N.

„Supercritical fluids: towards environment friendly processing“

Indian Drugs **36**, 212-219 (1999)

Toews, K. L.; Shroll, R. M.; Wai, C. M.; Smart, N. G.

„pH-defining equilibrium between water and supercritical CO₂. Influence on SFE of organics and metal chelates“

Anal. Chem. **67**, 4040-4043 (1995)

Tolic, A.; Zekovic, Z.; Pekic, B.

„Dependence of camomile flower solubility on carbon dioxide density at supercritical extraction“

Separ. Sci. Technol. **31**, 1889-1892 (1996)

Tyrer, D.

„Solubilities below and above the critical temperature“

J. Chem. Soc. **97**, 621-632 (1910)

USP 26: The United States Pharmacopeia

„Validation of compendial methods“

U. S. Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, 2439-2442 (2003)

Van Hees, T.; Piel, G.; Evrard, B.; Otte, X.; Thunus, L.; Delattre, L.

„Application of supercritical carbon dioxide for the preparation of a piroxicam- β -cyclodextrin inclusion compound”

Pharm. Res. **16**, 1864-1870 (1999)

Vitzthum, O. und Hubert, P.

„Verfahren zur Herstellung von Hopfenextrakten“

Ger. DE 2 127 618 (1971)

Vogel, K.

„Herstellung von Flüssigextrakten aus Kamille mit Propylenglykol als Lösungsmittel“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1992)

Vuorela, H.; Holm, Y.; Hiltunen, R.

„Application of headspace gas chromatography in essential oil analysis. Part VIII. Assay of matricine and chamazulene“

Flavour Frag. J. **4**, 113-116 (1989)

Vuorela, H.; Holm, Y.; Hiltunen, R.; Harvala, T.; Laitinen, A.

„Extraction of the volatile oil in chamomile flowerheads using supercritical carbon dioxide“

Flavour Frag. J. **5**, 81-84 (1990)

Waleczek, K. J.

„Herstellung und Charakterisierung eines β -Cyclodextrin/Kamillen-CO₂-Extrakt-Komplexes als Wirkkomponente einer halbfesten Arzneiform“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2002)

Waleczek, K. J.; Hempel, B.; Schmidt, P. C.

„Preparation and stability of a chamomile ointment containing a supercritical carbon dioxide chamomile extract/ β -cyclodextrin inclusion complex”

S. T. P. Pharma. Sci. **12**, 329-333 (2002)

Wichtl, M.

„Welche pflanzlichen Drogen spielen in unseren Apotheken noch eine Rolle?“

Dtsch. Apoth. Ztg. **124**, 60-63 (1984a)

Wichtl, M.

„Standardisierung pflanzlicher Drogen und daraus hergestellter Zubereitungen“

in Oelschläger, H. (Hrsg.): „Fortschritte in der Arzneimittelforschung“

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 149-158 (1984b)

Wollrab, A.

„Gaschromatographie“

Diesterweg Verlag, Frankfurt, S. 94-95 (1983)

Wüst, R.; Pfeiffer, H.; Van der Mei, H.

„Verfahren zur Herstellung von Pflanzenextrakten mit verbesserten sensorischen Eigenschaften“

Ger. Offen. DE 31 15 157 A1 (1982)

Yang, C.; Xu, Y.-R.; Yao, W.-X.

„Extraction of pharmaceutical components from Ginkgo biloba leaves using supercritical carbon dioxide“

J. Agric. Food Chem. **50**, 846-849 (2002)

Yoon, J.-H.; Chun, M.-K.; Hong, W.-H.; Lee, H.

„High-pressure phase equilibria for carbon dioxide-methanol-water system: experimental data and critical evaluation of mixing rules“

Ind. Eng. Chem. Res. **32**, 2881-2887 (1993a)

Yoon, J.-H.; Lee, H.-S.; Lee, H.

„High-pressure vapor-liquid equilibria for carbon dioxide + methanol, carbon dioxide + ethanol, and carbon dioxide + methanol + ethanol“

J. Chem. Eng. Data **38**, 53-55 (1993b)

Zekovic, Z. P.

„Chamomile ligulate flowers in supercritical CO₂-extraction“

J. Essent. Oil Res. **12**, 85-93 (2000)

Zosel, K.

„Verfahren zur Entcoffeinierung von Kaffee“

Ger. Offen. DE 2 005 293 (1970)

Zosel, K.

„Praktische Anwendungen der Stofftrennung mit überkritischen Gasen“

Angew. Chem. **90**, 748-755 (1978)

Kapitel 11

Anhang

11.1 Messdaten der Kalibrierung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Matricin, cis- und trans-En-In-Dicycloether

Tab. 11.1 Messdaten der Kalibrierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Matricin

| | Konzentration Matricin [mg/100 ml] | Flächen- einheiten Matricin | Konzentration Matricin [mg/100 ml] | Flächen- einheiten Matricin |
|--------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| | 0,7636 | 67677 | 1,5272 | 141609 |
| | 0,7636 | 69623 | 1,5272 | 140026 |
| | 0,7636 | 71278 | 1,5272 | 144931 |
| | 0,7636 | 68534 | 1,5272 | 137246 |
| | 0,7636 | 71056 | 1,5272 | 145288 |
| | 0,7636 | 71852 | 1,5272 | 145484 |
| Mittelwert | | 70003 | | 142431 |
| realsdv [%] | | 2,38 | | 2,37 |
| var (y) | | 2,77E+06 | | 1,14E+07 |
| | 2,2909 | 216962 | 3,0544 | 289022 |
| | 2,2909 | 216999 | 3,0544 | 295210 |
| | 2,2909 | 215852 | 3,0544 | 293888 |
| | 2,2909 | 216881 | 3,0544 | 293103 |
| | 2,2909 | 217615 | 3,0544 | 294493 |
| | 2,2909 | 218623 | 3,0544 | 293659 |
| Mittelwert | | 217155 | | 293229 |
| realsdv [%] | | 0,42 | | 0,74 |
| var (y) | | 8,40E+05 | | 4,77E+06 |
| | 3,8180 | 358374 | 4,5816 | 436718 |
| | 3,8180 | 361479 | 4,5816 | 435182 |
| | 3,8180 | 363184 | 4,5816 | 432977 |
| | 3,8180 | 368044 | 4,5816 | 429281 |
| | 3,8180 | 365199 | 4,5816 | 432613 |
| | 3,8180 | 358390 | 4,5816 | 427267 |
| Mittelwert | | 362445 | | 432340 |
| realsdv [%] | | 1,06 | | 0,82 |
| var (y) | | 1,47E+07 | | 1,26E+07 |

Tab. 11.2 Messdaten der Kalibrierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von cis-EID

| | Konzentration cis-EID [mg/100 ml] | Flächen- einheiten cis-EID | Konzentration cis-EID [mg/100 ml] | Flächen- einheiten cis-EID |
|--------------------|---|----------------------------------|---|----------------------------------|
| | 6,7327 | 358967 | 13,4655 | 755419 |
| | 6,7327 | 383293 | 13,4655 | 755010 |
| | 6,7327 | 379732 | 13,4655 | 780553 |
| | 6,7327 | 385807 | 13,4655 | 779700 |
| | 6,7327 | 393508 | 13,4655 | 779036 |
| | 6,7327 | 382710 | 13,4655 | 793597 |
| Mittelwert | | 380670 | | 773886 |
| realsdv [%] | | 3,05 | | 1,99 |
| var (y) | | 1,35E+08 | | 2,38E+08 |
| | 20,1982 | 1138437 | 26,9309 | 1491180 |
| | 20,1982 | 1113652 | 26,9309 | 1505923 |
| | 20,1982 | 1129399 | 26,9309 | 1494898 |
| | 20,1982 | 1109055 | 26,9309 | 1532504 |
| | 20,1982 | 1137204 | 26,9309 | 1550011 |
| | 20,1982 | 1132218 | 26,9309 | 1501598 |
| Mittelwert | | 1126661 | | 1512686 |
| realsdv [%] | | 1,10 | | 1,55 |
| var (y) | | 1,53E+08 | | 5,47E+08 |
| | 33,6637 | 1812889 | | |
| | 33,6637 | 1872630 | | |
| | 33,6637 | 1818104 | | |
| | 33,6637 | 1848315 | | |
| | 33,6637 | 1837039 | | |
| | 33,6637 | 1809789 | | |
| Mittelwert | | 1833128 | | |
| realsdv [%] | | 1,33 | | |
| var (y) | | 5,97E+08 | | |

Tab. 11.3 Messdaten der Kalibrierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von trans-EID

| | Konzentration trans-EID [mg/100 ml] | Flächen- einheiten trans-EID | Konzentration trans-EID [mg/100 ml] | Flächen- einheiten trans-EID |
|--------------------|---|------------------------------------|---|------------------------------------|
| | 0,9878 | 48562 | 1,9574 | 100041 |
| | 0,9878 | 51864 | 1,9574 | 99329 |
| | 0,9878 | 51176 | 1,9574 | 103391 |
| | 0,9878 | 51878 | 1,9574 | 99001 |
| | 0,9878 | 49629 | 1,9574 | 103538 |
| | 0,9878 | 51267 | 1,9574 | 100023 |
| Mittelwert | | 50729 | | 100887 |
| realsdv [%] | | 2,65 | | 2,02 |
| var (y) | | 1,80E+06 | | 4,15E+06 |
| | 2,9361 | 148433 | 3,9149 | 200112 |
| | 2,9361 | 154917 | 3,9149 | 208753 |
| | 2,9361 | 152496 | 3,9149 | 200328 |
| | 2,9361 | 156279 | 3,9149 | 206971 |
| | 2,9361 | 155649 | 3,9149 | 205720 |
| | 2,9361 | 156352 | 3,9149 | 210399 |
| Mittelwert | | 154021 | | 205381 |
| realsdv [%] | | 2,00 | | 2,09 |
| var (y) | | 9,51E+06 | | 1,85E+07 |
| | 4,8936 | 253344 | | |
| | 4,8936 | 248382 | | |
| | 4,8936 | 248362 | | |
| | 4,8936 | 247537 | | |
| | 4,8936 | 255372 | | |
| | 4,8936 | 252227 | | |
| Mittelwert | | 250871 | | |
| realsdv [%] | | 1,28 | | |
| var (y) | | 1,04E+07 | | |

11.2 Messdaten der Validierung für Matricin, cis- und trans-EID

Tab. 11.4 Systempräzision und Wiederfindung für Matricin

| | | | | |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Konz. [mg/100 ml] | 1,9552 | 1,7597 | 2,1691 | 2,3830 |
| Soll-Gehalt [%] | 100,00 | 90,00 | 110,94 | 121,88 |
| <hr/> | | | | |
| berechnete Konz. | 1,8918 | 1,6694 | 2,0829 | 2,4570 |
| Matricin | 1,9810 | 1,7485 | 2,1226 | 2,4895 |
| [mg/100 ml] | 1,9564 | 1,7862 | 2,2116 | 2,4246 |
| | 2,0127 | 1,7713 | 2,1180 | 2,4211 |
| | 1,9776 | 1,7613 | 2,1497 | 2,4448 |
| | 1,9119 | 1,7508 | 2,1604 | 2,4522 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 1,9552 | 1,7479 | 2,1409 | 2,4482 |
| realsdv [%] | 2,33 | 2,34 | 2,05 | 1,02 |
| <hr/> | | | | |
| Ist-Gehalt [%] | | 89,40 | 109,50 | 125,21 |
| Wiederfindungsrate [%] | | 99,33 | 98,70 | 102,74 |

Tab. 11.5 Methodenpräzision für Matricin bei sechsmaliger Herstellung eines Extraktes

| Konzentration | jeweils ca. 3,5 mg/100 ml | | |
|--------------------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Konz. [mg/100 ml] | 3,6249 | 3,6731 | 3,2879 |
| Matricin | 3,6689 | 3,6207 | 3,2467 |
| | 3,6692 | 3,6306 | 3,2847 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 3,6543 | 3,6415 | 3,2731 |
| realsdv [%] | 0,70 | 0,76 | 0,70 |
| | 4 | 5 | 6 |
| Konz. [mg/100 ml] | 3,6249 | 3,6731 | 3,2879 |
| Matricin | 3,6689 | 3,6207 | 3,2467 |
| | 3,6692 | 3,6306 | 3,2847 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 3,6543 | 3,6415 | 3,2731 |
| realsdv [%] | 0,70 | 0,76 | 0,70 |
| <hr/> | | | |
| Mittelwert (n = 18) | 3,5230 | | |
| realsdv [%] | 5,50 | | |

Tab. 11.6 Systempräzision und Wiederfindung für cis-En-In-Dicycloether

| | | | | |
|--------------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| Konz. [mg/100 ml] | 9,3982 | 8,4584 | 10,3262 | 11,2543 |
| Soll-Gehalt [%] | 100,00 | 90,00 | 109,87 | 119,75 |
| <hr/> | | | | |
| berechnete Konz. | 9,1826 | 8,0907 | 10,1412 | 11,2935 |
| cis-En-In-Dicycloether | 9,3537 | 8,3284 | 10,1285 | 11,4289 |
| [mg/100 ml] | 9,3296 | 8,1975 | 10,0766 | 11,5871 |
| | 9,4645 | 8,3064 | 9,9634 | 11,2515 |
| | 9,6210 | 8,2305 | 10,0729 | 11,4911 |
| | 9,4380 | 8,0717 | 10,2857 | 11,5190 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 9,3982 | 8,2042 | 10,1114 | 11,4285 |
| realsdv [%] | 1,57 | 1,30 | 1,05 | 1,15 |
| <hr/> | | | | |
| Ist-Gehalt [%] | | 87,30 | 107,59 | 121,60 |
| Wiederfindungsrate [%] | | 96,99 | 97,92 | 101,55 |

Tab. 11.7 Methodenpräzision für cis-EID bei sechsmaliger Herstellung eines Extraktes

| Konzentration | jeweils ca. 11 mg/100 ml | | |
|--------------------------------|--------------------------|----------------|----------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Konz. [mg/100 ml] | 11,7076 | 11,7632 | 10,8421 |
| cis-En-In-Dicycloether | 11,5746 | 11,9138 | 10,9165 |
| | 11,6120 | 11,9220 | 10,9361 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 11,6314 | 11,8663 | 10,8982 |
| realsdv [%] | 0,59 | 0,75 | 0,45 |
| | 4 | 5 | 6 |
| Konz. [mg/100 ml] | 10,9345 | 11,0035 | 12,1371 |
| cis-En-In-Dicycloether | 10,9819 | 10,9735 | 11,9909 |
| | 11,0118 | 10,9546 | 12,1220 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 10,9761 | 10,9772 | 12,0834 |
| realsdv [%] | 0,35 | 0,22 | 0,67 |
| <hr/> | | | |
| Mittelwert (n = 18) | 11,4054 | | |
| realsdv [%] | 4,55 | | |

11.3 Messdaten der Kalibrierung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Apigenin- und Apigenin-7-glucosid

Tab. 11.8 Messdaten der Kalibrierung von Apigenin

| | Konzentration Apigenin [mg/100 ml] | Flächen- einheiten Apigenin | Konzentration Apigenin [mg/100 ml] | Flächen- einheiten Apigenin |
|-------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| | 0,2616 | 20411 | 0,5232 | 41472 |
| | 0,2616 | 20372 | 0,5232 | 40620 |
| | 0,2616 | 20628 | 0,5232 | 39867 |
| | 0,2616 | 19997 | 0,5232 | 41262 |
| | 0,2616 | 20384 | 0,5232 | 43497 |
| | 0,2616 | 22014 | 0,5232 | 41223 |
| Mittelwert | | 20634 | | 41324 |
| relsdv [%] | | 3,42 | | 2,94 |
| var (y) | | 4,98E+05 | | 1,48E+06 |
| | 1,0464 | 88623 | 1,5696 | 128310 |
| | 1,0464 | 86386 | 1,5696 | 126652 |
| | 1,0464 | 87906 | 1,5696 | 125832 |
| | 1,0464 | 87444 | 1,5696 | 124202 |
| | 1,0464 | 86614 | 1,5696 | 127138 |
| | 1,0464 | 83418 | 1,5696 | 126411 |
| Mittelwert | | 86732 | | 126424 |
| relsdv [%] | | 2,10 | | 1,08 |
| var (y) | | 3,32E+06 | | 1,88E+06 |
| | 2,0928 | 170036 | 2,6160 | 217147 |
| | 2,0928 | 168104 | 2,6160 | 215941 |
| | 2,0928 | 167345 | 2,6160 | 218140 |
| | 2,0928 | 172943 | 2,6160 | 218380 |
| | 2,0928 | 168770 | 2,6160 | 215625 |
| | 2,0928 | 165691 | 2,6160 | 212565 |
| Mittelwert | | 168815 | | 216300 |
| relsdv [%] | | 1,47 | | 0,99 |
| var (y) | | 6,19E+06 | | 4,59E+06 |

Tab. 11.9 Messdaten der Kalibrierung von Apigenin-7-glucosid

| | Konzentration Apig.-7-gluc. [mg/100 ml] | Flächen- einheiten Apig.-7-gluc. | Konzentration Apig.-7-gluc. [mg/100 ml] | Flächen- einheiten Apig.-7-gluc. |
|--------------------|---|--|---|--|
| | 0,7012 | 16420 | 3,5060 | 90082 |
| | 0,7012 | 16800 | 3,5060 | 94886 |
| | 0,7012 | 18104 | 3,5060 | 99335 |
| | 0,7012 | 17287 | 3,5060 | 99153 |
| | 0,7012 | 18371 | 3,5060 | 94032 |
| | 0,7012 | 17248 | 3,5060 | 99548 |
| Mittelwert | | 17372 | | 96173 |
| realsdv [%] | | 4,30 | | 3,99 |
| var (y) | | 5,58E+05 | | 1,47E+07 |
| | 7,0120 | 198536 | 10,518 | 302040 |
| | 7,0120 | 197323 | 10,518 | 298150 |
| | 7,0120 | 204786 | 10,518 | 303934 |
| | 7,0120 | 209811 | 10,518 | 296225 |
| | 7,0120 | 211262 | 10,518 | 292044 |
| | 7,0120 | 209119 | 10,518 | 303208 |
| Mittelwert | | 205140 | | 299267 |
| realsdv [%] | | 2,92 | | 1,55 |
| var (y) | | 3,60E+07 | | 2,15E+07 |
| | 14,024 | 411032 | | |
| | 14,024 | 410104 | | |
| | 14,024 | 414459 | | |
| | 14,024 | 414652 | | |
| | 14,024 | 416914 | | |
| | 14,024 | 407918 | | |
| Mittelwert | | 412513 | | |
| realsdv [%] | | 0,82 | | |
| var (y) | | 1,14E+07 | | |

11.4 Messdaten der Validierung für Apigenin-7-glucosid

Tab. 11.10 Systempräzision und Wiederfindung für Apigenin-7-glucosid

| | | | | |
|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Konz. [mg/100 ml] | 11,885 | 10,6965 | 13,8013 | 15,7176 |
| Soll-Gehalt [%] | 100,00 | 90,00 | 116,12 | 132,25 |
| <hr/> | | | | |
| berechnete Konz. | 11,9964 | 10,4999 | 13,5839 | 15,3171 |
| Apigenin-7-glucosid | 11,8399 | 10,6463 | 13,6302 | 15,7145 |
| [mg/100 ml] | 11,8255 | 10,6577 | 13,4746 | 15,3236 |
| | 11,8597 | 10,2732 | 14,0866 | 16,0072 |
| | 11,8649 | 10,2831 | 13,3751 | 15,3203 |
| | 11,9233 | 10,7562 | 13,8992 | 15,5606 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 11,8850 | 10,5194 | 13,6750 | 15,5406 |
| realsdv [%] | 0,54 | 1,94 | 1,96 | 1,81 |
| <hr/> | | | | |
| Ist-Gehalt [%] | | 88,51 | 115,06 | 130,76 |
| Wiederfindungsrate [%] | | 98,34 | 99,09 | 98,87 |

Tab. 11.11 Methodenpräzision für Apigenin-7-glucosid

| Konzentration | jeweils ca. 9 mg/100 ml | | |
|--------------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Konz. [mg/100 ml] | 9,7407 | 9,7596 | 9,4068 |
| Apigenin-7-glucosid | 9,9880 | 9,4471 | 9,2892 |
| | 9,7425 | 8,9090 | 9,2678 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 9,8237 | 9,3719 | 9,3213 |
| realsdv [%] | 1,45 | 4,59 | 0,80 |
| | 4 | 5 | 6 |
| Konz. [mg/100 ml] | 10,3267 | 9,0872 | 9,1610 |
| Apigenin-7-glucosid | 9,8188 | 9,2156 | 9,1185 |
| | 9,3606 | 8,9523 | 9,0600 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 9,8354 | 9,0850 | 9,1132 |
| realsdv [%] | 4,91 | 1,45 | 0,56 |
| <hr/> | | | |
| Mittelwert (n = 18) | 9,4251 | | |
| realsdv [%] | 3,53 | | |

11.5 Messdaten der Kalibrierung und Validierung der gaschromatographischen Methode zur quantitativen Bestimmung von (-)- α -Bisabolol

Tab. 10.12 Messdaten der Kalibrierung von (-)- α -Bisabolol

| Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] | Konzentration n-Hexadecan [mg/100 ml] | Flächen- einheiten (-)- α -Bisabolol | Flächen- einheiten n-Hexadecan | FE Bisabolol/ FE Hexadecan | berechnete Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] |
|--|---|---|--------------------------------------|-------------------------------|--|
| 2,4196 | 2,1985 | 108170 | 122860 | 0,8804 | 2,3709 |
| 2,4196 | 2,1985 | 108370 | 122180 | 0,8870 | 2,3876 |
| 2,4196 | 2,1985 | 106480 | 120550 | 0,8833 | 2,3782 |
| 2,4196 | 2,1985 | 107140 | 119100 | 0,8996 | 2,4197 |
| 2,4196 | 2,1985 | 106810 | 121100 | 0,8820 | 2,3749 |
| 2,4196 | 2,1985 | 105980 | 119950 | 0,8835 | 2,3788 |
| Mittelwert | | 107158 | 120957 | 0,8860 | 2,3850 |
| realsdv [%] | | 0,88 | 1,16 | 0,79 | 0,75 |
| var (y) | | | | 4,92E-05 | |
| 4,8392 | 2,1985 | 230530 | 126370 | 1,8242 | 4,7785 |
| 4,8392 | 2,1985 | 230260 | 127000 | 1,8131 | 4,7500 |
| 4,8392 | 2,1985 | 226000 | 126100 | 1,7922 | 4,6968 |
| 4,8392 | 2,1985 | 225270 | 126170 | 1,7854 | 4,6795 |
| 4,8392 | 2,1985 | 225530 | 123560 | 1,8253 | 4,7811 |
| 4,8392 | 2,1985 | 225430 | 123160 | 1,8304 | 4,7941 |
| Mittelwert | | 227170 | 125393 | 1,8118 | 4,7467 |
| realsdv [%] | | 1,11 | 1,29 | 1,04 | 1,01 |
| var (y) | | | | 3,52E-04 | |

| Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] | Konzentration n-Hexadecan [mg/100 ml] | Flächen- einheiten (-)- α -Bisabolol | Flächen- einheiten n-Hexadecan | FE Bisabolol/ FE Hexadecan | berechnete Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] |
|--|---|---|--------------------------------------|-------------------------------|--|
| 7,2588 | 2,1985 | 346010 | 124360 | 2,7823 | 7,2224 |
| 7,2588 | 2,1985 | 349340 | 124590 | 2,8039 | 7,2775 |
| 7,2588 | 2,1985 | 346550 | 124410 | 2,7855 | 7,2307 |
| 7,2588 | 2,1985 | 333960 | 120380 | 2,7742 | 7,2017 |
| 7,2588 | 2,1985 | 346830 | 124470 | 2,7865 | 7,2330 |
| 7,2588 | 2,1985 | 337260 | 121450 | 2,7769 | 7,2087 |
| | | 343325 | 123277 | 2,7849 | 7,2290 |
| Mittelwert | | 1,80 | 1,51 | 0,38 | 0,37 |
| relsdv [%] | | | | 1,10E-04 | |
| var (y) | | | | | |
| 9,6784 | 2,1985 | 471640 | 126150 | 3,7387 | 9,6621 |
| 9,6784 | 2,1985 | 475350 | 127870 | 3,7174 | 9,6078 |
| 9,6784 | 2,1985 | 469530 | 125050 | 3,7547 | 9,7030 |
| 9,6784 | 2,1985 | 469639 | 125940 | 3,7291 | 9,6375 |
| 9,6784 | 2,1985 | 474320 | 127060 | 3,7330 | 9,6476 |
| 9,6784 | 2,1985 | 483200 | 129200 | 3,7399 | 9,6652 |
| | | 473947 | 126878 | 3,7355 | 9,6539 |
| Mittelwert | | 1,08 | 1,18 | 0,33 | 0,33 |
| relsdv [%] | | | | 1,55E-04 | |
| var (y) | | | | | |

| Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] | Konzentration n-Hexadecan [mg/100 ml] | Flächen- einheiten (-)- α -Bisabolol | Flächen- einheiten n-Hexadecan | FE Bisabolol/ FE Hexadecan | berechnete Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] |
|--|---|---|--------------------------------------|-------------------------------|--|
| 7,2588 | 2,1985 | 346010 | 124360 | 2,7823 | 7,2224 |
| 7,2588 | 2,1985 | 349340 | 124590 | 2,8039 | 7,2775 |
| 7,2588 | 2,1985 | 346550 | 124410 | 2,7855 | 7,2307 |
| 7,2588 | 2,1985 | 333960 | 120380 | 2,7742 | 7,2017 |
| 7,2588 | 2,1985 | 346830 | 124470 | 2,7865 | 7,2330 |
| 7,2588 | 2,1985 | 337260 | 121450 | 2,7769 | 7,2087 |
| | | 343325 | 123277 | 2,7849 | 7,2290 |
| Mittelwert | | 1,80 | 1,51 | 0,38 | 0,37 |
| relsdv [%] | | | | 1,10E-04 | |
| var (y) | | | | | |
| 9,6784 | 2,1985 | 471640 | 126150 | 3,7387 | 9,6621 |
| 9,6784 | 2,1985 | 475350 | 127870 | 3,7174 | 9,6078 |
| 9,6784 | 2,1985 | 469530 | 125050 | 3,7547 | 9,7030 |
| 9,6784 | 2,1985 | 469639 | 125940 | 3,7291 | 9,6375 |
| 9,6784 | 2,1985 | 474320 | 127060 | 3,7330 | 9,6476 |
| 9,6784 | 2,1985 | 483200 | 129200 | 3,7399 | 9,6652 |
| | | 473947 | 126878 | 3,7355 | 9,6539 |
| Mittelwert | | 1,08 | 1,18 | 0,33 | 0,33 |
| relsdv [%] | | | | 1,55E-04 | |
| var (y) | | | | | |

| Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] | Konzentration n-Hexadecan [mg/100 ml] | Flächen- einheiten (-)- α -Bisabolol | Flächen- einheiten n-Hexadecan | FE Bisabolol/ FE Hexadecan | berechnete Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] |
|--|---|---|--------------------------------------|-------------------------------|--|
| 12,0980 | 2,1985 | 612010 | 128440 | 4,7649 | 12,2799 |
| 12,0980 | 2,1985 | 608130 | 128480 | 4,7333 | 12,1991 |
| 12,0980 | 2,1985 | 595060 | 125690 | 4,7343 | 12,2018 |
| 12,0980 | 2,1985 | 594520 | 123660 | 4,8077 | 12,3890 |
| 12,0980 | 2,1985 | 587900 | 124460 | 4,7236 | 12,1744 |
| 12,0980 | 2,1985 | 598110 | 126190 | 4,7398 | 12,2156 |
| | | 599288 | 126153 | 4,7506 | 12,2433 |
| Mittelwert | | 1,51 | 1,58 | 0,66 | 0,65 |
| relsdv [%] | | | | 9,75E-04 | |
| var (y) | | | | | |
| 14,5176 | 2,1985 | 749260 | 129230 | 5,7979 | 14,9148 |
| 14,5176 | 2,1985 | 709780 | 126330 | 5,6185 | 14,4571 |
| 14,5176 | 2,1985 | 744580 | 128360 | 5,8007 | 14,9220 |
| 14,5176 | 2,1985 | 739430 | 127460 | 5,8013 | 14,9235 |
| 14,5176 | 2,1985 | 733420 | 127590 | 5,7483 | 14,7882 |
| 14,5176 | 2,1985 | 718780 | 127560 | 5,6348 | 14,4989 |
| | | 732542 | 127755 | 5,7336 | 14,7508 |
| Mittelwert | | 2,10 | 0,76 | 1,49 | 1,48 |
| relsdv [%] | | | | 7,29E-03 | |
| var (y) | | | | | |

| Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] | Konzentration n-Hexadecan [mg/100 ml] | Flächen- einheiten (-)- α -Bisabolol | Flächen- einheiten n-Hexadecan | FE Bisabolol/ FE Hexadecan | berechnete Konzentration (-)- α -Bisabolol [mg/100 ml] |
|--|---|---|--------------------------------------|-------------------------------|--|
| 19,3568 | 2,1985 | 983390 | 130910 | 7,5120 | 19,2872 |
| 19,3568 | 2,1985 | 993960 | 132610 | 7,4954 | 19,2449 |
| 19,3568 | 2,1985 | 1028800 | 137750 | 7,4686 | 19,1767 |
| 19,3568 | 2,1985 | 1032700 | 137610 | 7,5045 | 19,2683 |
| 19,3568 | 2,1985 | 980810 | 131740 | 7,4450 | 19,1166 |
| 19,3568 | 2,1985 | 1022400 | 136070 | 7,5138 | 19,2919 |
| | | 1007010 | 134448 | 7,4899 | 19,2309 |
| Mittelwert | | 2,34 | 2,27 | 0,37 | 0,36 |
| relsdv [%] | | | | 7,53E-04 | |
| var (y) | | | | | |
| 24,1960 | 2,1985 | 1232400 | 130960 | 9,4105 | 24,1303 |
| 24,1960 | 2,1985 | 1261000 | 134160 | 9,3992 | 24,1015 |
| 24,1960 | 2,1985 | 1242500 | 131810 | 9,4264 | 24,1709 |
| 24,1960 | 2,1985 | 1217500 | 129400 | 9,4088 | 24,1259 |
| 24,1960 | 2,1985 | 1230300 | 130960 | 9,3945 | 24,0894 |
| 24,1960 | 2,1985 | 1290800 | 137160 | 9,4109 | 24,1313 |
| | | 1245750 | 132408 | 9,4084 | 24,1249 |
| Mittelwert | | 2,12 | 2,12 | 0,12 | 0,12 |
| relsdv [%] | | | | 1,23E-04 | |
| var (y) | | | | | |

Tab. 10.13 Systempräzision und Wiederfindung für (-)- α -Bisabolol

| | | | | |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Konz. [mg/100 ml] | 8,469 | 7,622 | 9,268 | 10,066 |
| Soll-Gehalt [%] | 100,00 | 90,00 | 109,43 | 118,86 |
| <hr/> | | | | |
| berechnete Konz. | 8,2906 | 7,6012 | 9,5210 | 9,9082 |
| (-)- α -Bisabolol | 8,4524 | 7,5652 | 9,5587 | 9,9234 |
| [mg/100 ml] | 8,5123 | 7,6183 | 9,5541 | 9,9602 |
| | 8,5088 | 7,6745 | 9,6276 | 10,1678 |
| | 8,4747 | 7,5631 | 9,5488 | 10,5776 |
| | 8,4935 | 7,5737 | 9,5236 | 10,1828 |
| | 8,5639 | 7,5631 | 9,6162 | 10,2090 |
| | 8,4572 | 7,6233 | 9,5404 | 10,2498 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 8,4692 | 7,5978 | 9,5613 | 10,1474 |
| relsdv [%] | 0,95 | 0,52 | 0,42 | 2,18 |
| <hr/> | | | | |
| Ist-Gehalt [%] | | 89,71 | 112,90 | 119,82 |
| Wiederfindungsrate [%] | | 99,68 | 103,17 | 100,80 |

Tab. 10.14 Methodenpräzision für (-)- α -Bisabolol

| Konzentration | jeweils ca. 8,9 mg/100 ml | | |
|--------------------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Konz. [mg/100 ml] | 8,8902 | 8,8449 | 8,5794 |
| (-)- α -Bisabolol | 8,8491 | 8,8137 | 8,9553 |
| | 8,9190 | 8,8920 | 8,9634 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 8,8861 | 8,8502 | 8,8327 |
| relsdv [%] | 0,40 | 0,45 | 2,48 |
| | 4 | 5 | 6 |
| Konz. [mg/100 ml] | 8,9091 | 8,5806 | 8,8116 |
| (-)- α -Bisabolol | 8,9574 | 8,6262 | 8,7372 |
| | 8,9220 | 8,5677 | 8,7792 |
| Mittelwert (Ist-Gehalt) | 8,9295 | 8,5915 | 8,7760 |
| relsdv [%] | 0,28 | 0,36 | 0,43 |
| <hr/> | | | |
| Mittelwert (n = 18) | 8,8110 | | |
| relsdv [%] | 1,35 | | |

11.6 Firmenverzeichnis

AMSCO Finn-Aqua GmbH, Kalscheurener Straße 92, D-50354 Hürth
Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Heinrichstraße 3-4, D-12207 Berlin
Bender & Hobein GmbH, Buchbrunnenweg 26, D-89081 Ulm
Binder GmbH, Bergstraße 14, D-78532 Tuttlingen
Büchi Labortechnik GmbH, Am Porscheplatz 5, D-45127 Essen
Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstraße 1-5, 76185 Karlsruhe
Corel Co., Edison Straße 6, D-85716 Unterschleißheim
Deutsche Metrohm GmbH & Co., In den Birken 3, D-70794 Filderstadt
Extrasynthèse, B.P. 62, F-69730 Genay
Fisher Scientific GmbH, Liebigstraße 16, D-61130 Nidderau
Fritsch GmbH, Industriestraße 8, D-55743 Idar-Oberstein
GFL mbH; Schulze-Delitzsch-Straße 4, D-30938 Burgwedel
Grace GmbH, In der Hollerhecke 1, D-67547 Worms
HAG GF AG, Langemarckstr. 4–20, 28199 Bremen
Hewlett-Packard GmbH, Herrenberger Straße 140, D-71034 Böblingen
IKA-Werke GmbH & Co., Janke & Kunkel Straße 10, D-79219 Staufen
Julabo Labortechnik GmbH, Eisenbahnstraße 45, D-77960 Seelbach
Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Beuckestraße 22, D-14163 Berlin
Leybold Vakuum GmbH, Bonner Straße 498, D-50968 Köln
Liebherr Hausgeräte GmbH, Memminger Straße 77-79, D-88416 Ochsenhausen
Macherey-Nagel GmbH, Valencienner Straße 11, D-52355 Düren
Martin Bauer GmbH & Co. KG, Dutendorfer Straße 5-7, D-91487 Vestenbergsgreuth
MDL Informations Systems GmbH, Theodor-Heuss-Allee 108, D-60486 Frankfurt
Memmert GmbH & Co. KG, Äußere Rittersbacher Straße 38; D-91126 Schwabach
Mettler Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-Giessen
Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, D-64293 Darmstadt
Messer Griesheim GmbH, Fütingsweg 34, D-47805 Krefeld
Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-35353 Gießen
Microsoft Deutschland GmbH, Konrad-Zuse-Straße 1, D-85716 Unterschleißheim
Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5, D-65824 Schwalbach
Riedel-de Haën, Wunstorfer Straße 40, D-30926 Seelze
Retsch GmbH & Co. KG, Rheinische Straße 36, D-42781 Haan
Robugen GmbH, Alleestraße 22-26, D-73730 Esslingen-Zell
Sartorius AG, Weender Landstraße 94-108, D-37075 Göttingen

Schleicher & Schüll GmbH, Hahnestrasse 3, D-37586 Dassel/Relliehausen
Shimadzu Deutschland GmbH, Albert-Hahn-Straße 6-10, D-47269 Duisburg
Siemens AG, Wittelsbacherplatz 2, D-80333 München
Sitec Sieber Engineering AG, Aschbach 621, CH-8124 Maur
Wacker-Chemie GmbH, Hanns-Seidel-Platz 4, D-81737 München
Wagner & Munz GmbH, In der Rosenau 4, D-81829 München
Waters GmbH, Hauptstraße 87, D-65760 Eschborn
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstraße 12, D-69469 Weinheim

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Ammon, Döring, Drews, Gauglitz, Grabmayr, Häfelinger, Hanack, Heide, Jönsson, Kovar,
Lindner, Nagel, Pommer, Safayhi, Schmidt, Schultz, Wahl, Wankmüller

Lebenslauf

| | |
|-----------------------------|--|
| 25. Juli 1973 | geboren in Horb am Neckar als zweites Kind der Eheleute Irmtraud Kaiser, geb. Fuchs und Wolfgang Kaiser |
| 1980 – 1984 | Grundschule Horb am Neckar |
| 1984 – 1993 | Martin-Gerbert-Gymnasium Horb am Neckar |
| 1993 | Abschluss mit der „Allgemeinen Hochschulreife“ |
| 1993 – 1994 | Freiwilliges Soziales Jahr in der Winghofer-Klinik Rottenburg |
| Oktober 1994 – Oktober 1998 | Pharmaziestudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen |
| April 1997 | 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung |
| Oktober 1998 | 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung |
| November 1998 – April 1999 | Praktikum in der Hirsch-Apotheke in Reutlingen |
| Mai 1999 – Oktober 1999 | Praktikum bei der Bayer AG in Leverkusen |
| Dezember 1999 | 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung |
| Dezember 1999 | Approbation zur Apothekerin |
| Januar 2000 – Juli 2003 | Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Tübingen. Anfertigung der Dissertation „Herstellung, In-Line-Einschluss und Charakterisierung lipophiler und hydrophiler Kamillenextrakte unter Einsatz von verdichtetem Kohlendioxid“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt |
| März 2003 | Fachapothekerin für Pharmazeutische Technologie |