

**ANREICHERUNG UND IN-LINE-EINSCHLUSS  
VON HYPERFORIN AUS *HYPERICUM PERFORATUM* L.  
MITTELS ÜBERKRITISCHER CO<sub>2</sub>-EXTRAKTION**

**DISSERTATION**

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

**2003**

**vorgelegt von**

**HARALD RÖMPP**

Tag der mündlichen Prüfung

31. Juli 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 Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt, danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, für die Schaffung optimaler Arbeitsbedingungen und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, nicht nur in Zusammenhang mit dieser Arbeit. Insbesondere sein Einsatz für die Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie, die Organisation von Exkursionen und die Möglichkeit an Kongressen und Tagungen teilzunehmen hat meinen pharmazeutisch-technologischen Horizont erweitert und mein Interesse an diesem Gebiet verstärkt. Dafür gebührt ihm mein besonderer Dank.

Herrn Prof. Dr. S. Laufer, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Den Herren Dr. Christoph. Seger, Lehrstuhl für Pharmakognosie der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Österreich und Dr. Franz. Hadacek, Lehrstuhl für Vergleichende und Ökologische Phytochemie der Universität Wien, Österreich, gebührt mein besonderer Dank für ihren Einsatz bei den GC-MS-Untersuchungen der Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakte, ebenso Herrn Prof. Dr. E. Haslinger, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie und Pharmazeutische Technologie der Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich für die Förderung dieser Arbeiten.

Der Fa. Lichtwer Pharma AG, Berlin, danke ich für die Bereitstellung von Johanniskraut zur Extraktion, ebenso wie der Fa. Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co, Karlsruhe für die Überlassung von Hyperforin-Referenzsubstanzen.

Der Fa. SITEC Sieber Engineering AG, Maur, Schweiz, in Person von Dr. Beat. Zehnder gebührt mein Dank für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen technischen Fragen der CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern der Werkstatt des Pharmazeutischen Institutes der Eberhard-Karls-Universität Tübingen allen voran deren Meister Herrn Karl-Heinz Geiger danke ich für die Durchführung zahlreicher größerer und kleinerer Reparaturen,

ebenso wie Frau Helga Söllinger und Herrn Andreas Walker von der Chemikalienausgabe für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Roland Walker bedanke ich mich für seine große Bereitschaft zur Hilfe und Unterstützung nicht nur in Zusammenhang mit der CO<sub>2</sub>-Extraktion. Frau Renate Beer, Frau Martina Brenn und Herrn Klaus Weyhing danke ich für jegliche Unterstützung während meiner Zeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie danke ich ganz herzlich für das angenehme Arbeitsklima, für die gute Zusammenarbeit, für zahlreiche fachliche Diskussionen und gemeinsame Stunden außerhalb der Arbeitszeit.

Meiner freundschaftlichen Kollegin Frau Claudia Kaiser gebührt mein herzlichster Dank für ihre fachliche und menschliche Unterstützung in den vergangenen dreieinhalb Jahren, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, nicht zu vergessen das sorgfältige Korrigieren des ersten Manuskriptentwurfes und zahlreiche gemeinsame Erlebnisse außerhalb des Lehrstuhles.

Frau Ulrike Fischer, meiner langjährigen Freundin und zukünftigen Frau, gilt allergrößter Dank nicht nur für ihre Geduld sondern vor Allem für ihren starken privaten Rückhalt, der wichtigsten Voraussetzung für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit. In diesen herzlichsten Dank seien auch, und insbesondere, unsere Familien und Freunde einbezogen.

Meinen Eltern  
und Freunden  
gewidmet

## THEORIE UND PRAXIS

Eines Tages werde ich vielleicht alle Weisheiten  
dieser Welt aufgeschrieben haben

– werde aufstehen und wieder in eine Dummheit rennen.

Kristiane Allert-Wybranietz

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeine Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1	Extraktion mit überkritischen Gasen	3
2.1.1	Historischer Überblick	3
2.1.2	Der überkritische Zustand	4
2.1.3	Physikalisch-chemische Eigenschaften überkritischer Gase	4
2.1.4	Überkritisches Kohlendioxid	8
2.2	<i>Hypericum perforatum</i> L. – Geschichte, Inhaltsstoffe, Pharmakologie und Klinik	9
2.2.1	Geschichte von <i>Hypericum perforatum</i> L.	9
2.2.2	Botanik und Inhaltsstoffe von <i>Hypericum perforatum</i> L.	10
2.2.3	Pharmakologie und Klinik von <i>Hypericum perforatum</i> L.	15
<b>3</b>	<b>Beschreibung der Extraktionsanlage</b>	<b>21</b>
3.1	Allgemeine Daten zur CO <sub>2</sub> -Extraktionsanlage	21
3.2	Fließschema der CO <sub>2</sub> -Extraktionsanlage	21
3.3	Thermodynamik des Extraktionsprozesses	24
3.4	Beschreibung ausgewählter Regelkreise der Extraktionsanlage	28
3.4.1	Allgemeines zur Regelung	28
3.4.2	Temperaturregelkreise der CO <sub>2</sub> -Extraktionsanlage	29
3.4.3	Druckregelkreise der CO <sub>2</sub> -Extraktionsanlage	30
3.4.3.1	Regelung im Hochdruckbereich	31
3.4.3.2	Regelung im Niederdruckbereich	32
3.5	Messung von CO <sub>2</sub> -Massenfluss und -Dichte	32
3.6	Zentrale Messdatenerfassung	35

<b>4</b>	<b>Quantitative Bestimmung von Hyperforin</b>	<b>37</b>
4.1	Literaturübersicht	37
4.2	HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Hyperforin in Johanniskraut und Johanniskraut-CO <sub>2</sub> -Extrakten	39
4.3	Ergebnisse der Kalibrierung und Validierung	39
<b>5</b>	<b>Optimierung der Extraktionsbedingungen</b>	<b>43</b>
5.1	Extraktion von Hypericum perforatum L. mittels überkritischem CO <sub>2</sub> – Literaturübersicht	43
5.2	Untersuchung des Einflusses verschiedener Extraktionsbedingungen auf die Extraktausbeute und den Hyperforingehalt	45
5.2.1	Einfluss des Extraktionsdruckes	47
5.2.2	Einfluss der Extraktionstemperatur	48
5.2.3	Einfluss der Extraktionsdauer	49
5.2.4	Einfluss des CO <sub>2</sub> -Massenflusses	50
5.3	Massenbilanz der Extraktion	51
5.4	Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die Zersetzung von Hyperforin während der Extraktion	53
5.5	Einfluss des Zerkleinerungsgrades der Droge	55
5.6	Diskussion der Ergebnisse	56
5.6.1	Extraktionsdruck	56
5.6.2	Extraktionstemperatur	58
5.6.3	Extraktionsdauer	58
5.6.4	CO <sub>2</sub> -Massenfluss	59
5.6.5	Zersetzung von Hyperforin während des Extraktionsprozesses	60
5.7	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Optimierung der Extraktionsbedingungen	61
<b>6</b>	<b>Wachsabtrennung durch Zwischenabscheidung</b>	<b>63</b>
6.1	Literaturübersicht	63
6.2	Ergebnisse und Diskussion	66

6.2.1	Untersuchung der Wachsfraktion ohne Zwischenabscheidung	66
6.2.1.1	Voruntersuchungen mittels Gaschromatographie und Flammenionisationsdetektion	66
6.2.1.2	Gaschromatographisch-Massenspektrometrische Untersuchung der Wachsfraktion	67
6.2.2	Versuche mit Zwischenabscheidung	71
6.2.2.1	Fraktionierte Abscheidung unter Einsatz des Kühlthermostaten ministat cc (Fa. Huber)	71
6.2.2.2	Fraktionierte Abscheidung unter Einsatz des Kühlthermostaten FP50 HP (Fa. Julabo)	77
6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Wachsfraktion und Zwischenabscheidung	82
<b>7</b>	<b>In-line-Einschluss von Hyperforin in Cyclodextrine</b>	<b>84</b>
7.1	Allgemeines zu $\beta$ -Cyclodextrinen	84
7.2	Literaturübersicht	86
7.3	In-line-Herstellung der CO <sub>2</sub> -Extrakt-Einschlussverbindungen	87
7.4	Wiederfindung von Hyperforin in den Einschlussverbindungen	89
7.5	Untersuchungen zur Lagerstabilität	91
7.5.1	Lagerstabilität der reinen Johanniskraut-CO <sub>2</sub> -Extrakte	91
7.5.1.1	Stabilität in Abhängigkeit von der Lagertemperatur	92
7.5.1.2	Stabilität unter Lichteinfluss	93
7.5.2	Lagerstabilität der Einschlussverbindungen	94
7.6	Bestimmung der Einschlussraten von Hyperforin in $\beta$ -Cyclodextrin	97
7.7	Diskussion der Ergebnisse	99
7.7.1	Stabilität der reinen CO <sub>2</sub> -Extrakte	99
7.7.2	Stabilität von Hyperforin in $\beta$ -Cyclodextrin-Einschlussverbindungen	100
7.8	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Extraktstabilität und zum In-line-Einschluss	105

<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>107</b>
8.1	Materialien	107
8.1.1	Droge	107
8.1.2	Standardsubstanzen	107
8.1.3	Lösungsmittel und Chemikalien	108
8.1.4	Sonstige Verbrauchsmaterialien	109
8.2	Geräte zur allgemeinen Verwendung	110
8.3	Datenverarbeitung	111
8.4	Analytische Verfahren	112
8.4.1	HPLC-Methode zur Bestimmung von Hyperforin	112
8.4.1.1	Methodenbeschreibung	112
8.4.1.2	Probenvorbereitung	113
8.4.1.3	Kalibrierung und Validierung	114
8.4.2	GC-FID-Methode zur Bestimmung der Wachsfraktion	115
8.4.2.1	Methodenbeschreibung	115
8.4.2.2	Probenvorbereitung	116
8.4.3	GC-MS-Methode zur Bestimmung der Wachsfraktion	116
8.4.3.1	Methodenbeschreibung	116
8.4.3.2	Probenvorbereitung	117
8.4.4	Bestimmung der Einschussrate von Hyperforin in $\beta$ -Cyclodextrin/CO <sub>2</sub> -Extrakt-Komplexen	117
8.4.5	Teilchengrößenbestimmung mittels Siebanalyse	118
8.5	Technologische Verfahren	119
8.5.1	Zerkleinerung der Droge	119
8.5.2	Gefriertrocknung	119
8.5.3	Herstellung der CO <sub>2</sub> -Extrakte	119
8.5.3.1	Optimierung der Extraktionsbedingungen	119
8.5.3.2	Extraktion mit Zwischenabscheidung	121

8.5.4	Herstellung der CO <sub>2</sub> -Extrakt-Komplexe	121
8.5.4.1	Komplexbildung in dispergierter Phase	121
8.5.4.2	Komplexbildung in gelöster Phase	122
8.5.5	Stabilitätsuntersuchungen	123
8.5.5.1	Stabilitätsuntersuchung der CO <sub>2</sub> -Extrakte	123
8.5.5.2	Stabilitätsuntersuchung der CO <sub>2</sub> -Extrakt-Komplexe	123
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>130</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	<b>149</b>
11.1	Farbige Abbildungen	149
11.2	Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der quantitativen Bestimmung von Hyperforin	150
11.3	Firmenverzeichnis	153

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a.m.u.	atomare Masseneinheit
Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
β-CD	β-Cyclodextrin
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (früher BGA)
BGA	Bundesgesundheitsamt (heute BfArM)
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
d. h.	das heißt
DAB	Deutsches Arzneibuch
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Substitutionsgrad
Ea	Endabscheider
EOS	Zustandsgleichung
et al.	et alii
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
5-HT	Serotonin
GABA	γ-Aminobuttersäure
Galac	Galactose
GC	Gaschromatographie
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Gl.	Gleichung
Gluc	Glucose
HAMD-Skala	Hamilton-Depressions-Skala
HFKW 134a	1,1,1,2-Tetrafluorethan
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie

HP- $\beta$ -CD	Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin
I.D.	Innendurchmesser
ICD	International Classification of Diseases
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
LM	Lösungsmittel
m	Masse
MAO	Monoaminoxidase
$M_r$	molare Masse
MS	Massenspektrometrie
M- $\beta$ -CD	1,8-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
n. Chr.	nach Christus
NA	Noradrenalin
NF	National Formulary
pH	pH-Wert
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
Rham	Rhamnose
RO	Umkehrosmose
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
sdv	Standardabweichung
sog.	sogenannt
SSRI	selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
Syloid	hochdisperses Siliciumdioxid
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TIC	Gesamtionenstrom
TMCA	Trimethylchlorosilan
u. a.	unter anderem
USP	United States Pharmacopeia
UV	ultraviolett
V	Volumen
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
Za	Zwischenabscheider

### **Besondere Hinweise**

Soweit nicht anders vermerkt, geben die Fehlerbalken in den Diagrammen den 95 %-Vertrauensbereich des Mittelwertes aus einer Dreifachbestimmung wieder.

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*

H. Römpp, C. Seger, C. S. Kaiser, E. Haslinger und P. C. Schmidt

„Enrichment of Hyperforin from St John's Wort (Hypericum perforatum L.), by Pilot-Scale Supercritical Carbon Dioxide Extraction“

Eur. J. Pharm. Sci. – zur Publikation eingereicht

C. Seger, H. Römpp, S. Sturm, E. Haslinger, P. C. Schmidt und F. Hadacek

„Charakterization of St John's Wort (Hypericum perforatum L. ) Supercritical Fluid Extracts by HPLC-MS and GC-MS“

Eur. J. Pharm. Sci. – zur Publikation eingereicht

*Kongressbeiträge*

H. Römpp, C. S. Kaiser, G. Roos und P. C. Schmidt

„Enrichment of Hyperforin from St John's Wort by Supercritical Carbon Dioxide Extraction – preliminary results“

Poster, 2<sup>nd</sup> International Symposium on High Pressure Chemical Engineering, Hamburg **2001**

H. Römpp, C. S. Kaiser und P. C. Schmidt

„Anreicherung von Hyperforin aus Johanniskraut mittels überkritischem Kohlendioxid“

Poster , DPhG Jahrestagung Halle 2001, Arch. Pharm. Med. Chem. **334**, Suppl. **2** (**2001**)

H. Römpp, C. S. Kaiser und P. C. Schmidt

„Enrichment of Hyperforin from St John's Wort by Pilot-Scale Supercritical Carbon Dioxide Extraction“

Poster, APV Jahrestagung, Florenz, Italien 2002

Proc. 4<sup>th</sup> World Meeting ADRITELF/APGI/APV, 1125-1126 (**2002**)



# KAPITEL 1

## EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Trockenextrakte aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) auf ethanolisch-wässriger Basis finden häufige Anwendung in der Behandlung leichter bis mittelschwerer depressiver Erkrankungen. Während die klinische Wirksamkeit solcher Zubereitungen mehrfach gezeigt werden konnte, ist die Frage nach den wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen in Johanniskraut heute mehr denn je Gegenstand einer kontrovers geführten Diskussion. Neben dem Naphodianthron Hypericin und Flavonoiden scheint vor allem dem Phloroglucinol Hyperforin, für das eine Hemmung der Serotonin-Rückaufnahme in die präsynaptische Membran gezeigt werden konnte, eine zentrale Bedeutung zuzukommen. Die USP 26/NRF 21 trägt dem Rechnung und fordert für Johanniskrautdroge und Johanniskrauttrockenextrakt sowohl einen Mindestgehalt für Hypericin als auch für Hyperforin.

Als Phloroglucinolderivat hat Hyperforin einen eher lipophilen Charakter. Es ist sehr instabil und unterliegt bei Einfluss von Licht und Wärme einer raschen oxidativen Zersetzung. Eine Untersuchung des Hyperforingehaltes einer Reihe von Johanniskraut-Extraktpräparaten zeigt, dass nicht nur zwischen den unterschiedlichen Präparaten große Streuungen auftreten, sondern auch zwischen Chargen ein und desselben Produktes (Wurglics et al. 2001).

Die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid findet seit den 1970er Jahren breite Anwendung in der Nahrungsmittelindustrie. Ausgehend davon wird dieses Verfahren seit Mitte der 1980er Jahre auch auf pharmazeutisch relevante Bereiche ausgeweitet. Trotz der Etablierung der überkritischen CO<sub>2</sub>-Extraktion in vielen Bereichen der Naturstoffisolierung befinden sich gegenwärtig nur zwei pflanzliche Präparate auf dem deutschen Markt, die mit Hilfe von überkritischem Kohlendioxid gewonnen werden. Dies ist insbesondere auf Zulassungshürden für Phytopharmaka zurückzuführen, wonach ein auf eine andere Art und Weise hergestellter Pflanzenextrakt als neuer Wirkstoff betrachtet wird, für den sämtliche Nachweise zur Pharmakologie, Toxikologie und klinischen Wirksamkeit erbracht werden müssen.

Überkritisches Kohlendioxid besitzt eine hohe Selektivität für lipophile Pflanzeninhaltsstoffe. Die kritische Temperatur von 31 °C ermöglicht Extraktionen unter schonenden Bedingungen, der kritische Druck von 73 bar ist unter apparativen Gesichtspunkten leicht zu realisieren. Der Extraktionsprozess erfolgt in einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, dies wirkt sich positiv auf die Stabilität von oxidationsempfindlichen Stoffen aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die selektive Anreicherung von Hyperforin aus Johanniskraut mittels überkritischer CO<sub>2</sub>-Extraktion im Pilotmaßstab. Zunächst wird das Extraktionsverfahren hinsichtlich Ausbeute an Extrakt und Hyperforingehalt in den Extrakten optimiert, wobei auch die Extraktionsbilanz und die Zersetzungstendenz von Hyperforin während des Extraktionsprozesses berücksichtigt werden. Ausgehend von einer umfassenden Analyse der Begleitstofffraktion in den CO<sub>2</sub>-Extrakten mittels GC-MS wird untersucht, inwieweit sich co-extrahierte Cuticularwachse durch eine Zwischenabscheidestufe vom Extrakt abtrennen lassen, und ob sich dadurch die Selektivität des Verfahrens für Hyperforin steigern lässt. Durch Zusatz verschiedener  $\beta$ -Cyclodextrine soll der In-line-Einschluss von Hyperforin erreicht werden, mit dem Ziel, Hyperforin in den Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten zu stabilisieren.

# KAPITEL 2

## ALLGEMEINE LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Extraktion mit überkritischen Gasen

#### 2.1.1 Historischer Überblick

Das Auftreten einer überkritischen Phase wird zu Beginn des 19. Jahrhunderts erstmalig von de la Tour (1822) beschrieben. Dieser stellt für einige Substanzen das Verschwinden der Phasengrenze zwischen fest und flüssig bei Überschreiten einer bestimmten Temperatur fest. Die Lösungskapazität überkritischer Gase entdecken Hannay und Hogard (1879) anhand von Löslichkeitsversuchen mit anorganischen Salzen in überkritischem Ethanol. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wird die Dichte als der wichtigste Einflussparameter auf die Lösungskapazität überkritischer Gase entdeckt (Tyrrer 1910). Diese Beobachtungen führen ab den 1930er Jahren zu Anwendungen insbesondere in der Fraktionierung natürlicher und synthetischer Öle. Die Ausweitung dieser Trennmethode auf den Bereich der Naturstoffextraktion erfolgt in den 1960er Jahren (Zosel 1978). Erste industrielle Anwendungen im großtechnischen Maßstab, die bis heute genutzt werden sind die Entcoffeinierung von Rohkaffee (Zosel 1970) und die Gewinnung von Hopfenextrakt für die Brauindustrie (Vitzthum und Hubert 1971). Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten im Bereich der Naturstoffextraktion und -fraktionierung wurde seit dieser Zeit in Form von Publikationen und Patentschriften veröffentlicht. Sie umfassen vor allem die Extraktion und Fraktionierung von fetten und ätherischen Ölen, Aromen, Alkaloiden, Steroiden, Carotinoiden und zahlreichen anderen Stoffgruppen. Einen umfassenden Überblick bis Mitte der 1980er Jahre bieten Stahl et al. (1987). Ausgehend von chromatographischen Anwendungen (Klesper et al. 1968) wird die überkritische Extraktion auf den analytischen Bereich als Probenvorbereitungsmethode ausgeweitet (Hawthorne 1990). Eine Übersicht zur überkritischen Extraktion im analytischen Maßstab findet sich bei Modey et al. (1996), eine weitere Übersicht zur Isolierung verschiedener Naturstoffklassen bieten Jarvis und Morgan (1997). Kaiser et al. (2001) fassen die Arbeiten zur pharmazeutisch relevanten Naturstoffextraktion seit Mitte der 1980er sowohl für den analytischen als auch den präparativen Bereich in einer systematischen Literaturübersicht zusammen.

### 2.1.2 Der überkritische Zustand

Der überkritische Zustand einer Substanz ist definiert als der Bereich, bei dem man sich sowohl hinsichtlich des Druckes als auch der Temperatur oberhalb des kritischen Punktes der Substanz befindet. Der kritische Punkt im Druck/Temperatur-Diagramm ist demzufolge durch einen kritischen Druck ( $p_c$ ) und eine kritische Temperatur ( $T_c$ ) definiert und markiert das Ende der Dampfdruckkurve (Abb. 2-1). Der überkritische Zustand kann ausgehend von einem Gas bei überkritischer Temperatur durch Verdichtung oder ausgehend von einer Flüssigkeit bei überkritischem Druck durch Erwärmung erreicht werden. Der Übergang in den überkritischen Zustand ist *kein* Phasenübergang im eigentlichen Sinn. Das hat zur Folge, dass keine sprunghafte, sondern eine kontinuierliche Änderung der physikalischen Eigenschaften der Substanz zu beobachten ist.

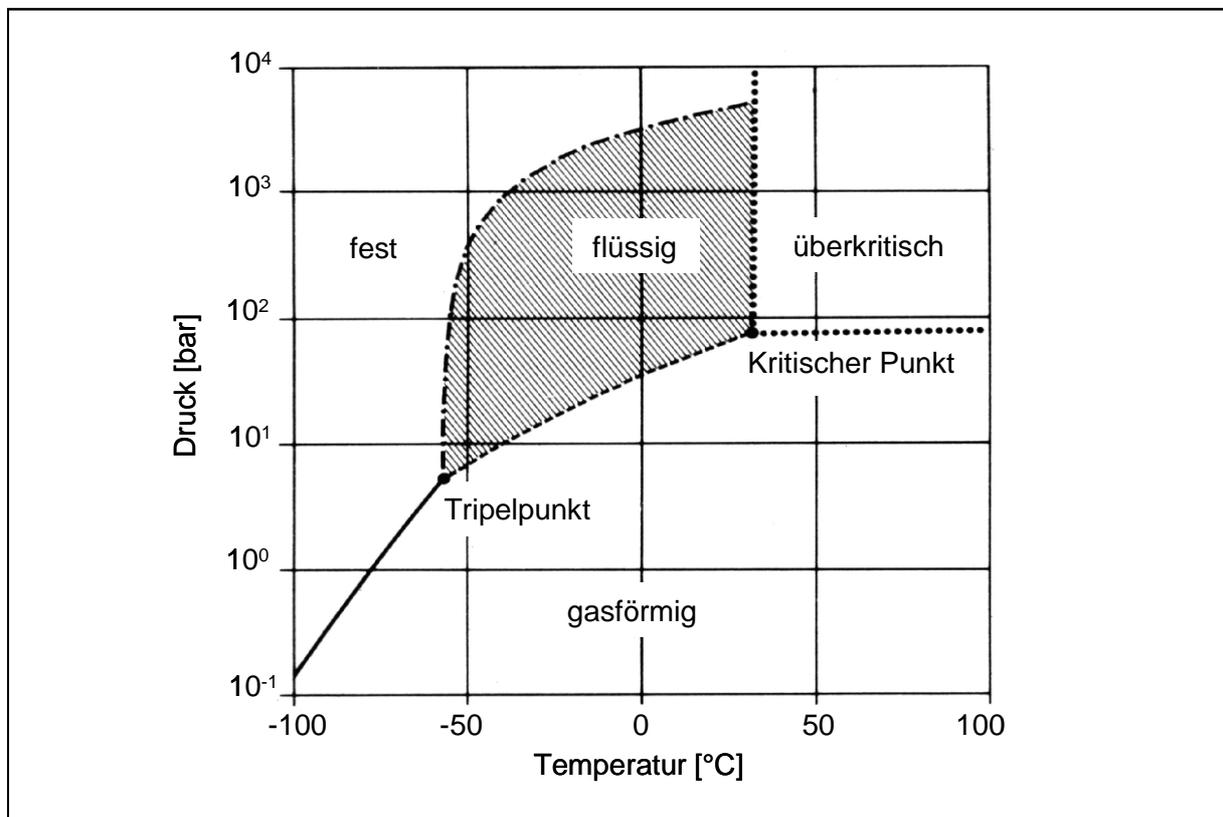


Abb. 2-1 Definition des überkritischen Zustandes am Beispiel von CO<sub>2</sub>

$$p_c = 73 \text{ bar}, T_c = 31 \text{ °C (Buse 1992)}$$

### 2.1.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften überkritischer Gase

In Tab. 2-1 sind die physikalischen Größen Dichte ( $\rho$ ), Viskosität ( $\eta$ ) und Diffusionskoeffizient ( $D$ ) für Flüssigkeiten, Gase und verdichtete Gase vergleichend zusammengestellt.

Tab. 2-1 Größenordnungsvergleich physikalischer Daten von Gas, Flüssigkeit und überkritischem Gas (nach Gouw und Jentoft 1972)

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

Die Dichte eines überkritischen Gases ist abhängig von Druck und Temperatur und liegt im Bereich der Dichten flüssiger Lösungsmittel. Dies ist entscheidend für die Lösungskapazität überkritischer Gase für schwerflüchtige Stoffe bei relativ geringen Temperaturen. Die Abhängigkeit der Löslichkeit von Temperatur, Druck und Dichte eines überkritischen Gases ist in Abb. 2-2 am Beispiel von Quarzsand in Wasser dargestellt.

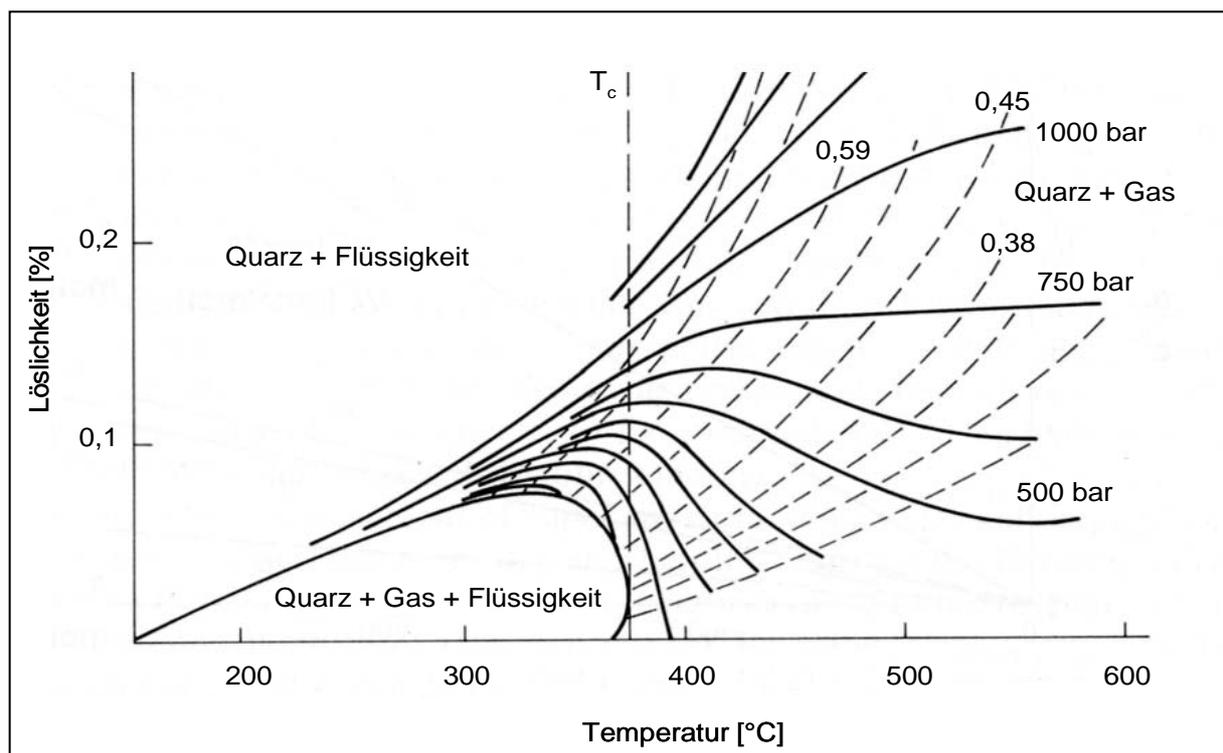


Abb. 2-2 Löslichkeit von Quarz in überkritischem Wasser ( $p_c = 218 \text{ bar}$ ,  $T_c = 374 \text{ °C}$ ) in Abhängigkeit von Temperatur, Druck und Dichte; ( — ) Isobaren [bar], ( - - - - ) Isochoren [ $\text{g/cm}^3$ ] (nach Brunner 1994)

Bei konstanter Temperatur (Isothermen) führt eine Steigerung des Druckes zu einer erhöhten Löslichkeit. Der gleiche Effekt wird beobachtet, wenn man die Dichte bei konstanter Temperatur erhöht. Die Dichte ist eine Funktion von Druck und Temperatur, steigender Druck und fallende Temperatur führen zu höheren Dichten. Somit kann unter isothermen Bedingungen eine Steigerung der Dichte nur durch Druckerhöhung erreicht werden. Insofern sind die beiden beschriebenen Effekte identisch. Bei konstanter Dichte (Isochoren) nimmt die Löslichkeit mit zunehmender Temperatur stetig zu. Neben der Dichte als entscheidendes Kriterium für die Lösungskapazität spielt der Dampfdruck für die Löslichkeit in einem überkritischen Gas eine herausragende Rolle. Steigende Temperaturen führen zu höheren Dampfdrücken der zu lösenden Substanz, daraus resultiert eine erhöhte Flüchtigkeit und eine verbesserte Löslichkeit. Das Zusammenspiel von Dichte (Lösungskapazität) und Dampfdruck (Flüchtigkeit) im Hinblick auf die Löslichkeit einer Substanz kann am Verlauf der Linien konstanten Druckes (Isobaren) verfolgt werden. Bis zu einem Druck von etwa 750 bar beobachtet man auf Grund der Dichtereduktion mit steigender Temperatur eine erniedrigte Löslichkeit. Oberhalb des Grenzdruckes von 750 bar wird der negative Effekt der abnehmenden Dichte durch den exponentiell ansteigenden Dampfdruck überkompensiert, dies hat eine erhöhte Löslichkeit mit zunehmender Temperatur zur Folge. Den Übergangsbereich bezeichnet man auch als „cross-over-region“.

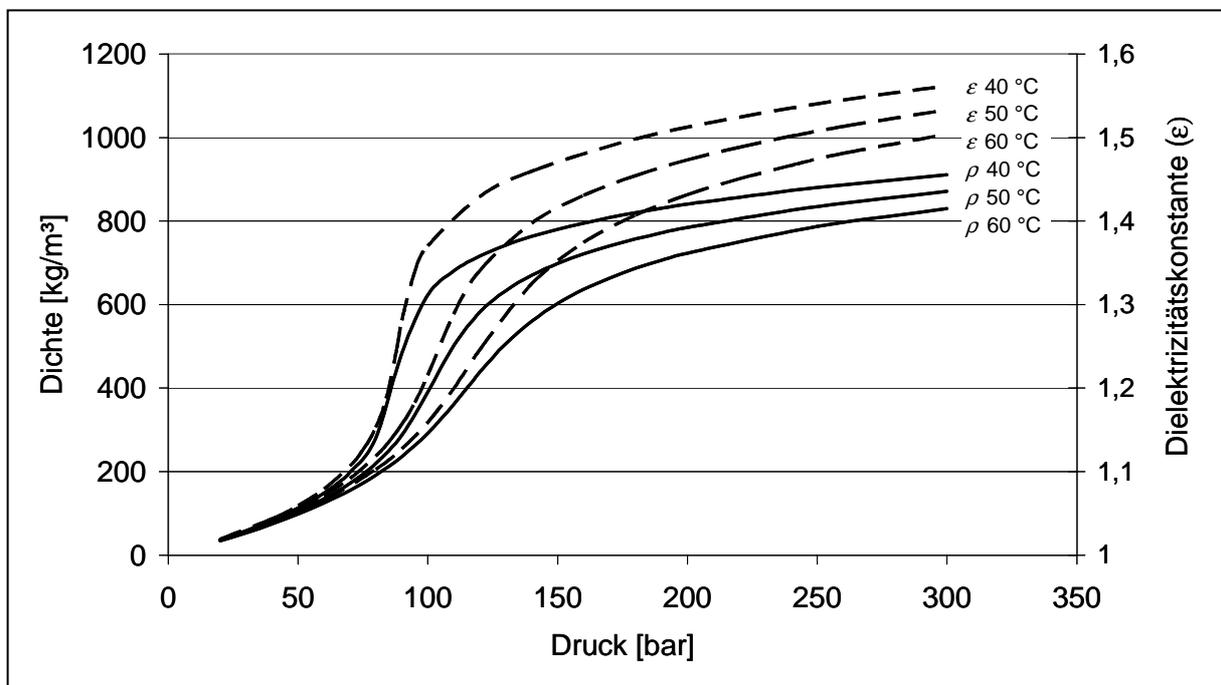


Abb. 2-3 Dichte ( $\rho$ ) und relative Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ , bezogen auf Vakuum) von  $\text{CO}_2$  ( $p_c = 73 \text{ bar}$ ,  $T_c = 31 \text{ °C}$ ) als Funktion von Druck und Temperatur; Dichten berechnet nach Bender-EOS (Bender 1970); relative Dielektrizitätskonstanten nach Moriyoshi et al. (1993)

Den starken Einfluss des Druckes auf die Dichte ( $\rho$ ) im Bereiche des kritischen Punktes zeigt Abb. 2-3 am Beispiel von  $\text{CO}_2$  bei verschiedenen Temperaturen. Hieraus ergibt sich eine hohe Variabilität der Lösungskapazität, die sich innerhalb gewisser Grenzen allein durch die Wahl der Extraktionsparameter Druck und Temperatur steuern lässt. Bei höheren Drücken ist die Abhängigkeit der Dichte vom Druck dagegen nur noch gering ausgeprägt. Auch der Einfluss der Temperatur macht sich im Bereich des kritischen Punktes am deutlichsten bemerkbar.

Die Abb. 2-3 stellt weiterhin die Abhängigkeit der relativen Dielektrizitätskonstanten ( $\epsilon$ , bezogen auf Vakuum) von Druck und Temperatur dar. Die relative Dielektrizitätskonstante ist ein Maß für die Polarität eines Lösungsmittels und spiegelt dessen Fähigkeit wieder, polare Substanzen zu lösen. Der Verlauf der Kurven entspricht dem der Dichte, die Zunahme der relativen Dielektrizitätskonstanten mit steigendem Druck ist am kritischen Punkt und für nahkritische Temperaturen (40 °C) am deutlichsten ausgeprägt. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die relative Dielektrizitätskonstante von  $\text{CO}_2$  auch bei hohen Drücken verhältnismäßig gering ist. Die relative Dielektrizitätskonstante von Wasser als polares Lösungsmittel zum Vergleich liegt bei 80,3.

Neben der Lösungskapazität und der Polarität spielt das Massentransportverhalten einer Substanz bei der Extraktion eine wichtige Rolle. Es wird wesentlich durch den Diffusionskoeffizienten ( $D$ ) bestimmt, der die Proportionalitätskonstante zwischen Massenfluss ( $J$ ) und dem Konzentrationsgradienten über die Diffusionsstrecke ( $dc/dx$ ) darstellt. Den Zusammenhang gibt das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz wieder (Gl. 2-1). Der Diffusionskoeffizient ist entsprechend der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 2-2) proportional zur Temperatur ( $T$ ) und umgekehrt proportional zur Viskosität des umgebenden Mediums ( $\eta$ ). In Zusammenhang mit Tab. 2-1 ergibt sich hieraus, dass bei der Extraktion mit überkritischen Gasen auf Grund höherer Diffusionskoeffizienten und verhältnismäßig geringen Viskositäten verglichen mit der konventionellen Lösungsmittelextraktion, Stoffübergangsprozesse beschleunigt werden. Eine Übersicht über experimentell ermittelte Diffusionskoeffizienten in verdichteten Gasen findet sich bei Liang et al (1991).

$$J = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad (2-1)$$

J	Massenfluss [mol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
D	Diffusionskoeffizient [m <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
dc	Konzentrationsgradient [mol·m <sup>-3</sup> ]
dx	Diffusionsstrecke [m]

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot d \cdot \eta} \quad (2-2)$$

k	Boltzmann-Konstante [1,38·10 <sup>-23</sup> J·K <sup>-1</sup> ]
T	Temperatur [K]
d	Durchmesser eines Moleküls [m]
η	Viskosität des umgebenden Mediums [Pa·s]

#### 2.1.4 Überkritisches Kohlendioxid

Kohlendioxid ist das bei weitem gebräuchlichste Gas in der überkritischen Extraktion von Naturstoffen. Seine kritischen Parameter ( $p_c = 73$  bar,  $T_c = 31$  °C,  $\rho_c = 0,47$  g/cm<sup>3</sup>) sind technisch leicht zu realisieren und erlauben die überkritische Extraktion bereits bei moderaten Temperaturen, dies ist für die Stabilität thermolabiler Pflanzeninhaltsstoffe von Vorteil. Darüber hinaus ist es physiologisch unbedenklich, keimfrei, bakteriostatisch, weder brennbar noch explosiv, umweltfreundlich und in großen Mengen günstig verfügbar. Auf Grund seines linear-symmetrischen Aufbaus weist das CO<sub>2</sub>-Molekül kein permanentes Dipolmoment auf. Dies spiegelt sich in einer geringen relativen Dielektrizitätskonstante (1,179 bei 74 bar und 32 °C; Moriyoshi et al. 1993) wieder und verleiht überkritischem Kohlendioxid die Eigenschaften eines lipophilen Lösungsmittels mit hoher Selektivität für lipophile Pflanzeninhaltsstoffe. Wie verdichtete Gase im Allgemeinen, besitzt auch überkritisches CO<sub>2</sub> eine verglichen mit konventionellen Lösungsmitteln nur geringe Lösungskapazität. Die Beladung verdichteter Gase liegt bei allenfalls einigen Gewichtsprozent. Dies hat zur Folge, dass bei der Extraktion mit überkritischen Gasen wesentlich höhere Lösungsmitteldurchsätze erforderlich sind als bei herkömmlichen Extraktionsverfahren.

## 2.2 *Hypericum perforatum* L. – Geschichte, Inhaltsstoffe, Pharmakologie und Klinik

### 2.2.1 Geschichte von *Hypericum perforatum* L.

Eine erste Erwähnung findet Johanniskraut bei Plinius dem Älteren (23-79 n. Chr.). In dessen „Historia Naturalis“, 77 n. Chr., beschreibt der griechische Arzt Dioskurides in seiner „Materia Medica“ vier Johanniskrautarten, von denen eine – das „Harthew“ – dem heutigen *Hypericum perforatum* L. entspricht. Als Anwendungsgebiete werden die Behandlung fiebriger Erkrankungen, die Diureseförderung und Wundbehandlung beschrieben. Diese Anwendungen finden sich auch in zahlreichen Kräuterbüchern des Mittelalters wieder, darunter Leonhart Fuchs' „New Kreüterbuch“ von 1543. Paracelsus (1493-1541) schreibt dem Johanniskraut als Heil- und Zauberkraut Wunderkräfte zu. Dies ist insbesondere auf den roten Saft, der beim Zerreiben der Blätter austritt, zurückzuführen. Der Artnamen *Hypericum perforatum* tritt erstmals bei Carl von Linné in seinem „Species plantarum“ aus dem Jahr 1753 auf, und wird dort als durchlöcherter oder perforiertes Johanniskraut bezeichnet, dies ist auf die gegen Sonnenlicht durchscheinenden Ölsekretbehälter zurückzuführen. Ethymologisch leitet sich „Hypericum“ oder die frühere Bezeichnung „Hyperikon“ von den beiden griechischen Begriffen hyper (über) und ikon (Bild) ab. „Hyperikon“ könnte in diesem Sinne eine Bezeichnung für Pflanzen gewesen sein, die über Götterbilder und -statuen aufgehängt wurden, mit dem Zweck, böse Geister zu vertreiben. Auch hierin spiegelt sich das Mystische und die Zauberkraft, die dem Johanniskraut in Antike und Mittelalter zugeschrieben wurde, wieder. Die Deutsche Bezeichnung „Johanniskraut“ leitet sich von Johannes dem Täufer ab: es blüht um den 24. Juli, dem Johannestag, der rote Pflanzensaft erinnert an dessen vergossenes Blut. Die Christen sahen in der Pflanze einen Hinweis auf Johannes den Täufer und weihten sie ihm. Einen ersten Hinweis auf die „antidepressive Wirkung“ von *Hypericum perforatum* L. findet sich bei Johann Hieronymus Kniphof (1704-1763), der in seinem Kräuterbuch die Wirkung des Johanniskrauts bei Schwindel und „fürchterlichen melancholischen Gedanken“ beschreibt (Czygan 1993, 2003).

Einzug in das Deutsche Arzneibuch findet das Johanniskraut als „Hyperici herba“ erstmals 1941 in den Ergänzungsband des DAB 6. Nachdem es in den nachfolgenden Ausgaben nicht enthalten war, wird es 1979 mit dem Anwendungsgebiet psychovegetative Störungen und depressive Verstimmungszustände in den Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC) aufgenommen. Diese DAC-Monographie entfiel nach Aufnahme von Johanniskraut in das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.). Die Kommission E des Bundesgesundheitsamtes (BGA) – heute Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) – bewertet Johanniskraut positiv und erfasst es in der Monographie „Hyperici herba“ (1984) und einer entsprechenden Standardzulassung. Während die Ph. Eur. 4 (2003) lediglich eine Monographie „Hyperici

herba“ enthält, findet man in der USP 26/NF 21 (2003) eine Monographie „St John’s Wort“ und eine Monographie „Powdered St John’s Wort Extract“. Als mystische Heilpflanze mit ihren Ursprüngen in der Antike ist dem Johanniskraut der Übergang zu einer anerkannten und wissenschaftlich belegten Arzneidroge gelungen.

## 2.2.2 Botanik und Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L.

### *Botanik*

Die Gattung *Hypericum* zählt innerhalb der Ordnung Theales (syn. Guttiferales) zu der Familie der Hypericaceae (syn. Guttiferae, Clusiaceae). Die offizinelle Art *Hypericum perforatum* L. ist eine ausdauernde, aufrechte Pflanze, die eine Höhe von 20 bis 100 cm erreicht. Der runde Stiel mit zwei Längskanten ist kahl und zur Spitze hin mit Drüsen besetzt. Die Pflanze ist im oberen Teil ästig, mit zahlreichen, zum Teil ausläuferartigen, bis 12 cm langen Adventivsprossen. Die Laubblätter sind elliptisch-eiförmig, ganzrandig und gegenständig und auf Grund von Ölbehältern durchscheinend punktiert mit schwarz erscheinenden Hypericinbehältern am Rand und zum Teil auch auf der Fläche besetzt. Die Blüten mit fünf gelben, unsymmetrischen, meist an einer Seite gekerbten Kronblättern und fünf gleichgestalteten Kelchblättern bilden eine Trugdolde. Die Blüte besitzt zwischen 50 und 60 Staubblätter und einen oberständigen Fruchtknoten mit drei bis fünf Griffeln (Kaul 2000).

### *Verbreitung*

*Hypericum perforatum* L. ist in Europa, Westasien und Nordafrika beheimatet und in diesen Regionen weit verbreitet. Eingeschleppt findet sich Johanniskraut auch in Ostasien, Nord- und Südamerika, Australien und Neuseeland (Schütt und Schulz 1993).

### *Inhaltsstoffe*

Gute Übersichten zu den bisher bekannten Inhaltsstoffen in *Hypericum perforatum* L. finden sich bei Schütt und Schulz (1993), Hölzl et al. (1994), Bombardelli und Morazzoni (1995) und bei Nahrstedt und Butterweck (1997).

### *Phloroglucine*

Hyperforin (siehe Abb. 4-1 auf Seite 37) ist das mengenmäßig vorherrschende Phloroglucinderivat, sein Vorkommen ist charakteristisch für *Hypericum perforatum* L. Nach Maisenbacher und Kovar (1992) enthalten Blüten bis zu 2 % und Früchte bis zu 4,5 % Hyperforin. Das methylanaloge Adhyperforin ist zu 0,2 % bzw. 1,8 % enthalten. Eine Literaturübersicht zur

Isolierung, Strukturaufklärung, Stabilität und Analytik von Hyperforin und Adhyperforin ist in Kapitel 4.1 auf Seite 37 wiedergegeben.

### Naphthodianthrone

Die wichtigsten in *Hypericum perforatum* L. vorkommenden Naphthodianthrone sind Hypericin und Pseudohypericin, sowie deren Biosynthesevorstufen (siehe Abb. 2-4). Der Gehalt an Hypericin und hypericinähnlichen Substanzen liegt im getrockneten Kraut zwischen 0,1 und 0,15 % und ist in Blüten und Knospen mit 0,2-0,3 % am höchsten. Hypericin ist eine wasserunlösliche Verbindung die nativ wahrscheinlich als Glucosid auftritt und deren Kaliumsalze in Wasser löslich sind (Falk und Schmitzberger 1992).

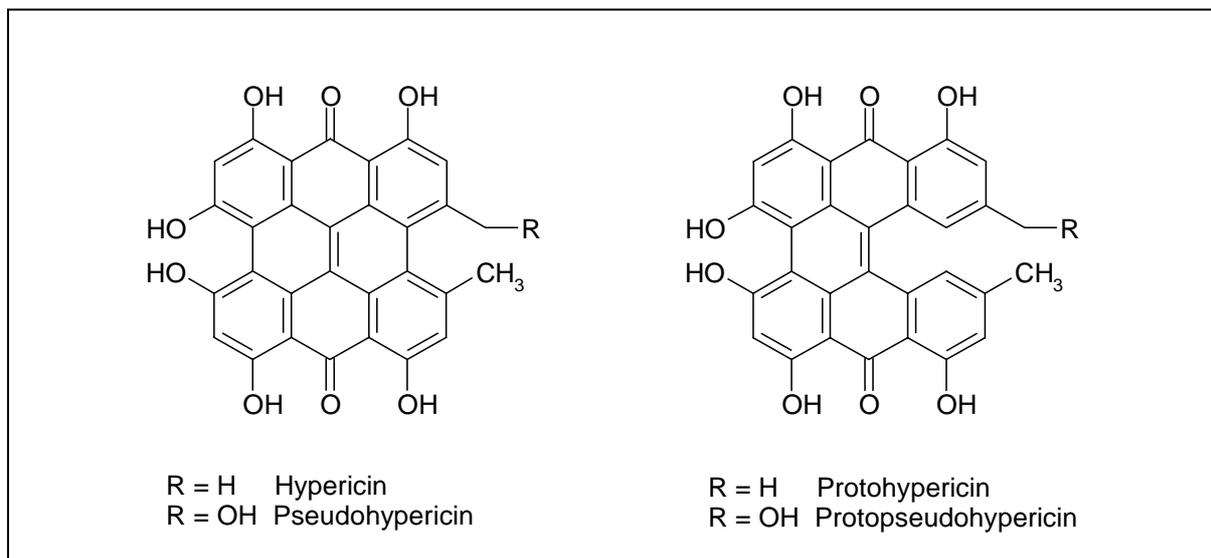


Abb. 2-4 Naphthodianthrone in *Hypericum perforatum* L.

### Flavonoide, Biflavone und Xanthone

*Hypericum perforatum* L. enthält ein breites Spektrum an Flavonolen und Flavonen, sowie deren Glycosiden. Die Hauptkomponenten bilden die Quercetinglycoside Hyperosid, Rutin, Quercitrin und Isoquercitrin, als Aglyca kommen Quercetin, Dihydroquercetin, Kämpferol, Luteolin und Myricetin vor (siehe Abb. 2-5). Insgesamt beträgt der Gehalt an Flavonoiden im getrockneten Kraut 2-4 % (Berghöfer 1987, Hölzl und Ostrowski 1987, Butterweck und Nahrstedt 2003)

Charakteristisch für *Hypericum perforatum* L. ist das Auftreten von dimeren Flavonoiden in den Blüten und Knospen der Pflanze (siehe Abb. 2-5). Zu nennen sind hier das I3,I18-Biapigenin mit einem Gehalt von 0,1-0,5 % und das I3',I18-Biapigenin mit 0,01-0,05 % im getrockneten Kraut (Berghöfer 1987).

Typisch für Hypericaceae ist das Vorkommen von Xanthonen (siehe Abb. 2-6), die bevorzugt in den Wurzeln gespeichert werden, jedoch in allen Pflanzenteilen in unterschiedlichen Mengen auftreten. Kielcorin stellt mit einem Gehalt von 0,01 % in der Droge das mengenmäßig vorherrschende Xanthon dar (Nielsen und Arends 1978, Bennett und Lee 1989).

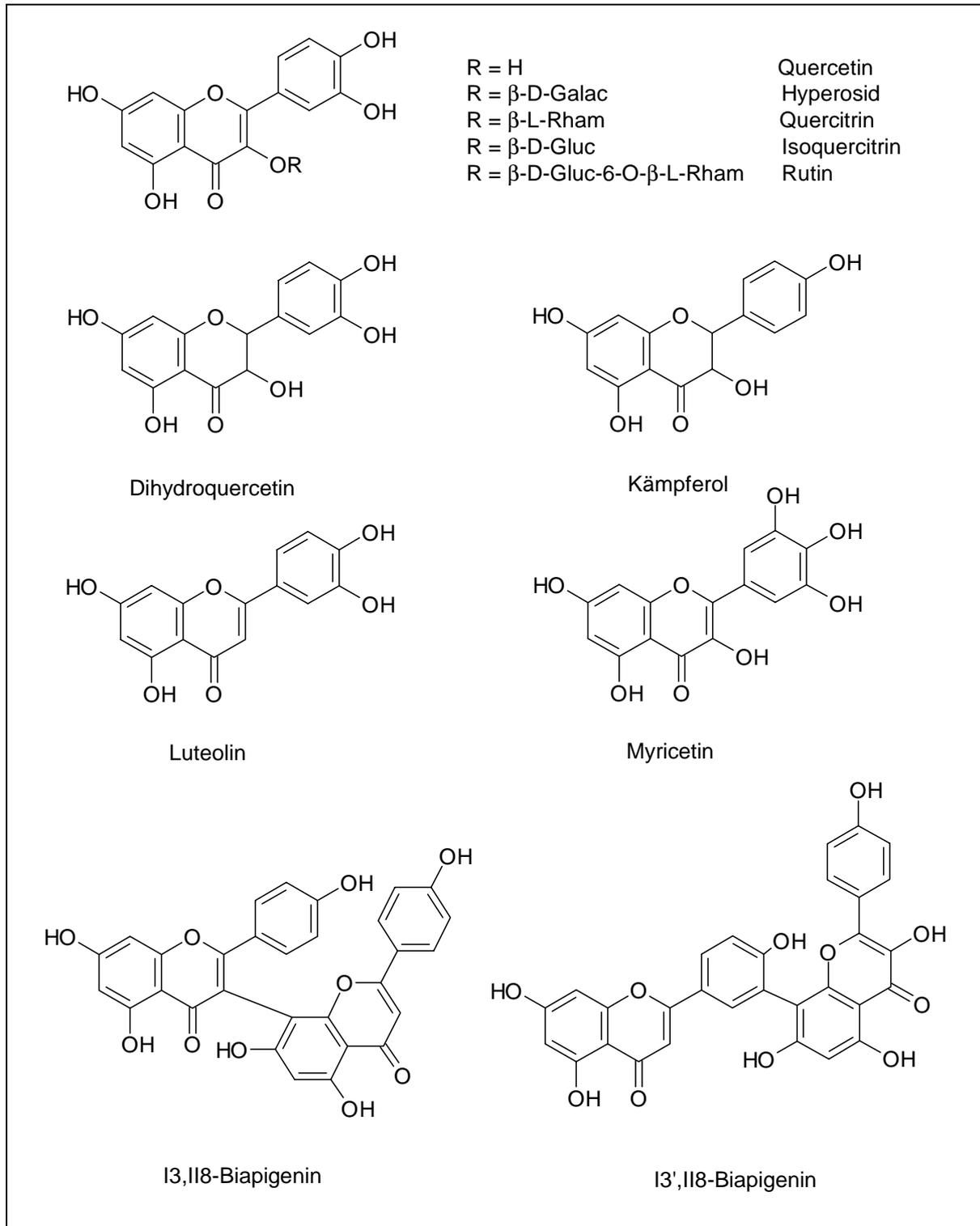


Abb. 2-5 Flavonoide in *Hypericum perforatum* L.

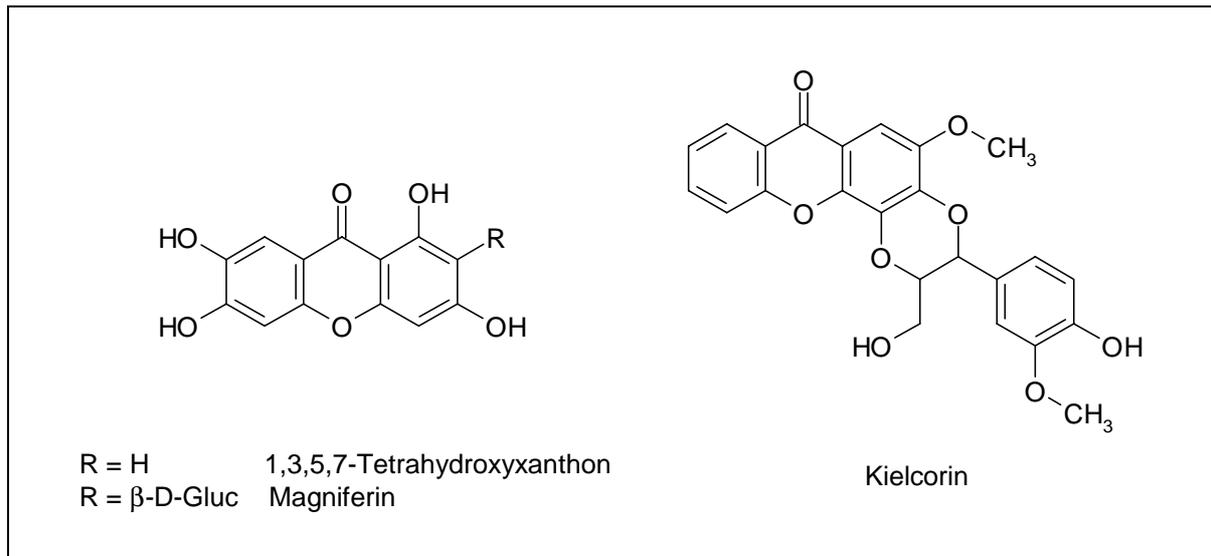


Abb. 2-6 Xanthone in *Hypericum perforatum* L.

#### Tannine und Proanthocyanidine

Im getrockneten Kraut von *Hypericum perforatum* L. finden sich zwischen 5 und 15 % Gerbstoffe, die dem Catechin-Typ zugeordnet werden können (siehe Abb. 2-7). Auf Grund dieses hohen Gehaltes wird Johanniskraut gelegentlich auch als Gerbstoffdroge bezeichnet. Neben Catechingerbstoffen treten Procyanidine auf (Hölzl et al. 1994).

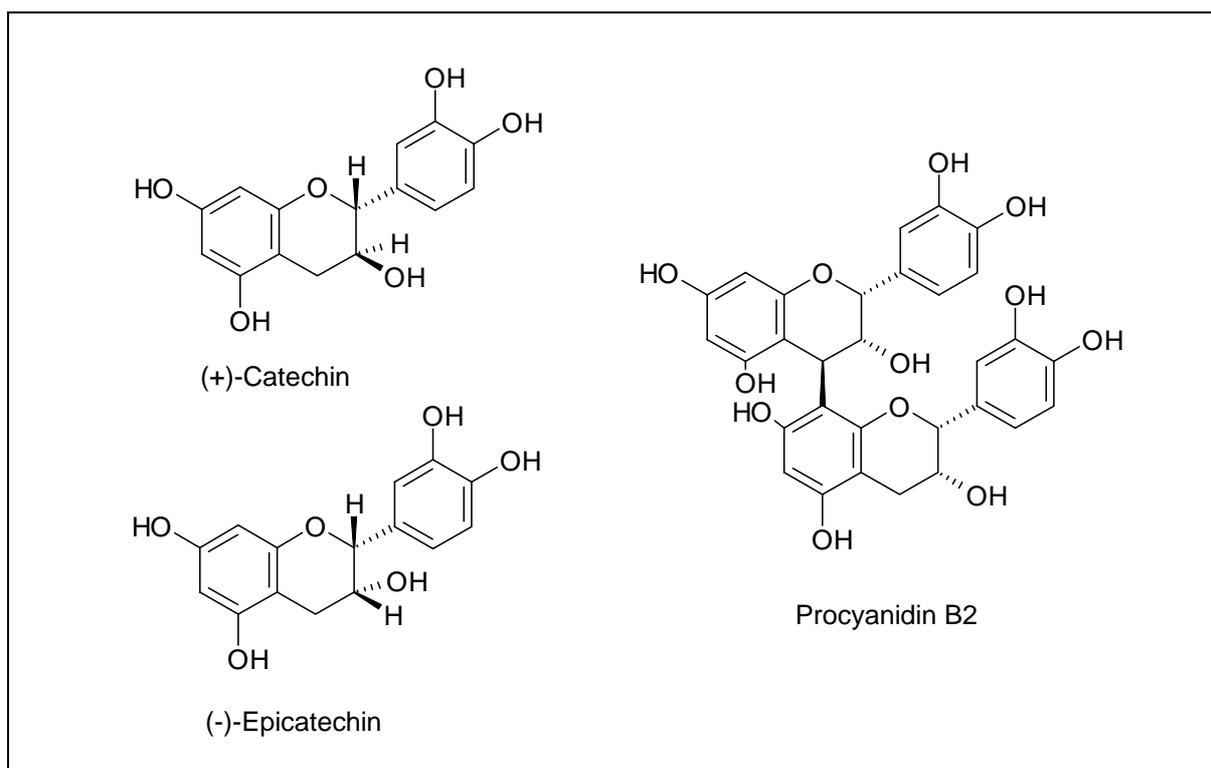


Abb. 2-7 Gerbstoffe und Procyanidine in *Hypericum perforatum* L.

### Lipophile Begleitstoffe

Der Gehalt an ätherischem Öl in Johanniskraut unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen und beträgt 0,1-1 %. Das wasserdampfvlüchtige ätherische Öl findet sich vor allem in Knospen und Blüten. Seine Hauptbestandteile sind höhere n-Kohlenwasserstoffe, insbesondere C<sub>29</sub>-Alkan, 2-Methyloctan, Undecan und Dodecanol, sowie Mono- und Sesquiterpene mit  $\alpha$ -Pinen und Caryophyllen als Hauptvertreter. Desweiteren findet sich bis zu 0,2 % 2-Methyl-3-buten-2-ol (siehe Abb. 2-8), das Abbauprodukt der Hopfenbittersäure (Nahrstedt und Butterweck 1997).

Durch Extraktion von *Hypericum perforatum* L. mit Petrolether erhält man eine Fett- und Wachsfraktion mit den Paraffinen C<sub>28</sub> und C<sub>30</sub> und den Wachsalkoholen C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub> und C<sub>28</sub>. Darüber hinaus finden sich verschiedene Alkane und Alkanole im Bereich C<sub>16</sub> bis C<sub>29</sub> sowie verzweigt-kettige Alkane (Bronz et al. 1983a,b).

### Sonstige Inhaltsstoffe

An ubiquitären Pflanzensäuren kommen in *Hypericum perforatum* L. Chlorogensäure und Kaffeesäure (< 1 %) vor (siehe Abb. 2-8). Ascorbinsäure (0,04 %) wurde ebenfalls nachgewiesen (Kaul 2000). An stickstoffhaltigen Verbindungen sind insbesondere freie Aminosäuren mit ca. 1 % im getrockneten Kraut (Lapke et al. 1996) zu nennen. Der Gehalt an  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist mit 0,07 % verglichen mit anderen Pflanzen außergewöhnlich hoch (siehe Abb. 2-8). Über Spuren von Alkaloiden berichten Schütt und Schulz (1993). Darüber hinaus finden sich in Johanniskraut die Anthrachinone Stryrin und Oxystryrin (Berghöfer 1987).

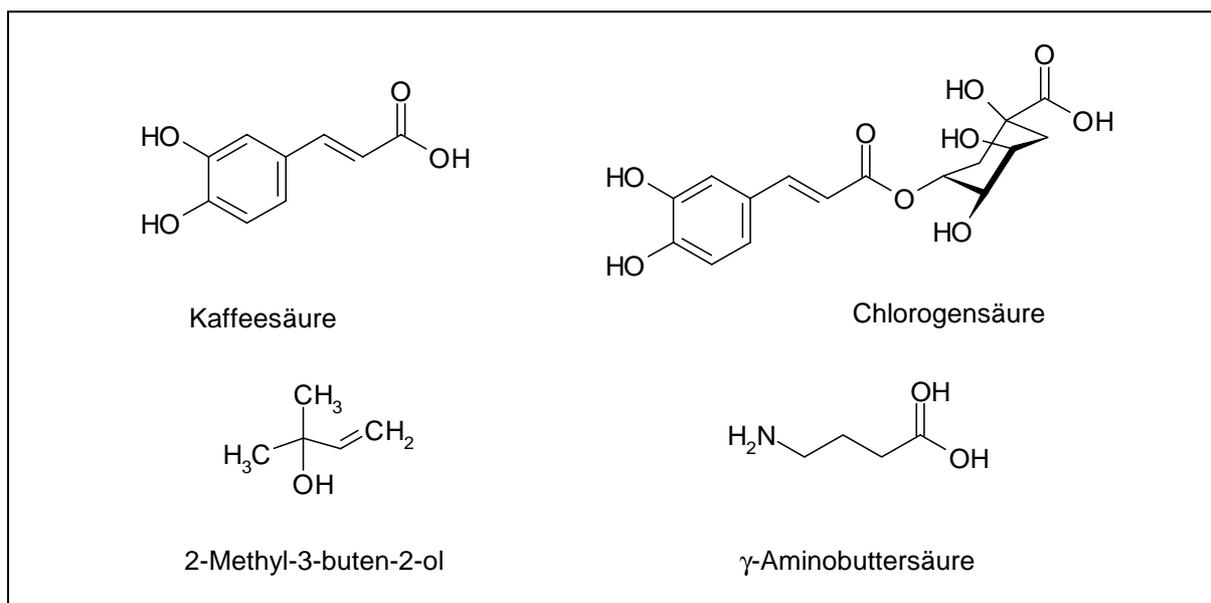


Abb. 2-8 Sonstige Inhaltsstoffe in *Hypericum perforatum* L.

### 2.2.3 Pharmakologie und Klinik von *Hypericum perforatum* L.

Gesamtübersichten zum aktuellen pharmakologisch-klinischen Kenntnisstand zu Johanniskraut einschließlich Pharmakokinetik und Toxikologie der Inhaltsstoffe sowie Nebenwirkungsaspekte finden sich bei Barnes et al. (2001) und Greeson et al. (2001).

Die Kommission E des Bundesgesundheitsamtes (BGA) bewertet das Johanniskraut in der Monographie „Hyperici herba“ (1984) positiv. Als innerliche Anwendungsgebiete einer öligen Zubereitung werden dyspeptische Beschwerden angegeben, äußerlich kommt es zur Wundbehandlung, bei Myalgien und Verbrennungen zur Anwendung. Die Wirksamkeit bei Wundbehandlungen wird der seit längerer Zeit bekannten antibakteriellen Wirkung des Hyperforins zugeschrieben (Gurevich et al. 1971, Reichling et al. 2001). Schempp et al. (2000a) finden keinen photosensibilisierenden Effekt öliger Johanniskrautzubereitungen unterschiedlichen Hypericingehalts nach topischer Applikation. Eine weitere Studie untersucht den Einfluss alkoholisch-wässriger Johanniskrautextrakt-Präparate auf die dermale Immunantwort nach äußerlicher Anwendung und stellt eine immunsuppressive Wirkung fest, die dem Hyperforin zugeordnet werden kann. Dieses Ergebnis stützt die traditionelle Anwendung topischer Johanniskrautpräparate bei entzündlichen Reaktionen der Haut (Schempp et al. 2000b). Bork et al. (1999) identifizieren Hypericin als Hemmstoff von NF- $\kappa$ B, einem zentralen Entzündungs- und Immunmodulator. Eine Übersicht über den aktuellen Stand von Zubereitungen aus *Hypericum perforatum* L. in der Dermatologie geben Schempp et al. (2002).

Andere, nicht-ölige Zubereitungen aus Johanniskraut sind gemäß Kommission E innerlich indiziert bei psychovegetativen Störungen, depressiven Verstimmungszuständen, Angst und nervöser Unruhe. Diese Indikationsgruppe für Zubereitungen aus *Hypericum perforatum* L. spielt heute die Hauptrolle in der arzneilichen Anwendung von Johanniskrautextrakt-Präparaten. In Zusammenhang mit der Indikation „depressive Verstimmungszustände“ führt die Rote Liste 2003 insgesamt 44 Präparate auf, die Zubereitungen aus Johanniskrauttrockenextrakt enthalten.

Während die Wirksamkeit von Johanniskrautextrakten bei leichten bis mittelschweren Depressionen (ICD-10: F32.0, F32.1 oder F33.0) in zahlreichen klinischen Studien belegt werden konnte, ist das antidepressive Wirkprinzip bis heute nicht aufgeklärt und Gegenstand einer kontrovers geführten Diskussion. Als mögliche, für die antidepressive und anxiolytische Wirkung verantwortlichen, Inhaltsstoffgruppen kommen Naphthodianthrone, Phloroglucinole, Flavonoide und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) in Betracht.

Die Entstehung von depressiven Zuständen wird pharmakologisch auf einen Mangel an verschiedenen Neurotransmittern – insbesondere Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) – im synaptischen Spalt zurückgeführt. Über eine Hemmung der Wiederaufnahme dieser Neurotransmitter in die präsynaptische Membran oder durch eine Hemmung ihres Abbaus über die Monoaminoxidase (MAO) oder Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) greifen chemisch-synthetische antidepressive Wirkstoffklassen in den neuronalen Stoffwechsel ein und erhöhen dadurch die Konzentration dieser Neurotransmitter im synaptischen Spalt. Diese Konzentrationserhöhung hat eine adaptive Veränderung der Rezeptordichte an der postsynaptischen Membran zur Folge, die zeitparallel zu der antidepressiven Wirkung dieser Substanzklassen auftritt (Müller et al. 1999).

Für Johanniskrautextrakt-Präparate werden dieselben und zum Teil weitergehende Wirkmechanismen in Betracht gezogen. So zeigen Suzuki et al. (1984) eine Hemmung der MAO durch Hypericin in-vitro. Thiede und Walper (1993) finden ebenfalls eine Hemmung der MAO, allerdings erst bei höheren Hypericin-Konzentrationen. Ein Hypericum-Gesamtextrakt (Ethanol/Wasser 80/20) zeigt sich dem Reinhypericin überlegen. Eine Hemmung der Catechol-O-Methyl-Transferase wird mit Hypericin allein nicht beobachtet. Dagegen zeigen an Flavonoiden und Hypericinen angereicherte Extraktfraktionen eine Hemmung der COMT. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass auf Grund der hohen notwendigen Konzentrationen für eine Hemmung in-vitro Hypericin nicht allein für die antidepressive Wirksamkeit verantwortlich gemacht werden kann. Diese Ergebnisse werden durch Bladt und Wagner (1993) sowie Müller et al. (1997) bestätigt. Letztere stellen jedoch eine verminderte Rückaufnahme von 5-HT in die präsynaptische Membran durch einen kommerziellen Johanniskraut-Trockenextrakt (LI 160) fest und postulieren dies als den Hauptwirkmechanismus der antidepressiven Wirksamkeit von Johanniskrautextrakt-Präparaten. Für eine Beteiligung von Hypericin an der antidepressiven Wirkung von *Hypericum perforatum* L. sprechen auch Ergebnisse aus Tierverhaltensexperimenten (Butterweck et al. 1998, 2001)

Die Hemmung der Rückaufnahme von 5-HT aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptische Membran durch alkoholisch-wässrige Extrakte von *Hypericum perforatum* L. wird von mehreren Autoren bestätigt. Durch Untersuchungen mit hyperforinangereicherten CO<sub>2</sub>-Extrakten, die keine anderen, potentiell wirksamkeitsbestimmenden Inhaltstoffe enthalten, wird Hyperforin als das wirksame Prinzip identifiziert (Müller et al. 1998, Chatterjee et al. 1998). Sloley et al. (2000) untersuchen die 5-HT-Rückaufnahme an Extrakten mit einem standardisierten Hypericingehalt von 0,3 % und unterschiedlichen Hyperforingehalten. Die Autoren finden eine Korrelation der Rückaufnahme von 5-HT mit dem Hyperforingehalt der Extrakte. Vergleichende Untersuchungen von Hyperforin und chemisch-synthetischen Anti-

depressiva zur Hemmung der Serotonin-Rückaufnahme führen Singer et al. (1999) durch. Dabei stellt sich heraus, dass der Wirkmechanismus von Hyperforin dem der chemisch-synthetischen, selektiven Serotonin-Rückaufnahmehemmer (SSRI) entspricht, darüber hinaus jedoch noch andere Mechanismen eine Rolle spielen. Diese Befunde werden gestützt durch eine klinische Studie, in der sich 900 mg Johanniskraut-Extrakt/Tag mit einem Hyperforingehalt von 5 % sowohl gegenüber Placebo als auch gegenüber 900 mg Extrakt/Tag mit 0,5 % Hyperforin überlegen zeigt (Laakmann et al. 1998). Die orale Bioverfügbarkeit von Hyperforin untersuchen Biber et al. (1998). Durch die Gabe von 3 x täglich 300 mg Johanniskrautextrakt mit 5 % Hyperforin erhält man Plasmaspiegel von annähernd 100 ng/ml, entsprechend 180 nmolar.

Der Einfluss wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoffe auf die Rückaufnahme verschiedener Neurotransmitter, wie Serotonin, Noradrenalin, Dopamin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure wird von Wonnemann et al. (2001) untersucht. Neben Hyperforin zeigen nur Adhyperforin und oligomere Procyanidine in-vitro eine nennenswerte Rückaufnahmehemmung. Adhyperforin trägt wesentlich zur 5-HT-Wiederaufnahmehemmung von Johanniskraut-Extrakten bei. Es hemmt die Rückaufnahme der relevanten Neurotransmitter in die präsynaptische Membran 10-mal stärker als Hyperforin (Jensen et al. 2001). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Gehalt von Adhyperforin in Johanniskraut und Johanniskrautextrakt-Präparaten nur ca. 1/6 des Hyperforingehaltes beträgt.

Eine über die Rückaufnahmehemmung verschiedener Neurotransmitter – insbesondere Serotonin – hinausgehende Wirkung von Hyperforin bzw. Johanniskrautextrakt-Präparaten legen verschiedene jüngere Arbeiten nahe. Eine Steigerung der neuronalen Ausschüttung von Glutamat, Aspartat und GABA durch Hyperforin, die mit einer Zunahme des freien, intrazellulären Calciums einhergeht, zeigen Chatterjee et al. (2001). Andere Autoren stellen eine Veränderung der Membranfluidität unter Hyperforineinfluss fest (Eckert und Müller 2001). Die Bindung von Johanniskrautextraktfraktionen und einiger Inhaltsstoffe als Reinsubstanzen an verschiedene Rezeptorstrukturen untersuchen Simmen et al. (2001) und Gobbi et al. (2001). Beide Arbeiten halten fest, dass neben der Rückaufnahmehemmung von Serotonin durch Hyperforin, weitere synergistische Effekte von Hyperforin oder anderen Inhaltsstoffen eine Rolle in der antidepressiven Wirkung von *Hypericum perforatum* L. spielen. Den Einfluss von Johanniskrautextrakt und seinen Inhaltsstoffen auf Ionenkanäle und Membranpotentiale im zentralen Nervensystem untersuchen Krishtal et al. (2001) und Langosch et al. (2001). Eine Beteiligung von Interleukin-6 an der antidepressiven Wirkung finden Calapari et al. (2001) an knock-out-Mäusen.

Die in-vitro-Untersuchungen zum antidepressiven Wirkmechanismus von Johanniskrautextrakten werden durch zahlreiche in-vivo Studien im Tiermodell gestützt. Erhöhte extraneuronale Spiegel an Dopamin im Rattenhirn finden Di Matteo et al. (2000) nach einmaliger Gabe eines Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extraktes. Nach wiederholter Applikation eines methanolischen und eines hyperforinangereicherten Extraktes an Ratten werden erhöhte Plasmaspiegel an Serotonin und Dopamin beobachtet (Rommelspacher et al. 2001). Neuroendokrine Effekte von Johanniskrautextrakten, die in Zusammenhang mit der Wiederaufnahmehemmung verschiedener Neurotransmitter stehen, werden ebenfalls beschrieben (Schüle et al. 2001, Franklin und Cowen 2001). Durch elektroenzephalographische Messungen an Ratten (Dimpfel et al. 1998) und am Menschen (Schellenberg et al. 1998) wird die positive Wirkung eines herkömmlichen Trockenextraktes und von hyperforinangereicherten Extrakten bestätigt. Ergebnisse aus Tierverhaltensstudien stützen die Befunde einer antidepressiven Wirkung von *Hypericum perforatum* L. in-vitro und unterstreichen die zentrale Bedeutung von Hyperforin (Battacharya et al. 1998, Cambarana et al. 2001, Klusa et al. 2001, Misane und Ögren 2001). Eine umfassende Übersicht zu in der Literatur beschriebenen Tierverhaltensstudien unter Gabe von Johanniskrautextrakten einschließlich deren Bewertung geben Müller und Holoubek (2003). Dabei stellen die Autoren die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen den entsprechenden Resultaten biochemischer Untersuchungen gegenüber. Neben der herausragenden Rolle von Hyperforin deuten die vorliegenden Daten auf eine Beteiligung weiterer Inhaltsstoffe an der antidepressiven Wirkung von Zubereitungen aus *Hypericum perforatum* L. hin. So zeigen Butterweck et al. (2000) sowie Butterweck und Nahrstedt (2003) eine antidepressive Wirksamkeit der Flavonoidfraktion von Johanniskrauttrockenextrakten im Tierverhaltensmodell. In einer Untersuchung zum Alkoholsuchtverhalten von Ratten zeigt sich ein hyperforinangereicherter CO<sub>2</sub>-Extrakt gegenüber einem methanolisch-wässrigen Extrakt überlegen (Perfumi et al. 2001).

Die bisher vorliegenden Daten zur antidepressiven Wirkung von *Hypericum perforatum* L. geben Anlass zu der Vermutung, dass mehrere Inhaltsstoffe an der Wirkung beteiligt sind (Simmen et al. 2001, Müller und Holoubek 2003). Die Monographien „St John's Wort“ und „Powdered St John's Wort Extract“ des USP 26/NF 21 (2003) tragen dieser Tatsache Rechnung und machen Gehaltsangaben sowohl für Hypericin als auch für Hyperforin. Insgesamt betrachtet kann daher nur von wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen gesprochen werden. Dies schlägt sich auch im Rahmen des Zulassungsverfahrens nieder, wonach bei der Deklaration von Johanniskrautextrakt-Präparaten eine fixe Extraktmenge und eine Spanne für die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe gefordert wird (Bühler 1995).

Die Wirksamkeit von Johanniskraut bei leichten bis mittelschweren Depressionen konnte in zahlreichen klinischen Studien sowohl gegenüber Placebo als auch gegenüber chemisch-synthetischen Antidepressiva belegt werden. Eine systematische Übersicht und Metaanalyse über Studien mit Zubereitungen aus *Hypericum perforatum* L. bis Mitte der 1990er Jahre findet sich bei Linde et al. (1996). Auf Basis von insgesamt 14 in die Untersuchung einbezogenen placebokontrollierten Studien zeigen Johanniskraut-Extrakte einen 2-3fach stärkeren Effekt auf der Hamilton-Depressionsskala (HAMD-Skala) als Placebo. In sechs Studien stellt sich eine gegenüber chemisch-synthetischen Antidepressiva vergleichbare Wirksamkeit heraus. Eine umfassende Zusammenstellung und Bewertung klinischer Studien zur Wirksamkeit von Johanniskraut gegenüber Placebo und chemisch-synthetischen Antidepressiva geben Whiskey et al. (2001) unter zusätzlicher Einbeziehung neuerer Studien. Das Ergebnis der Metaanalyse deckt sich mit dem von Linde et al. (1996). Eine weitere Zusammenstellung und Bewertung von kontrollierten klinischen Studien zur Wirksamkeit von Johanniskraut-Präparaten gibt Schulz (2002, 2003). Darin wird unterschieden zwischen Trockenextrakten aus *Hypericum perforatum* L. auf ethanolisch-wässriger Basis (50 oder 60 % [V/V]) oder methanolisch-wässrigen Trockenextrakten (80 % [V/V]). In 10 von 12 placebokontrollierten Studien zeigen Johanniskraut-Präparate eine signifikante Überlegenheit gegenüber Placebo. Zwischen den unterschiedlichen Herstellungsmethoden der Trockenextrakte sind keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Die überwiegend hohen Ansprechraten von 20-30 % unter Placebothherapie deuten auf eine besonders wichtige Rolle des behandelnden Arztes bei leichten bis mittelschweren depressiven Erkrankungen hin. In kontrollierten klinischen Studien zeigt Johanniskraut eine den chemisch-synthetischen Antidepressiva vergleichbare, in einzelnen Studien sogar stärkere Wirksamkeit. Als Dosischwelle für die Wirksamkeit von *Hypericum perforatum* L. bei leichten bis mittelschweren depressiven Erkrankungen sind 300 mg Trockenextrakt pro Tag anzusehen, in einem Dosisbereich von 500-1000 mg pro Tag zeigen Johanniskraut-Präparate eine vergleichbare Wirksamkeit wie chemisch-synthetische Antidepressiva. Zur Wirksamkeit von Johanniskraut bei schweren Depressionen liegen keine ausreichenden Daten vor.

Während Johanniskraut-Präparate in klinischen Studien äußerst geringe Nebenwirkungs-raten von 1-3 % mit überwiegend gastrointestinalen Beschwerden und allergischen Reaktionen zeigen (Schulz 2001), wurde in der jüngeren Vergangenheit immer wieder von ernsthaften Wechselwirkungen bei Gabe von Johanniskraut-Präparaten berichtet. Besonders kritisch, weil akut lebensbedrohend ist die Verringerung der Cyclosporin-Plasmaspiegel bei Transplantationspatienten bei gleichzeitiger Gabe von Johanniskraut, so dass in diesem Fall eine absolute Kontraindikation vorliegt (Mai et al. 2000, Bauer et al. 2002b). Eine umfassende Übersicht zu Fallberichten und Studien zu Wechselwirkungen mit Zubereitungen aus *Hypericum*

*cum perforatum* L geben Johne et al. (2001) und Johne und Roots (2003). Die auftretenden Wechselwirkungen sind sowohl pharmakodynamischer als auch pharmakokinetischer Natur. Pharmakodynamische Wechselwirkungen sollten insbesondere bei gleichzeitiger Gabe von chemisch-synthetischen Antidepressiva insbesondere SSRIs bedacht werden. Pharmakokinetische Wechselwirkungen sind insbesondere bei gleichzeitiger Gabe von Johanniskraut-Präparaten mit hochwirksamen Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite in Betracht zu ziehen. Neben dem bereits erwähnten Cyclosporin sind hier insbesondere herzirksame Glykoside (Johne et al. 1999), Amitriptylin (Johne et al. 2000) und Antikoagulantien vom Cumarin-Typ zu nennen. Die beobachteten Wechselwirkungen können sowohl über die metabolisierenden intestinalen und hepatischen Cytochrom P450-Enzyme als auch über p-Glykoprotein vermittelt werden. So zeigen Dürr et al. (2000) und Moore et al. (2000) in-vitro eine Induktion des Cytochrom P450-Isoenzym CYP 3A4 unter Gabe von kommerziellen Johanniskrautextrakt-Präparaten. Demgegenüber steht eine Arbeit von Obach (2000), der eine Hemmung verschiedener Cytochrom P450-Isonenzyme zeigen kann. Eine Induktion von p-Glykoprotein, dass Fremdstoffe aktiv aus intestinalen Zellen heraus in den Gastrointestinaltrakt transportiert durch Johanniskraut-Extrakte wird durch Hennessy et al. (2002) nachgewiesen. Alles in allem zeigen die vorliegende Daten, dass klinisch relevante Wechselwirkungen unter der Gabe von Zubereitungen aus *Hypericum perforatum* L. auftreten können, die jedoch nicht über die chemisch-synthetischer Arzneistoffe, insbesondere Antidepressiva hinausgehen. Die Frage nach den Mechanismen der Wechselwirkungen und der daran beteiligten Inhaltsstoffe von Johanniskraut ist bis heute noch nicht abschließend geklärt (Nöldner 2001).

# KAPITEL 3

## BESCHREIBUNG DER EXTRAKTIONSANLAGE

### 3.1 Allgemeine Daten zur CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Extraktionsanlage im Pilotmaßstab ist eine Sonderanfertigung der Fa. Sitec. Die Anlage arbeitet diskontinuierlich im Batchverfahren mit wahlweise 1,2- oder 3,3 l-Extraktionshülse und ist für die Extraktion mit verdichteten, nicht brennbaren Gasen im Druckbereich 40 bis 500 bar und Temperaturen zwischen 30 und 80 °C ausgelegt. Die Abscheidung erfolgt entweder ein- oder zweistufig. Eine Zudosierung von Schleppmitteln in Form von Wasser, organischen Lösungsmitteln oder Mischungen daraus ist über ein separates Pumpensystem möglich. Das für die Extraktion verwendete Gas wird durch Verdampfung mit anschließender Kondensation rückgewonnen und dem Kreislauf wieder zugeführt.

### 3.2 Fließschema der CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage

Ein vereinfachtes Fließschema der verwendeten CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage ist in Abb. 3-1 wiedergegeben.

Flüssiges CO<sub>2</sub> wird von unten aus dem Vorratstank **(1)** entnommen und gelangt über einen Unterkühler **(2)** in die Hochdruckpumpe **(3)**. Sowohl Vorratstank, als auch Unterkühler sind doppelt gemantelt, die Kühlung erfolgt durch ein Kälteaggregat R22 (ca. 1,5 kW, Fa. Danfoss) mit HFKW 134a als Kühlmittel. Im Unterkühler wird das flüssige CO<sub>2</sub> soweit abgekühlt, dass Kavitationen im Pumpenraum vermieden werden. Die Hochdruckpumpe EH-M-210V1 (Fa. Lewa) ist als Membranpumpe ausgeführt. Die maximale Förderate beträgt 20 l/h bei 500 bar. Durch die im Pumpenkopf geleistete Kompressionsarbeit wird Wärme frei, diese wird über einen Kühlmantel des Pumpenkopfes in Verbindung mit einem Kühlthermostaten Minichiller cc (140 W bei -10 °C, Fa. Peter Huber) mit Ethanol als Wärmeträger abgeführt. Das flüssige CO<sub>2</sub> wird durch die Pumpe auf Extraktionsdruck verdichtet und in einem Wärmetauscher **(4)** auf Extraktionstemperatur erwärmt. Der Wärmetauscher ist so ausgelegt, dass das CO<sub>2</sub> an dessen Ende, vor Eintritt in den Extraktionsbehälter **(5)**, bereits Extraktionsbedingungen hinsichtlich Druck und Temperatur erreicht. Der Wärmetauscher wird zur Hochdruckpumpe **(3)** hin durch ein Rückschlagventil abgegrenzt, um ein Rückfließen des verdichteten CO<sub>2</sub> während der Saugphase der Pumpe zu verhindern. Der für Extraktionen

mögliche Druckbereich wird nach unten durch den minimalen Saugdruck der Hochdruckpumpe **(3)** bei einer vorgegebenen Temperatur des Unterkühlers und nach oben durch die Bauweise der Hochdruckpumpe und der gesamten Extraktionsanlage begrenzt. Er liegt zwischen 40 und 500 bar. Vor der Extraktion wird das zu extrahierende Gut in einer Extraktionshülse, die an ihren Enden mit je einer Sintermetallplatte verschlossen ist, in den Extraktionsbehälter eingebracht. Die Sintermetallplatten sorgen dafür, dass der CO<sub>2</sub>-Strom fein verteilt wird und verhindern somit Kanalbildungen im Drogenbett. Im Extraktionsbehälter findet die Beladung des Kohlendioxids mit Extraktivstoffen statt. Der Extraktionsbehälter ist doppelt gemantelt und wird zusammen mit dem Wärmetauscher von einem Thermostaten E203 (2,2 kW, Fa. Lauda) mit Wasser als Wärmeträger temperiert.

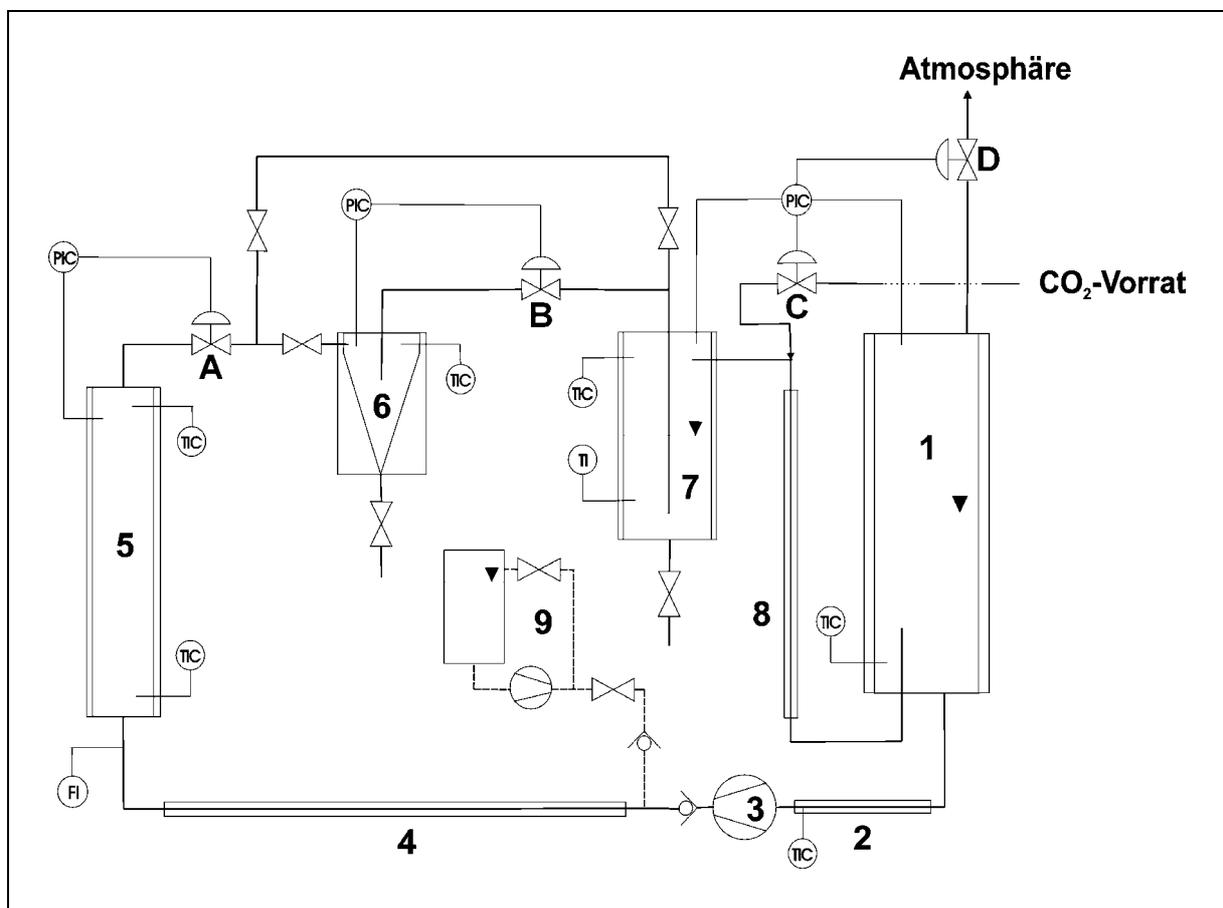


Abb. 3-1 Fließschema der verwendeten Extraktionsanlage (Erklärung 1-9: siehe Text)

$\nabla$  = Ventil,  $\nabla$  = pneumatisches Druckregelventil,  $\nabla$  = Rückschlagventil,  
 FI = Flussmesser, PI(C) = Druckmesser(-regler),  
 TI(C) = Temperaturmesser(-regler)

Massenfluss und Dichte des überkritischen Fluids werden unmittelbar vor Eintritt des CO<sub>2</sub> in den Extraktionsbehälter mittels eines Massendurchflussmessers Mass 2100 – DI 1,5 (Fa.

Danfoss) bestimmt. Die Temperaturmessung im Extraktionsbehälter erfolgt an zwei Stellen: beim Eintritt des unbeladenen CO<sub>2</sub> direkt in dessen Strömungskanal und bei Austritt des beladenen CO<sub>2</sub> aus dem Extraktionsbehälter. Das beladene CO<sub>2</sub> verlässt den Extraktionsbehälter und wird über ein pneumatisch betriebenes, stetig regelndes Ventil 80037-IP (Fa. Kämmer) **(A)** auf den Zwischenabscheidedruck entspannt. Der Zwischenabscheider **(6)** ist als Fluidzyklon ausgeführt. In diesem kommt es in Abhängigkeit von den gewählten Bedingungen zu einer Teilseparation des beladenen CO<sub>2</sub> von den Extraktivstoffen. Mögliche Zwischenabscheidedrücke liegen im Bereich zwischen 40 und 500 bar bei Temperaturen zwischen 0 und 80 °C. Die Temperatur wird im Strömungskanal bei Austritt des noch teilbeladenen CO<sub>2</sub> aus dem Zwischenabscheider gemessen, die Temperierung erfolgt mittels eines Thermostaten FP50 HP (500 W bei -20 °C, Fa. Julabo) mit Siliconöl als Wärmeträger. Vom beladenen CO<sub>2</sub>-Strom separierte Extraktivstoffe sammeln sich im unteren Teil des Fluidzyklons und gelangen von dort in einen Vorratsbehälter (nicht abgebildet). Noch teilbeladenes CO<sub>2</sub> verlässt den Fluidzyklon nach oben und wird über ein zweites, pneumatisch betriebenes, stetig regelndes Ventil **(B)** auf den Endabscheidedruck entspannt. Die Zwischenabscheidestufe kann wahlweise über einen Bypass umgangen werden, so dass der gesamte Extrakt im Endabscheider **(7)** anfällt. In diesem herrschen dieselben Bedingungen wie im Vorrattank **(1)**, CO<sub>2</sub> liegt im flüssigen Aggregatzustand vor und steht im Gleichgewicht mit der Gasphase. Aufgrund der geringeren Löslichkeit der Extraktivstoffe in flüssigem CO<sub>2</sub> kommt es zur Separation. In Abhängigkeit von den Eigenschaften der Extraktivstoffe verbleibt jedoch ein gewisser Teil in Lösung. Der Endabscheider wird über einen thermostatisierten Doppelmantel (Thermostat E103, 1,5 kW, Fa. Lauda) mit Wasser als Überträgermedium beheizt, so dass flüssiges CO<sub>2</sub> kontinuierlich verdampft und damit keine Lösungskapazität mehr aufweist. Die Temperatur im Endabscheider wird an zwei Stellen gemessen: zum einen in der Flüssigphase, zum anderen in der Gasphase. Mögliche Endabscheidedrücke liegen zwischen 40 und 80 bar. Die Begrenzung nach unten ist durch die maximal erreichbare Temperatur im Unterkühler **(2)** und den sich daraus ergebenden minimalen Saugdruck der Hochdruckpumpe **(3)** gegeben. Die Begrenzung nach oben ergibt sich aus der Bauweise des Endabscheiders. Beim Betrieb der Anlage bildet sich im Endabscheider ein Niveau an flüssigem CO<sub>2</sub> aus, das mit der Gasphase im Gleichgewicht steht. Dadurch verliert man im Vergleich zu überkritischem CO<sub>2</sub> einen Freiheitsgrad, d. h. bei einem vorgegebenen Druck stellt sich die Temperatur in der Flüssigphase entsprechend von selbst ein. Separierte Extraktivstoffe sammeln sich am Boden und können entweder während der Extraktion durch Öffnen eines Ablassventils oder im Anschluss an die Extraktion nach Entspannung auf Umgebungsdruck aus dem Separator entnommen werden. Im Separator verdampftes CO<sub>2</sub> wird über einen Kondensator **(8)** verflüssigt von unten, d. h. über die Flüssigphase in den Vorrattank **(1)** eingeleitet. Der Kondensator ist als doppelt gemantelter Wärmetauscher ausgeführt und wird

vom selben Kälteaggregat wie Vorratstank und Unterkühler **(2)** gespeist. Der Druck im Vorratstank und damit der Druck im Endabscheider **(7)** wird über zwei nichtstetig regelnde, pneumatisch angetriebene Ventile eingestellt – im Falle eines zu geringen Druckes wird CO<sub>2</sub> aus externen Vorratsflaschen entnommen **(C)**, entsprechend wird bei zu hohem Druck CO<sub>2</sub> in die Atmosphäre abgeleitet **(D)**.

Über ein gesondertes System bestehend aus Lösungsmittelvorratsbehälter und Membrandosierpumpe EK-M-2101V (Fa. Lewa) **(9)** bietet die Extraktionsanlage die Möglichkeit, dem CO<sub>2</sub>-Strom vor dessen Eintritt in den Wärmetauscher sog. Modifier in Form von organischen Lösungsmitteln mit einer maximalen Förderrate von 2 l/h bei 500 bar zuzuführen. Um den minimalen Saugdruck der Membrandosierpumpe von 3,5 bar sicherzustellen wird der Vorratsbehälter mit 5 bar Druckluft beaufschlagt. Ein Rückschlagventil grenzt die Eintrittsstelle des Lösungsmittels in den CO<sub>2</sub>-Strom zur Druckseite der Membrandosierpumpe hin ab und verhindert dadurch ein Rückfließen von CO<sub>2</sub> und Lösungsmittel während der Saugphase der Membrandosierpumpe.

Die Absicherung der Anlage gegen Überdruck erfolgt mittels drei separater Berstscheiben für Extraktionsbehälter **(5)**, Zwischenabscheider **(7)** und Lösungsmitteldosiersystem **(9)** mit einem maximalen Berstdruck von 550 bar und mit 2 separaten Berstscheiben für Vorratstank **(1)** und Endabscheider **(7)** mit einem maximalen Berstdruck von 100 bar.

Die Anlage verfügt über einen Anschluss an die externen CO<sub>2</sub>-Vorratsflaschen und einen Anschluss für Druckluft mit mindestens 5 bar (Hausleitung, Pharmazeutische Technologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) zur Druckversorgung der pneumatischen Ventile und zur Beaufschlagung des Lösungsmittelvorratsbehälters mit Druckluft, ferner einen Drehstromanschluss 380 V/16 A und einen Wechselstromanschluss 220 V/16 A. Überschüssiges CO<sub>2</sub> wird direkt in das hausinterne Abzugssystem eingeleitet.

### 3.3 Thermodynamik des Extraktionsprozesses

Die Zustandsänderung des im Kreislauf geführten Gases kann anhand eines Temperatur-Entropie-Diagrammes (T,S-Diagramm) veranschaulicht werden. Die hierbei auftretenden Flächen unter der Kurve einer Zustandsänderung repräsentieren umgesetzte Wärmemengen, entsprechend den Gl. 3-1 und 3-2.

$$S = \frac{Q}{T} \quad (3-1)$$

$$dQ = T \cdot dS \quad (3-2)$$

S	Entropie [J·kg <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> ]
T	Temperatur [K]
Q	Wärmeenergie [J]

Die Gibb'sche Phasenregel (Gl. 3-3) stellt einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der unabhängigen Variablen (Freiheitsgrade F), der Zahl der vorliegenden Komponenten (K) und der dabei auftretenden Phasen (P) her. Im T,S-Diagramm eines Systems bestehend aus einer reinen Komponente (K = 1) ist demnach eine homogene Phase durch eine Fläche, der Koexistenzbereich zweier Phasen durch eine Linie charakterisiert.

$$F = K - P + 2 \quad (3-3)$$

F	Anzahl der Freiheitsgrade
K	Anzahl der Komponenten
P	Anzahl der Phasen

In Abb. 3-2 ist ein exemplarisches T,S-Diagramm für einen Extraktionsprozess bei Kreislaufbetrieb mit einer Flüssiggas-Pumpe dargestellt. Kennzeichnend sind die Bereiche, in denen Kohlendioxid als homogene flüssige, gasförmige und überkritische Phase vorliegt sowie weiterhin das Zweiphasengebiet flüssig/gasförmig. Die gestrichelte Linie, die den überkritischen Bereich umschließt, dient lediglich der Abgrenzung und stellt keine Phasengrenze im eigentlichen Sinne dar. An Punkt **A** liegt CO<sub>2</sub> gasförmig bei einem Druck von 40 bar vor. Durch isobare Abkühlung beginnt bei Eintritt in das Zweiphasengebiet (**B**) die Kondensation des Kohlendioxids. Während des isobaren Kondensationsvorganges besitzt das System einen Freiheitsgrad. Das bedeutet, dass bei sich änderndem Verhältnis der Mengen an flüssigem und gasförmigem CO<sub>2</sub> sowohl Druck als auch Temperatur konstant bleiben. Der Molenbruch an flüssigem Kohlendioxid nimmt dabei kontinuierlich zu und ist gleich 1, wenn das Zweiphasengebiet im Punkt **C** verlassen wird. Um Kavitationen im Pumpenraum durch verdampfendes CO<sub>2</sub> während der Ansaugphase zu vermeiden, wird dieses zunächst isobar unterkühlt (**C** → **D**) und anschließend durch die Pumpe auf den Extraktionsdruck verdichtet (**E**). Dieser Prozessschritt wird idealisiert als adiabatisch betrachtet. Das bedeutet, dass dabei keinerlei Wärmeverluste auftreten. Geht die Druckerhöhung adiabatisch reversibel vonstat-

ten, so verläuft sie bei konstanter Entropie (isentrop). Durch isobare Wärmezufuhr erreicht man die Extraktionstemperatur von 40 °C (Extraktionspunkt F). Die Abscheidung erfolgt durch isenthalpe Drosselung auf den Abscheidedruck von 40 bar. Eine vollständige Trennung von CO<sub>2</sub> und extrahiertem Material wird durch Wärmezufuhr erreicht. Dabei wird der Molenbruch flüssig/gasförmig kontinuierlich verkleinert und erreicht den Wert null, wenn sämtliches CO<sub>2</sub> gasförmig vorliegt (B) und praktisch keine Lösungskapazität mehr aufweist.

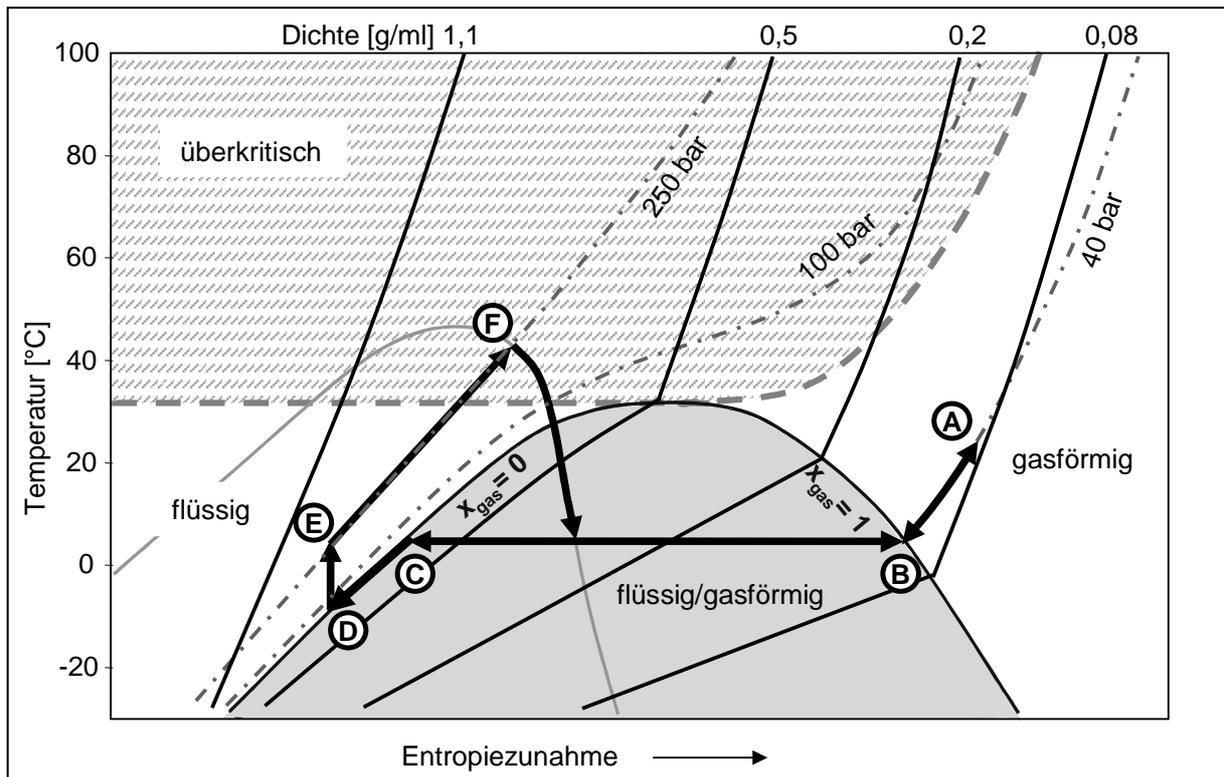


Abb. 3-2 Extraktionskreislauf im T,S-Diagramm von CO<sub>2</sub> (Erklärung A-F: siehe Text)

■ Zweiphasengebiet: flüssig/gasförmig, ▨ überkritischer Zustand  
 ( — ) Isochoren, ( - - - ) Isobaren; ( — · — ) Isenthalpe

Drosselung bedeutet eine Druckreduktion ohne Gewinn von technischer oder kinetischer Arbeit. Sie verläuft immer in Richtung zunehmender Entropie und stellt einen adiabatisch, irreversiblen (isenthalp) Prozess dar. Bei der Drosselung realer Gase kommt es auf Grund des Joule-Thomson-Effektes zu einer Abkühlung des Gases. Zwischen den Molekülen realer Gase bestehen anziehende Wechselwirkungen, die bei einer Druckabsenkung überwunden werden müssen. Bei adiabatischer Prozessführung kann diese Energie nicht aus der Umgebung zugeführt werden, sondern muss dem Gas selbst entzogen werden, das sich dabei abkühlt. Umgekehrt kann bei hohen Drücken eine Erwärmung auftreten, die darauf zurückzuführen ist, dass die Teilchen so stark angenähert werden, dass es auf Grund ihres Eigenvolumens zu abstoßenden Kräften kommt und die damit einhergehende Expansion in Form von

Wärmeenergie frei wird. Die anziehenden und abstoßenden Kräfte berücksichtigt van der Waals in seiner  $p/v/T$ -Zustandsgleichung für reale Gase (Gl. 3-4). Diese gehen auch in die Berechnung des Joule-Thomson-Effektes ein (Gl. 3-5).

$$\left(p + \frac{a}{v^2}\right) \cdot (v - b) = R \cdot T \quad (3-4)$$

$p$	Druck [Pa]
$R$	allgemeine Gaskonstante [8,314 J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> ]
$T$	Temperatur [K]
$\frac{a}{v^2}$	Binnendruck des Gases, bedingt durch Anziehungskräfte [Pa]
$v$	molares Volumen
$v - b$	Kovolumen, bedingt durch Eigenvolumen der Teilchen [m <sup>3</sup> ]
$a$	van der Waals-Konstante [Pa·m <sup>6</sup> ·mol <sup>-2</sup> ]
$b$	van der Waals-Konstante [m <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]

$$\eta_{JT} = \left(\frac{\partial T}{\partial p}\right)_H = \frac{\frac{2a}{R \cdot T} - b}{c_p} \quad (3-5)$$

$\eta_{JT}$	Joule-Thomson-Effekt
$c_p$	Wärmekapazität des Gases bei konstantem Druck [J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> ]

Die Konstanten  $a$  und  $b$  in den Gl. 3-4 und 3-5 können experimentell ermittelt oder aus den kritischen Daten eines Gases über die Gl. 3-6 und 3-7 berechnet werden.

$$p_c = \frac{a}{27 \cdot b^2} \quad (3-6)$$

$$T_c = \frac{8 \cdot a}{27 \cdot R \cdot b} \quad (3-7)$$

$p_c$	kritischer Druck [Pa]
$T_c$	kritische Temperatur [K]

Auf der Grundlage der van der Waals-Zustandsgleichung für reale Gase wurden weitere „equations of state“ (EOS) aufgestellt, mit dem Ziel, experimentelle Befunde in ein mathema-

tisches Modell zu überführen. In diesem Zusammenhang sei die Bender-EOS als Beispiel einer multiparametrischen Gleichung erwähnt. Diese liefert für den flüssigen und überkritischen Zustand einer Reinsubstanz (z. B. Kohlendioxid) eine sehr exakte Anpassung an empirische Daten und erlaubt somit auch Vorhersagen zu treffen (Bender 1970). Ein Überblick über die Entwicklung und den Nutzen einer Reihe von Zustandsgleichungen gibt Brunner (1994). Dabei geht er auch auf die Grenzen ihrer Aussagekraft ein und liefert ausführliche Erläuterungen und Herleitungen der für Extraktionsprozesse relevanten thermodynamischen Parameter.

### 3.4 Beschreibung ausgewählter Regelkreise der Extraktionsanlage

#### 3.4.1 Allgemeines zur Regelung

Der Begriff Regelung beschreibt einen Vorgang, bei dem der vorgegebene Wert einer Größe fortlaufend durch Eingriff auf Grund von Messungen dieser Größe hergestellt und aufrecht erhalten wird (Bauer et al. 2002a). Ein Regelkreis besteht demnach aus einer Regelgröße, deren aktueller Istwert über einen Messwertempfänger erfasst und über ein Messsignal einer zentralen Reglereinheit zugeführt wird. Die zentrale Reglereinheit vergleicht den Istwert mit dem vorgegebenen Sollwert und steuert über eine Stellgröße ein Stellglied an, das seinerseits auf die Regelgröße einwirkt (Abb. 3-3). Betrachtet man z. B. ein Temperierbad, so kann der Messwertempfänger z. B. ein Thermoelement sein, das der zentralen Reglereinheit ein Messsignal in Form einer Spannung zuführt. Die Reglereinheit vergleicht Istwert mit Sollwert und steuert über die Stellgröße in Form einer Spannung ein Heizelement als Stellglied an.

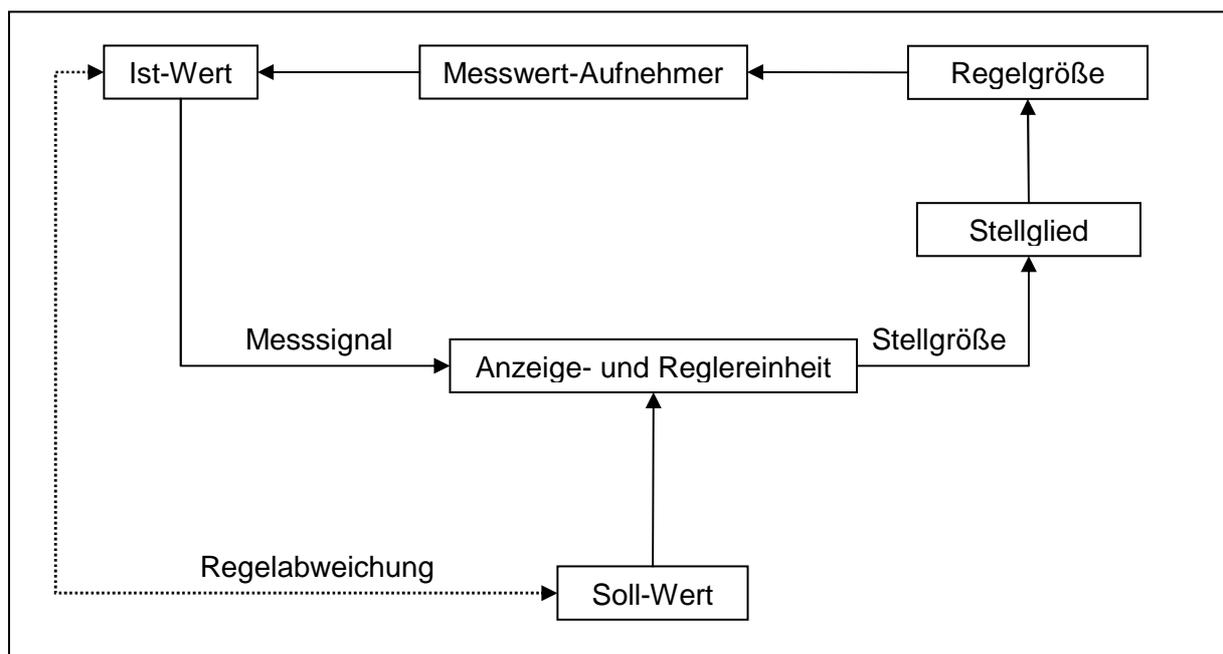


Abb. 3-3 Allgemeine schematische Darstellung eines Regelkreises

Man unterscheidet unstetige und stetige Regelungen. Unstetige Regelungen besitzen eine Stellgröße mit fixem Wert, die im Falle einer Regelabweichung aktiv, ansonsten inaktiv ist. Für ein Temperierbad bedeutet dies, dass ab einer bestimmten Temperaturabweichung die Heizung mit einer konstanten Leistung eingeschaltet wird und entsprechend wieder abgeschaltet wird, wenn die Temperaturabweichung ausgeglichen ist. Unstetige Regelungen führen zu einem starken Schwingen der Regelgröße um den Sollwert.

Dem stehen stetige Regelungen, bei denen die Stellgröße dynamisch an die Regelabweichung angepasst wird, gegenüber. Man unterscheidet Proportional-, Integral- und Differential-Regler. Bei Proportional-Reglern (P-Regler) ist die Höhe der Stellgröße proportional zur Regelabweichung, d. h. hohe Regelabweichungen führen zu hohen Stellgrößen und umgekehrt. Die Heizleistung eines Temperierbades würde demnach an die Höhe der Temperaturabweichung vom Sollwert angepasst werden. Aufgrund von Trägheiten im System, führt der Proportional-Regler zu relativ starken Schwingungen um den Sollwert. Der Integral-Regler (I-Regler) ändert die Stellgröße mit einer Geschwindigkeit, die proportional zur Regelabweichung ist. Dies bedeutet, dass bei gegebener Regelgröße die Stellgröße solange verändert wird, bis die Regelabweichung abnimmt. Dies führt zu einer verlangsamt Änderung bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Regelabweichung gleich null ist. Übertragen auf ein Temperierbad wird die Heizleistung bei gegebener Regelabweichung solange gesteigert, bis die Regelabweichung abnimmt. Dadurch verlangsamt sich die Steigerung der Heizleistung bis die Regelabweichung gleich null ist und damit die Heizleistung unverändert bleibt – Wärmeverluste und über die Heizung zugeführte Wärme stehen im Gleichgewicht. Integral-Regler regeln solange wie eine Regelabweichung vorliegt, der Regelvorgang ist relativ langsam, ein Überschwingen tritt seltener auf. Der Differential-Regler (D-Regler) ändert die Stellgröße proportional zur Änderungsgeschwindigkeit der Regelgröße, die Höhe der Regelabweichung hat keinen Einfluss auf die Stellgröße. Für ein Temperierbad bedeutet dies, dass die Heizleistung umso höher ist, je schneller die Temperatur des Bades abfällt. Differential-Regler haben die Aufgabe, rasch auftretende Störgrößen zu unterdrücken. Um eine optimale Anpassung der Regelung an die Problemstellung zu erreichen werden Regler mit gemischter Charakteristik zusammengestellt, z. B. PI-, PD- oder PID-Regler.

### **3.4.2 Temperaturregelkreise der CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage**

Als Messwertaufnehmer für die Temperaturmessung an der CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage werden ausschließlich Thermoelemente des Typs Eisen-Konstantan (Fe-Cu/Ni) der Fa. Sitec eingesetzt. PID-Regler des Typs 2416 (Fa. Eurotherm) dienen als zentrale Anzeige- und Reglereinheit und steuern mit Ausnahme der Temperaturregelung im Zwischenabscheider un stetig

regelnde Magnetventile als Stellglieder über ein analoges Spannungssignal (0-100 mV) an. Unstetig heißt in diesem Zusammenhang, dass die Magnetventile entweder offen oder geschlossen sind und der Öffnungsgrad über die Zeit gesteuert wird. Ein Öffnungsgrad von 50 % bedeutet beispielsweise, dass das Magnetventil die Hälfte der Zeit geöffnet und die andere Hälfte geschlossen ist. Diese Magnetventile steuern den Fluss des Wärmeträgers im Doppelmantel des entsprechenden Bauteils, der vom Thermostaten bzw. Kälteaggregat erzeugt wird. Dies bedeutet, dass sowohl Heizthermostate als auch Kälteaggregate auf eine fixe Über- bzw. Untertemperatur eingestellt werden und die Wärmezufuhr an den Verbraucher im Sinne einer Temperaturregelung im Verbraucher geregelt wird. Die Tatsache, dass die Temperatur des Wärmeträgers im Thermostaten bzw. Kälteaggregat ihrerseits intern geregelt wird, bleibt davon unberührt.

Für die Temperaturregelung im Zwischenabscheider ist eine direkte Ansteuerung des Programmgebers über einen Analogeingang (0-10 V) des Thermostaten FP50 HP vorgesehen. Dieses Analogsignal wird im Regler erzeugt und auf den Thermostaten übertragen. Der Arbeitsbereich ergibt sich aus der zuvor erfolgten Zuordnung der Grenzen des Analogsignals zu einer oberen und unteren Grenztemperatur des Thermostaten. Das aktuelle analoge Eingangssignal hängt von der Höhe der Regelabweichung im Zwischenabscheider ab und wirkt über den analogen Eingang auf die Sollwertvorgabe im Thermostaten innerhalb des vorgeählten Arbeitstemperaturbereichs ein. Der Thermostat regelt entlang dieser Sollwertvorgaben seine Badtemperatur intern. Insofern besteht der Regelkreis aus zwei hintereinander geschalteten Reglern: eine Regelabweichung im Zwischenabscheider führt im Regler der Extraktionsanlage zu einer Stellgröße die auf die Sollwertvorgabe des Thermostaten als Stellglied einwirkt. Entsprechend dieser Sollwertvorgabe und der sich daraus ergebenden internen Regelabweichung im Thermostaten wird dessen Kühl- bzw. Heizleistung als Stellgröße angepasst und damit die Temperatur im Sinne der Temperaturvorgabe im Zwischenabscheider verändert. Das Problem, das sich aus dieser Anordnung ergibt, ist die sehr lange Regelstrecke mit hoher Trägheit und dadurch bedingt starken Schwankungen um den Sollwert.

### **3.4.3 Druckregelkreise der CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage**

Als Aufnehmer für die Messung der Drücke werden Druckmessumformer ED 517 (Fa. Bourdon-Haenni) für unterschiedliche Druckbereiche eingesetzt: für den Hochdruckbereich mit Extraktionsbehälter und Zwischenabscheider 0-600 bar, für den Niederdruckbereich mit Endabscheider und Vorratstank 0-100 bar. Die Umformer sind mit einer Kraftmessdose aus-

gestattet, die mit 24 V Gleichspannung gespeist wird und ein druckabhängiges Ausgangssignal in Form eines Stromes (4-20 mA) liefert.

### 3.4.3.1 Regelung im Hochdruckbereich

PID-Regler 2408 (Fa. Eurotherm) bilden die zentrale Anzeige- und Regeleinheit. Als Stellglieder für die Regelung des Druckes im Extraktionsbehälter bzw. Zwischenabscheider werden stetig regelnde Kämmer-Ventile 80037-IP (Fa. Kämmer) mit elektropneumatischem Stellungsregler eingesetzt. Der Öffnungsgrad solcher stetig regelnden Ventile ist im Gegensatz zu Magnetventilen nicht über die Zeit sondern über die tatsächliche Öffnung des Ventils definiert. Ein Öffnungsgrad von z. B. 50 % bedeutet in diesem Fall, dass 50 % der Querschnittsfläche des Ventils geöffnet sind. Stetig regelnde Ventile ermöglichen eine Druckregelung unter Gewährleistung eines kontinuierlichen Volumenstroms. Kämmer-Ventile werden pneumatisch betrieben, das Funktionsprinzip ist in Abb. 3-4 wiedergegeben.

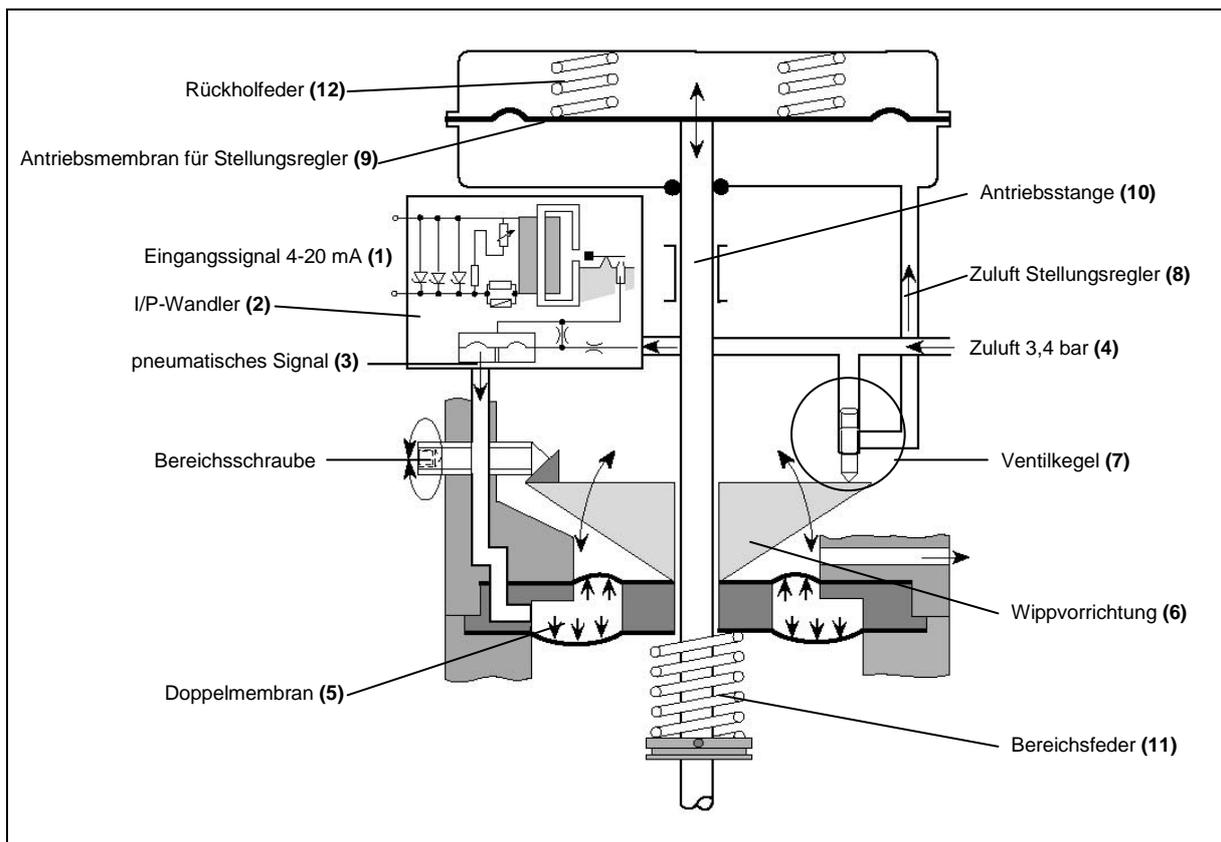


Abb. 3-4 Funktionsprinzip eines Kämmer-Ventils mit elektropneumatischem Stellungsregler

Das vom PID-Regler 2408 kommende elektrische Ausgangssignal in Form eines Stromes (4-20 mA) wird vom Kämmerventil als Eingangssignal (1) aufgenommen und über einen I/P-Wandler (2) in ein pneumatisches Signal (0,2-1 bar) (3) umgewandelt, indem der Ventil-Eingangsdruk von 3,4 bar (4) entsprechend gedrosselt wird. Das so erhaltene pneumati-

sche Signal wirkt auf eine Doppelmembran **(5)**, die über eine Wippvorrichtung **(6)** den Öffnungsgrad eines Ventilkegels **(7)** erhöht. Der Ventilkegel steigert den Luftstrom **(8)** und damit den Druck auf die Membran des Stellantriebes **(9)**. Dadurch wird die Antriebsstange **(10)** nach oben bewegt und der Öffnungsgrad des Kämmer-Ventils erhöht. Durch die Positionsänderung der Antriebsstange wird eine Zugkraft auf eine Bereichsfeder **(11)** ausgeübt. Die von der Bereichsfeder ausgeübte Kraft ist der Kraft der Doppelmembran entgegengerichtet. Im Kräftegleichgewicht Doppelmembran zu Bereichsfeder ändert sich der Druck auf die Antriebsmembran nicht mehr. Die Antriebsstange verharrt in ihrer Position und hält somit den Öffnungsgrad des Kämmer-Ventils konstant. Ein sinkendes elektrisches Eingangssignal führt zu einem geringeren pneumatischen Signal. Dadurch fällt der Druck auf die Doppelmembran, die über die Wippvorrichtung den Öffnungsgrad des Ventilkegels verringert, und somit den Druck auf die Antriebsmembran des Stellantriebes senkt. Über die Rückholfeder **(12)** des Stellantriebes wird die Antriebsstange nach unten bewegt und der Öffnungsgrad des Kämmer-Ventils solange gesenkt, bis ein Kräftegleichgewicht zwischen Doppelmembran und Bereichsfeder herrscht.

### 3.4.3.2 Regelung im Niederdruckbereich

Im Gegensatz zum Hochdruckbereich muss im Niederdruckbereich mit Endabscheider und Vorratstank kein kontinuierlicher CO<sub>2</sub>-Fluss aufrechterhalten werden. Die Druckregelung erfolgt hier nicht über stetig regelnde Kämmer-Ventile sondern über Magnetventile als Stellglieder. Als zentrale Regeleinheit dient ein PID-Regler 2416 (Fa. Eurotherm). Dieser gibt in Abhängigkeit von der Regelabweichung zwei verschiedene analoge Spannungssignale (0-100 mV) aus und führt sie je einem Magnetventil zu. Eines dieser beiden Ventile öffnet, um bei Überdruck CO<sub>2</sub> in die Atmosphäre abzugeben, das andere öffnet, um bei einem Druckabfall CO<sub>2</sub> aus dem externen Flaschenvorrat nachzuführen. Im Falle von zu hohem Druck liegt das Spannungssignal an ersterem, im Falle von zu geringem Druck an letzterem an. Ab einer gewissen Grenzspannung öffnen die Magnetventile und schließen bei Unterschreiten dieser Spannung wieder.

## 3.5 Messung von CO<sub>2</sub>-Massenfluss und -Dichte

Der Massenfluss unterliegt nicht wie Druck und Temperatur einem Regelkreis sondern wird lediglich über den Pumpenhub gesteuert. Je höher der Pumpenhub, desto höher der Volumenstrom und damit, bei konstanter Dichte, der Massenstrom. Massenstrom und Dichte werden über ein und denselben Messwertaufnehmer erfasst. Dieser ist unmittelbar vor Eintritt des überkritischen Fluids in den Extraktionsbehälter angebracht (FI in Abb. 3-1). Die

Messung dieser beiden Parameter erfolgt somit hinsichtlich Druck und Temperatur unter Extraktionsbedingungen in unbelastetem Zustand des Extraktionsfluids. Eine Schnittzeichnung durch einen Messwertaufnehmer Massflo 2100 – DI 1,5 (Fa. Danfoss) zur Bestimmung von Durchfluss und Dichte des Extraktionsfluids ist in Abb. 3-5 dargestellt.

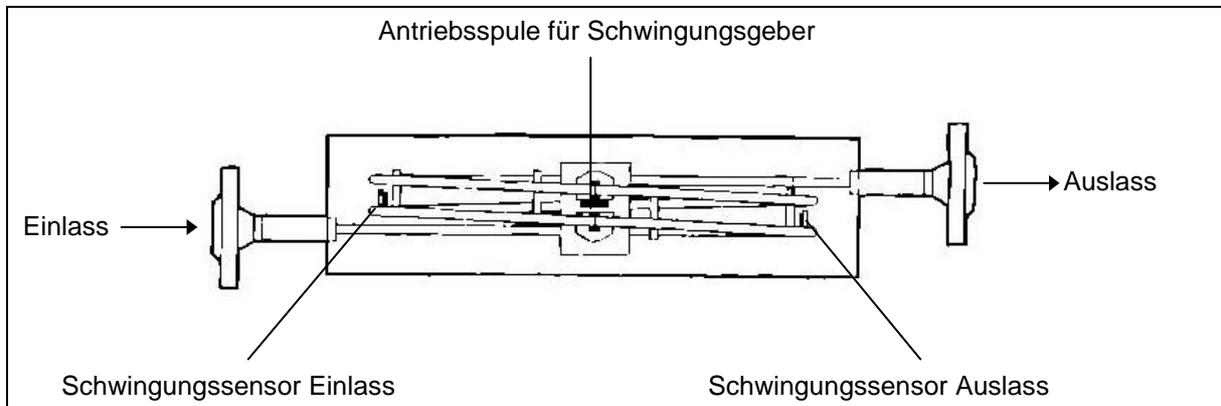
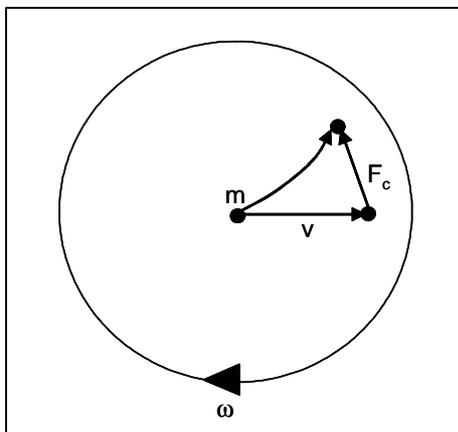


Abb. 3-5 Schnittzeichnung durch eine Durchflussmesseinrichtung nach dem Coriolis-Prinzip

Das Messprinzip beruht auf der Coriolis-Kraft (siehe Abb. 3-6), wonach ein Masseteilchen, das sich mit einer Geschwindigkeit  $v$  in einem Bezugssystem bewegt, welches seinerseits mit einer Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  rotiert, einer Coriolis-Kraft  $F_C$  ausgesetzt ist (Gl. 3-8).



$$F_C = 2 \cdot m \cdot v \cdot \omega \quad (3-8)$$

$F_C$	Coriolis-Kraft [N]
$m$	Masse [kg]
$v$	Geschwindigkeit des Masseteilchens [ $m \cdot s^{-1}$ ]
$\omega$	Winkelgeschwindigkeit des Bezugssystems [ $s^{-1}$ ]

Abb. 3-6 Coriolis-Kraft

Aufgrund des 3. Newton'schen Axioms (actio = reactio) übt ein Masseteilchen, das einer Kraft ausgesetzt ist, eine Kraft von gleichem Betrag aus, die der Richtung der einwirkenden Kraft entgegengesetzt ist. Das Masseteilchen, welches auf Grund der Rotation des Bezugssystems einer Coriolis-Kraft ausgesetzt ist, übt somit eine Gegenkraft auf das rotierende Bezugssystem aus, die der Rotation entgegengesetzt ist.

Die Gl. 3-9 und 3-10 liefern einen Zusammenhang zwischen Coriolis-Kraft und Massenfluss.

$$Q_m = m \cdot v \quad (3-9)$$

$$Q_m \quad \text{Massenfluss [kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\text{]}$$

$$F_C = 2 \cdot Q_m \cdot \omega \quad (3-10)$$

Das überkritische  $\text{CO}_2$  durchfließt den punktsymmetrisch aufgebauten Messwertaufnehmer in einem spiralförmig gebogenen Messrohr mit mehreren Windungen (siehe Abb. 3-5). Die für das Auftreten von Coriolis-Kräften erforderliche Rotationsbewegung des Bezugssystems wird durch eine zentrale Antriebsspule erzeugt, die das gesamte Rohrsystem in sinusförmige Schwingungen versetzt. Diese Schwingungen werden von zwei punktsymmetrisch angeordneten Sensoren im Bereich des Ein- und Auslasses erfasst und der Auswerteelektronik zugeführt. Befinden sich in dem Messrohr ein Medium mit einer Dichte von annähernd Null (Gas) ohne Auftreten eines Massenflusses, wird von beiden Sensoren ein- und dieselbe Schwingung erfasst, die der geräteabhängigen Resonanzfrequenz entspricht. Liegt in dem Messrohr dagegen ein Stoff mit höherer Dichte (Flüssigkeit) vor, der ebenfalls nicht fließt, wird durch die Bewegung des Messrohres eine Kraft auf das Medium ausgeübt. Auf Grund des 3. Newton'schen Axioms wirkt diese Kraft in entgegengesetzter Richtung auf das Messrohr zurück und verändert somit die Resonanzfrequenz. Die Dichte des im Messrohr enthaltenen Mediums ist damit proportional zu Resonanzfrequenz des Messrohres. Befindet sich im Messrohr eine strömende Flüssigkeit so wirkt auf die Flüssigkeit auf Grund der Schwingung des Systems eine Coriolis-Kraft, die ihrerseits auf das Messrohr im Sinne von *actio* ist *reactio* zurückwirkt. Damit wird die Schwingung des Messrohres um die Reaktionskraft aus der Coriolis-Kraft beaufschlagt. Diese Reaktionskraft ist am Einlass des Messrohres der Antriebskraft der Spule entgegengesetzt, am Auslass wirkt sie dagegen in dieselbe Richtung wie die Antriebskraft. Durch die an Ein- und Auslass unterschiedlich wirkenden Kräfte kommt es zu einer Verdrehung des Messrohres (siehe Abb. 3-7). Die rückwirkenden Reaktionskräfte bewirken, dass die beiden punktsymmetrisch angeordneten Schwingungssensoren phasenverschobene Signale erfassen. Am Einlass verzögern sich die Signale, am Auslass erscheinen sie früher. Der Massenfluss  $Q_m$  ist der dabei auftretenden Phasenverschiebung  $\Delta\phi$  proportional (de Kraker 2001).

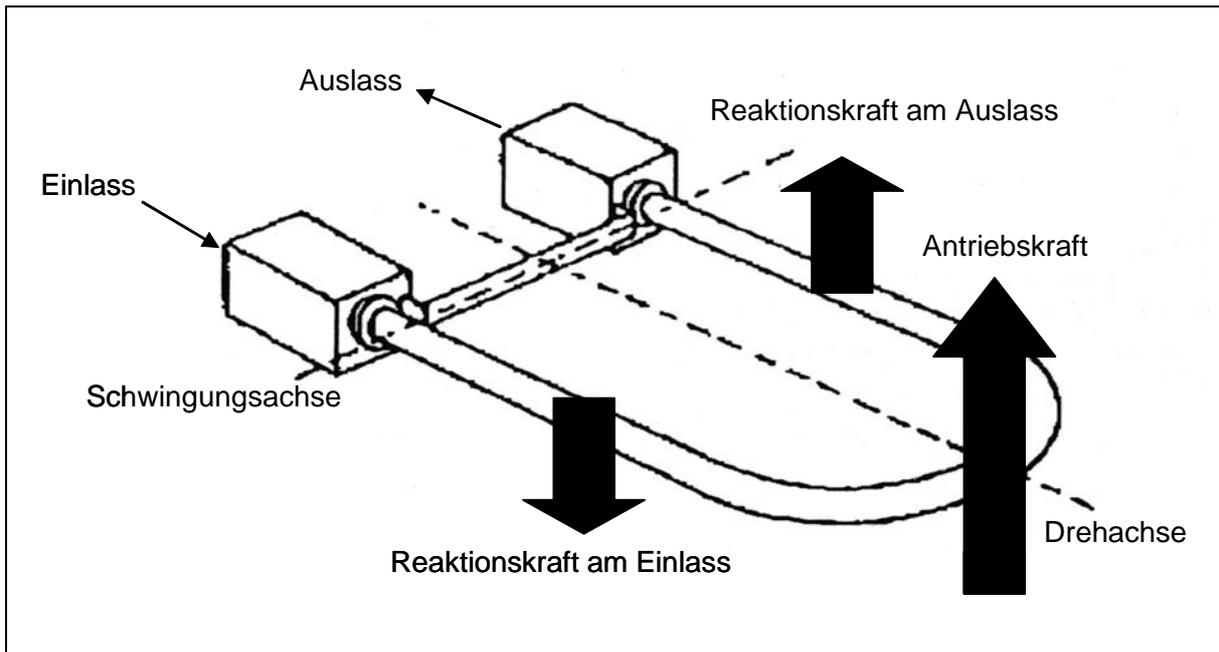


Abb. 3-7 Kräfte und Achsen an einem Massendurchflussmesser nach dem Coriolis-Prinzip am Beispiel eines U-förmigen Messrohres (de Kraker 2001)

### 3.6 Zentrale Messdatenerfassung

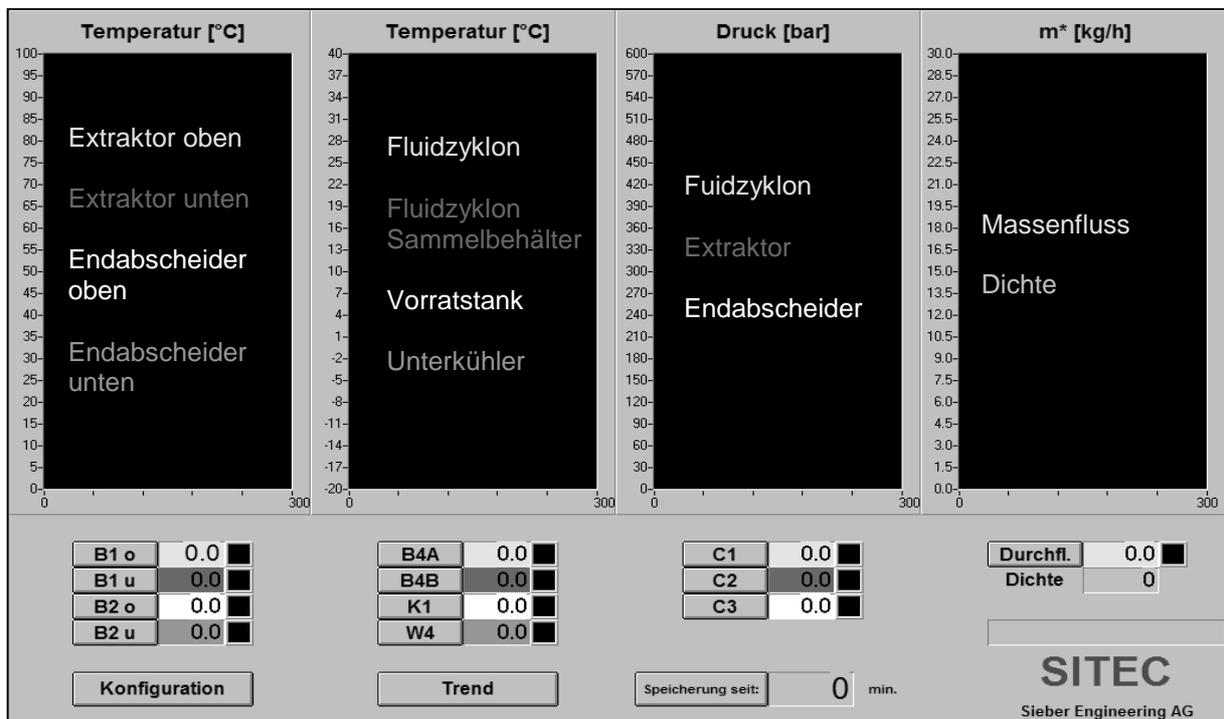


Abb. 3-8 Visualisierungsoberfläche des Messdatenerfassungsprogramms Visidaq

Sämtliche Daten der Temperatur-, Druck-, Dichte- und Durchflussmessung werden über analoge Strom- bzw. Spannungssignale von den zentralen Regler- und Anzeigeeinheiten auf

zwei 8-Kanal-Analog/Digital-Wandler Adam 4017 (Fa. Advantech) übertragen, digitalisiert und über eine RS232-Schnittstelle einem Rechner zugeführt. Die Visualisierung erfolgt mittels Visidaq 3.11 (Fa. Advantech). Das Programm erlaubt den Aufbau einer benutzerdefinierten Oberfläche nach dem drag&drop-Prinzip. Die Messdaten werden zeitabhängig aufgezeichnet und on-line visualisiert. Die Benutzeroberfläche ist in Abb. 3-8 dargestellt. Zusätzlich wird alle 60 Sekunden der über diesen Zeitraum gemittelte Messwert im ASCII-Format gespeichert. Eine gesamte Darstellung und Übersicht des Prozesses ist durch Einlesen dieser Messdaten in Excel möglich. Eine entsprechende grafische Darstellung aller Prozessparameter über die Zeit gibt Abb. 3-9 im Anhang (siehe Abschnitt 11.1 auf Seite 149) wieder.

# KAPITEL 4

## QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON HYPERFORIN

### 4.1 Literaturübersicht

Hyperforin ist eine sehr lipophile Verbindung und zählt zu den wertbestimmenden Inhaltsstoffen von *Hypericum perforatum* L.. Die Erstisolierung und -charakterisierung von Hyperforin aus *Hypericum perforatum* L. gelingt durch Gurevich et al. (1971). Hierbei wird das zu diesem Zeitpunkt schon länger bekannte antibiotische Wirkprinzip von Johanniskraut eindeutig dem Hyperforin zugeordnet (Hagenström 1955). Die vollständige Strukturaufklärung erfolgt schrittweise durch Bystrov et al. (1975) und Brondz et al. (1982, 1983c). Das homologe Adhyperforin, das sich von Hyperforin durch eine zusätzliche Methylgruppe unterscheidet, kann erstmals von Maisenbacher und Kovar (1992b) isoliert und dessen Struktur aufgeklärt werden. Als Phloroglucinderivat ist Hyperforin sehr instabil. Orth (1999b) gelingt die Identifizierung und Isolierung des mengenmäßig vorherrschenden, oxidativen Zwischenabbauproduktes Orthofofin, auch Furohyperforin genannt. Die Strukturformeln von Hyperforin, Adhyperforin und dem Hauptabbauprodukt Orthofofin sind in Abb. 4-1 dargestellt.

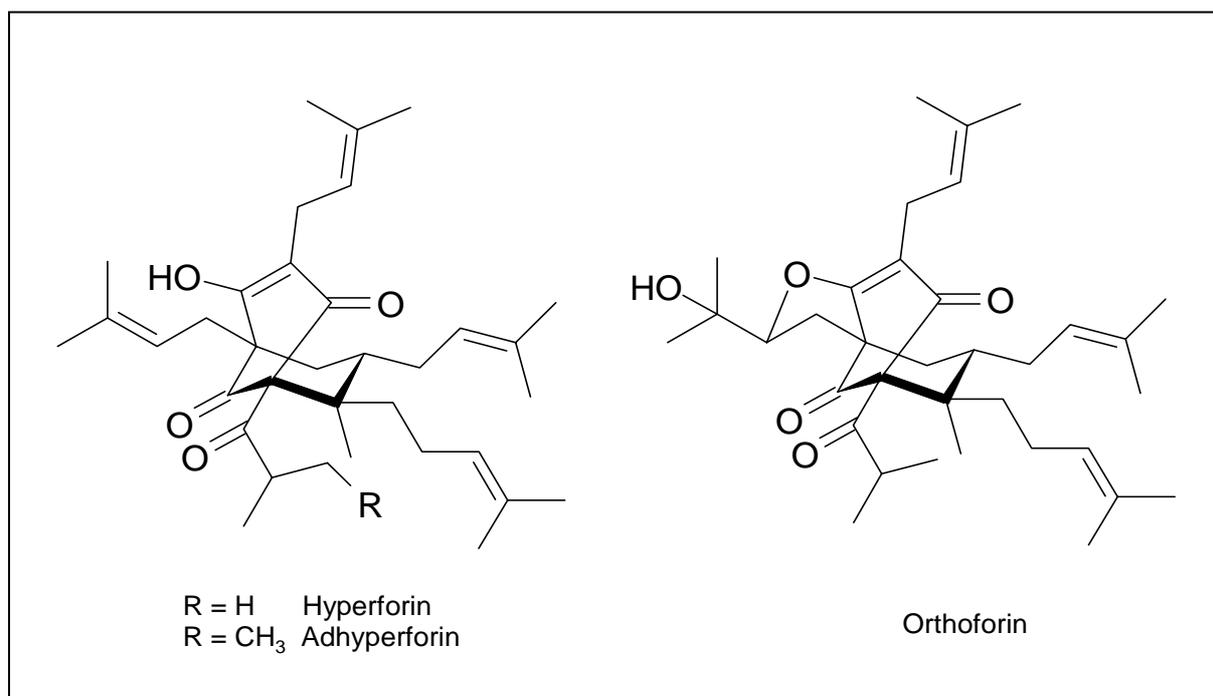


Abb. 4-1 Strukturformeln von Hyperforin, Adhyperforin und Orthofofin

Eine erste isokratische Methode zur Bestimmung von Hyperforin in Johanniskrautöl mittels HPLC beschreiben Maisenbacher und Kovar (1992a). Die Trennung erfolgt an einer RP8-Phase mit einem Acetonitril/Ammoniumdihydrogenphosphat-Gemisch bei pH 2,5. Hyperforin wird mittels UV bei 270 nm detektiert. Auf dieser Basis entwickeln Orth et al. (1999) eine ebenfalls isokratische Methode mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch bei pH 4,5 als mobile und RP18 als stationäre Phase und wenden diese Methode zur Bestimmung von Hyperforin in Fertigarzneimitteln und zur Stabilitätsuntersuchung von Hyperforinisolaten als Referenzsubstanzen an. Mit einer sehr ähnlichen Methode bestimmen Chi und Franklin (1999) den Gehalt von Hyperforin in humanem Blutplasma nach vorheriger Festphasenextraktion. Zur Gehaltsbestimmung von Hyperforin in Blutplasma (Cui et al. 2002) und in überkritischen CO<sub>2</sub>-Extrakten (Cui und Ang 2002) wird Benzo[k]flouranthene als interner Standard mit UV-Detektion bei 287 bzw. 270 nm verwendet. Für sämtliche in der Literatur beschriebene isokratische HPLC-Verfahren zur Bestimmung von Hyperforin liegt dessen Retentionszeit im Bereich um 10 Minuten.

Im Zuge der Diskussion um die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe in *Hypericum perforatum* L. gab und gibt es Bestrebungen, sämtliche in Frage kommende Inhaltsstoffe unter Anwendung *einer* Gradienten-HPLC-Methode zu erfassen. Erstmals wird ein solches Verfahren von Hölzl und Ostrowski (1987) beschrieben. Bei einer festen Wellenlänge von 254 nm und unter Einsatz eines phosphorsauren Gradienten bestehend aus Acetonitril/Wasser und Acetonitril/Methanol gelingt nach Trennung an einer RP18-Phase die simultane Erfassung von Naphthodianthronen, Flavonoiden, Biflavonoiden, Pflanzensäuren und Hyperforin innerhalb von 80 Minuten. Mit Hilfe eines ternären Gradienten aus phosphorsauerm Wasser, Acetonitril und Methanol kann die Dauer eines HPLC-Laufes auf 50 Minuten verkürzt werden (Brolis et al. 1998). Bei einer Detektionswellenlänge von 270 nm können neben Hyperforin weitere Phloroglucinderivate, insbesondere das Homologe Adhyperforin, erfasst werden. Die Quantifizierung erfolgt unter Verwendung von Rutin als internem Standard.

Die Monographien „St John's Wort“ und „Powdered St John's Wort“ des USP 26/NF 21 (2003b) schreiben das selbe Gradientenprogramm zur Bestimmung von Hypericin, Pseudohypericin und Hyperforin in Johanniskraut-Droge bzw. Trockenextrakten bei 270 nm vor, jedoch unter Verwendung von Oxybenzon als internem Standard. Da die USP 26/NF 21 (2003b) keine Gehaltsangaben zu Flavonoiden in Johanniskraut und Johanniskraut-Trockenextrakten macht, werden diese im Rahmen der Gehaltsbestimmung nicht quantitativ erfasst, sondern lediglich bei der Identitätsbestimmung auf Rutin und Hyperosid geprüft. Die Monographie „St John's Wort“ der Ph. Eur. 4 (2003) sieht lediglich eine UV-photometrische

Gesamtbestimmung der Hypericine vor, und lässt andere wertbestimmenden Inhaltsstoffe in Johanniskraut unberücksichtigt.

#### **4.2 HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Hyperforin in Johanniskraut und Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten**

Im Rahmen dieser Arbeit wird zur Bestimmung von Hyperforin in Johanniskraut und in Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten die von Orth et al. (1999a) beschriebene Methode herangezogen. Die Quantifizierung erfolgt mit einem Gemisch aus Hyperforin/Adhyperforin (SON 056/21, Fa. Schwabe) als externem Standard, dessen Gehalt durch Berechnung des Peakflächenverhältnisses von Hyperforin zur insgesamt detektierten Peakfläche und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekülmassen von Hyperforin ( $M_r = 536$ ) und Adhyperforin ( $M_r = 550$ ) ermittelt wird. Der auf diese Weise bestimmte Hyperforingehalt des Standards beträgt  $74,77 \pm 0,03$  % und wird der externen Kalibrierung zu Grunde gelegt.

#### **4.3 Ergebnisse der Kalibrierung und Validierung**

Die Validierung einer analytischen Methode ist der dokumentierte Nachweis, dass das Verfahren für die analytische Problemstellung geeignet ist, und innerhalb des gewählten Arbeitsbereiches zu den erwarteten Ergebnissen führt (USP 26/NF 21 2003a). Die Anforderungen der USP 26/NF 21 sind weitestgehend deckungsgleich mit denen der ICH-Guidelines „Validation of analytical procedures“ (ICH Q2A 1994) und „Validation of analytical procedures: methodology“ (ICH Q2B 1996). Die im Rahmen der Validierung eines Analysenverfahrens zu untersuchenden Parameter sind Richtigkeit, Präzision, Spezifität, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Linearität und Arbeitsbereich. Die für ein bestimmtes Analysenverfahren zu validierenden Parameter richten sich in erster Linie nach der Aufgabenstellung. Unterschieden werden Verfahren zur reinen Identifikation eines Analyten, zur Prüfung auf Verunreinigungen und zur Gehaltsbestimmung der Hauptkomponente in einem Gemisch. Letzteres trifft auf die Bestimmung von Hyperforin in CO<sub>2</sub>-Extrakten zu, so dass im Rahmen dieser Arbeit auf die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze verzichtet wird. Zur Selektivität der Methode für Hyperforin wird auf Orth (1999) verwiesen, der diesen Nachweis im Rahmen der Methodenentwicklung erbracht hat. Der Nachweis der Identität wird durch Vergleich der Retentionszeit mit der einer Referenzsubstanz erbracht. 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. Die Systempräzision spiegelt den zufälligen Fehler bei wiederholter Injektion derselben Pro-

be wieder, während die Methodenpräzision den gesamten Vorgang der Probenaufbereitung umfasst.

Das HPLC-Chromatogramm eines Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extraktes ist exemplarisch in Abb. 4-2 wiedergegeben. Drei basisliniengetrennte Peaks sind zu erkennen: Orthoforin nach einer Retentionszeit von ca. 7 min, Hyperforin nach ungefähr 8,5 min und Adhyperforin nach knapp 10 Minuten. Im Rahmen der Gehaltsbestimmungen von Hyperforin in Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten wird lediglich Hyperforin quantifiziert, für das die Ergebnisse der Kalibrierung im Folgenden zusammengestellt sind.

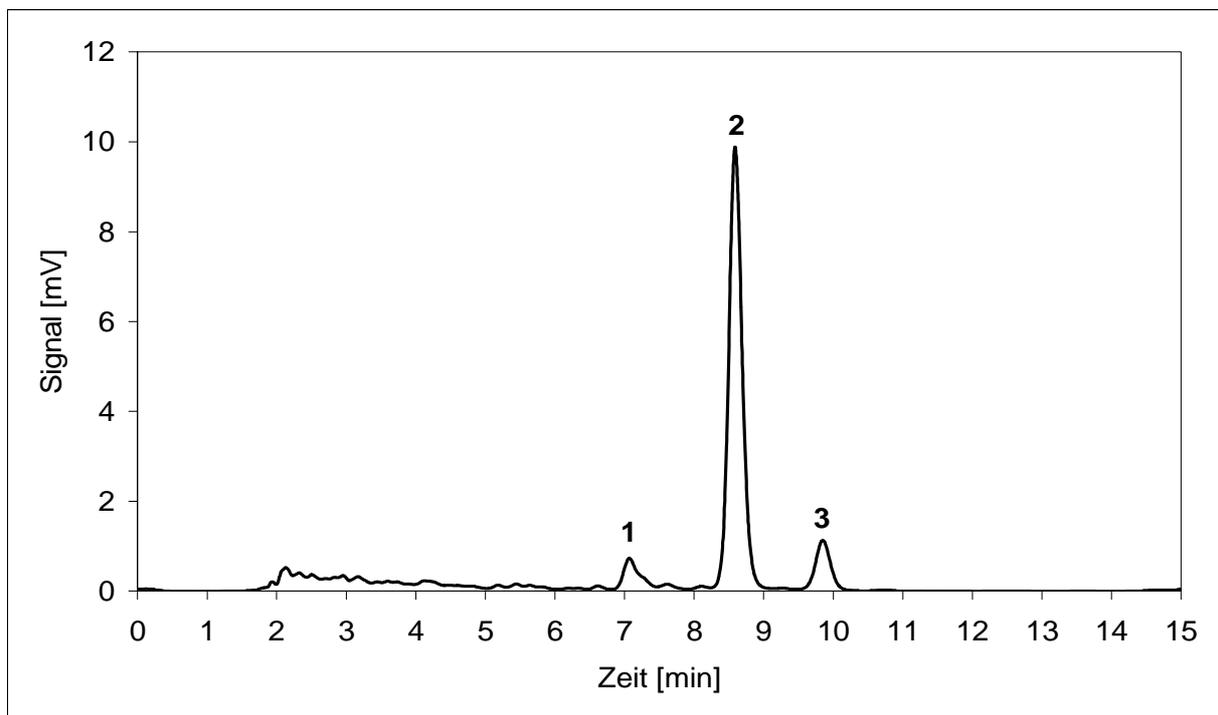


Abb. 4-2 HPLC-Chromatogramm eines Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extraktes

1 Orthoforin 2 Hyperforin 3 Adhyperforin

Die Kalibrierung erfolgt durch Auftragung der Peakflächen über der Konzentration an Hyperforin in der Lösung, und Berechnung der Kalibriergeraden nach der Methode der Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate (Gottwald 2000). Die Kalibriergerade zusammen mit dem um den Faktor 10 aufgeweiteten 95 %-Vertrauensbereich ist in Abb. 4-3 dargestellt. Der Vertrauensbereich gibt die Unsicherheit des Datenschwerpunktes in y-Richtung sowie der Steigung der Kalibriergeraden wieder. Die Güte der Kalibrierung wird anhand des Residuenplots (Abb. 4-4) beurteilt. In Tab. 4-1 sind die Ergebnisse der Kalibrierung für die Hyperforin-Gehaltsbestimmung mittels HPLC zusammengefasst (Rohdaten siehe Abschnitt 11.2, Tab. 11-1 auf Seite 150).

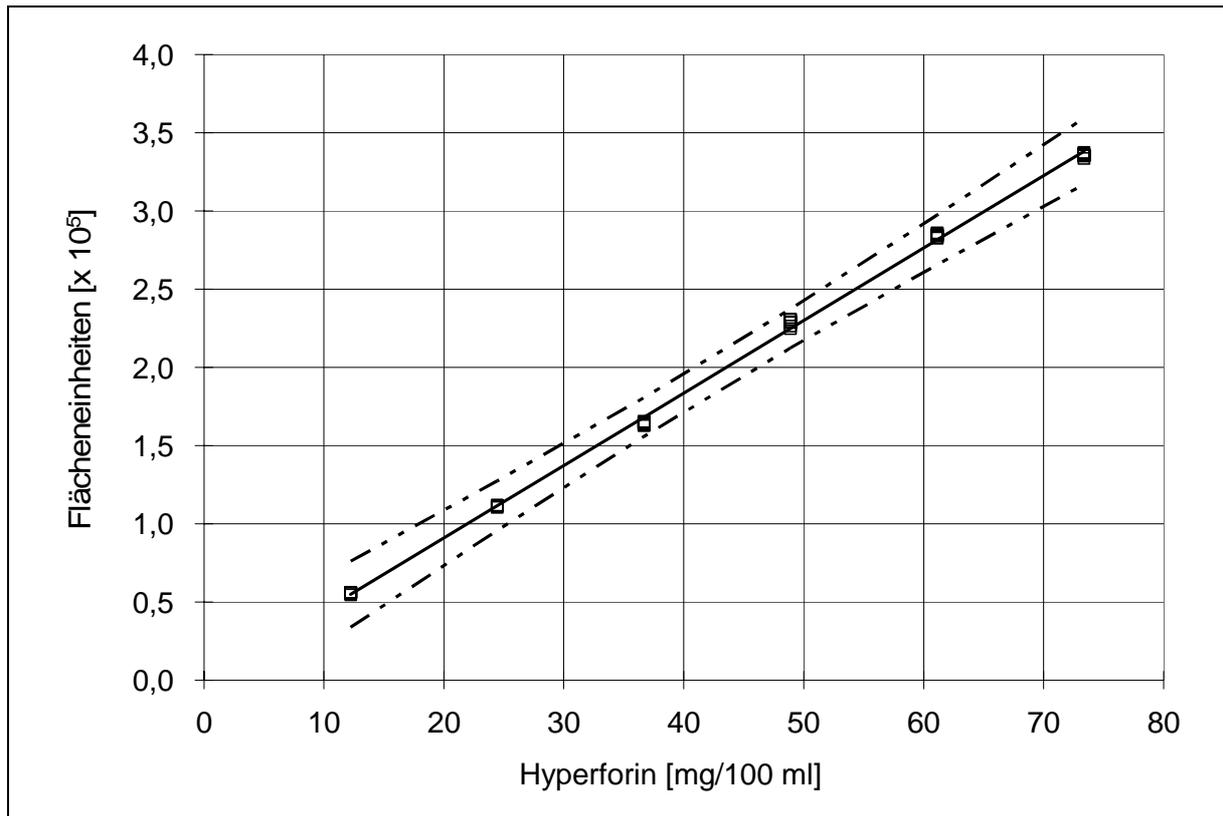


Abb. 4-3 Kalibriergerade für Hyperforin mit 95%-Konfidenzintervall; (□) Messwerte  
(—) Kalibriergerade, (— . .) 95%-Konfidenzintervall (10fach aufgeweitet)

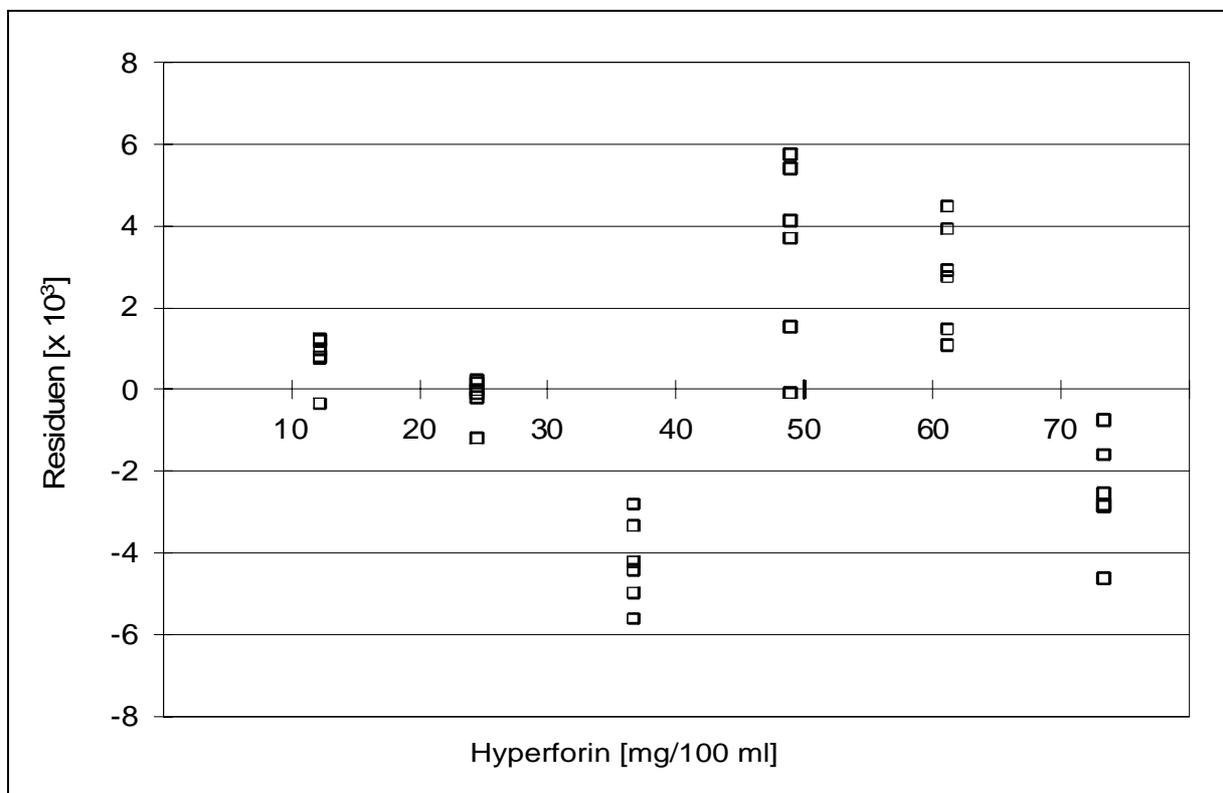


Abb. 4-4 Residuenplot der Kalibrierung von Hyperforin; (□) Residuen

Tab. 4-1 Kalibrierdaten der HPLC-Gehaltsbestimmung für Hyperforin

Parameter	Kalibrierung Hyperforin
Messbereich [mg/100 ml]	12,228 – 73,370
Datenschwerpunkt	$\bar{x} = 42,799$ $\bar{y} = 196573$
Korrelationskoeffizient	0,9995
Reststandardabweichung	3053
Verfahrensstandardabweichung	0,6588
Relative Verfahrensstandardabweichung	1,54 %
Geradengleichung Hyperforin	$f(x) = 4633,6x - 1740,1$

Die Ergebnisse der Validierung für die Parameter Systempräzision, Methodenpräzision und Richtigkeit für die Gehaltsbestimmung von Hyperforin mittels HPLC gibt Tab. 4-2 wieder. Die Rohdaten der Validierung sind in Abschnitt 11.2, Tab 11-2, Tab. 11-3 und Tab. 11-4 auf den Seiten 151-152 zusammengestellt.

Tab. 4-2 Statistische Daten zur Validierung der HPLC-Gehaltsbestimmungsmethode für Hyperforin

Parameter	Soll-Gehalt [%]	Konzentration [mg/100 ml]	Rel. Standardabweichung [%]	Wiederfindungsrate [%]
Systempräzision		33,387 (n = 6)	1,32	
Methodenpräzision				
LM-Extraktion		ca. 50 (n = 18)	4,72	
CO <sub>2</sub> -Extraktion		ca. 35 (n = 18)	2,28	
Wiederfindung	90,00	30,048	1,46	101,91
	108,27	36,147	1,56	100,60
	116,53	38,906	2,02	100,95

# KAPITEL 5

## OPTIMIERUNG DER EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN

### 5.1 Extraktion von *Hypericum perforatum* L. mittels überkritischem CO<sub>2</sub> – Literaturübersicht

Im Rahmen der Identifizierung von Hyperforin als maßgeblich wirksamkeitsmitbestimmendem Prinzip in *Hypericum perforatum* L. (siehe 2.2.3, Seite 15) wird von zahlreichen Autoren die pharmakologische Wirksamkeit von hyperforinangereicherten Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten untersucht. Gemeinsam ist diesen Arbeiten, dass sie lediglich Angaben zum Hyperforingehalt dieser Extrakte enthalten, jedoch in der Regel keinerlei Aussagen zu den Herstellungsbedingungen machen, unter denen diese Extrakte gewonnen werden (Tab. 5-1).

Tab. 5-1 Literaturübersicht der pharmakologisch untersuchten CO<sub>2</sub>-Extrakte

Autor	Hyperforin	Herstellung	Sonstige Inhaltsstoffe
Chatterjee et al. (1998)	38,8 %	-	nicht nachweisbar
Dimpfel et al. (1998)	30,1 %	DEV 25:1	nicht nachweisbar
Müller et al. (1998)	38,8 %	-	nicht nachweisbar
Di Matteo et al. (2000)	-	-	-
Perfumi et al. (2001)	24,3 %	-	Hypericin sehr gering

Nur wenige Arbeiten und Patente befassen sich mit der überkritischen CO<sub>2</sub>-Extraktion von Johanniskraut im analytischen oder präparativen Maßstab. Eine Extraktionsmethode mit überkritischem CO<sub>2</sub> im analytischen Maßstab zur Gewinnung von Phloroglucinolen entwickeln Cui et al. (2002). Untersucht wird der Einfluss des Extraktionsdruckes (311, 380, 449 bar) und der Extraktionstemperatur (40, 50, 60 °C) auf das Peakflächenverhältnis von Hyperforin bzw. Adhyperforin zur Gesamtpeakfläche. Auf einen statischen Extraktionsschritt von 10 min folgt jeweils eine dynamische Extraktion über 1,5 h bei einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 1 ml/min. Bei 1 g eingesetztem Johanniskraut als Ausgangsmaterial ergibt sich daraus in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen ein Droge/Lösungsmittelverhältnis von 1/91 bis 1/76. Das extrahierte Material wird nach Entspannung auf Normaldruck in einem Gemisch aus n-Hexan und Methanol aufgefangen. Bei einem Druck von 380 bar und einer Temperatur von 50 °C erreicht man sowohl für Hyperforin als auch für Adhyperforin maxima-

le Peakflächenverhältnisse. Insgesamt finden sich im Vergleich zu einer Ultraschallextraktion nur 60 % des Hyperforins und Adhyperforins im CO<sub>2</sub>-Extrakt wieder. Ein Zusatz von Methanol als Modifier erhöht den Anteil polarer Komponenten im Extrakt.

Eine Patentschrift von Castor et al. (2001) beschreibt die Gewinnung verschiedener wirksamer Fraktionen aus *Hypericum perforatum* L. in analytischem Maßstab auf dem Wege der sequentiellen Extraktion mit nahekritischen, kritischen oder überkritischen Gasen und unter Zusatz organischer Co-Solventien. Unter „Example 3“ wird eine Extraktion von 3 g getrocknetem Johanniskraut bei 207 bar und 40 °C über 30 min mit reinem Kohlendioxid beschrieben. Darauf folgt ein schrittweiser Methanolzusatz von 5, 10 und 20 % im Abstand von 10 min. Die auf diese Weise gewonnenen vier Fraktionen werden unter Vakuum bei 40 °C getrocknet und deren Ausbeute und Hyperforingehalt bestimmt. Die höchsten Gehalte an Hyperforin werden mit reinem Kohlendioxid erzielt und liegen bei ca. 44 %.

In präparativem Maßstab unter Einsatz eines 3,75 l-Extraktionsbehälters untersuchen Catchpole et al. (2002) die Extraktion von Hyperforin und Adhyperforin aus Johanniskraut mit überkritischem (300 bar, 40 oder 50 °C) und flüssigem CO<sub>2</sub> (70 bar, 22 °C). Nach überkritischer Extraktion erfolgt die Abscheidung zweistufig, wobei keinerlei Angaben zu den Abscheidebedingungen gemacht werden. Die dabei gewonnenen Fraktionen bezeichnen die Autoren als „oleoresin“ bzw. „essential oil“, beide werden auf ihren Gehalt an Hyperforin und Adhyperforin untersucht. Die höchsten Gehalte an Phloroglucinolen mit rund 50 % Hyperforin und 9 % Adhyperforin im Extrakt finden die Autoren bei einer Extraktion mit flüssigem Kohlendioxid, im Rahmen derer der gesamte Extrakt in einer Fraktion anfällt. Extraktionen mit überkritischem CO<sub>2</sub> bei 300 bar und 40 °C liefern 38 % Hyperforin und 6,5 % Adhyperforin in der „oleoresin“-Fraktion gegenüber 19,7 bzw. 3,3 % in der „essential oil“-Fraktion. Der Zusatz von 10 % Ethanol als Modifier verringert den Gehalt an Phloroglucinolen in beiden Fraktionen durch Co-Extraktion hydrophiler Begleitstoffe. Hypericin erscheint unter keinen der untersuchten Bedingungen im Extrakt. Kinetische Untersuchungen zur Ausbeute der „oleoresin“-Fraktion zeigen eine schnellere Extraktion unter überkritischen Bedingungen bei höheren Temperaturen und eine deutliche Verlangsamung bei Extraktion mit flüssigem CO<sub>2</sub>.

Ein weiteres präparatives Verfahren zur Gewinnung von Hyperforin mittels überkritischer CO<sub>2</sub>-Extraktion im präparativen Maßstab findet sich in der Patentliteratur (Erdelmeier et al. 2001b) mit dem Ziel, Hyperforin aus *Hypericum perforatum* L. durch Extraktion zu gewinnen und zu stabilisieren. In diesem Zusammenhang wird unter „Example 5“ ein Verfahren beschrieben, bei dem zunächst Frischpflanzenmaterial ausgepresst, der Presssaft mit Ascorbinsäure als Antioxidans versetzt und dieser anschließend dem Pressrückstand wieder zu-

gesetzt wird. Anschließend wird bei 350 bar und 40 °C bei einem Droge/Lösungsmittelverhältnis von 1/20 mit überkritischem Kohlendioxid extrahiert. Nach Trocknung bei 60 °C erhält man ausgehend von 515 g Frischpflanzenmaterial eine Ausbeute von 12,3 g Extrakt, der 43,1 % Hyperforin enthält.

## 5.2 Untersuchung des Einflusses verschiedener Extraktionsbedingungen auf die Extraktausbeute und den Hyperforingehalt

Im Folgenden wird der Einfluss der Extraktionsparameter Druck, Temperatur, CO<sub>2</sub>-Massenfluss und Extraktionsdauer auf die Extraktausbeute und den Hyperforingehalt beschrieben. Ziel dieser Optimierung der Extraktionsparameter ist es, eine möglichst hohe Anreicherung von Hyperforin unter schonenden Bedingungen bei akzeptablen Restgehalten in der Droge zu erzielen. Die experimentellen Daten finden sich unter 8.5.3.1 auf Seite 119. Wenn nichts anderes angegeben ist, liegen als Ausgangsmaterial 370 g Johanniskraut zu Grunde, welches unmittelbar vor der Extraktion mittels Schneidmühle zerkleinert wird (siehe 8.5.1, Seite 119). Die Partikelgrößenverteilung des für die Extraktion eingesetzten Johanniskrauts wird sowohl vor als auch nach der Mahlung in der Schneidmühle mittels Siebanalyse bestimmt (siehe 8.4.5, Seite 118). Das Ergebnis ist in Abb. 5-1 dargestellt.

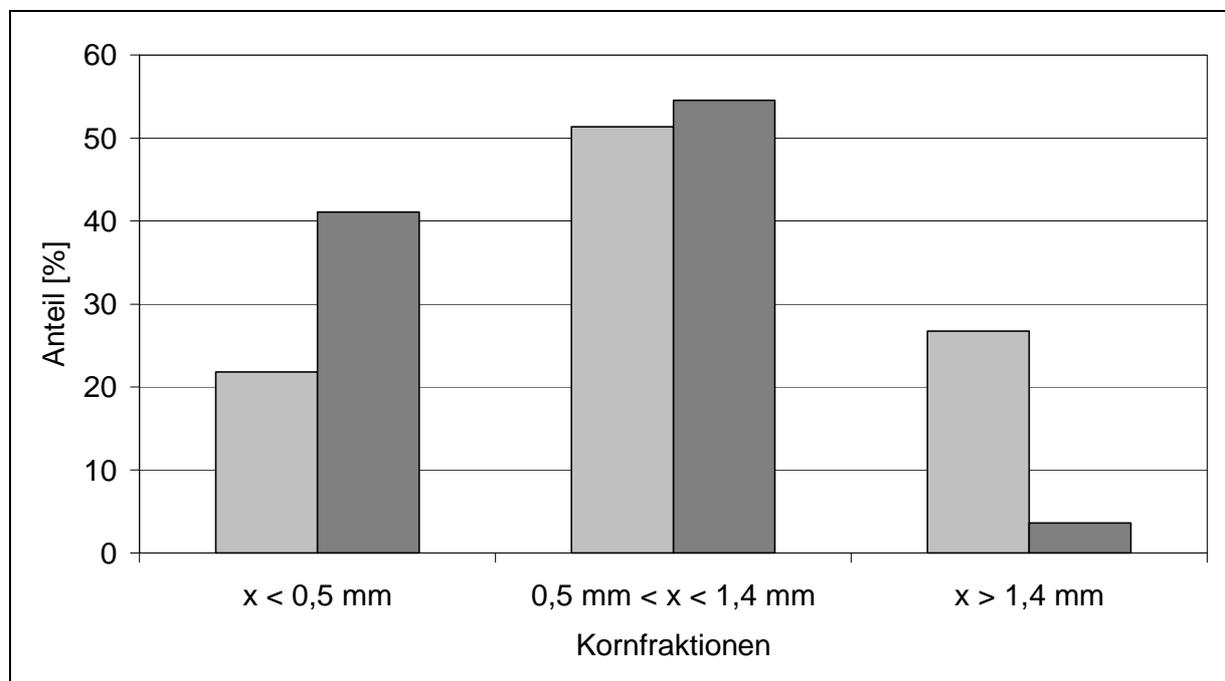


Abb. 5-1 Partikelfractionen des verwendeten Johanniskrautes vor (□) und nach (■) der Behandlung in der Schneidmühle

Durch die Mahlung in der Schneidmühle wird die Fraktion  $> 1,4$  mm zugunsten der Fraktion  $< 0,5$  mm verringert, während die mittlere Fraktion zwischen  $0,5$  und  $1,4$  mm mit einem Anteil von  $50\%$  praktisch unverändert bleibt. Zur besseren Charakterisierung der Partikelgrößenverteilung nach Mahlung mit der Schneidmühle wird eine weitere Siebanalyse mit den Siebgrößen  $0,355$  und  $1$  mm durchgeführt, deren Resultat sich in Tab. 5-2 findet. Für das verwendete Ausgangsmaterial ergibt sich daraus eine Korngrößenverteilung von  $59,3\%$  zwischen  $0,355$  und  $1$  mm, sowie  $80,4\% < 1$  mm.

Tab. 5-2 Korngrößenverteilung des verwendeten Johanniskrautes nach der Behandlung in der Schneidmühle.

Kornfraktionen		
$x < 0,355$ mm	$0,355$ mm $> x > 1$ mm	$x > 1$ mm
21,1 %	59,3 %	19,3 %

Die Extraktion von Johanniskraut mit überkritischem  $\text{CO}_2$  erfolgt entsprechend Abschnitt 8.5.3.1 auf Seite 119. Der Extrakt wird direkt anschließend an die Entnahme aus dem Separator bei  $-30$  °C tiefgefroren und nach Sublimation des Kohlendioxids in Petrischalen gefriergetrocknet (siehe 8.5.2, Seite 119). Nach der Gefriertrocknung wird durch Wägung der Petrischale die Ausbeute an getrocknetem Extrakt bestimmt und prozentual auf die Einwaage an Johanniskraut in die Extraktionshülse berechnet. Der gefriergetrocknete Extrakt stellt eine inhomogene, gelblich bis bräunliche, leicht flockige bis stark zähe und klebrige Masse dar und wird nach Bestimmung der Ausbeute in einer Fantaschale homogenisiert. Der homogenisierte Extrakt wird bis zur Gehaltsbestimmung von Hyperforin bei  $-70$  °C gelagert. Die Gehaltsbestimmung erfolgt gemäß Abschnitt 8.4.1 auf Seite 112. Jeder Extrakt wird dreifach analysiert und die Hyperforinkonzentration der entsprechenden Probenlösung über die Kalibriergerade ermittelt. Aus dieser Konzentration und dem Volumen der Probelösung wird die Masse an Hyperforin prozentual auf die Probeneinwaage berechnet. In den folgenden Diagrammen ist die Extraktausbeute als Punkt bzw. Linie, der Hyperforingehalt als Säule dargestellt. Für letzteren ist der 95 %-Vertrauensbereich des Mittelwertes aus drei Einzelbestimmungen angegeben. Jede Extraktion wird einmal wiederholt.

### 5.2.1 Einfluss des Extraktionsdruckes

Die Abhängigkeit der Extraktausbeute und des Hyperforingehaltes der Extrakte vom Extraktionsdruck wird auf den drei Druckniveaus 90, 120 und 150 bar untersucht. Die Extraktionstemperatur wird bei 40 °C konstant gehalten, der CO<sub>2</sub>-Massenfluss beträgt 8 kg·h<sup>-1</sup> bei einer Extraktionsdauer von 3 h. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-2 dargestellt.

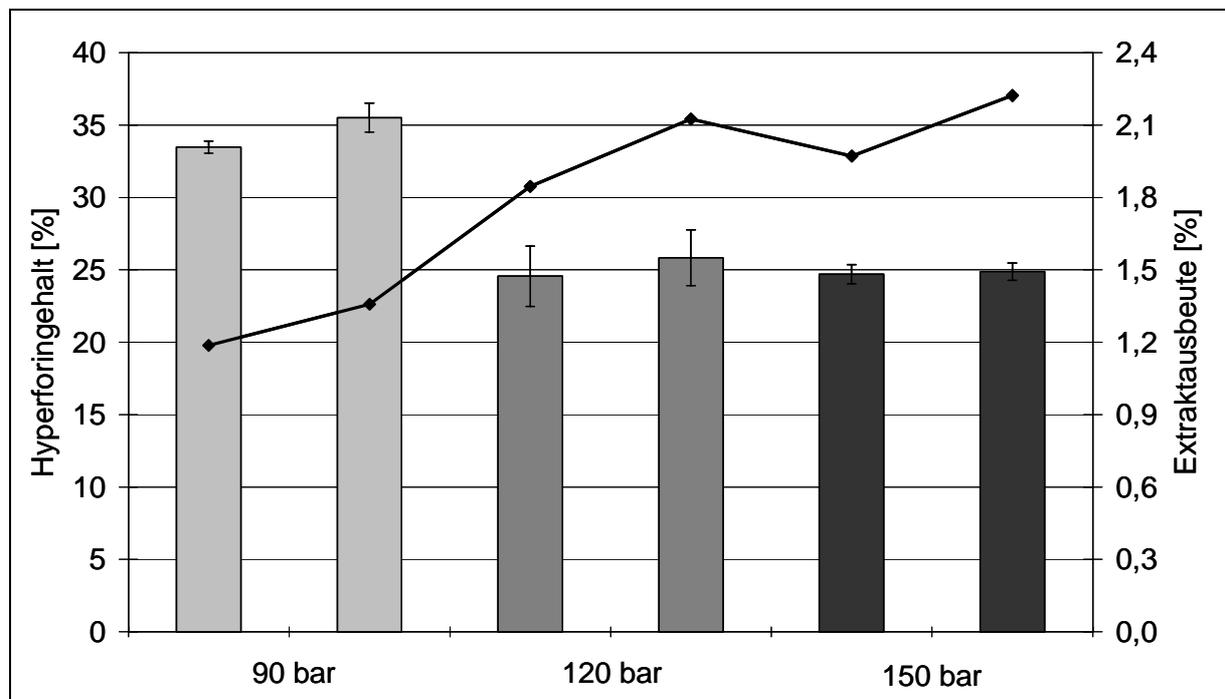


Abb. 5-2 Abhängigkeit der Extraktausbeute und des Hyperforingehaltes vom Extraktionsdruck; (—◆—) Extraktausbeute, (□) Hyperforingehalt 90 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h, (■) Hyperforingehalt 120 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h, (■) Hyperforingehalt 150 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h; (n = 3 Proben)

Steigender Extraktionsdruck führt zu höheren Extraktausbeuten aber gleichzeitig zu einem geringeren Hyperforingehalt der Extrakte. Extrakte, die bei 90 bar hergestellt werden, enthalten bis zu 35 % Hyperforin. Verglichen damit liefert ein Extraktionsdruck von 120 bar eine um 50-60 % höhere Extraktausbeute bei jedoch 30 % geringerem Hyperforingehalt. Eine weitere Drucksteigerung auf 150 bar zeigt keine Auswirkungen, weder auf die Ausbeute noch auf den Gehalt der Extrakte an Hyperforin. Betrachtet man die absolute Ausbeute an Hyperforin, erhält man rund 1,6 g bei 90 bar verglichen mit 1,85 g bei 120 bar. Daraus ergibt sich, dass die bei höheren Drücken gefundenen geringeren Gehalte an Hyperforin durch die wesentlich größeren Ausbeuten überkompensiert werden.

### 5.2.2 Einfluss der Extraktionstemperatur

Zur Untersuchung des Einflusses der Extraktionstemperatur auf Ausbeute und Hyperforingehalt der resultierenden Extrakte werden Extraktionen bei 120 bar/40°C und 158 bar/50 °C durchgeführt. Die Ergebnisse gibt Abb. 5-3 wieder.

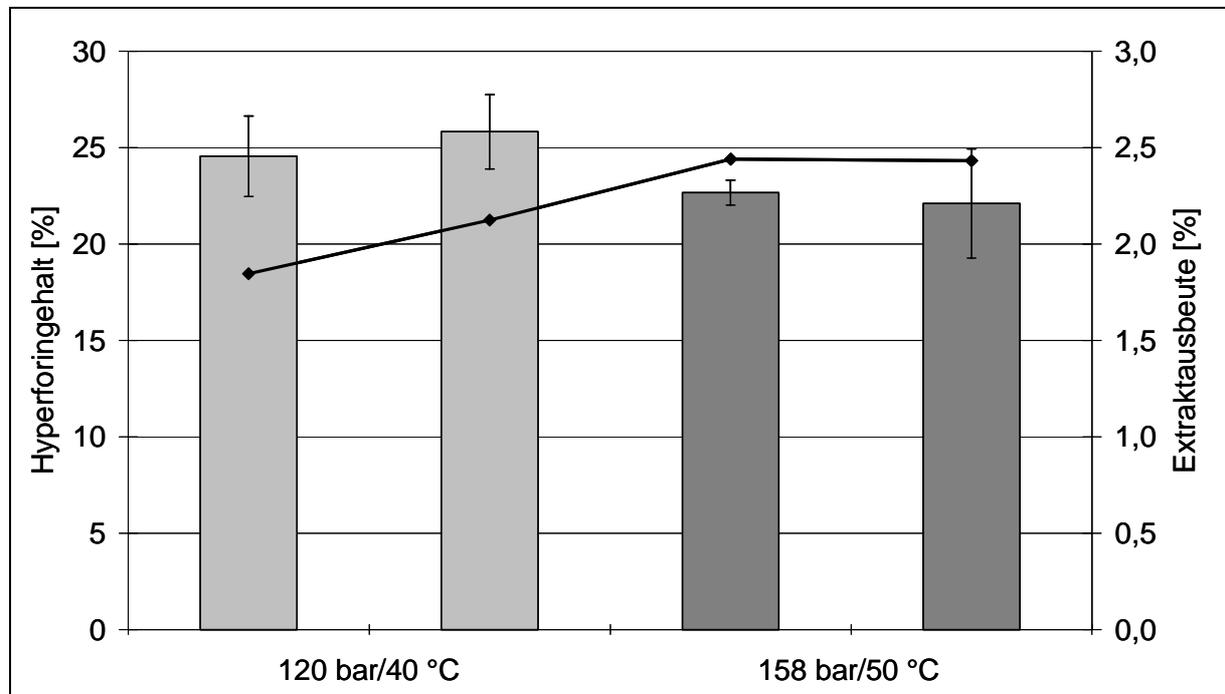


Abb. 5-3 Abhängigkeit der Ausbeute und des Hyperforingehaltes von der Extraktionstemperatur; (—◆—) Extraktausbeute, (□) Hyperforingehalt 120 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h, (■) Hyperforingehalt 158 bar/50 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h; (n = 3 Proben)

Aus einer höheren Temperatur ergibt sich eine geringere Dichte und dadurch eine verringerte Lösungskapazität des überkritischen CO<sub>2</sub> (siehe 2.1.3, Seite 4). Um den Einfluss der Temperatur unabhängig von der veränderten Dichte untersuchen zu können, wird der Extraktionsdruck bei einer Extraktionstemperatur von 50 °C so angepasst, dass die Dichte konstant bleibt (berechnet nach Bender-EOS, Bender 1970). CO<sub>2</sub>-Massenfluss und Extraktionsdauer werden bei 8 kg·h<sup>-1</sup> bzw. 3 h konstant gehalten. Die Extraktion bei einer erhöhten Temperatur von 50 °C führt zu einer höheren Extraktausbeute aber geringeren Hyperforingehalten der Extrakte. Während die Ausbeute von rund 2 % bei 120 bar/40 °C auf annähernd 2,5 % bei 158 bar/50 °C ansteigt, fällt der Hyperforingehalt von 25 auf 22 % leicht ab. Die Gesamtausbeute an Hyperforin bei 50 °C beträgt rund 2 g verglichen mit 1,85 g bei 40 °C.

### 5.2.3 Einfluss der Extraktionsdauer

Die Abhängigkeit der Extraktausbeute und des Hyperforingehaltes von der Extraktionsdauer und der damit verbundenen Menge an Kohlendioxid, die das Drogenbett passiert, wird durch Extraktionen von 1, 3 und 5 h Dauer ermittelt. Dies entspricht  $\text{CO}_2$ -Mengen von 8, 24 bzw. 40  $\text{kg CO}_2/\text{h}$  oder einem Droge/Lösungsmittelverhältnis von 1/22, 1/67 bzw. 1/111. Der Effekt wird bei einem konstanten Extraktionsdruck von 120 bar, bei einer Extraktionstemperatur von 40 °C und einem  $\text{CO}_2$ -Massenfluss von  $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$  untersucht.

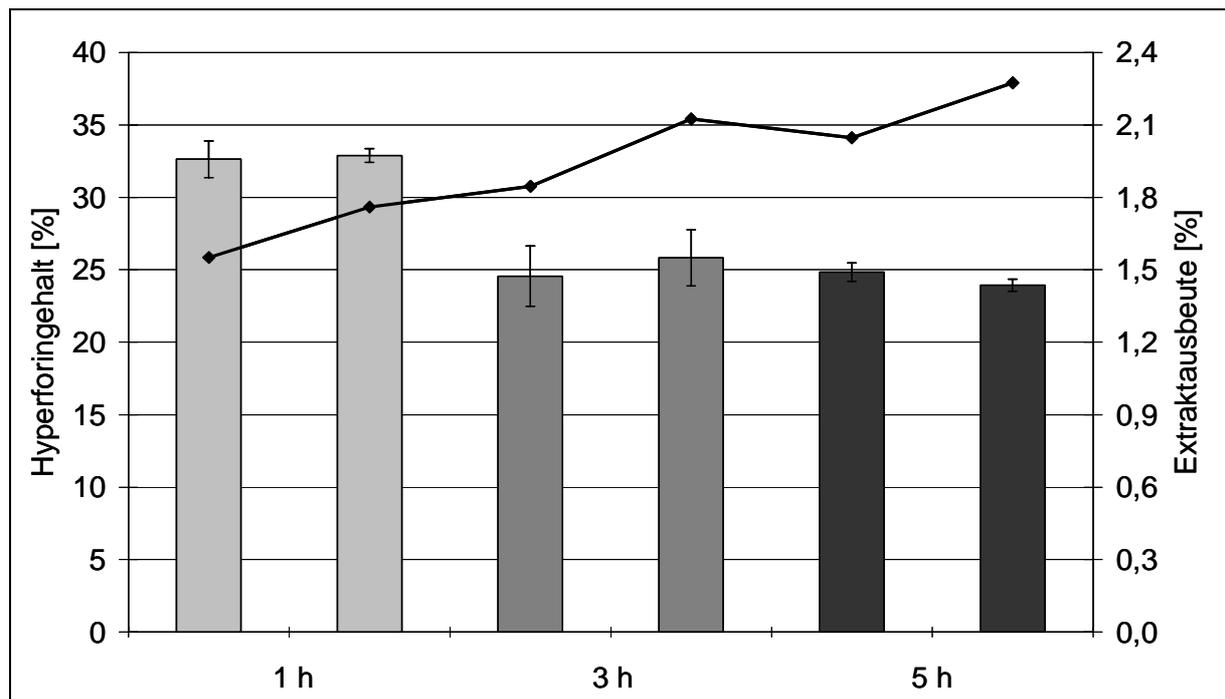


Abb. 5-4 Abhängigkeit der Extraktausbeute und des Hyperforingehaltes von der Extraktionsdauer; (—◆—) Extraktausbeute, (□) Hyperforingehalt 120 bar/40 °C/8  $\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}/1 \text{ h}$ , (■) Hyperforingehalt 120 bar/40 °C/8  $\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}/3 \text{ h}$ , (■) Hyperforingehalt 120 bar/40 °C/8  $\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}/5 \text{ h}$ ; ( $n = 3$  Proben)

Wie in Abb. 5-4 dargestellt erhält man nach einer Extraktion von einer Stunde bei 120 bar/40 °C/8  $\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}$  eine Ausbeute von 1,5-1,8 % und einen Hyperforingehalt der Extrakte von rund 33 %. Eine Verlängerung der Extraktionsdauer von 1 auf 3 h führt zu einer Erhöhung der Ausbeute um ca. 20 % bei einer Reduktion des Hyperforingehaltes der resultierenden Extrakte von 25 %. Führt man auch hier analog den Überlegungen zur Druckabhängigkeit eine Betrachtung der absoluten Masse an Hyperforin, die in den jeweiligen Extrakten erscheint durch, so erhält man nach 1 h ungefähr 2 g Hyperforin, die sich mit längerer Extraktionsdauer nicht mehr verändert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Extraktion von Hyperforin aus Johanniskraut innerhalb einer Stunde abgeschlossen ist.

### 5.2.4 Einfluss des CO<sub>2</sub>-Massenflusses

Die Abhängigkeit von Ausbeute und Hyperforingehalt der Extrakte vom CO<sub>2</sub>-Massenfluss wird auf den drei Niveaus 4, 6 und 12 kg·h<sup>-1</sup> untersucht und ist in Abb. 5-5 dargestellt. Wie in Abschnitt 5.2.3 aufgezeigt, wird das Extraktionsergebnis maßgeblich durch die Menge an Kohlendioxid, die das Drogenbett passiert, beeinflusst. Um den Effekt eines veränderten Massenflusses isoliert von der Menge an Extraktionsfluid beurteilen zu können, wird die Extraktionsdauer so angepasst, dass die Gesamtmenge an CO<sub>2</sub>, die das Drogenbett passiert konstant bleibt. Damit ergeben sich die folgenden Kombinationen: 4 kg·h<sup>-1</sup>/6 h, 8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h und 12 kg·h<sup>-1</sup>/2 h, bei einem konstanten Extraktionsdruck von 120 bar und einer Temperatur von 40 °C.

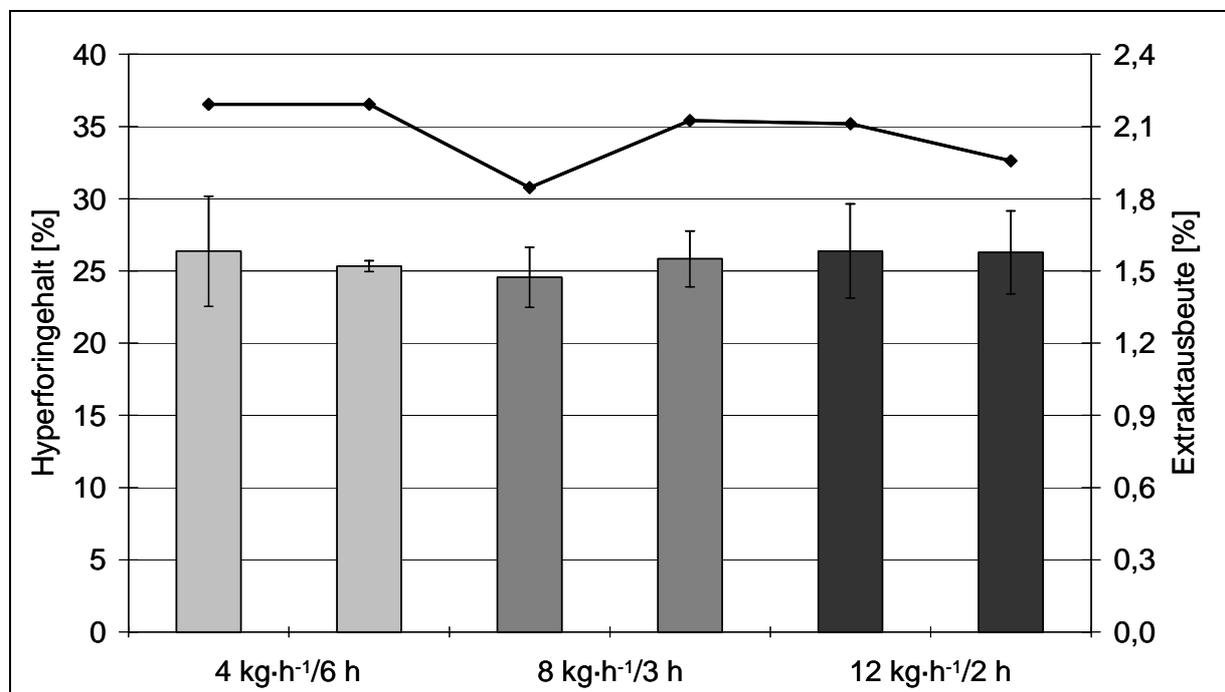


Abb. 5-5 Abhängigkeit der Extrakttausbeute und des Hyperforingehaltes vom Massenfluss;

- (—◆—) Extrakttausbeute, (□) Hyperforingehalt 120 bar/40 °C/4 kg·h<sup>-1</sup>/6 h,
- (■) Hyperforingehalt 120 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h,
- (■) Hyperforingehalt 120 bar/40 °C/12 kg·h<sup>-1</sup>/2 h; (n = 3 Proben)

Der CO<sub>2</sub>-Massenfluss zeigt praktisch keinen Effekt auf den Hyperforingehalt der Extrakte. Unabhängig vom Massenfluss ergeben sich Hyperforingehalte von etwa 25 %. Für die Extrakttausbeute ist eine leichte Tendenz zu geringeren Werten bei höherem Massenfluss zu erkennen.

### 5.3 Massenbilanz der Extraktion

Die Aufstellung einer Massenbilanz für die Extraktion erfolgt gemäß Abb. 5-6. Zunächst wird über eine 15-minütige Mazeration der Ausgangsdroge mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) im Ultraschallbad der Hyperforingehalt der Ausgangsdroge bestimmt. Aus dem Hyperforingehalt und der Einwaage an Droge kann die maximal extrahierbare Masse an Hyperforin in der Ausgangsdroge errechnet und als 100 %-Wert gesetzt werden. Unter analoger Vorgehensweise wird die nicht extrahierte, in der Droge verbliebene Masse an Hyperforin ermittelt, indem der Resthyperforingehalt nach Mazeration bestimmt und mit der Rückwaage an extrahierter Droge multipliziert wird.

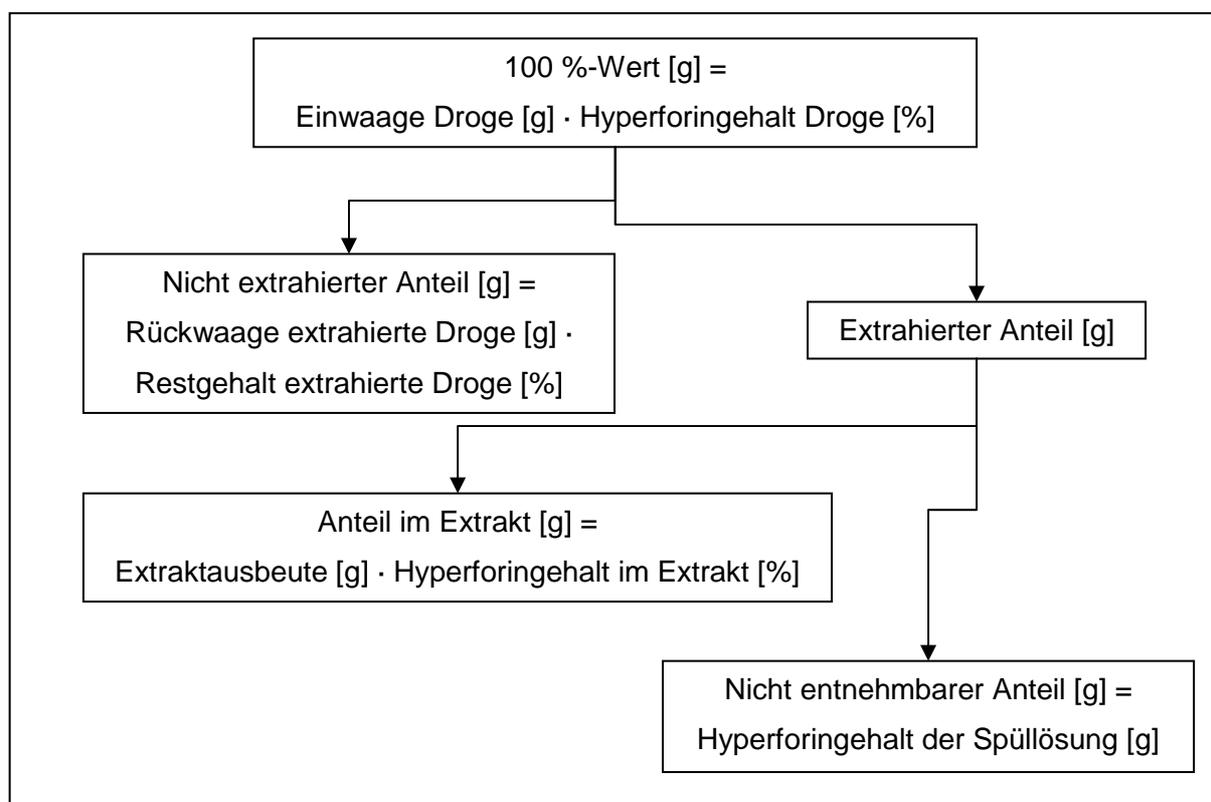


Abb. 5-6 Analysen- und Berechnungsschema zur Aufstellung einer Massenbilanz für die  $\text{CO}_2$ -Extraktion

Der extrahierte Anteil setzt sich zusammen aus dem Hyperforin, das im Extrakt erscheint und dem, welches nach der Entnahme des Extraktes aus dem Separator als nicht entnehmbarer Anteil in diesem verbleibt. Die Hyperforinmasse im Extrakt wird berechnet aus der Extraktausbeute und dem Hyperforingehalt des Extraktes (siehe Abschnitt 5.2). Der nicht entnehmbare Anteil wird bestimmt indem der Separator nach Entnahme des Extraktes mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) gespült, und die Spüllösung in einen Messkolben überführt und analysiert wird. Aus der Hyperforinkonzentration und dem Volumen der Probenlösung

wird die nicht entnehmbare Masse an Hyperforin berechnet. Sämtliche Massenanteile werden prozentual auf den 100 %-Wert bezogen.

Das Resultat der Bilanzierung von Hyperforin ohne den Anteil der Spüllösung in Abb. 5-7 dargestellt. Dunkle Säulen repräsentieren den Anteil an Hyperforin der im Extrakt gefunden wird, helle Säulen den nicht extrahierbaren Anteil in der Droge. Der Hyperforingehalt der Ausgangsdroge wird auf  $0,85 \pm 0,02$  % (Mittelwert  $\pm$  sdv) bestimmt.

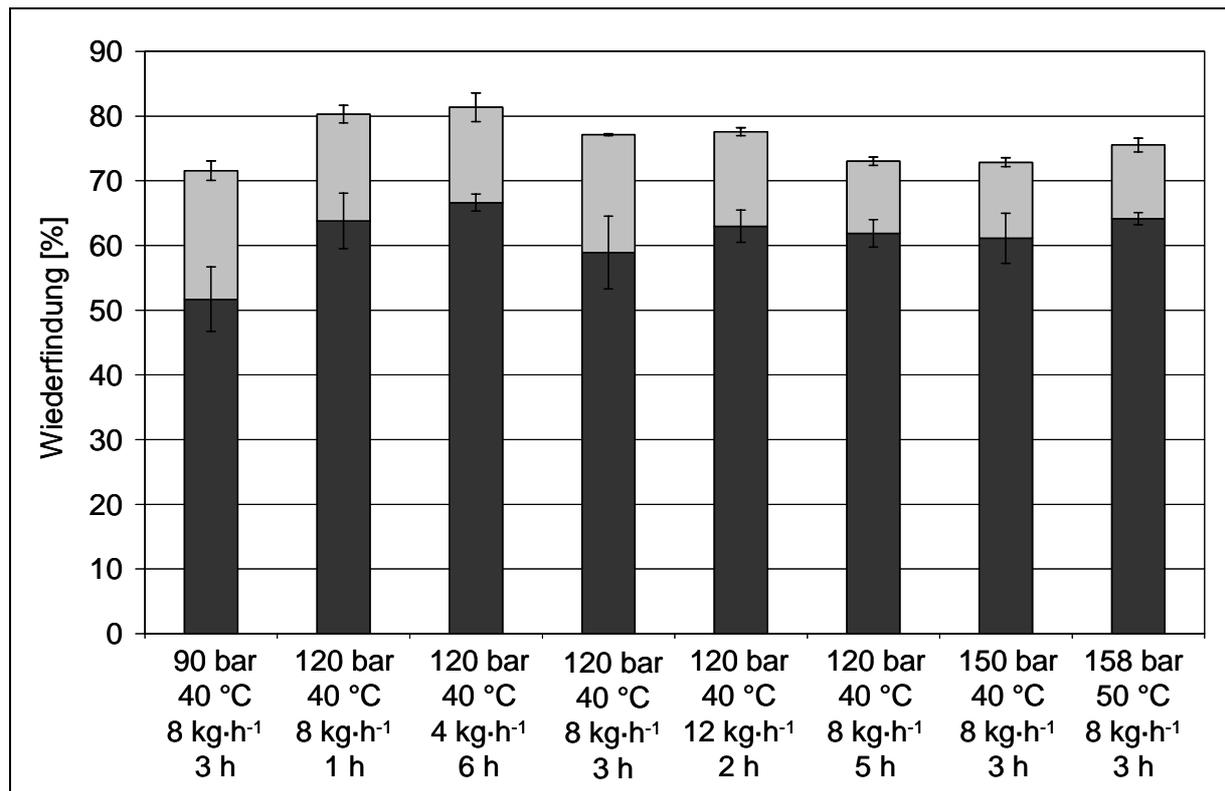


Abb. 5-7 Wiederfindung von Hyperforin im Extrakt (■) und in der extrahierten Droge (□) bei verschiedenen Extraktionsbedingungen; Fehlerbalken repräsentieren Spannweiten ( $n = 2$  Extrakte)

Für sämtliche Extrakte mit Ausnahme derer die bei 90 bar/40 °C gewonnen werden, findet man 59-67 % des gesamten Hyperforins im Extrakt wieder. Demgegenüber fällt der Anteil an Hyperforin nach einer Extraktion bei 90 bar/40 °C deutlich auf 50 % ab. Betrachtet man dagegen den Anteil an Hyperforin in der extrahierten Droge so wird der positive Einfluss eines hohen Extraktionsdruckes, einer höheren Extraktionstemperatur und längerer Extraktionsdauer auf die Restgehalte deutlich. Nach einer Extraktion bei einem Druck von 150 bar oder einer Temperatur von 50 °C bei konstanter Dichte werden nur 10 % des gesamten Hyperforins in der extrahierten Droge wiedergefunden. Ebenso verhält es sich nach einer verlängerten Extraktion über 5 h. Für sämtliche anderen Extraktionsbedingungen liegt die Wiederfin-

dung in der extrahierten Droge rund 1,5- bis 2-fach so hoch bei 15-20 %. In Abb. 5-7 sind die Wiederfindungen im Separator nach Entnahme des Extraktes nicht dargestellt. Diese werden nur für zwei einzelne Extrakte bestimmt. Die Gesamtbilanz für diese Extrakte ist in Tab. 5-3 wiedergegeben. Der nicht entnehmbare Anteil im Separator beträgt unter den gegebenen Bedingungen rund 10 %. Bezieht man diesen in die Bilanzierung mit ein, so erhält man eine Gesamtwiederfindung von über 95 % und somit eine annähernd ausgeglichene Bilanz.

Tab. 5-3 Gesamtbilanz für zwei Einzelextrakte bei 120 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h und 120 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/1 h

Droge (n = 3)	0,85 ± 0,02 %		
100 %	→ bei 370 g Droge entsprechend 3,145 ± 0,074 g Hyperforin		
120 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup> /3 h			
	Extrakt	Extrahierte Droge	Spüllösung
Hyperforin [g]	2,030	0,581	0,395
%	64,5	18,5	12,6
Wiederfindung [%]	95,6		
120 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup> /1 h			
	Extrakt	Extrahierte Droge	Spüllösung
Hyperforin [g]	2,141	0,566	0,337
%	68,1	18,0	10,7
Wiederfindung [%]	96,8		

#### 5.4 Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die Zersetzung von Hyperforin während der Extraktion

Wie in Kapitel 4 bereits angedeutet und in Kapitel 7 näher ausgeführt, ist Hyperforin als Phloroglucinolderivat äußerst instabil und unterliegt somit bei Temperaturbelastung einer raschen oxidativen Zersetzung. Als dominierendes Zwischenabbauprodukt konnte Orthoforin identifiziert werden (Orth et al. 1999b). Ausgehend von diesem findet eine weitergehende Zersetzung zu verschiedenen Abbauprodukten statt (Fuzzati et al. 2001). Orthoforin erscheint bei den gegebenen Bedingungen der HPLC-Bestimmung von Hyperforin im Chromatogramm bei

einer Retentionszeit von ca. 7 min (Abschnitt 4.2, Abb. 4-2 auf Seite 40). Durch Vergleich des Peakflächenverhältnisses Orthoforin/Hyperforin in der Ausgangsdroge nach Mazeration mit dem in den Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten, soll die Zersetzungstendenz von Hyperforin zu Orthoforin während der Extraktion abgeschätzt werden. Die Peakflächenverhältnisse der Ausgangsdroge und der Extrakte bei verschiedenen Extraktionsbedingungen sind in Abb. 5-8 zusammengefasst. Für jede Extraktionsbedingung ist der Mittelwert aus zwei unter identischer Vorgehensweise hergestellten Extrakten dargestellt.

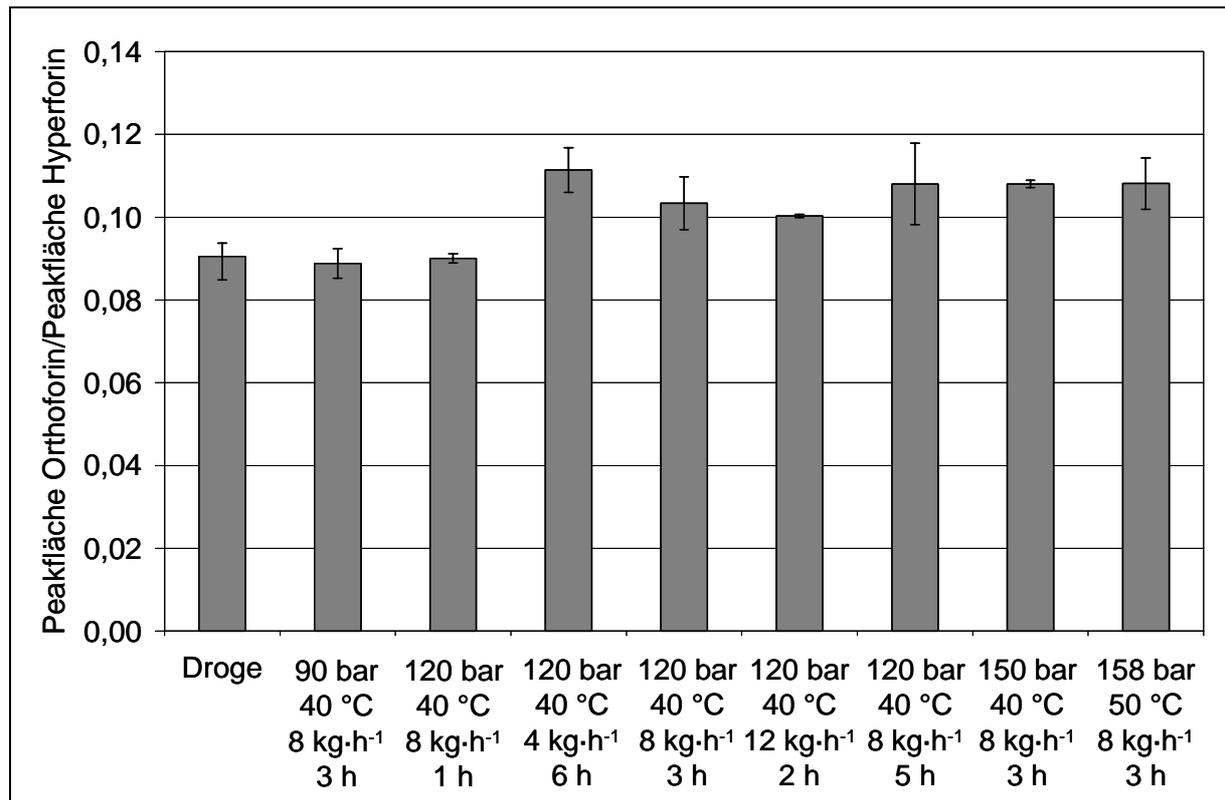


Abb. 5-8 Peakflächenverhältnis von Orthoforin zu Hyperforin in Droge und Extrakten bei verschiedenen Extraktionsbedingungen;

Fehlerbalken repräsentieren Spannweiten ( $n = 2$  Extrakte)

Das Orthoforin/Hyperforin-Peakflächenverhältnis in der Ausgangsdroge beträgt 0,09. Extraktionen bei 90 bar und eine kurze Extraktion von 1 h bei 120 bar haben keinen Einfluss. Dagegen steigt das Verhältnis Orthoforin zu Hyperforin bei längerer Extraktionsdauer und höherer Extraktionstemperatur auf bis zu 0,11 an, dies entspricht einer Zunahme von rund 22 %.

## 5.5 Einfluss des Zerkleinerungsgrades der Droge

Der Einfluss des Zerkleinerungsgrades der Droge auf die Extraktausbeute und den Hyperforingehalt wird anhand eines Vergleiches bei 120 bar, 40 °C bei einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> untersucht. Da sich bei nicht zerkleinerter Droge eine geringere Packungsdichte in der Extraktionshülse ergibt, wird die Extraktionsdauer verringert, so dass das Droge/Lösungsmittelverhältnis konstant bleibt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5-4 zusammengestellt.

Tab. 5-4 Gegenüberstellung der Extraktionsergebnisse bei Verwendung von zerkleinerter und unzerkleinerter Droge (n = 2 Extrakte)

	Extraktion bei 120 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup>	
	Droge zerkleinert	Droge unzerkleinert
Eingesetzte Drogenmenge [g]	370	300
Extraktionsdauer <sup>1</sup> [min]	180	146
Ausbeute [%] ± Spannweite	1,99 ± 0,13	1,75 ± 0,14
Hyperforingehalt [%] ± Spannweite	25,2 ± 0,6	27,5 ± 0,5
Wiederfindung Hyperforin im Extrakt [%] ± Spannweite	58,9 ± 5,6	51,2 ± 4,9
Wiederfindung Hyperforin in der Droge [%] ± Spannweite	18,2 ± 0,2	19,9 ± 2,6
Orthoforin/Hyperforin-Verhältnis	0,1034 ± 0,064	0,0875 ± 0,0016

Eine stärkere Zerkleinerung der Droge führt zu einer um 14 % höheren Extraktausbeute aber einem 8 % geringeren Hyperforingehalt. Dies schlägt sich in einer um ein Fünftel höheren Hyperforinausbeute im Extrakt nieder, während die Wiederfindung in der Droge praktisch unverändert bleibt. Das Orthoforin/Hyperforin-Peakflächenverhältnis ist um 18 % erhöht. Tab. 5-5 zeigt, dass diese Zunahme zum Teil auf den Zerkleinerungsvorgang in der Schneidmühle zurückzuführen ist.

<sup>1</sup> Um das Droge/Lösungsmittelverhältnis konstant zu halten wird die Extraktionsdauer entsprechend angepasst

Tab. 5-5 Einfluss der Zerkleinerung der Droge mittels Schneidmühle auf den Hyperforingehalt und auf das Orthoforin/Hyperforin-Peakflächenverhältnis der Ausgangsdroge ( $n = 3$  Proben)

	Droge zerkleinert	Droge unzerkleinert
Hyperforingehalt [%] $\pm$ sdv	0,85 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,02
Orthoforin/Hyperforin $\pm$ sdv	0,091 $\pm$ 0,005	0,083 $\pm$ 0,008

Die Zerkleinerung von Johanniskraut in der Schneidmühle reduziert den Hyperforingehalt der Droge von 0,94 auf 0,85 % was einer Abnahme um 10 % entspricht. Im gleichen Maße nimmt das Orthoforin/Hyperforin-Peakflächenverhältnis zu. Eine Zerkleinerung der Droge wirkt sich somit lediglich auf die Hyperforinausbeute im Extrakt positiv aus.

## 5.6 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen der Isolierung von Hyperforin aus Johanniskraut beschreiben Orth et al. (1999) die Extraktion von Johanniskrautblüten mit n-Hexan. Ebenso wie n-Hexan ist überkritisches Kohlendioxid als lipophiles Lösungsmittel zu betrachten. Sein linearer Aufbau weist kein Dipolmoment auf. Die relative Dielektrizitätskonstante beträgt im Bereich des kritischen Punktes ungefähr 1,1 (Moriyoshi et al. 1993), verglichen mit 1,9 für n-Hexan. Die Abhängigkeit der relativen Dielektrizitätskonstanten von Druck und Temperatur gibt Abb. 2-3 in Abschnitt 2.1.3 auf Seite 4 wieder.

Die bis heute vorliegenden Arbeiten zur Extraktion von *Hypericum perforatum* L. mittels überkritischem CO<sub>2</sub> im analytischen oder präparativen Maßstab verwenden Extraktionsdrücke zwischen 200 und 450 bar sowie Temperaturen zwischen 40 und 60 °C. Eine Untersuchung der Abhängigkeit des Extraktionsergebnisses von CO<sub>2</sub>-Massenfluss und Extraktionsdauer findet sich in der aktuellen Literatur nicht (siehe Abschnitt 5.1).

### 5.6.1 Extraktionsdruck

Wie in Abschnitt 2.1.3 ausgeführt ist die Lösungskapazität überkritischer Gase in erster Linie abhängig von deren Dichte, die ihrerseits eine Funktion von Druck und Temperatur ist. Abb. 2-3 auf Seite 4 zeigt, dass die Abhängigkeit der Dichte eines überkritischen Gases im Bereich des kritischen Punktes am stärksten ausgeprägt ist. In diesem Bereich führen kleine Druckerhöhungen zu relativ starken Erhöhungen der Dichte und daraus resultierend der Lösungskapazität eines überkritischen Fluids. Eine höhere Lösungskapazität begünstigt die

Extraktion aller, auch unerwünschter Begleitstoffe, wie beispielsweise Cuticularwachse. Aus diesem Grund werden im Rahmen der Optimierung des Extraktionsdruckes moderate Drücke im Bereich des kritischen Punktes von CO<sub>2</sub> untersucht, mit dem Ziel eine möglichst starke Anreicherung von Hyperforin aus Johanniskraut zu erreichen.

Entsprechend Bender-EOS (Bender 1970) ergeben sich für die untersuchten Drücke von 90, 120 und 150 bar bei einer konstanten Temperatur von 40 °C Dichten von 484, 716 bzw. 780 kg/m<sup>3</sup>. Wie auf Grund der höheren Lösungskapazität zu erwarten, steigt mit zunehmendem Druck die Ausbeute an Gesamtextrakt an (Abb. 5-2 – Linie). Da der Gehalt an Hyperforin im Extrakt bei einer Drucksteigerung von 90 auf 120 bar um rund 30 % abnimmt, ist die Ausbeutesteigerung in erster Linie auf eine Co-Extraktion unerwünschter Begleitstoffe wie beispielsweise Cuticularwachsen zurückzuführen. Cuticularwachse sind ubiquitär und Teil der Cuticula, dem pflanzlichen Abschlussgewebe. Als solches erfüllen sie Schutzfunktionen, insbesondere vor Austrocknung. Die Löslichkeit von C<sub>28</sub>-n-Alkan, einem der dominierenden Bestandteile der Cuticularwachse in überkritischem CO<sub>2</sub> untersuchen Reverchon et al. (1993). Sie ermitteln Löslichkeiten von 0,017 und 0,092 % (m/m) bei 40 °C und Drücken von 90 bzw. 150 bar, entsprechend einer Erhöhung der Löslichkeit um den Faktor 5-6. Zur Löslichkeit von Hyperforin in überkritischem Kohlendioxid liegen keine vergleichbaren Daten vor. Auf Grund der Steigerung der absoluten Ausbeute von Hyperforin von 1,6 g bei 90 bar auf 1,85 g bei 120 bar ist zu schließen, dass auch Hyperforin von der erhöhten Lösungskapazität des überkritischen CO<sub>2</sub> bei höheren Drücken profitiert. Im Sinne einer möglichst selektiven Anreicherung von Hyperforin im Extrakt erweisen sich jedoch niedrige Drücke als vorteilhaft. Betrachtet man die Massenbilanz (Abb. 5-7) in Abhängigkeit vom Extraktionsdruck so fällt zunächst auf, dass bei 90 bar nur 50 % des insgesamt extrahierbaren Hyperforins im Extrakt wiedergefunden werden, während der Anteil in der extrahierten Droge mit 20 % im Vergleich zu 120 bar praktisch unverändert bleibt. Dies erklärt sich aus der geringen Ausbeute nach Extraktion bei 90 bar. Geht man davon aus, dass die Masse an Extrakt, der im Separator nach Entnahme des Extraktes verbleibt, unabhängig von den Extraktionsbedingungen ist, so fällt dieser Anteil bei geringeren Ausbeuten stärker ins Gewicht. Eine Extraktion bei einem Druck von 150 bar erweist sich als vorteilhaft im Hinblick auf den Restgehalt in der Droge. Im Vergleich zu 90 oder 120 bar halbiert sich der in der extrahierten Droge gefundene Anteil an Hyperforin.

### 5.6.2 Extraktionstemperatur

Neben dem Extraktionsdruck wird die Dichte des überkritischen CO<sub>2</sub> maßgeblich durch die Temperatur beeinflusst. Eine Erhöhung von 40 auf 50 °C bei einem konstanten Druck von 120 bar verringert die Dichte entsprechend der Bender-EOS (Bender 1970) von 716 auf 581 kg/m<sup>3</sup> und bewirkt somit eine geringere Lösungskapazität des überkritischen Fluids. Wie in Abschnitt 2.1.3 ab Seite 4 am Beispiel der Löslichkeit von Quarzsand in überkritischem Wasser ausgeführt (siehe Abb. 2-2, Seite 5), hat eine Erhöhung der Temperatur einen steigenden Dampfdruck und damit größere Flüchtigkeit einer Substanz zur Folge. Um zu untersuchen inwieweit diese Flüchtigkeit der zu extrahierenden Substanzen das Extraktionsergebnis beeinflusst, ist es notwendig, Extraktionen bei erhöhter Temperatur aber konstanter Dichte durchzuführen. Dies wird erreicht, indem ausgehend von 120 bar/40 °C bei 158 bar/50 °C extrahiert wird. Die Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Ausbeute um ca. 20 % bei geringfügig abnehmendem Hyperforingehalt (siehe Abb. 5-3). Die zunehmende Temperatur wirkt sich positiv auf die Extrahierbarkeit von Hyperforin aus, erkennbar daran, dass die Ausbeute an Hyperforin von 1,85 auf 2 g leicht ansteigt. Dieser Anstieg der Hyperforinausbeute erklärt jedoch nicht die Zunahme der Gesamtausbeute um 20 %. Nach Reverchon et al. (1993) steigt die Löslichkeit von C<sub>28</sub>-n-Alkan ausgehend von 110 bar/35 °C (711 kg/m<sup>3</sup>) von 0,053 auf 0,16 % (m/m) bei 135 bar/45 °C (706 kg/m<sup>3</sup>). Dies entspricht einer Verdreifachung der Löslichkeit und ist auf Grund der konstanten Dichte auf eine Erhöhung der Flüchtigkeit des Alkans zurückzuführen. Die Erhöhung der Ausbeute bei geringeren Gehalten an Hyperforin erklärt sich damit aus einer verstärkten Extraktion von unerwünschten Begleitstoffen wie beispielsweise Cuticularwachsen. Eine verbesserte Effizienz der Extraktion leitet sich aus der Massenbilanz (siehe Abb. 5-7) ab. Während der Anteil an Hyperforin im Extrakt bei höherer Temperatur leicht ansteigt, fällt er in der extrahierten Droge um ca. 50 % ab. Eine möglichst selektive Extraktion von Hyperforin aus Johanniskraut mit hohen Gehalten im Extrakt wird durch tiefere Temperaturen begünstigt.

### 5.6.3 Extraktionsdauer

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Ausbeute und des Hyperforingehaltes von der Extraktionsdauer. Eine Extraktion über eine Stunde liefert einen Hyperforingehalt von 33 % verglichen mit 25 % nach 3- oder 5-stündiger Extraktionsdauer. Die Extraktausbeute erhöht sich von rund 1,65 % nach einer Stunde auf 2,2 % nach fünf Stunden. Während die Ausbeute nach längerer Extraktion weiter ansteigt, bleibt der Hyperforingehalt der Extrakte ab 3-stündiger Extraktion konstant (siehe Abb. 5-4). Dass die Steigerung der Ausbeute nicht auf die vermehrte Extraktion von Hyperforin zurückgeführt werden kann, ist an der absoluten Hyperforinausbeute im Extrakt erkennbar. Bereits nach einer

Stunde liegt diese bei rund 2,0 g und bleibt bei längerer Extraktionsdauer unverändert. Überkritisches Kohlendioxid, das die Extraktionshülse durchströmt, nimmt Extraktivstoffe auf und wird in Abhängigkeit der Löslichkeit abgesättigt. Gelöste Stoffe werden im CO<sub>2</sub>-Strom abtransportiert, frisches, unbeladenes CO<sub>2</sub> strömt nach und steht für noch ungelöste Bestandteile zur Verfügung. Dadurch kann sich das Sättigungsgleichgewicht zwischen Extraktivstoffen und überkritischem CO<sub>2</sub> permanent neu einstellen. Dies geschieht umso häufiger, je mehr Kohlendioxid die Extraktionshülse durchströmt. Während einer Extraktion werden zunächst Stoffe aus zerstörten Zellen gelöst (Abschwemme), der limitierende Vorgang hierbei ist die Lösungsgeschwindigkeit der Extraktivstoffe im überkritischen Extraktionsmedium. Parallel dazu diffundieren Extraktivstoffe aus unzerstörten Zellen in das Extraktionsmedium. Geschwindigkeitsbestimmend für diesen Vorgang ist die Diffusion über die Zellmembran (Sovova et al. 1994). Im Laufe des Extraktionsprozesses wird das überkritische CO<sub>2</sub> zunächst mit jenen Stoffen abgesättigt, die die höchste Löslichkeit besitzen. In dem Maße wie die Abschwemme aus zerstörten Zellen in den Hintergrund und die Diffusion aus intakten Zellen in den Vordergrund tritt, nimmt der Sättigungsgrad im Extraktionsmedium ab. Die dadurch freiwerdende Lösungskapazität steht damit für andere, schwerer lösliche Extraktivstoffe zur Verfügung, die sich in dieser Phase im Extrakt anreichern. Die Massenbilanz (siehe Abb. 5-7) spiegelt die höhere Ausbeute an Hyperforin im Extrakt nach einer Stunde wieder. Bei längeren Extraktionszeiten kommt der Effekt der Diffusion von Hyperforin aus intakten Zellen stärker zum Tragen, dies schlägt sich in einer geringeren Wiederfindung in der extrahierten Droge nieder.

#### 5.6.4 CO<sub>2</sub>-Massenfluss

Die Abhängigkeit der Extraktionsergebnisse vom CO<sub>2</sub>-Massenfluss gibt Aufschluss über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Extraktionsprozesses (siehe vorangegangener Abschnitt 5.6.3). Die Diffusion aus intakten, bei der Zerkleinerung nicht zerstörten Zellen, in das Extraktionsmedium wird durch geringere CO<sub>2</sub>-Massenflussraten und den dadurch bedingten geringeren Durchflussgeschwindigkeiten und verlängerten Verweilzeiten des überkritischen Kohlendioxids in der Extraktionshülse begünstigt (Mira et al. 1995). Um den Effekt des CO<sub>2</sub>-Massenflusses unabhängig von dem in Abschnitt 5.6.3 diskutierten Effekt der CO<sub>2</sub>-Menge untersuchen zu können, wird bei verändertem Massenfluss die Extraktionsdauer entsprechend so angepasst, dass die Gesamtmenge an CO<sub>2</sub> konstant bleibt. Während die Ausbeute mit zunehmendem Massenfluss geringfügig abnimmt, bleibt der Hyperforingehalt der Extrakte unverändert (siehe Abb. 5-5). Der CO<sub>2</sub>-Massenfluss besitzt somit keinen entscheidenden Einfluss auf das Extraktionsergebnis. Dies legt den Schluss nahe, dass bei Verwendung von zerkleinerter Droge als Ausgangsmaterial, die Abschwemme den dominierenden

Massentransportvorgang während der Extraktion darstellt. Betrachtet man die Massenbilanz (siehe Abb. 5-7) der Extraktion in Abhängigkeit vom CO<sub>2</sub>-Massenfluss, fällt die leicht erhöhte Hyperforinausbeute von rund 63 % bei einer Flussrate von 4 kg·h<sup>-1</sup> auf. Dies deutet darauf hin, dass auch die Diffusion aus intakten Zellen während der Extraktion eine – wenn auch untergeordnete – Rolle spielt, die jedoch erst bei sehr geringen, schwer realisierbaren CO<sub>2</sub>-Massenflüssen zum Tragen kommt. Insgesamt scheint die Löslichkeit sowohl von Hyperforin als auch der unerwünschten Begleitstoffe, insbesondere Cuticularwachse, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Extraktionsprozesses zu sein. Cuticularwachse sind Bestandteil der Cuticula und als solche auf der Oberfläche lokalisiert. Die Extraktion dieser Begleitstoffe erfolgt somit in Form einer reinen Abschwemme. Hyperforin ist überwiegend in Blüten lokalisiert. Durch die Zerkleinerung mittels Schneidmühle wird ein Großteil der Zellen aufgeschlossen und das Hyperforin so einer Abschwemme zugänglich gemacht.

### 5.6.5 Zersetzung von Hyperforin während des Extraktionsprozesses

Der Vergleich des Peakflächenverhältnisses von Orthoforin zu Hyperforin in der Ausgangsdroge mit dem der CO<sub>2</sub>-Extrakte erlaubt eine grobe Abschätzung einer eventuell auftretenden Zersetzungstendenz. Orthoforin stellt lediglich ein Zwischenabbauprodukt von Hyperforin bei der oxidativen Zersetzung dar (Fuzzati et al. 2001). Das hat zur Folge, dass der Orthoforingehalt nicht nur durch den Abbau von Hyperforin allein, sondern auch durch die weitere Zersetzung von Orthoforin zu nicht detektierbaren Abbauprodukten beeinflusst wird. Ein direkter Vergleich setzt weiterhin eine identische Extrahierbarkeit von Hyperforin und Orthoforin mit überkritischem CO<sub>2</sub> voraus. Orthoforin unterscheidet sich von Hyperforin durch eine zusätzliche Hydroxylfunktion (siehe Abb. 4-2 auf Seite 37). Diese verleiht Orthoforin einen hydrophileren Charakter als Hyperforin. Aus diesem Grund dürfte die Extrahierbarkeit von Orthoforin im Vergleich zu Hyperforin schlechter sein und zwar insbesondere bei niedrigen Drücken und damit geringer Lösungskapazität und bei kurzen Extraktionszeiten und den damit verbundenen hohen Sättigungsgraden für Hyperforin. Wie in Abb. 5-8 dargestellt, führen Extraktionen bei 90 bar/40 °C/3 h und 120 bar/40 °C/1 h zu keiner Veränderung des Orthoforin/Hyperforin-Verhältnisses verglichen mit der Ausgangsdroge. Alle weiteren untersuchten Extraktionsbedingungen führen zu einer signifikanten Zunahme dieses Verhältnisses. Offen bleibt, inwieweit die beobachteten Effekte auf eine unterschiedliche Extrahierbarkeit zurückzuführen sind, oder eine Zersetzung während der Extraktion durch Temperaturbelastung in der Extraktionshülse dafür verantwortlich ist. Nachdem gelöstes Hyperforin den Extraktionsbehälter verlassen hat, sammelt es sich im Endabscheider bei Temperaturen um 8 °C. Relativ tiefe Temperaturen in Verbindung mit einer CO<sub>2</sub>-Schutzgasatmosphäre im Separator verhindern weitere Zersetzungsreaktionen. Begünstigt werden Abbaureaktionen da-

gegen durch die vergleichsweise hohen Temperaturen im Extraktionsbehälter. Kurze Extraktionszeiten haben eine kurze Verweilzeit der Droge im Extraktionsbehälter und damit eine geringere Temperaturbelastung zur Folge. Neben einer schlechteren Extrahierbarkeit kann dies das unveränderte Peakflächenverhältnis erklären. Für eine Extraktion bei 90 bar und 40 °C über 3 h ist die Temperaturbelastung identisch mit einer Extraktion bei 120 bar und ansonsten identischen Bedingungen. In diesem Fall dürfte eine schlechtere Extrahierbarkeit auf Grund geringerer Lösungskapazität für das unveränderte Peakflächenverhältnis verantwortlich sein. Festzuhalten bleibt, dass eine Extraktion bei geringem Druck oder mit kurzer Dauer das Orthoforin/Hyperforin-Peakflächenverhältnis nicht negativ beeinflusst, während höhere Extraktionstemperaturen und eine längere Dauer es in Richtung Orthoforin verschieben. Die Zerkleinerung der Droge in der Schneidmühle führt zu einer deutlichen Reduktion des Hyperforingehaltes durch Zersetzung.

### **5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Optimierung der Extraktionsbedingungen**

Um eine möglichst starke Anreicherung von Hyperforin im CO<sub>2</sub>-Extrakt zu erreichen, sollten Extraktionsbedingungen bei moderatem überkritischem Druck von 90-120 bar in Verbindung mit Temperaturen, die nicht höher als 40 °C liegen, und Extraktionszeiten von einer Stunde angewendet werden. Auf diese Weise erreicht man eine bis zu 40-fache Anreicherung von Hyperforin im Extrakt. Höhere Extraktionsdrücke führen zu einem deutlichen Anstieg der Extraktausbeute, der nicht allein auf die Extraktion von Hyperforin sondern in zunehmendem Maße auch von Begleitstoffen, insbesondere Cuticularwachsen zurückzuführen ist. Höhere Temperaturen führen auf Grund einer gesteigerten Flüchtigkeit ebenfalls zu höheren Ausbeuten, die auch hier durch eine vermehrte Extraktion von Begleitstoffen verursacht werden. Weiterhin beeinflusst eine höhere Temperatur das Orthoforin/Hyperforin-Peakflächenverhältnis im Extrakt negativ. Dies weist auf einen höheren Gehalt an Abbauprodukten hin. Längere Extraktionszeiten begünstigen durch einen verringerten Sättigungsgrad von Hyperforin im überkritischen Kohlendioxid ebenfalls die Extraktion unerwünschter Begleitstoffe, dies macht sich auch hier in erhöhten Extraktausbeuten bemerkbar. Sowohl höhere Temperaturen als auch höhere Drücke und längere Extraktionszeiten führen zu einem geringeren Hyperforingehalt in den Extrakten und somit zu einer schlechteren Selektivität. Der CO<sub>2</sub>-Massenfluss hat keinen nennenswerten Einfluss auf Ausbeute und Hyperforingehalt, Dies deutet auf Abschwemme von Hyperforin und co-extrahierten Begleitstoffen als dominierenden Prozess hin. In der Massenbilanz werden abhängig von den Extraktionsbedingungen 50-65 % des insgesamt extrahierbaren Hyperforins im Extrakt wieder gefunden, wohingegen 10-20 % in der Droge verbleiben. Das Defizit von 20-30 % ist auf nicht entnehmbare Anteile

im Endabscheider zurückzuführen. Die Zerkleinerung der Droge durch Behandlung in der Schneidmühle reduziert den Hyperforingehalt in der Ausgangsdroge durch Abbau von Hyperforin. Alles in allem erweist sich eine Extraktion bei 120 bar und 40 °C bei einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> über 1 h unter Verwendung von unzerkleinerter Droge als optimal hinsichtlich Ausbeute, Hyperforingehalt und Anreicherung von Zersetzungsprodukten im Extrakt.

# KAPITEL 6

## WACHSABTRENNUNG DURCH ZWISCHENABSCHIEDUNG

### 6.1 Literaturübersicht

Wie in Kapitel 5 dargestellt, besitzt reines überkritisches CO<sub>2</sub> eine hohe Selektivität für lipophile Pflanzeninhaltsstoffe. Aus diesem Grund fallen neben den erwünschten wertbestimmenden Substanzen auch Bestandteile der Cuticularwachse im CO<sub>2</sub>-Extrakt an. Cuticularwachse bilden die Abschlusschicht der Pflanzenepidermis und erfüllen in erster Linie Schutzfunktionen (Choi et al. 1996). Aufgrund ihrer Lokalisation stehen sie einer direkten Abschwemme zur Verfügung und können somit ohne nennenswerten Diffusionswiderstand in das Extraktionsfluid übergehen. Dies macht man sich auch bei der Gewinnung verschiedener Bestandteile der Cuticularwachse mit überkritischem Kohlendioxid zu Nutze (Choi et al. 1996, 1997).

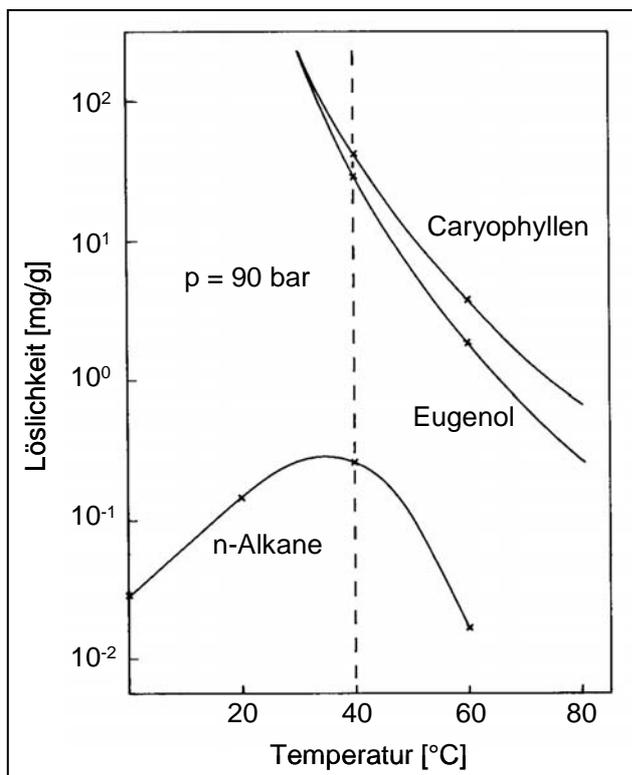


Abb. 6-1 Löslichkeitsisobaren von Caryophyllen, Eugenol und n-Alkanen bei 90 bar (Stahl et al. 1983)

Erste Ansätze zur Zwischenabscheidung von Cuticularwachsen bei der Extraktion von ätherischen Ölen beschreiben Stahl et al. (1983) am Beispiel der Extraktion von *Artemisia absinthium* L. (Wermut). Ausgehend von Löslichkeitsversuchen von Caryophyllen und Eugenol, zwei Hauptbestandteilen des ätherischen Öles von Wermut, sowie den n-Alkanen als Vertreter der Wachsfraktion entwickeln sie ein Extraktionsschema mit dreistufiger Abscheidung. Die Löslichkeitsisobaren der n-Alkane und der Bestandteile des ätherischen Öles sind in Abb. 6-1 dargestellt. Bei konstantem Druck von 90 bar und ausgehend von einer Temperatur von 40 °C nimmt die Löslichkeit sowohl der Bestandteile des ätherischen Öles als auch der n-Alkane mit steigender Temperatur ab.

Demgegenüber verhalten sich die Bestandteile des ätherischen Öles und der Cuticularwachs bei einer Absenkung der Temperatur entgegengesetzt. Während die Löslichkeit des ätherischen Öles mit sinkender Temperatur stark zunimmt, fällt die der n-Alkane ab. Bei einer Temperatur von ca. 0 °C ergibt sich daraus ein Unterschied in der Löslichkeit von mehreren Zehnerpotenzen, den man sich für eine fraktionierte Abscheidung zu Nutze machen kann. Ausgehend von einer Extraktion von Wermut bei 100 bar und 40 °C wird durch eine erste Zwischenabscheidstufe bei 70 bar und 0 °C eine nahezu quantitative Abtrennung der Cuticularwachs vom ätherischen Öl erreicht. Unter Anwendung desselben Extraktionsschemas gelingt die Wachsabtrennung auch für Kamillenblüten (*Chamomilla recutita* L. Rauschert.). Wie Tab 6-1 zeigt, finden sich in der Literatur eine Reihe von Beispielen zur Abtrennung der Cuticularwachs von ätherischem Öl auf dem Wege der fraktionierten Abscheidung. Allen gemeinsam ist, dass die Zwischenabscheidung durch eine starke Reduktion der Temperatur bei konstantem bzw. leicht abgesenktem Druck erreicht wird.

Eine Extraktion von *Hypericum perforatum* L. bei 300 bar und 40 °C mit zweistufiger Abscheidung beschreiben Catchpole et al. (2002). Die Zwischenabscheidebedingungen werden nicht explizit erwähnt, es findet sich lediglich ein Hinweis, dass sie „typischerweise bei 90 bar und 45-50 °C liegen“. Die Endabscheidung erfolgt bei 55-60 bar und Temperaturen von 45-50 °C. Unter diesen Bedingungen werden zwei Fraktionen gewonnen, die von den Autoren als „oleoresin“ (Zwischenabscheider) und „essential oil“ (Endabscheider) bezeichnet, und die auf ihren Gehalt an Hyperforin und Adhyperforin untersucht werden. Die Hauptmasse an Hyperforin fällt unter diesen Bedingungen im Zwischenabscheider an, über das Verhalten der Cuticularwachs während der Extraktion und Abscheidung werde keine Angaben gemacht.

Weitere Beispiele zur mehrstufigen Abscheidung von Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten, sowie zum Löslichkeitsverhalten von Hyperforin in verdichtetem Kohlendioxid finden sich in der gegenwärtigen Literatur nicht. Ausgehend von einer umfassenden Charakterisierung der Wachsfraktion von Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten wird untersucht, inwieweit sich das gängige Prinzip der Wachsabtrennung bei Extraktion von ätherischen Ölen auf *Hypericum perforatum* L. übertragen lässt.

Tabelle 6-1 Extraktion mit reinem überkritischen CO<sub>2</sub> im präparativen Maßstab und fraktionierter Abscheidung (Literaturübersicht)

Droge	Extraktions- bedingungen	Zwischenabscheide- bedingungen	Endabscheide- bedingungen	Autor (Jahr)
<i>Origanum majorana</i>	100 bar / 50 °C	80 bar / 0 °C	25 bar / -5 °C	Reverchon (1992)
<i>Chamomilla recutita</i>	90 bar / 40 °C	90 bar / 0 °C	30 bar / -5 °C	Reverchon und Senatore (1994)
<i>Mentha x piperita</i>	90 bar / 50 °C	80 bar / 0 °C	25 bar / -5 °C	Reverchon et al. (1994a)
<i>Ocimum basilicum</i>	100 bar / 40 °C	80 bar / 0 °C	25 bar / -5 °C	Reverchon et al. (1994b)
<i>Lavandula officinalis</i>	90 bar / 48 °C	80 bar / -10 °C	25 bar / 0 °C	Reverchon et al. (1995a)
<i>Salvia officinalis</i>	90 bar / 50 °C	85 bar / -12 °C	17 bar / -6 °C	Reverchon et al. (1995b, 1996)
<i>Coriandrum sativum</i>	250 bar / 40 °C	95 bar / 43 °C	55 bar / 55 °C	Catchpole et al. (1996)
<i>Lavandula officinalis</i>	300 bar / 40 °C	75-95 bar / 30-40 °C	20-55 bar / 20-40 °C	Oszagán et al. (1996)
<i>Zingiber officinalis</i>	90 bar / 50 °C	1. Stufe: 90 bar / 0 °C 2. Stufe: 75 bar / 35 °C	40 bar / 22 °C	D'Alpaos et al. (1997)
<i>Coriandrum sativum</i>	150 bar / 50 °C	60 bar / 10 °C	30 bar / 0 °C	Anitescu et al. (1997)
<i>Eugenia caryophyllata</i>	90 bar / 50 °C	90 bar / -10 °C	15 bar / 10 °C	Della Porta et al. (1998)
<i>Illicium verum</i>	90 bar / 50 °C	90 bar / -10 °C	15 bar / 10 °C	Della Porta et al. (1998)
<i>Angelica archangelica</i>	120 bar / 40 °C	60 bar / 10 °C	30 bar / 0 °C	Doneanu und Anitescu (1998)
<i>Satureja hortensis</i>	120 bar / 40 °C	90 bar / 15 °C	2 bar / -5 °C	Esquivel et al. (1998)
<i>Eucalyptus globulus</i>	90 bar / 50 °C	90 bar / -10 °C	15 bar / 15 °C	Della Porta et al. (1999)
<i>Mentha pulegium</i>	100 bar / 50 °C	80 bar / -16 °C	18 bar / 0 °C	Reis-Vasco et al. (1999)
<i>Foeniculum vulgare</i>	300 bar / 40 °C	70-90 bar / 40 °C	20 bar / 20 °C	Simándi et al. (1999)

## 6.2 Ergebnisse und Diskussion

### 6.2.1 Untersuchung der Wachsfraktion ohne Zwischenabscheidung

#### 6.2.1.1 Voruntersuchungen mittels Gaschromatographie und Flammenionisationsdetektion

Zwei unter identischen Bedingungen bei 120 bar/40 °C/12 kg·h<sup>-1</sup>/2 h hergestellte Extrakte aus 370 g zerkleinertem Johanniskraut (80,4 % < 1 mm, siehe Abschnitt 5.2 auf Seite 45) werden einer Gefriertrocknung (siehe 8.5.2 auf Seite 119) unterzogen. Der so gewonnene CO<sub>2</sub>-Extrakt wird manuell in einen hellen, gelb-grünlich erscheinenden, flockigen und in einen zähen, klebrigen Teil mit brauner Farbe getrennt. Die beiden Fraktionen des Extraktes sind in Abb. 6-1 auf Seite 149 im Abschnitt 11.1 abgebildet. Der flockige, gelbliche Anteil liegt dem klebrig, braunen Anteil nach Extraktion und Gefriertrocknung oben auf, dies lässt auf eine geringere Dichte schließen. Beide Teile werden gewogen und deren Hyperforingehalt mittels HPLC bestimmt. Das Ergebnis ist in Tab. 6-2 zusammengestellt. Die braune, als „hyperforinreicher Anteil“ bezeichnete Fraktion repräsentiert ca. 2/3 der Masse des gesamten Extraktes. Sein Hyperforingehalt liegt bei rund 34 %. Somit stellt dieser Anteil 90 % des insgesamt im Extrakt enthaltenen Hyperforins dar. Die restlichen 10 % befinden sich im „wachsreichen Anteil“ des Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extraktes.

Tab. 6-2 Vergleich der Masse und des Hyperforingehaltes im hyperforinreichen und wachsreichen Anteil im Separator nach einer Extraktion bei 120 bar/40 °C/12 kg·h<sup>-1</sup>/2 h (Mittelwert ± Spannweite, n = 2 Extrakte)

	Hyperforinreicher Anteil	Wachsreicher Anteil
Masse [g]	5,21 ± 0,14	2,31 ± 0,42
% von Gesamtausbeute	69,4 ± 4,4	30,6 ± 4,4
Hyperforingehalt [%]	34,4 ± 2,0	8,4 ± 0,6
% vom Gesamthyperforin	90,3 ± 0,7	9,7 ± 0,7

In Abb. 6-3 ist ein exemplarisches GC-Chromatogramm der Wachsfraktion abgebildet. Man erkennt vier dominierende äquidistante Peaks, die auf Basis von Literaturdaten (Reverchon und Senatore 1994) einer homologen Reihe von n-Alkanen mit einer Kohlenstoffzahl von 27, 29, 31 und 33 zugeordnet werden können, wobei das C<sub>29</sub>-n-Alkan (Nonacosan) mengenmäßig überwiegt. Dies deckt sich mit Angaben von Brondz et al. (1983a), die mittels GC-MS-Untersuchungen Nonacosan als das dominierende n-Alkan in Johanniskraut identifizieren.

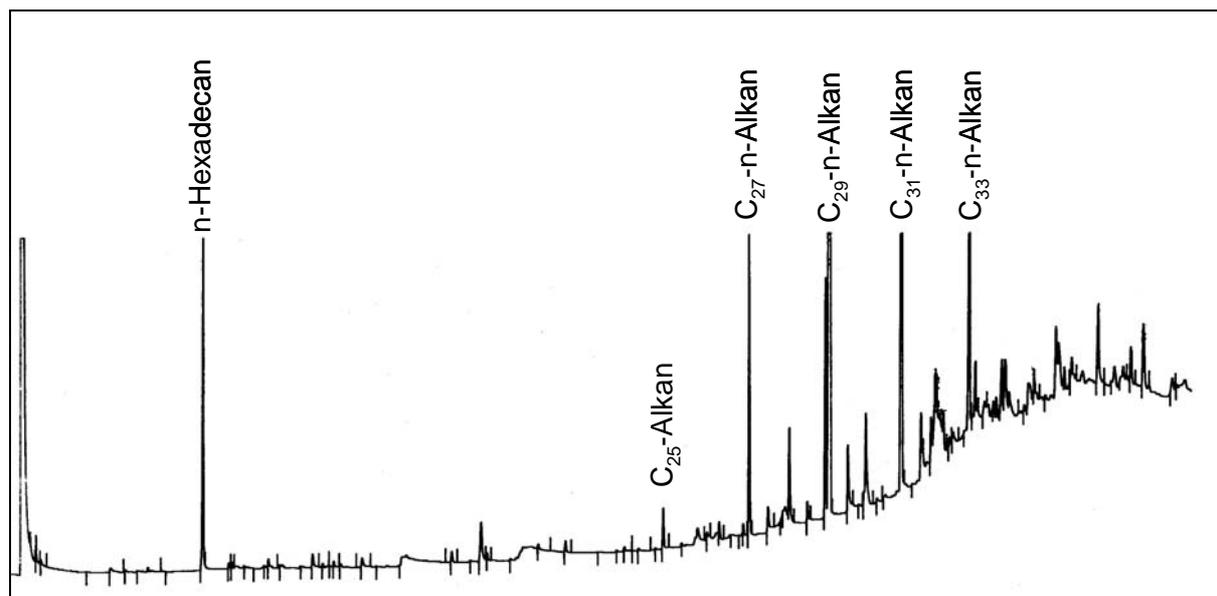


Abb. 6-3 GC-Chromatogramm der Wachsfraktion

### 6.2.1.2 Gaschromatographisch-Massenspektrometrische Untersuchung der Wachsfraktion<sup>2</sup>

Mittels gaschromatographischer Trennung und anschließender Flammenionisationsdetektion kann lediglich eine Reihe homologer n-Alkane nachgewiesen und quantifiziert werden. Mit Hilfe einer GC-MS-Untersuchung der Wachsfraktion von drei unter identischen Bedingungen bei 120 bar/40 °C, einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> über 3 h hergestellten Extrakten aus unzerkleinertem Johanniskraut soll ein qualitativer Überblick über weitere Bestandteile dieser Fraktion gewonnen werden. Hierzu wird wie im Abschnitt 6.2.1.1 beschrieben nach der Gefriertrocknung die Wachsfraktion von der Hyperforinfraktion abgetrennt. Um eine Erfassung aller, auch nicht ausreichend flüchtiger Substanzen, insbesondere Alkohole und organische Säuren, sicherzustellen, wird die Probe vor der gaschromatographischen Trennung mit einem Silylierungsreagenz umgesetzt. Bei der beschriebenen Methode wird dafür eine Mischung aus N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA) und Trimethylchlorsilan (TMCS) im Verhältnis 99:1 verwendet. Die Silylierung der Probe erfolgt dabei in Pyridin als Lösungsmittel bei Raumtemperatur. Weitere Parameter der Methode sind Abschnitt 8.4.3 ab Seite 116 zu entnehmen. Die auf diese Weise bestimmte Zusammensetzung der Wachsfraktion ist in Tab. 6-3 zusammengestellt. Die Struktur von fettgedruckten Substanzen kann mit Hilfe kommerziell erhältlicher Standards bzw. durch Vergleich der Spektren mit Spektraldatenbanken aufgeklärt werden. Mittels GC-MS-Analyse können neun n-Alkane von C<sub>21</sub>-C<sub>32</sub> identifiziert werden. Davon entfällt der Hauptanteil auf Nonacosan, das auch insgesamt den

<sup>2</sup> Für die Durchführung der Untersuchungen danke ich Dr. Christoph Seger, Universität Innsbruck und Dr. Franz Hadacek, Universität Wien

Hauptanteil der Wachsfraktion ausmacht. Ungeradzahlige n-Alkane dominieren über geradzahlige. Im Gegensatz zu den GC-FID-Untersuchungen wird kein C<sub>33</sub>-n-Alkan nachgewiesen. Insofern ist die dort gemachte Zuordnung in Frage zu stellen. Insgesamt decken sich diese Ergebnisse mit Untersuchungen von Brondz et al. (1983a), die ebenfalls Nonacosan als dominierendes n-Alkan identifizieren, sowie eine Dominanz von Alkanen ungeradzahligter Kettenlänge feststellen. Weiterhin können vier primäre Alkohole geradzahligter Kettenlängen C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub> und C<sub>30</sub> sowie ein sekundärer Alkohol (C<sub>29</sub>) identifiziert werden. Dies ist in Übereinstimmung zu einer Arbeit von Brondz et al. (1983b), die dieselben primären Alkohole in *Hypericum perforatum* L. nachweisen. Desweiteren kann eine Reihe gesättigter Fettsäuren zwischen C<sub>14</sub> und C<sub>32</sub> identifiziert werden, darunter Palmitin- und Stearinsäure, sowie die ungesättigten Fettsäuren Öl- und Linolsäure. Im Gegensatz zu Stojanovic et al. (2003) können außer diesen beiden ungesättigten Fettsäuren keine weiteren nachgewiesen werden. Weitere in Tab. 6-3 fettgedruckte Substanzen werden strukturaufgeklärt und sind in Tab. 6-4 zusammengefasst. Neben insgesamt 42 z. T. isomeren Wachsestern der Kettenlänge C<sub>29</sub>-C<sub>48</sub> findet sich in der Esterfraktion Glycerol-1-palmitat und Methyllinoleat. Wie die Fettsäurefraktion so wird auch die Wachsfraktion von Palmitinsäure als Säurekomponente dominiert (siehe Tab. 6-5). Unter den Wachsestern dominieren die geradzahligen Kettenlängen C<sub>40</sub>, C<sub>42</sub>, C<sub>44</sub> und C<sub>46</sub>. Die Ergebnisse zur Zusammensetzung der Wachsesterfraktion stimmen mit dem gegenwärtigen Wissen zur Biosynthese von Wachsen in höheren Pflanzen überein (Rashotte et al. 2001). Eine Reihe terpenoider Substanzen wird ebenfalls identifiziert. Dies sind mit Neroldiol ein Sesquiterpenalkohol und mit Neophytadien und Phytol zwei Diterpene, mit Squalen und den drei Sterolen  $\beta$ -Sitosterol und  $\beta$ -Stigmasterol und Nervisterol (Kikuchi et al. 1982) sowie den pentacyclischen Derivaten  $\beta$ -Amyrin und Lupeol insgesamt sechs Triterpene. Auffällig und überraschend ist das Auftreten der relativ polaren Vanillin- und Azelainsäure (Nonandisäure) in den CO<sub>2</sub>-Extrakten. Letztere wird von Limbeck und Puxbaum (1999) in atmosphärischen Aerosolen nachgewiesen. Sie könnte damit über das aus der Atmosphäre gewonnene Kohlendioxid in den Extrakt gelangen.

Das wirksamkeitsmitbestimmende Hyperforin und dessen Homologes Adhyperforin machen zusammen ca. 40 % der Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakte aus. Die Untersuchung gibt Hinweise über die Zusammensetzung der restlichen 60 % der CO<sub>2</sub>-Extrakte. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass es sich in Tab. 6-3 lediglich um relative Anteile des gesamten Gaschromatogramms handelt und keineswegs um Gehalte im Extrakt.

Tab. 6-3 Zusammensetzung der Wachsfraktion im Endabscheider untersucht mittels GC-MS-Analyse nach vorheriger Umsetzung mit BSTFA/TCMS. Die relativen Gehalte werden aus den jeweiligen Peakflächen bezogen auf die Gesamtpeakfläche berechnet und repräsentieren den Mittelwert aus  $n = 3$  Extrakten. Zu fettgedruckten relativen Gehalten siehe Tab. 6-4.

Anzahl C-Atome	Alkane	Alkohole	Säuren	Ester	Terpene	Sonstiges
8						<b>0,1</b>
9						<b>0,1</b>
14			1,0			
15			0,7		<b>0,5</b>	
16			<b>9,3</b>	<b>0,2</b>		
17			0,2			
18			<b>1,5</b> <b>8,6</b> <b>2,0</b>	<b>0,2</b>		
20			0,9		<b>0,6</b> <b>1,1</b>	
21	0,4					
22			0,7			
23	0,2		0,2			
24		0,6	1,3			
25	0,6					
26		2,0	2,0			
27	3,3					
28	0,9	4,2	2,4		<b>1,1</b> <b>5,5</b> <b>1,0</b>	
29	39,3	0,9		0,5		
30	1,2	3,0	2,0	0,6	<b>0,2</b> <b>0,3</b> <b>0,4</b>	
31	1,9					
32	0,6		0,1	0,6		<b>0,6</b>
33				0,5		
34				0,4		
36				0,5		
38				1,5		
39				0,2		
40				2,7		
41				0,3		
42				2,6		
43				0,2		
44				3,1		
45				0,1		
46				2,0		
48				0,6		

Tab. 6-4 Teilüberblick über Substanzen, deren Struktur aufgeklärt werden kann  
(vgl. Tab. 6-3)

Anzahl C-Atome	Säuren	Ester	Terpene	Sonstiges
8				<b>Vanillinsäure</b>
9				<b>Azelainsäure</b>
15			<b>Neroldiol</b>	
16	<b>Palmitinsäure</b>	<b>Glycerol-1-palmitat</b>		
18	<b>Stearinsäure Ölsäure Linolsäure</b>	<b>Methylinoleat</b>		
20			<b>Neophytadien Phytol</b>	
28			<b>β-Stigmasterol β-Sitosterol Nervisterol</b>	
30			<b>Squalen β-Amyrin Lupeol</b>	
32				<b>n-Aldehyd</b>

Alles in allem stimmen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Zusammensetzung der Cuticularwache von *Hypericum perforatum* L. (Stojanovic et al. 2003) mit einer Reihe anderer Pflanzen überein (Martins et al. 1999, Jetter und Riederer 1999, 2000, Griffiths et al. 2000). Es zeigt sich, dass die CO<sub>2</sub>-Extrakte aus Johanniskraut neben den wertbestimmenden Inhaltsstoffen Hyperforin und dessen Homologem Adhyperforin (zusammen ca. 40 %) eine Vielzahl wachsartiger Substanzen enthalten. Dominierend hierbei ist das C<sub>29</sub>-n-Alkan, eine Reihe von Fettalkoholen und -säuren sowie deren Wachsester, desweiteren β-Sitosterol. Diese Substanzen sind überwiegend Bestandteile der Cuticularschicht der Epidermis, also der äußeren Zellschicht und können somit während des Extraktionsprozesses leicht abgeschwemmt werden. Das Auftreten von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren im Extrakt, deutet darauf hin, dass nicht nur die Abschwemme der Epidermis eine Rolle spielt, sondern in begrenztem Umfang auch das Zellinnere aufgeschlossen wird.

Tab. 6-5 Relative Anteile der isomeren Wachsester identischer Masse, geordnet nach der Kettenlänge der Säurekomponente. Die Isomerzusammensetzung wird auf Basis des  $[RCO_2H_2]^+$ -Fragments im Massenspektrum eines Peaks homologer Wachsester berechnet. Werte repräsentieren den Mittelwert aus  $n = 3$  Extrakten

Wachsester		Anzahl C-Atome der Säuren										
Anzahl C-Atome	% TIC	12	14	15	16	17	18	20	22	24	26	
29	0.5	100										
30	0.6	5		95								
32	0.6	3		89			8					
33	0.5	77	2	8	14							
34	0.4	2		73			21	4				
36	0.5	12	4	35			26	23				
38	1.5	2	11	40		5	39	2	Sp <sup>3</sup>			
39	0.2	17		68			5	5				
40	2.7	2	3	83			6	4	2	Sp <sup>3</sup>		
41	0.3	2		10	60		16	11				
42	2.6	2	7	60			27	2	1		Sp <sup>3</sup>	
43	0.2	34		38		6	21					
44	3.1	2		79			Sp <sup>3</sup>	16	4			
45	0.1	78			22							
46	2.0	39			59			1				
48	0.6	97					3					

## 6.2.2 Versuche mit Zwischenabscheidung

### 6.2.2.1 Fraktionierte Abscheidung unter Einsatz des Kühlthermostaten ministat cc (Fa. Huber)

Wie die vorangegangene Literaturübersicht in Tab. 6-1 deutlich macht, wird die Abscheidung von Cuticularwachsen in der Regel durch eine starke Reduktion der Temperatur im Zwischenabscheider erreicht. Die Extraktionsanlage im Lieferzustand sieht lediglich ein Heizen, jedoch kein Kühlen des Zwischenabscheiders vor. Aus diesem Grund werden zunächst die Thermostaten von Fluidzyklon und Zwischenabscheider-Vorratsbehälter getauscht und erste Versuche zur Zwischenabscheidung durchgeführt. Dabei kommt ein ministat cc (200 W bei 0 °C, 3 l-Bad, Fa. Huber) als Kühlthermostat mit Ethanol als Wärmeträger zum Einsatz. Der

<sup>3</sup> Spuren

Eintritt des Kühlmediums erfolgt an einem kurzen Wärmetauscher vor, der Austritt an einem Wärmetauscherstück hinter dem Fluidzyklon. Die Ansteuerung des Thermostaten erfolgt wie in Abschnitt 3.4.2 auf Seite 45 für den Zwischenabscheider beschrieben, über den Analogausgang (0-10 V) des Reglers. Der Sollwert wird über den entsprechenden Regler der CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage vorgegeben.

Unter diesen apparativen Voraussetzungen fällt bei drei Extraktionsbedingungen eine Zwischenabscheiderfraktion an. Extraktions- bzw. Zwischenabscheidebedingungen über die gesamte Extraktionsdauer gemittelt finden sich in Tab. 6-6 zusammen mit den Ausbeuten an Endabscheider- und Zwischenabscheiderfraktion. CO<sub>2</sub>-Massenfluss (8 kg·h<sup>-1</sup>) und Extraktionsdauer (3 h) bleiben unverändert. Der Sollbedingungen im Zwischenabscheider betragen 80 bar/0 °C.

Tab. 6-6 Ausbeuten an Zwischenabscheider- und Endabscheiderfraktion;

CO<sub>2</sub>-Massenfluss = 8 kg·h<sup>-1</sup>, Extraktionsdauer = 3 h

Extraktion	Zwischenabscheidung	Ausbeuten [g] (% von Gesamtausbeute)	
		Zwischenabscheider	Endabscheider
90 bar/40 °C	79 bar/25 °C	-	5,02 (100)
120 bar/40 °C	81 bar/23 °C	0,35 (6,7)	4,91 (93,3)
196 bar/60 °C	82 bar/26 °C	1,15 (16,7)	5,75 (83,3)
200 bar/40 °C	77 bar/21 °C	1,23 (21,4)	4,53 (78,6)

Während für den Zwischenabscheidedruck die Sollvorgabe mit geringen Abweichungen eingehalten werden kann, liegt die Temperatur im Fluidzyklon mit 21-26 °C über der Zielvorgabe und ist, wie Abb. 6-4 zeigt, über die gesamte Prozessdauer starken Schwankungen unterworfen. Die Temperatur im Fluidzyklon stellt sich nicht durch die Regelung ein, sondern wird durch eine Reihe anderer Einflussgrößen bestimmt. Zunächst ist in diesem Zusammenhang konstruktiv bedingte, äußerst kurze Kühlstrecke zu nennen, die für eine Abkühlung des 40-60 °C warmen, überkritischen CO<sub>2</sub> zur Verfügung steht. Diese besteht aus einem ca. 30 cm langen Wärmetauscher in Form eines Doppelmantels vor dem Fluidzyklon und aus dem Doppelmantel des Fluidzyklons selbst. Der Wärmetauscher, der ein Erwärmen des CO<sub>2</sub> von -10 °C bei Eintritt in die Hochdruckpumpe auf 40-60 °C vor Eintritt des überkritischen CO<sub>2</sub> in den Extraktionsbehälter sicherstellt, ist im Vergleich dazu ca. 5 m lang und wird mit 10 °C Übertemperatur betrieben. Weiterhin ist die relativ geringe Kühlleistung des ministat cc in Verbindung mit dessen geringem Badvolumen zu nennen. Im Zwischenabscheider ausfal-

lende Cuticularwaxse können sich auf der Innenwand des Zyklons niederschlagen und temporär den Wärmeübergang verschlechtern. Insgesamt stellt sich im Laufe einer Extraktion innerhalb des Zyklons ein Gleichgewicht zwischen eingetragener Wärmemenge und über den Thermostaten abgeführter Wärme ein. Im Gleichgewicht und bei Abwesenheit von Störgrößen wie z. B. Fluss- und Druckschwankungen sollte die Temperatur im Fluidzyklon konstant bleiben. Die z. T. starken Schwankungen der Temperatur im Fluidzyklon deuten somit auf einen ineffizienten Regelkreis hin.

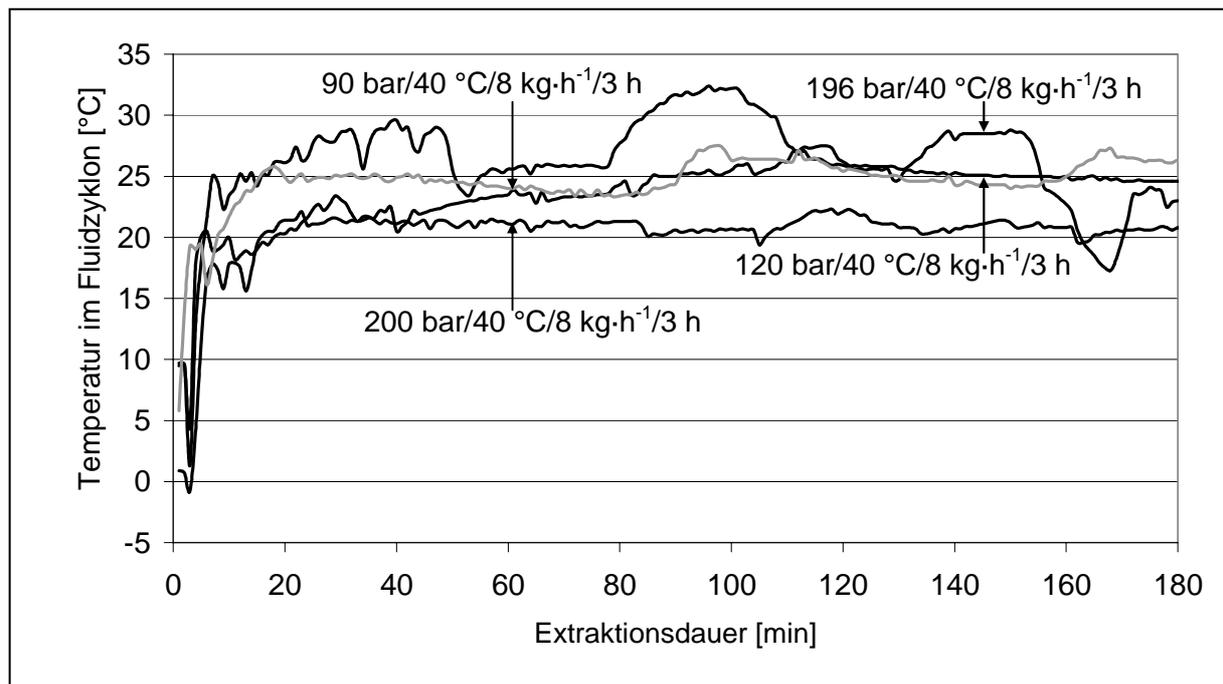


Abb. 6-4 Temperatur im Fluidzyklon über die jeweilige Prozessdauer bei verschiedenen Extraktionsbedingungen mit Kühlthermostat ministat cc (Fa. Huber)  
Sollbedingungen im Fluidzyklon 80 bar/0 °C

Wie Tab. 6-6 zeigt fallen trotz relativ hoher Temperaturen im Fluidzyklon wechselnde Anteile des gesamten Extraktes im Zwischenabscheider an. Diese sind für eine Extraktion bei 120 bar/40 °C mit ca. 7 % äußerst gering. Eine Drucksteigerung auf 200 bar führt in Folge der höheren Dichte des Extraktionsmediums (siehe Abschnitt 5.6.1 auf Seite 56) zu einer Steigerung der Gesamtausbeute um 0,5 g. Die Erhöhung der Ausbeute der Zwischenabscheiderfraktion um rund 0,9 g von 0,35 auf 1,23 g deutet darauf hin, dass zusätzlich extrahierte Stoffe zum allergrößten Teil im Zwischenabscheider anfallen bzw. bei einer Extraktion mit moderateren Bedingungen nicht im Extrakt erscheinen. Die darüber hinaus im Fluidzyklon anfallende Masse an Extrakt ist darauf zurückzuführen, dass die Temperatur unter diesen Extraktionsbedingungen mit 21 °C am tiefsten liegt und den geringsten Schwankungen unterworfen ist. Eine Steigerung der Temperatur von 40 auf 60 °C bei konstanter Dichte des

Extraktionsmediums durch Erhöhung des Druckes von 120 auf 196 bar resultiert in einer um 1,6 g d. h. ca. 30 % erhöhten Ausbeute. Dies ist auf eine bessere Löslichkeit von Begleitstoffen, wie z. B. Cuticularwachsen, in Folge eines erhöhten Dampfdruckes zurückzuführen (siehe Abschnitt 5.6.2 auf Seite 58). Die Steigerung der Gesamtausbeute verteilt sich gleichmäßig auf die Zwischen- und Endabscheiderfraktion, das heißt nicht die gesamte Menge an zusätzlich extrahierten Stoffen fällt im Zwischenabscheider an. Dies erscheint zunächst überraschend, da man annehmen würde, dass Stoffe, die erst bei einer erhöhten Extraktionstemperatur von 60 °C im Extrakt erscheinen, unter Bedingungen, wie sie im Zwischenabscheider herrschen, wieder ausfallen. Der Grund hierfür kann in der im Mittel relativ hohen Temperatur im Zwischenabscheider von 26 °C verbunden mit deren starken Schwankungen gesucht werden. Dies reicht offenbar nicht aus, um die zusätzlich extrahierten Stoffe quantitativ im Fluidzyklon abzuscheiden. Eine Extraktion bei 90 bar/40 °C liefert keine Zwischenabscheiderfraktion, der gesamte Extrakt fällt im Endabscheider an. Vergleicht man die Ausbeuten bei 90 bzw. 120 bar und 40 °C mit den Ergebnissen in Kapitel 5 zur Optimierung der Extraktionsbedingungen (siehe Abb. 5-2 auf Seite 47), so fällt auf, dass die Ausbeute bei 90 bar/40 °C mit den dortigen Ergebnissen vergleichbar ist (1,4 gegenüber 1,3 %). Bei 120 bar/40 °C liegt die Gesamtausbeute aus Zwischenabscheider- und Endabscheiderfraktion bei 1,4 %. Dem stehen ca. 2 % bei Extraktion ohne Zwischenabscheidung gegenüber. Dieses Defizit erklärt sich dadurch, dass bei Extraktion mit Zwischenabscheidung Extraktbestandteile im Rohrsystem vor und nach dem Fluidzyklon bzw. im Fluidzyklon selbst verbleiben und sich somit einer Entnahme aus der Anlage entziehen. Der Fluidzyklon ist so konstruiert, dass abgeschiedene Stoffe den Zyklon nach unten über ein horizontal angeordnetes Rohr verlassen und so in ein Auffangbehältnis gelangen, aus dem sie nach der Extraktion entnommen werden können. Da der Fluidzyklon und die Rohrleitungen nicht ohne weiteres zugänglich sind, wird im Rahmen dieser Untersuchung nur der Anteil berücksichtigt, der tatsächlich in diesem Auffangbehältnis anfällt.

Wie Tab. 6-7 zeigt, ist die Zwischenabscheiderfraktion gegenüber der Endabscheiderfraktion an n-Alkanen angereichert. Besonders ausgeprägt ist diese Anreicherung für das dominierende C<sub>29</sub>-n-Alkan zu beobachten: dessen Gehalt liegt 3- bis 6mal höher als in der Endabscheiderfraktion. Eine Übersicht der Anteile an insgesamt extrahiertem C<sub>29</sub>-n-Alkan, die in der Zwischenabscheider- bzw. Endabscheiderfraktion gefunden werden, gibt Abb. 6-5 wieder. Während nach einer Extraktion mit 120 bar/40 °C mit Zwischenabscheidung knapp 20 % des C<sub>29</sub>-n-Alkans im Zwischenabscheider anfallen, steigt der Anteil bei 200 bar/40 °C auf etwas über 60 % an. Bei einer Extraktion unter erhöhter Temperatur sind die beiden Anteile ungefähr ausgeglichen bei jeweils 50 %. Die absoluten Massen an Nonacosan in der Zwischenabscheider- und Endabscheiderfraktion sind in Tab. 6-8 zusammengestellt.

Tab. 6-7 Gehalt an  $C_{27}$ -,  $C_{29}$ - und  $C_{31}$ -n-Alkan in der Zwischenabscheider- und Endabscheiderfraktion;  $CO_2$ -Massenfluss =  $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ , Extraktionsdauer = 3 h

Extraktion	Zwischenabscheidung	Gehalt [% (m/m)]					
		Zwischenabscheider			Endabscheider		
		$C_{27}$	$C_{29}$	$C_{31}$	$C_{27}$	$C_{29}$	$C_{31}$
90 bar/40 °C	79 bar/25 °C	-	-	-	0,8	8,6	1,0
120 bar/40 °C	81 bar/23 °C	2,0	16,7	1,7	1,2	5,7	1,3
196 bar/60 °C	82 bar/26 °C	1,9	14,6	5,8	0,6	2,6	1,0
200 bar/40 °C	77 bar/21 °C	1,6	17,6	3,4	0,7	2,7	1,3

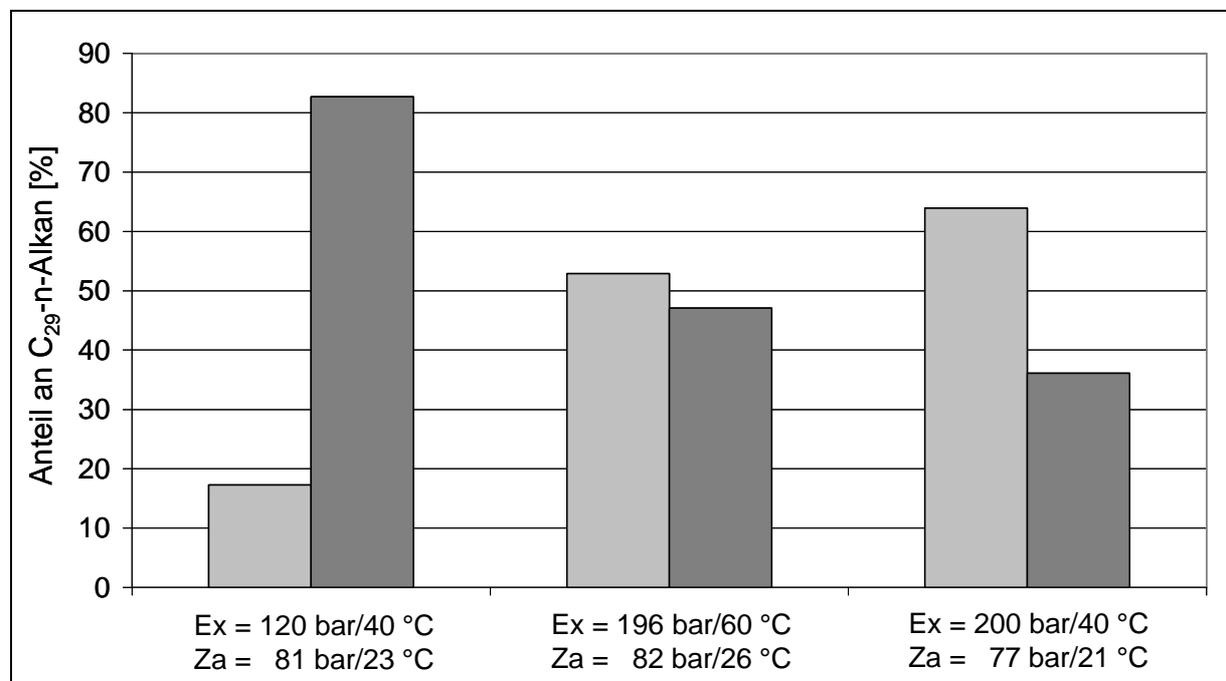


Abb. 6-5 Anteil der insgesamt extrahierten Masse an  $C_{29}$ -n-Alkan in der Zwischenabscheider- (□) und Endabscheiderfraktion (■);

$CO_2$ -Massenfluss =  $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ , Extraktionsdauer = 3 h

Bei Extraktionsbedingungen, unter denen eine Zwischenabscheiderfraktion anfällt, ist die Gesamtmasse an  $C_{29}$ -n-Alkan unabhängig von Extraktionsdruck und -temperatur konstant. Eine Extraktion bei 90 bar/40 °C liefert eine um ca. 1/3 höhere Ausbeute. Dies ist zum einen Indiz dafür, dass bereits bei moderaten Extraktionsbedingungen Nonacosan quantitativ extrahiert wird, zum anderen dafür, dass Extraktbestandteile, die im Fluidzyklon abgeschieden werden, sich z. T. einer Entnahme entziehen. Eine Extraktion bei 200 bar/40 °C bzw. bei

196 bar/60 °C führt zu einer effektiveren Abscheidung von Nonacosan im Fluidzyklon, obwohl die Temperatur 20-30 °C über der 0 °C-Marke liegt, die in der Literatur für eine Zwischenabscheidung von Cuticularwachsen favorisiert wird. Die Tatsache, dass bei ähnlichen Bedingungen im Zwischenabscheider und insgesamt gleicher extrahierter Masse an C<sub>29</sub>-n-Alkan stark unterschiedliche Anteile im Zwischenabscheider anfallen, erscheint unlogisch. Eine mögliche Erklärung liegt in den Löslichkeitsisothermen der n-Alkane begründet. Diese bestimmen Reverchon et al. (1993) am Beispiel des C<sub>28</sub>-n-Alkans mittels einer Durchflusszelle (siehe Abb. 6-6). Löslichkeitsdaten von Chandler et al. (1996) führen zum gleichen Ergebnis und zeigen darüber hinaus, dass das homologe C<sub>29</sub>-n-Alkan ähnliche Löslichkeitseigenschaften besitzt. Die in der Literatur vorhandenen Löslichkeitsdaten von C<sub>28</sub>- bzw. C<sub>29</sub>-n-Alkan erstrecken sich über einen Druckbereich von 80-250 bar bei Temperaturen von 35-45 bar. Daten zur Löslichkeit dieser n-Alkane in flüssigem CO<sub>2</sub> liegen nicht vor.

Tab. 6-8 Absolute Massen an C<sub>29</sub>-n-Alkan in der Zwischenabscheider- und Endabscheiderfraktion; CO<sub>2</sub>-Massenfluss = 8 kg·h<sup>-1</sup>, Extraktionsdauer = 3 h

Extraktion	Zwischenabscheidung	Masse an C <sub>29</sub> -n-Alkan [mg]		
		Z.-abscheider	E.-abscheider	Gesamt
90 bar/40 °C	79 bar/25 °C	-	429	429
120 bar/40 °C	81 bar/23 °C	58	280	338
196 bar/60 °C	82 bar/26 °C	168	150	318
200 bar/40 °C	77 bar/21 °C	216	122	338

In dem Verlauf der Isothermen zeigt sich der bereits in Abschnitt 2.1.3 auf Seite 4 am Beispiel der Löslichkeit von Quarzsand in überkritischem Wasser beschriebene Effekt von Druck und Temperatur. Wie in Abb. 6-6 zu erkennen, steigt bei konstantem Druck unterhalb von ca. 110 bar die Löslichkeit der Alkane mit fallender Temperatur. Dagegen steigt sie oberhalb dieses Drucks mit steigender Temperatur an. Ausgehend von einer Extraktion bei 90 bar/40 °C führt eine Zwischenabscheidung bei 79 bar/25 °C in Folge der Druckreduktion zu einer Abnahme der Löslichkeit. Unterhalb von 110 bar steigt die Löslichkeit der n-Alkane mit fallender Temperatur jedoch an, so dass sich die beiden Effekte neutralisieren können und die Löslichkeit unter Zwischenabscheidebedingungen ungefähr denen bei 90 bar/40 °C entspricht. Ähnliches ergibt sich für eine Extraktion bei 120 bar/40 °C und Zwischenabscheidung bei 81 bar/23 °C. Auch in diesem Fall dürften sich die beiden Effekte aufheben, so dass im Zwischenabscheider nur ein sehr geringer Anteil des C<sub>29</sub>-n-Alkans anfällt. Ein höherer Extraktionsdruck hat eine höhere Löslichkeit der n-Alkane zur Folge. Die Löslichkeit unter den

Bedingungen im Fluidzyklon ist nun gegenüber denen bei Extraktionsbedingungen deutlich verringert, so dass ein Teil der Wachsfraktion im Zwischenabscheider ausfällt. Ähnliches gilt wiederum für eine Extraktion bei erhöhter Temperatur von 60 °C und einem Druck von 196 bar. Auch in diesem Fall ist der Abfall in der Löslichkeit groß genug, damit die betrachteten n-Alkane in einer Zwischenstufe abgeschieden werden können. Insgesamt sollte bedacht werden, dass die vorliegenden Löslichkeitsdaten auf der Untersuchung von *Reinsubstanzen* beruhen, bei einer Extraktion jedoch ein *Vielstoffgemisch* vorliegt. Das Auftreten von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substanzen ist wahrscheinlich. Daher können die Löslichkeitsdaten nicht uneingeschränkt übertragen werden, sondern dienen lediglich dazu, eine Tendenz aufzuzeigen.

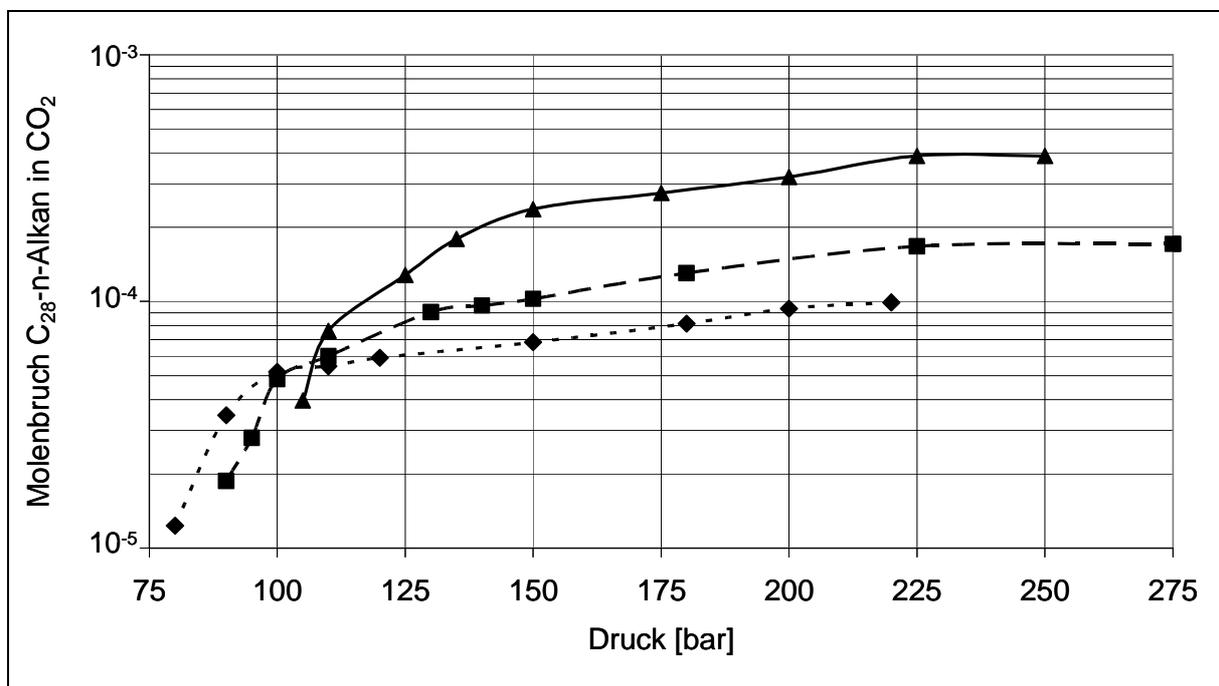


Abb. 6-6 Löslichkeitsisothermen von C<sub>28</sub>-n-Alkan in überkritischem CO<sub>2</sub>, bestimmt mittels Durchflusszelle (Reverchon et al. 1993);  
 (···◆···) 35 °C, (-■-) 40 °C, (—▲—) 45 °C

### 6.2.2.2 Fraktionierte Abscheidung unter Einsatz des Kühlthermostaten FP50 HP (Fa. Julabo)

Verglichen mit den Ansätzen zur fraktionierten Abscheidung von Cuticularwachsen in der Literatur (siehe Tab. 6–1) sind Temperaturen von 20-30 °C im Zwischenabscheider relativ hoch. Eine Abscheidung der Cuticularwachse erfolgt in der Regel bei Temperaturen von 10 °C und tiefer sowie Drücken von 90 bar und darunter. Unter diesen Bedingungen ist die Löslichkeit der Cuticularwachse stark verringert und es kommt zu deren Ausfällung (Rever-

chon et al. 1994). Um ähnlich tiefe Temperaturen zu erreichen, wird der Heiz-/Kühlthermostat ministat cc (Fa. Huber) gegen einen FP50 HP (800 W bei 0 °C, 8 l-Bad, Fa. Julabo) ausgetauscht. Die Badsolltemperatur wird direkt am Thermostat auf -30 °C eingestellt. In Vorversuchen kommt es häufig im Bereich der Ventile im Rohrsystem vor und nach dem Fluidzyklon zu einem Verstopfen durch die bei tiefen Temperaturen ausgefällten Substanzen. Dieses Problem kann verringert werden, indem die Kühlung lediglich am Fluidzyklon erfolgt, das Rohrsystem davor und danach jedoch nicht aktiv gekühlt wird. Die Temperatur im Fluidzyklon wird auch in diesem Fall nicht geregelt, sondern stellt sich unter den gegebenen Bedingungen wie bereits unter 6.2.2.1 beschrieben ein. Der Unterschied zu den vorangegangenen Versuchen ist, dass der eingesetzte Thermostat eine wesentlich höhere Kühlleistung und ein größeres Badvolumen besitzt. Um eine Equilibrierung des Fluidzyklons vor der Extraktion zu ermöglichen, wird die Anlage unter Umgehung des Extraktors angefahren, und dieser erst nach Einstellung von stabilen Bedingungen im Fluidzyklon in den Extraktionskreislauf geschaltet.

Im Rahmen der Optimierung der Extraktionsbedingungen hinsichtlich einer hohen Anreicherung von Hyperforin im CO<sub>2</sub>-Extrakt erweisen sich kurze Extraktionen bei 120 bar/40 °C über 1 h bzw. 90 bar/40 °C über 3 h bei einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> und Einsatz von unzerkleinerter Droge als optimal (siehe Kapitel 5 ab Seite 43). Unter Verwendung eines Thermostaten mit höherer Leistung soll untersucht werden, ob und inwieweit sich der Hyperforingehalt des CO<sub>2</sub>-Extraktes im Endabscheider durch eine fraktionierte Abscheidung der Wachse im Zwischenabscheider steigern lässt.

In einem ersten Schritt wird eine Extraktion bei 120 bar/40 °C bei einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> über 40 min durchgeführt. Die Zwischenabscheidung erfolgt bei 90 bar. Unter diesen Bedingungen stellt sich im Zwischenabscheider eine mittlere Temperatur von 16 °C ein. Der Temperaturverlauf über die gesamte Extraktionsdauer ist Abb. 6-7 zu entnehmen. Die Temperatur liegt damit ca. 10 °C tiefer als bei den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Versuchen mit Zwischenabscheidung. Im Fluidzyklon fallen unter diesen Bedingungen nur Spuren an Extrakt an. Der Gehalt an Hyperforin und C<sub>29</sub>-n-Alkan in der Endabscheiderfraktion ist in Tab. 6-9 zusammengestellt.

Der Gehalt an Hyperforin liegt in der Endabscheiderfraktion bei knapp 38 % und ist damit gegenüber einer Extraktion unter denselben Bedingungen ohne Zwischenabscheidung um ca. 8 % erhöht (vergleiche Tab. 7-3 auf Seite 92). Eine Temperatur von 16 °C im Zwischenabscheider liegt immer noch deutlich über den Vorgaben der Literatur. Die Kühlleistung des Thermostaten ist unter diesen Bedingungen ausgeschöpft, die Sollbadtemperatur von -30 °C

kann lediglich zu Beginn der Extraktion realisiert werden. Tiefere Temperaturen sind daher nur zu erreichen, indem die Flussrate an CO<sub>2</sub> verringert wird. In diesem Fall muss pro Zeiteinheit weniger Kohlendioxid von einer Ausgangstemperatur von 40 °C abgekühlt werden. Dadurch sollte es möglich sein, geringere Temperaturen im Fluidzyklon zu erreichen. Um die Gesamtmenge an CO<sub>2</sub> konstant zu halten, muss jedoch die Extraktionsdauer entsprechend verlängert werden (siehe auch Abschnitt 5.2.4 auf Seite 50).

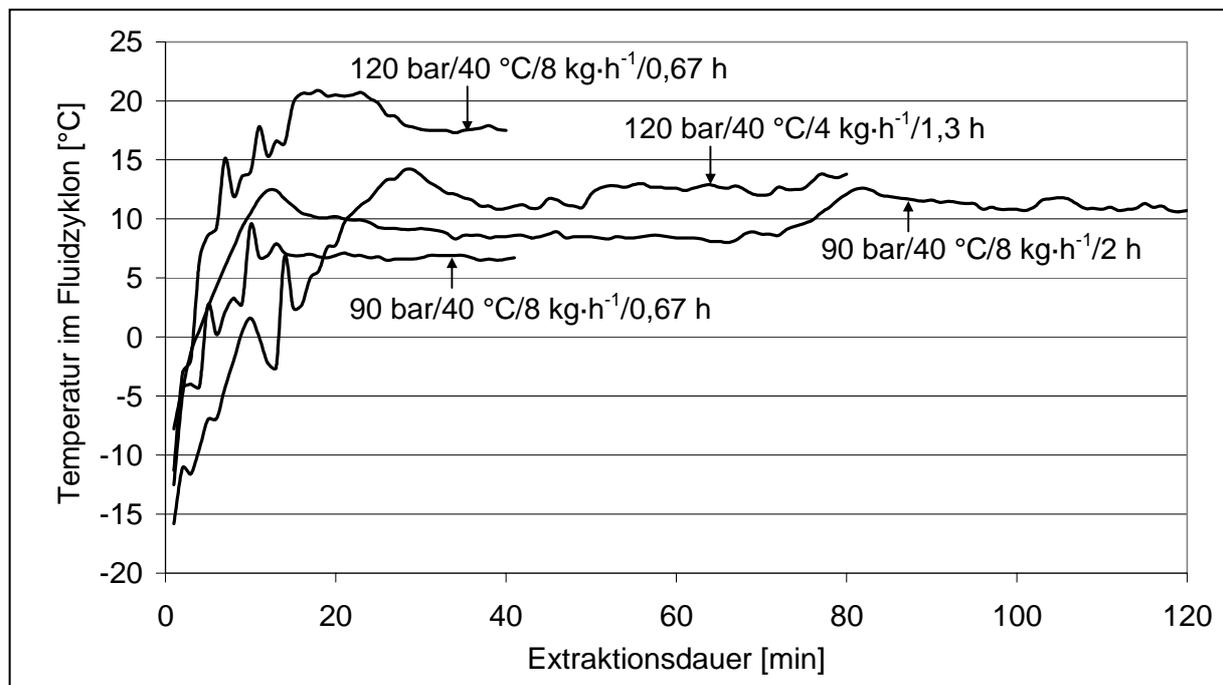


Abb. 6-7 Temperatur im Fluidzyklon über die jeweilige Prozessdauer bei verschiedenen Extraktionsbedingungen mit Kühlthermostat FP50 HP (Fa. Julabo); Sollbedingungen im Fluidzyklon 90 bar/0 °C

Tab. 6-9 Vergleich des Gehaltes an Hyperforin und C<sub>29</sub>-n-Alkan in der Endabscheiderfraktion bei unterschiedlichem CO<sub>2</sub>-Massenfluss (n = 3 Proben); Einsatz von 200 g unzerkleinertem Johanniskraut

Extraktion	Zwischenabscheidung	Gehalt [% (m/m)] ± sdv	
		Hyperforin	C <sub>29</sub> -n-Alkan
120 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup> /0,67 h	90 bar/16 °C	37,6 ± 0,4	6,7 ± 0,3
120 bar/40 °C/4 kg·h <sup>-1</sup> /1,33 h	90 bar/ 9 °C	33,4 ± 0,9	6,7 ± 0,2

Eine Extraktion bei 120 bar/40 °C und einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 4 kg·h<sup>-1</sup> für 80 min führt bei einem Druck im Zwischenabscheider von 90 bar zu einer mittleren Temperatur von 9 °C. Der Gesamtverlauf ist in Abb. 6-7 dargestellt. Auch unter diesen Bedingungen fallen nur Spuren des Extraktes im Zwischenabscheider an. Der Hyperforingehalt in der Endabscheiderfraktion liegt bei ca. 34 % und ist damit geringer als bei einer Extraktion, mit höherem CO<sub>2</sub>-Massenfluss, bei der sich eine höhere Temperatur im Zwischenabscheider einstellt. Der Gehalt an C<sub>29</sub>-n-Alkan wird nicht beeinflusst (siehe Tab. 6-9). Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass es sich um Einzelergebnisse handelt, die *nicht* durch eine Wiederholung bestätigt sind. Allerdings zeigt sich in Kapitel 5, dass die Schwankungen im Hyperforingehalt zwischen zwei identischen Extraktionen äußerst gering sind. Eine mögliche Erklärung für den Abfall des Hyperforingehaltes ist evtl. darin zu suchen, dass unterhalb einer gewissen Temperatur auch Hyperforin im Zwischenabscheider ausfallen kann, sich dort jedoch einer Entnahme durch Anhaftung auf der Innenfläche des Fluidzyklons entzieht. Dem widerspricht jedoch, dass die Ausbeute an Extrakt im Endabscheider, wie Tab. 6-10 zeigt, bei beiden Versuchen nahezu identisch ist. Die Tatsache, dass der Gehalt an Nonacosan durch tiefere Temperaturen nicht beeinflusst wird, deutet darauf hin, dass trotz des hohen Gehaltes in der Droge zahlreiche andere Stoffe bei der Zwischenabscheidung von Cuticularwachsen berücksichtigt werden müssen.

Tab. 6-10 Zusammenstellung der Extraktausbeuten der Versuche unter Verwendung des Kühlthermostaten FP50 HP; 200 g unzerkleinerte Droge

Extraktion	Zwischenabscheidung	Ausbeute [g] (%)
120 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup> /0,67 h	90 bar/16 °C	2,16 (1,08)
120 bar/40 °C/4 kg·h <sup>-1</sup> /1,33 h	90 bar/9 °C	2,24 (1,12)
90 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup> /0,67 h	90 bar/5 °C	0,80 (0,40)
90 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup> /0,67 h	-	0,88 (0,44)
90 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup> /2 h	90 bar/9 °C	1,84 (0,92)
90 bar/40 °C/8 kg·h <sup>-1</sup> /2 h	-	1,72 (0,86)

Einen direkten Vergleich des Gehaltes an Hyperforin bzw. C<sub>29</sub>-n-Alkan in der Endabscheiderfraktion nach Extraktionen bei 90 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup> und unterschiedlicher Extraktionsdauer mit und ohne Zwischenabscheidung gibt Abb. 6-8 wieder. Die Temperaturverläufe im Endabscheider sind in Abb. 6-7 dargestellt. Bei keinem der beiden Versuche mit Zwischenabscheidung fällt eine entnehmbare Zwischenabscheiderfraktion an. Gegenüber den Versuchen

ohne Einsatz einer fraktionierten Abscheidung ist der Gehalt an  $C_{29}$ -n-Alkan im Endabscheider um rund 1/3 verringert. Dies schlägt sich bei einer kurzen Extraktion über 40 min nicht in einem höheren Gehalt an Hyperforin nieder. Eine Verdreifachung der Extraktionsdauer auf 2 h führt bei Einsatz einer Zwischenabscheidung zu einem halbierten Gehalt an  $C_{29}$ -n-Alkan, trotz einer im Mittel höheren Temperatur im Fluidzyklon. Die Zwischenabscheidung zeigt in diesem Fall einen positiven Effekt auf den Gehalt an Hyperforin im  $CO_2$ -Extrakt, der jedoch statistisch nicht gesichert ist. Betrachtet man die Extraktausbeuten im Endabscheider (siehe Tab. 6-10), so fällt auf, dass durch eine Extraktion mit fraktionierter Abscheidung die Extraktausbeute gegenüber einer unfraktionierten Abscheidung nicht nennenswert verringert ist, sondern sich in der gleichen Größenordnung bewegt. Dies steht zunächst im Widerspruch zu der Beobachtung, dass der Gehalt an  $C_{29}$ -n-Alkan in der Endabscheiderfraktion verringert ist. Allerdings sollte bedacht werden, dass es sich bei der Wachsfraktion um ein spezifisch sehr leichtes Material handelt, so dass sich ein geringerer Gehalt an  $C_{29}$ -n-Alkan in der Endabscheiderfraktion nicht notwendigerweise in einer deutlich geringeren Ausbeute niederschlagen muss. Hinzu kommt, dass der Extrakt nicht quantitativ aus dem Separator zu entnehmen ist, sondern wechselnde, wenn auch geringe Anteile im Endabscheider verbleiben.

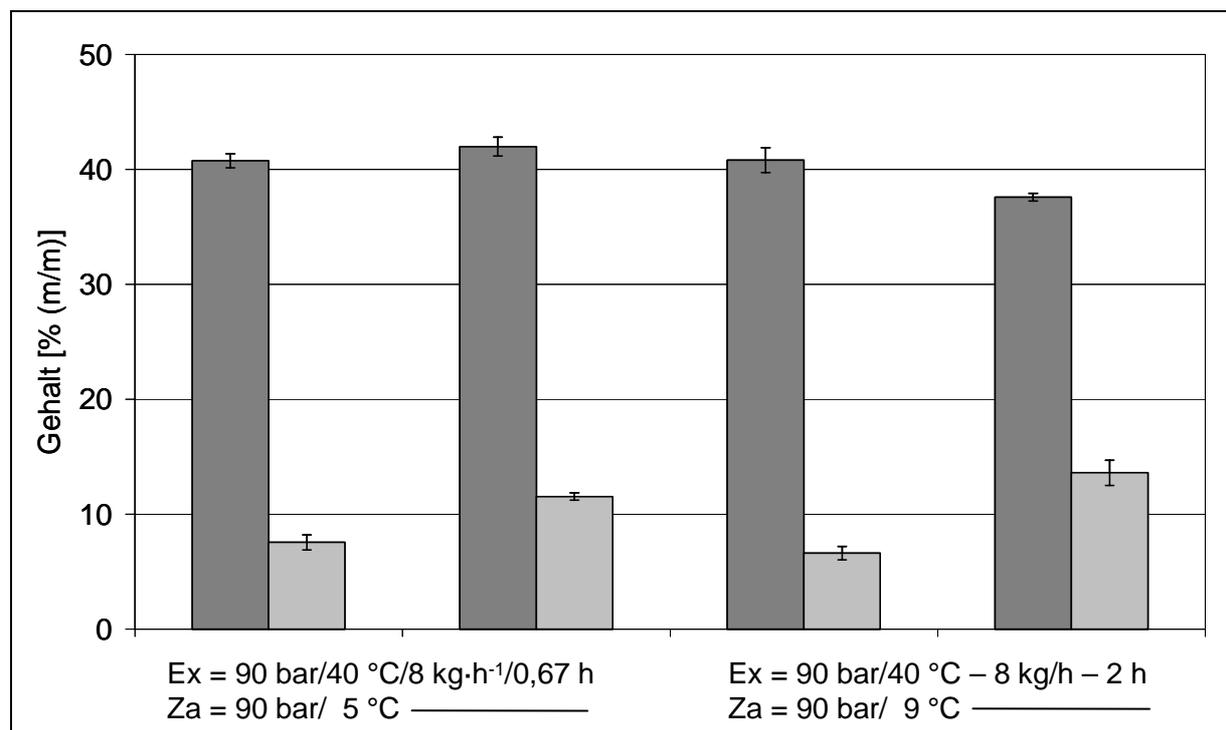


Abb. 6-8 Gehalt an Hyperforin (■) und an  $C_{29}$ -n-Alkan (□) in der Endabscheiderfraktion mit und ohne Zwischenabscheidung; 200 g unzerkleinerte Droge

Insgesamt betrachtet führen die Versuche zur Zwischenabscheidung unter den gegebenen Bedingungen nicht zu dem erhofften Effekt einer möglichst quantitativen Abscheidung der Wachsfraction im Fluidzyklon und damit verbunden einer Steigerung des Hyperforingehaltes in der Endabscheiderfraction. Eine genauere Kenntnis des Löslichkeitsverhaltens von Hyperforin und verschiedenen Bestandteilen der Wachsfraction in flüssigem und überkritischem CO<sub>2</sub> würde die Grundlage für eine Prozessführung mit Zwischenabscheidung erheblich verbessern. Diese Daten sind in der Literatur jedoch nur unzureichend vorhanden. Zwischenabscheidung durch isobare Abscheidung bei Temperaturen um 0 °C sind unter den baulichen Gegebenheiten der Extraktionsanlage nur schwer zu verwirklichen. Um solche Temperaturen im Fluidzyklon zu erreichen, ohne Gefahr zu laufen, dass Verstopfungen im Bereich der Ventile und damit unkontrollierbare Druckanstiege auftreten, sind verschiedene weitergehende Modifikationen der Extraktionsanlage notwendig. Aufgrund der geringen Kühlstrecke ist ein noch leistungsfähigerer Kühlthermostat als der Julabo FP50 HP notwendig. Eine *Regelung* der Zwischenabscheidetemperatur setzt den Einsatz eines Pt100-Fühlers im Fluidzyklon voraus, über den der Thermostat direkt angesteuert werden kann. Die Badtemperatur würde dann so geregelt werden, dass im Fluidzyklon die gewünschte Temperatur herrscht. Somit würde dieser Temperaturregelkreis von dem Regler der Anlage auf den Kühlthermostat verlagert. Um die Gefahr von Verstopfungen im Bereich der Ventile durch ausfrierende Wachse zu verringern, ist zudem der Einsatz einer Ventilheizung insbesondere an den Ventilen, die direkt vor und nach dem Fluidzyklon angeordnet sind, notwendig.

### **6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Wachsfraction und Zwischenabscheidung**

CO<sub>2</sub>-Extrakte aus *Hypericum perforatum* L. weisen eine starke Inhomogenität auf. Neben einer zähen, braunen hyperforinreichen Masse fällt im Endabscheider ein flockiges, gelbliches Produkt an. Der hyperforinreiche Anteil macht ca. 70 % der Gesamtausbeute aus und enthält 90 % des insgesamt extrahierten Hyperforins. Im wachtreichen Anteil lässt sich mittels GC-FID eine Reihe homologer n-Alkane ungerader Kettenlänge nachweisen und quantifizieren mit Nonacosan als deren Hauptbestandteil. Das Auftreten dieser n-Alkane in der Wachsfraction wird durch GC-MS-Untersuchungen bestätigt. Darüber hinaus kann eine Reihe von n-Alkanolen und Fettsäuren sowie Wachsestern aus beiden nachgewiesen werden. Sowohl für die n-Alkanole als auch für die Fettsäuren ist die geradzählige C-Kettenlänge dominierend. Unter den Fettsäuren überwiegt die Palmitinsäure, die ungesättigten Säuren Öl- und Linolsäure treten ebenfalls auf. Bis auf die freien Fettsäuren sind sämtliche Bestandteile der Wachsschicht der Cuticula zuzuordnen.

Erste Versuche zur Zwischenabscheidung von Wachsen bei tiefen Temperaturen liefern zwar eine Wachsfraktion im Zwischenabscheider mit hohen Gehalten an Nonacosan, dennoch fällt dessen größter Teil im Endabscheider an. Die Extraktionsergebnisse lassen sich mit Literaturdaten zum Löslichkeitsverhalten von n-Alkanen in flüssigem und überkritischem CO<sub>2</sub> ansatzweise erklären. Die Regelung der Temperatur im Zwischenabscheider ist äußerst ineffektiv, da der zunächst verwendete Thermostat eine nur unzureichende Leistung besitzt und die Kühlstrecke im Bereich des Fluidzyklons sehr kurz ist. Dadurch werden im Zwischenabscheider lediglich Temperaturen von 20-30 °C erreicht, die sehr großen Schwankungen innerhalb eines Prozesses unterworfen sind. Ein Austausch des Thermostaten gegen einen leistungsfähigeren führt zu einer Absenkung der Temperatur auf Werte zwischen 5 und 16 °C bei insgesamt geringeren Schwankungen. Auch unter den untersuchten Extraktionsbedingungen von 90 bzw. 120 bar und 40 °C sowie Abscheidung bei 90 bar fallen im Zwischenabscheider lediglich Spuren einer Wachsfraktion an. Der Gehalt an C<sub>29</sub>-n-Alkan im Endabscheider ist zwar verringert, dies schlägt sich jedoch nicht in einem höheren Gehalt an Hyperforin in den Extrakten nieder. Eine genauere Kenntnis des Löslichkeitsverhaltens von Hyperforin und Bestandteilen der Cuticularwachse sowie einige apparative Änderungen wären für eine effektive Zwischenabscheidung notwendig.

# KAPITEL 7

## IN-LINE-EINSCHLUSS VON HYPERFORIN IN CYCLODEXTRINE

### 7.1 Allgemeines zu $\beta$ -Cyclodextrinen

Das  $\beta$ -Cyclodextrinmolekül ist ein cyclisches Oligosaccharid, das aus sieben  $\alpha$ -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten besteht (Freudenberg und Meyer-Delius 1938, Freudenberg et al. 1947) und das die Fähigkeit besitzt, mit Gastkomponenten Einschlussverbindungen zu bilden (Cramer und Henglein 1957). Die Gewinnung von  $\beta$ -CD erfolgt durch enzymatischen Abbau von Stärke, wobei neben dem siebengliedrigen  $\beta$ -CD, das sechsgliedrige  $\alpha$ -CD und das achthgliedrige  $\gamma$ -CD entstehen. Die sieben Glucosemoleküle des  $\beta$ -CD bilden einen konischen Torus, dessen zentrale Kavität durch Gerüstkohlenstoffatome und ethergebundene Sauerstoffatome begrenzt wird, die überwiegend apolare Wechselwirkungen eingehen können. Die primären und sekundären Hydroxylgruppen ragen nach außen und verleihen dem Molekül auf diese Weise hydrophile Eigenschaften (siehe Abb. 7-1). Die Wasserlöslichkeit von  $\beta$ -Cyclodextrin ist mit 1,85 g/100 ml dennoch relativ gering. Durch Substitution eines Teiles der Wasserstoffatome der Hydroxylgruppen durch Methyl- bzw. Hydroxypropylgruppen lässt sich die Löslichkeit beträchtlich steigern. So wird die Wasserlöslichkeit von 1,8-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M- $\beta$ -CD) und Hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) mit größer 200 g/100 ml angegeben.

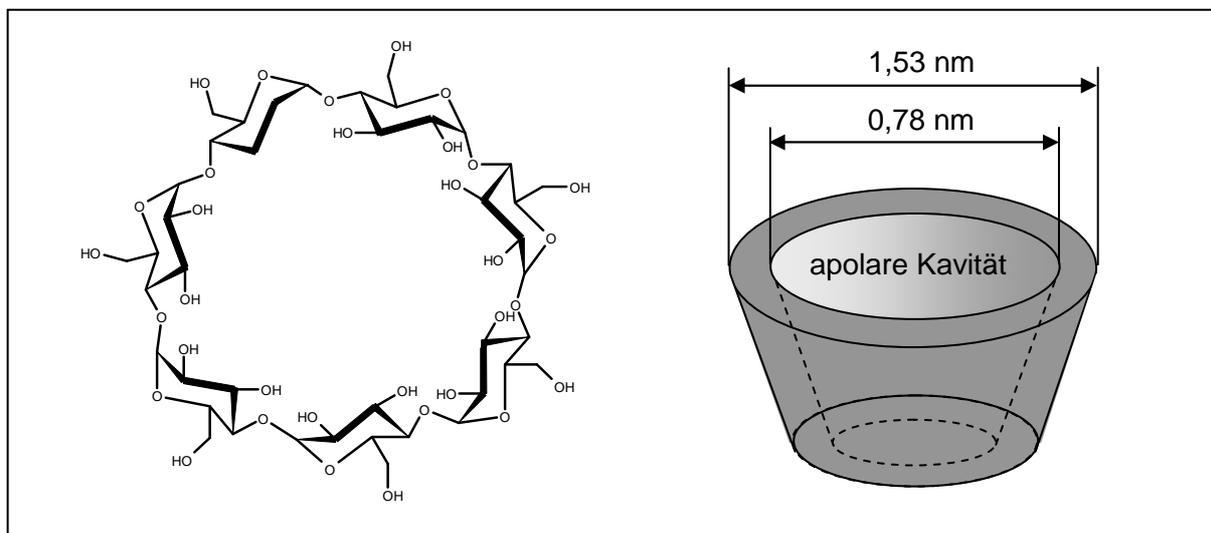


Abb. 7-1 Molekulare Struktur und dreidimensionale Anordnung von  $\beta$ -CD

Einschlussverbindungen können bereits in wässriger Lösung gebildet werden, kovalente Bindungen treten dabei nicht auf. Die Triebkraft für die Komplexbildung ist der Entropiegewinn der bei Verdrängung der polaren Wassermoleküle aus der apolaren Kavität des CD durch Gastmoleküle mit höherer Affinität auftritt (Szejtli 1998, Loftsson 1999). Dabei dringt das Gastmolekül ganz oder mit einem Molekülteil geeigneter Größe unter Ausbildung von van-der-Waals-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen in die apolare Kavität ein (Komiya und Bender 1978). In Lösung existiert ein dynamisches Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Gastmolekülen, dessen Lage entsprechend dem Massenwirkungsgesetz durch eine stoffspezifische Stabilitätskonstante definiert ist.

Die Herstellung von CD-Einschlussverbindungen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Bei der Lösungs- oder Copräzipitationsmethode werden wasserlösliche Substanzen direkt in meist heißen, konzentrierten wässrigen Lösungen des CD gelöst. Dabei kristallisieren die Einschlussverbindungen entweder sofort oder nach langsamem Abkühlen oder Eindampfen des Lösungsmittels aus. Nicht wasserlösliche Substanzen werden in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst und zusammen mit der wässrigen CD-Lösung geschüttelt, wobei die Komplexe als Präzipitat anfallen. Für die Herstellung von Einschlussverbindungen nach der Knetmethode wird zunächst ein wässriger Brei aus 20-80 % CD hergestellt, in den anschließend die flüssige oder gelöste Gastkomponente eingerührt wird. Auf diese Weise entsteht ein Teig, der getrocknet werden muss. Unabhängig von der gewählten Herstellungsmethode müssen anhaftende, nicht eingeschlossene Substanzreste durch Waschen mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel entfernt werden. Übersichten über die möglichen Herstellungsmethoden für CD-Einschlussverbindungen finden sich bei Hedges (1998) und bei Loftsson (1999).

Die Einsatzmöglichkeiten von CD im pharmazeutischen Bereich sind äußerst vielfältig. Neben der Löslichkeitsverbesserung und Stabilisierung von Arzneistoffen sind sie in der Lage, die Flüchtigkeit von Wirkstoffen zu verringern und flüssige Substanzen in eine pulverförmige, leicht handhabbare Form zu überführen. Eine Reihe von Übersichtsarbeiten stellt die Vielseitigkeit dieser Einsatzmöglichkeiten zusammen und beschreibt die Möglichkeiten der Herstellung und Charakterisierung von Cyclodextrin-Komplexen (Saenger 1980, Hedges 1998, Szejtli 1998, Loftsson 1999).

## 7.2 Literaturübersicht

Als Phloroglucinderivat ist Hyperforin sehr instabil und unterliegt unter Licht- und Wärmeeinfluss einem raschen oxidativen Abbau. Einen drastischen Gehaltsabfall von Hyperforin in „Oleum Hyperici“ nach dem Ergänzungsbuch zum DAB 6 (1953) innerhalb von 14 Tagen unter die Nachweisgrenze finden Maisenbacher und Kovar (1992). In einer umfangreichen Untersuchung zum Einfluss des verwendeten Öles und der Herstellungsmethode auf die Stabilität von Hyperforin in diesen Zubereitungen zeigen sich mittelkettige Triglyceride anderen Grundlagen überlegen, der Ausschluss von Licht wirkt sich positiv auf den Hyperforingehalt des Öles aus. Bei Lagerung von gelöstem Hyperforin in verschiedenen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur unter Lichtschutz über 30 Tage zeigt sich eine von der Polarität des jeweiligen Lösungsmittels abhängige Zersetzung. Während sich in methanolischer und methanolisch-wässriger Lösung noch 80 % des Ausgangsgehaltes findet, erhält man für stark apolare Lösungsmittel wie n-Hexan oder Petrolether Werte, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen (Orth et al. 2000). Die Lagerung von Reinhyperforin (> 99,9 %) als Substanz über acht Monate bei Raumtemperatur führt zu einem Abbau auf 55 % des Ausgangswertes, gegenüber 87 % bei -20 °C. Lagerung unter Stickstoffatmosphäre führt zu einer Stabilitätsverbesserung (Orth et al. 1999a). Für eine Langzeitlagerung von Hyperforin schlagen die Autoren -70 °C unter Stickstoffatmosphäre vor. Als das dominierende Zwischenabbauprodukt nach Oxidation von Hyperforin in methanolischer Lösung isolieren und identifizieren Orth et al. (1999b) das Orthofofin, auch Furohyperforin genannt. Mittels einer HPLC-MS-Kopplung können mit Isomeren des Orthofofins sowie dessen Hydroperoxids weitere Abbauprodukte von Hyperforin nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird gezeigt, dass das homologe Adhyperforin demselben Abbauschema wie Hyperforin unterliegt (Fuzzati et al. 2001).

Stabilitätsuntersuchungen von Hyperforin in Johanniskraut-Trockenextrakten und Zubereitungen daraus sowie Maßnahmen zu dessen Stabilisierung finden sich in erster Linie in der jüngeren Patentliteratur. So beschreibt Ghosal (2001) eine beschleunigte Zersetzung von Hyperforin in Anwesenheit von Hypericin, die sich durch Zusatz eines antioxidativ wirkenden Extraktes aus *Emblica officinalis* verlangsamt. In die gleiche Richtung zielen Arbeiten, die durch Zugabe verschiedener Antioxidantien vor oder während des Extraktionsvorganges eine Stabilisierung von Hyperforin über bis zu 12 Monate erreichen. Darin finden sich auch Beispiele zur Herstellung von hyperforinangereicherten und -stabilisierten Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten. Erdelmeier et al. (2001a, b) empfehlen den Zusatz von Ascorbylpalmitat zur Stabilisierung zu getrocknetem Johanniskraut bzw. von Ascorbinsäure zu einem frischen Pflanzenpresssaft. In beiden Fällen schließt sich eine Extraktion mittels überkritischem CO<sub>2</sub> an. Verschiedene Einflüsse auf die Stabilität von Hyperforin und andere Inhaltsstoffe in Kapselzubereitungen aus Johanniskraut-Trockenextrakten untersuchen Bilia et al. (2001). Dabei

zeigen Zubereitungen mit 2,85 % Ascorbinsäurezusatz eine leicht verbesserte Stabilität während der Lagerung bei 40 °C. Dagegen zeigt sich keine Verbesserung während einer Lagerung bei Raumtemperatur. Die Stabilität von 70 %-igem Rohhyperforin in Anwesenheit verschiedener Antioxidantien untersuchen Orth und Schmidt (2000) und finden eine geringfügige Stabilitätsverbesserung bei Einsatz von Ascorbinsäure. Weiterhin untersuchen sie die Stabilität von Hyperforin in Einschlussverbindungen mit verschiedenen Cyclodextrinen. Die Herstellung der Komplexe erfolgt nach der Lösungs- bzw. Copräzipitationsmethode. Während  $\alpha$ -CD und  $\beta$ -CD die Stabilität von Hyperforin negativ beeinflussen, zeigt sich nach Einschluss in  $\gamma$ -CD und M- $\beta$ -CD eine deutliche Verbesserung. Komplexe aus Hyperforin und M- $\beta$ -CD zeigen innerhalb von sechs Monaten bei 20 °C keine signifikante Abnahme des Hyperforingehaltes.

Neben den herkömmlichen Methoden zur Herstellung von Einschlussverbindungen mit  $\beta$ -CD kann die Komplexierung auch mittels überkritischem  $\text{CO}_2$  erfolgen. So beschreiben Van Hees et al. (1999) den Einschluss von Piroxicam in  $\beta$ -CD in überkritischem  $\text{CO}_2$ , indem eine physikalische Mischung aus beiden statisch unter Druck gesetzt wird. Bei einer Temperatur von 150 °C und Drücken von 300-450 bar werden Einschlussraten von bis zu 90 % erzielt. Ebenfalls auf statischem Wege bei 280 bar und 40 °C erreichen Perrut et al. (2002) den Einschluss von Prednisolon in HP- $\beta$ -CD. Mittels einer dynamischen Methode gewinnen Charoenchaitrakool et al. (2002) Komplexe aus Ibuprofen und M- $\beta$ -CD. Dabei wird das mit Ibuprofen beladene überkritische  $\text{CO}_2$  bei 130-220 bar und 35 °C über ein Bett aus M- $\beta$ -CD geleitet. Auf ähnliche Art und Weise bei Drücken zwischen 20 und 60 bar und im Temperaturbereich von 10-40 °C gelingt der Einschluss von Geraniol und Senföl in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD (Kamihira et al. 1990). Einen anderen Weg zur Bildung von Einschlussverbindungen beschreiben Adda und Lorne (1991). Durch Zusatz von  $\beta$ -CD in den Abscheidebehälter einer  $\text{CO}_2$ -Extraktionsanlage erreichen sie eine verbesserte Ausbeute flüchtiger Substanzen.

### 7.3 In-line-Herstellung der $\text{CO}_2$ -Extrakt-Einschlussverbindungen

Die Herstellung der Einschlussverbindungen aus Johanniskraut- $\text{CO}_2$ -Extrakt und verschiedenen Komplexierungsmitteln erfolgt In-line als Teil des Extraktionsprozesses. Hierzu werden vor der Extraktion 16,5 oder 33 g des jeweiligen Komplexierungsmittels als Festsubstanz bzw. in Lösung in den Endabscheider gegeben und anschließend 200 g Droge bei 120 bar, 40 °C bei einem  $\text{CO}_2$ -Massenfluss von  $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$  für 40 min extrahiert. Während der Extraktion gelangt der abgeschiedene Extrakt mit  $\beta$ -CD im Endabscheider in Kontakt. Durch ständig einströmendes  $\text{CO}_2$  kommt es zu relativ starken Turbulenzen und einer intensiven Durchmischung. Der Einschluss erfolgt auf diese Weise In-line und ist somit integraler Bestandteil

des Extraktionsprozesses. Nach Ende der Extraktion wird der Endabscheider schnell entspannt, das gefrorene Gemisch aus Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakt und Komplexmierungsmittel entnommen und anschließend einer Gefriertrocknung unterworfen. Nach Gefriertrocknung wird das Gemisch vorsichtig ohne Druck in einer Reibschale homogenisiert. Die experimentellen Bedingungen finden sich in Abschnitt 8.5.4 auf Seite 121. Die dem Einschluss zu Grunde liegenden molaren Verhältnisse an  $\beta$ -CD zu Hyperforin lassen sich aus der Ausbeute und dem Hyperforingehalt der Extrakte, die ohne Zusatz von Komplexmierungsmittel hergestellt werden berechnen. Diese bilden die Grundlage für die Stabilitätsuntersuchungen der reinen Extrakte (siehe Tab. 7-3 auf Seite 92). Die Berechnung erfolgt gemäß Gl. 7-1, die molaren Massen der eingesetzten  $\beta$ -CD finden sich in Tab. 8-7 im Abschnitt 8.5.4 auf Seite 122. Die molaren Verhältnisse sind in Tab. 7-1 zusammengefasst.

$$\frac{n_{\beta\text{-CD}}}{n_{\text{Hf}}} = \frac{m_{\beta\text{-CD}} \cdot M_{\text{Hf}} \cdot 100}{M_{\beta\text{-CD}} \cdot (m_{\text{Ex}} \cdot w_{\text{Ex}} + m_{\text{Sp}})} \quad (7-1)$$

$\frac{n_{\beta\text{-CD}}}{n_{\text{Hf}}}$	molares Verhältnis $\beta$ -CD:Hyperforin [ $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
$m_{\beta\text{-CD}}$	eingesetzte Masse an $\beta$ -CD [g]
$M_{\beta\text{-CD}}$	molare Masse des eingesetzten $\beta$ -CD [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
$M_{\text{Hf}}$	molare Masse Hyperforin ( $535 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
$m_{\text{Ex}}$	Ausbeute an Extrakt ohne $\beta$ -CD-Zusatz [g]
$w_{\text{Ex}}$	Hyperforingehalt im Extrakt [% (m/m)]
$m_{\text{Sp}}$	Masse an Hyperforin in der Spüllösung

Tab. 7-1 Molare Verhältnisse  $\beta$ -Cyclodextrin:Hyperforin

Massenverhältnis CD:Extrakt	Molares Verhältnis CD:Hyperforin	
	8T CD:1T Extrakt	16T CD:1T Extrakt
$\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD)	8,1:1	16,2:1
1,8-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M- $\beta$ -CD)	7,0:1	14,0:1
Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD)	6,6:1	13,2:1

Auf Grund der gewählten Massenverhältnisse von  $\beta$ -CD zu Extrakt von 8:1 und 16:1 ergeben sich zwei Stufen an molaren Verhältnissen von 6,6-8,1:1 bzw. 13,2-16,2:1. Die Spannen sind Folge der unterschiedlichen molaren Massen der eingesetzten  $\beta$ -Cyclodextrine. Die Masse an Hyperforin, die als nicht entnehmbarer Anteil im Separator verbleibt wird auf Basis von

drei Extraktionen auf  $0,271 \pm 0,074$  mg (Mittelwert  $\pm$  sdv,  $n = 3$ ) bestimmt. Somit ergibt sich ein 6,5-16-facher Überschuss an  $\beta$ -CD im Vergleich zu Hyperforin.

#### 7.4 Wiederfindung von Hyperforin in den Einschlussverbindungen

Die Bestimmung der Wiederfindung im Komplex dient der Feststellung, ob die Masse an Hyperforin, die auf Grund der zuvor durchgeführten Extraktionen ohne Zusatz von  $\beta$ -CD im Komplex zu erwarten ist, auch tatsächlich in diesem gefunden wird. Hierzu muss zunächst die Gesamtmasse an Hyperforin ermittelt werden, die tatsächlich für einen Einschluss zur Verfügung steht. Zu der Masse an Hyperforin im entnommenen Extrakt kommt dabei noch die im Separator verbleibende Masse nach Entnahme des Extraktes hinzu, die durch die Spüllösung des Separators repräsentiert wird. Zur statistischen Absicherung wird eine Massenbilanz auf Basis von  $n = 3$  Extraktionen analog der unter Abschnitt 5.3 auf Seite 51 beschriebenen Vorgehensweise aufgestellt. Die Extraktionsbedingungen entsprechen denen, die zur Herstellung der reinen  $\text{CO}_2$ -Extrakte und der Komplexe herangezogen wurden: unzerkleinerte Droge, Extraktion bei 120 bar, 40 °C und einem  $\text{CO}_2$ -Massenfluss von  $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$  über 40 min, kein Zusatz von Komplexbildungsmittel im Separator. Der Ausgangshyperforin-gehalt der Droge wird in einer sechsfachen Bestimmung ermittelt und als 100 %-Wert gesetzt. Der Extraktgehalt und der Restgehalt in der extrahierten Droge wird durch dreifache Analyse bestimmt und zusätzlich die Spüllösung für alle drei Extrakte nach Entnahme aus dem Separator analysiert. Das Ergebnis ist in Tab. 7-2 zusammengestellt.

Tab. 7-2 Wiederfindung in Extrakt, extrahierter Droge und Spüllösung bei 120 bar/40 °C/  $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ /40 min bei Einsatz von 200 g unzerkleinerter Droge; Mittelwert  $\pm$  sdv

Droge (n = 6)	$0,84 \pm 0,04$ %		
100 %	→ bei 200 g Droge entsprechend $1,680 \pm 0,079$ g Hyperforin		
	Extrakt	Extrahierte Droge	Spüllösung
Hyperforin [g]	$0,713 \pm 0,089$	$0,549 \pm 0,054$	$0,271 \pm 0,075$
%	$42,5 \pm 5,3$	$32,7 \pm 3,2$	$16,1 \pm 4,4$
Wiederfindung [%]	$91,3 \pm 5,2$		
(n = 3)			

Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die hier erzielten Resultate *nicht* direkt mit denen aus Abschnitt 5.3 auf Seite 51 vergleichbar sind, da unzerkleinerte Droge zu Grunde

liegt. Dies erklärt die deutlich geringeren Wiederfindungen im Extrakt von ungefähr 42 % und den vergleichsweise hohen Anteil von 32 %, der in der extrahierten Droge verbleibt. Der nicht entnehmbare Anteil im Separator beträgt ca. 16 %. Daraus ergibt sich ein Anteil von ca. 59 % des insgesamt in 200 g Droge vorhandenen Hyperforins, der im Rahmen eines In-line-Einschlusses der Komplexbildung zur Verfügung steht, entsprechend absolut  $0,984 \pm 0,047$  g Hyperforin.

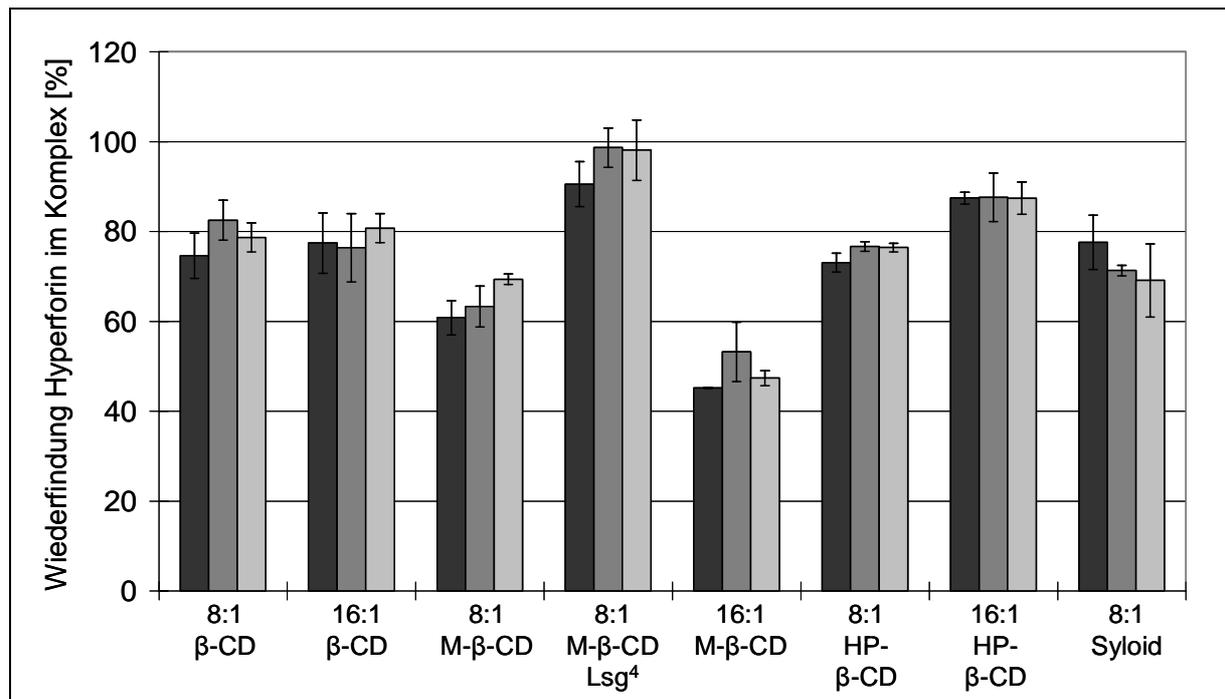


Abb. 7-2 Wiederfindung von Hyperforin in  $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexen unter Berücksichtigung reiner Johanniskraut- $\text{CO}_2$ -Extrakte (Tab. 7-3) und in Abhängigkeit von der Lagerdauer; (■) Startwert, (■) -30 °C/15 Wochen, (□) -30 °C/23 Wochen; Fehlerbalken repräsentieren Spannweiten ( $n = 2$  Komplexe)

Auf Basis dieses 100 %-Wertes wird die Wiederfindung an Hyperforin in den In-line-Einschlussverbindungen ermittelt. Dazu wird der Hyperforingehalt der Einschlussverbindung mittels HPLC bestimmt (siehe Abschnitt 8.4.1 auf Seite 112) und über die Ausbeute an Komplex die Wiederfindung von Hyperforin berechnet. Abb. 7-2 gibt die Wiederfindungsraten von Hyperforin zu Beginn der Stabilitätsuntersuchungen, nach 15 bzw. 23 Wochen Lagerung bei -30 °C wieder. Die Wiederfindungsraten innerhalb eines Komplexes sind über die Lagerdauer annähernd konstant, die auftretenden Schwankungen sind in erster Linie analytisch bedingt. Mit Ausnahme von 1,8-Methyl- $\beta$ -CD (M- $\beta$ -CD) im Massenverhältnis 8:1, vorgelegt im Separator als methanolisch-wässrige Lösung werden bei der Wiederfindung von Hyperforin

<sup>4</sup> 1,8-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin eingesetzt als methanolisch-wässrige Lösung (50/50 [V/V]) entsprechend Abschnitt 8.5.4.2 auf Seite 122

nicht annähernd 100 % erreicht, das Defizit beträgt bis zu 50 %. Für unsubstituiertes  $\beta$ -CD liegt die Wiederfindung unabhängig von der eingesetzten  $\beta$ -CD-Menge bei 80 %. Für 1,8-Methyl- $\beta$ -CD zeigt die Wiederfindung eine deutliche Abhängigkeit von der eingesetzten Menge. Während für ein Massenverhältnis Komplexbildner:Extrakt von 8:1 die Wiederfindungsrate 60-70 % beträgt, sinkt sie bei Verdoppelung der eingesetzten Menge an M- $\beta$ -CD auf ca. 45-50 % ab. Für Hydroxypropyl- $\beta$ -CD dreht sich das Bild um. Bei einem Massenverhältnis von 8:1 findet man rund 77 % des Hyperforins in der Extrakt-HP- $\beta$ -CD-Mischung wieder, gegenüber 87 % bei einem Verhältnis von 16:1. Insgesamt kann Hyperforin in den Komplexen bei -30 °C und innerhalb des betrachteten Zeitraumes von 23 Wochen als stabil bezeichnet werden.

## 7.5 Untersuchungen zur Lagerstabilität

### 7.5.1 Lagerstabilität der reinen Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakte

Die Stabilität von Hyperforin in Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten in Abhängigkeit von der Lagertemperatur wird auf Basis von sechs Extrakten untersucht. Diese werden unter identischer Vorgehensweise bei 120 bar, 40 °C, einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> und einer Extraktionsdauer von 40 min hergestellt. Als Ausgangsmaterial kommen 200 g unzerkleinertes Johanniskraut mit einer Partikelgröße von 73,2 % < 1,4 mm (siehe Abb. 5-1 in Abschnitt 5.1) zum Einsatz. Nach Entnahme des Extraktes aus dem Separator wird er gefriergetrocknet und anschließend bis zur Analyse bei -70 °C gelagert. Die verwendeten Extraktionsbedingungen haben sich im Rahmen der in Kapitel 5 dargestellten Optimierung hinsichtlich einer möglichst hohen Anreicherung von Hyperforin bei akzeptablen Restgehalten in der extrahierten Droge und geringer Abbautendenz zu Orthoforin als günstig herausgestellt. Die insgesamt sechs Extrakte werden auf ihren Hyperforingehalt analysiert (siehe 8.4.1 auf Seite 112) und anschließend entsprechend Abb. 7-3 auf die Lagerbedingungen aufgeteilt. Die Ausbeute und der Hyperforingehalt der zu Grunde liegenden Extrakte sind in Tab. 7-3 zusammengestellt.

Das der Stabilitätsuntersuchung von Hyperforin in Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten zu Grunde liegende Rohmaterial kann als sehr homogen betrachtet werden. Die Ausbeuten liegen um 1 % bei einem Hyperforingehalt von etwa 35 %. Die in Tab. 7-3 dargestellten Standardabweichungen basieren auf n = 3 Extrakten. Die relative Standardabweichung für die Ausbeute und den Ausgangshyperforingehalt der Extrakte beträgt 7,1 bzw. 2,3 %. Die relativen Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung der jeweiligen Extrakte liegen zwischen 1,5 und 3 %. Damit weisen die Extrakte auch in sich eine gute Homogenität auf. Aus diesem

Grund werden die fortlaufenden Gehaltsbestimmungen auf Basis von Einzelbestimmungen durchgeführt.

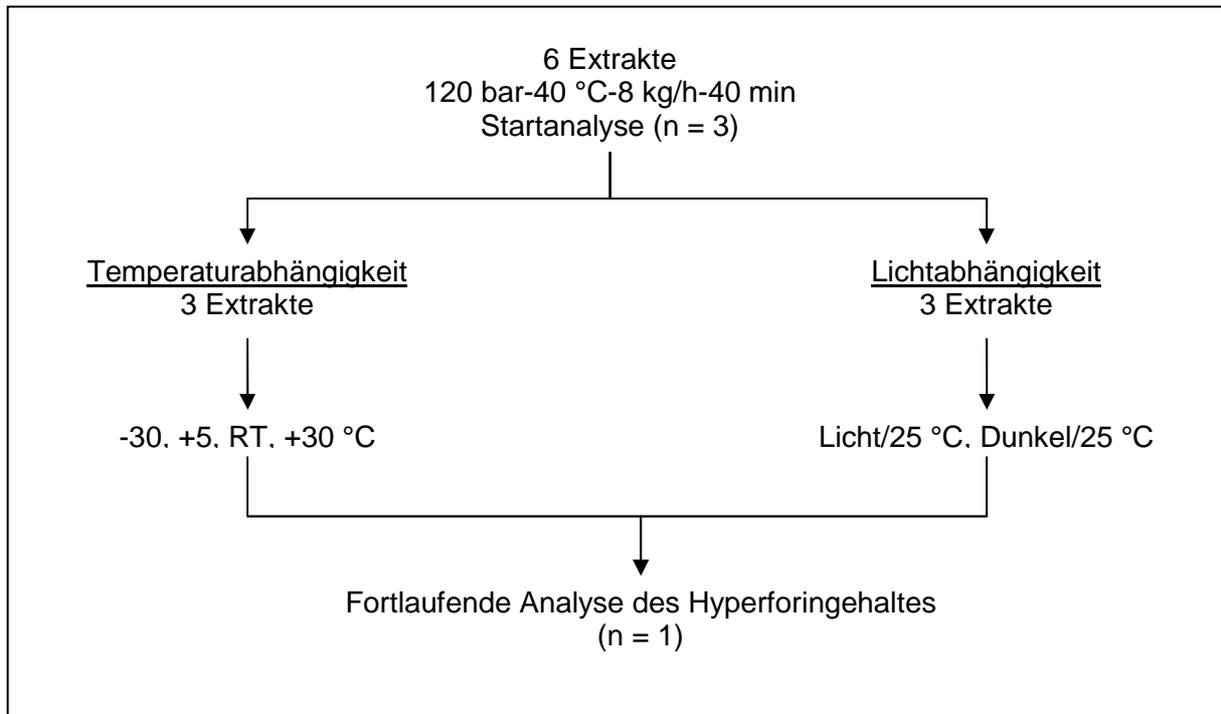


Abb. 7-3 Schema der Stabilitätsuntersuchungen reiner CO<sub>2</sub>-Extrakte (siehe auch Abschnitt 8.5.5.1 auf Seite 123)

Tab. 7-3 Ausbeute und Hyperforingehalt der für die Stabilitätsuntersuchungen eingesetzten Extrakte

	Ausbeute [%] ± sdv	Hyperforingehalt [%] ± sdv
Temperaturabhängigkeit (n = 3)	0,97 ± 0,03	34,5 ± 0,7
Lichtabhängigkeit (n = 3)	1,02 ± 0,09	34,9 ± 0,8
Gesamt (n = 6)	0,99 ± 0,07	34,7 ± 0,8

### 7.5.1.1 Stabilität in Abhängigkeit von der Lagertemperatur

Die Lagerstabilität über 24 Wochen in Abhängigkeit von der Lagertemperatur ist in Abb. 7-4 dargestellt. Bei einer Lagertemperatur von -30 °C tritt erst nach einer Dauer von 9 Wochen eine geringfügige Gehaltsabnahme ein. Nach 24 Wochen erreicht man 98 % vom Ausgangsgehalt, diese Abnahme ist jedoch nicht signifikant. Bei einer Lagertemperatur von +5 °C im Kühlschrank geht der Abbau etwas schneller von statten, nach einer Lagerung über 24 Wochen erhält man eine signifikante Abnahme auf 96 % vom Ausgangsgehalt. Sowohl

bei -30 als auch bei +5 °C sind die Vertrauensbereiche der einzelnen Analysenzeitpunkte sehr eng. Das bedeutet, dass die drei zu Grunde liegenden Extrakte ein sehr ähnliches Abbauverhalten zeigen.

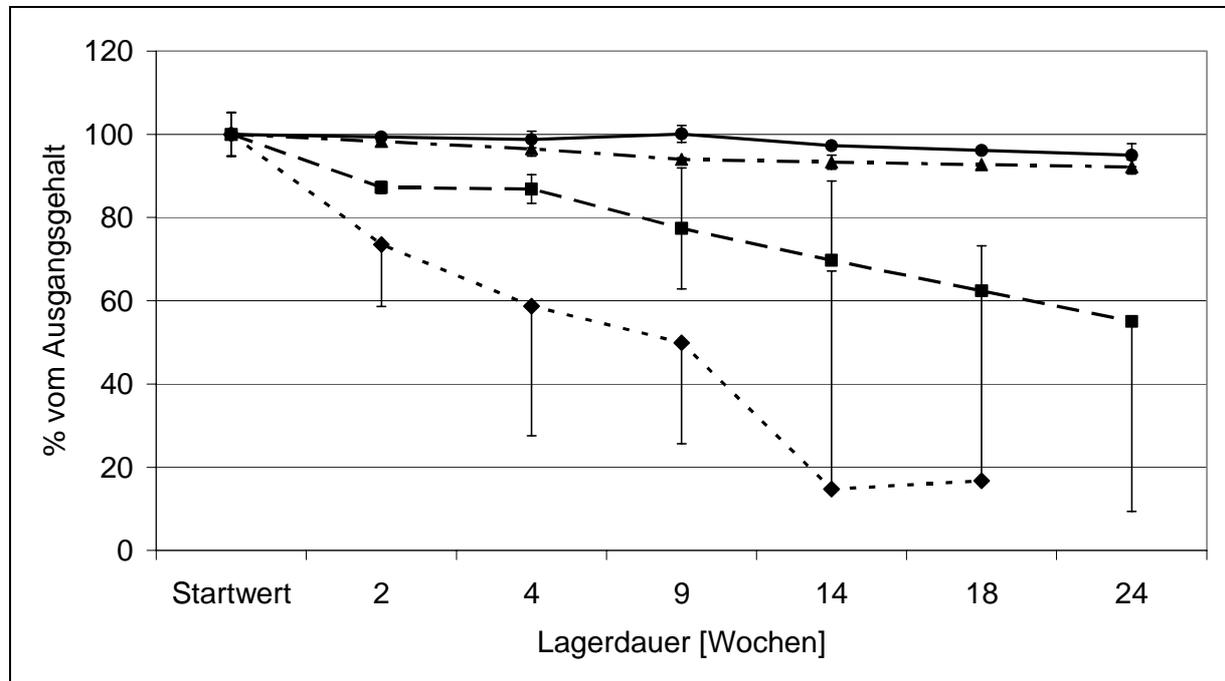


Abb. 7-4 Stabilität der Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakte in Abhängigkeit von der Lagertemperatur; (—●—) -30 °C, (-▲-) +5 °C, (-■-) Raumtemperatur, (····◆····) +30 °C

Dies ändert sich bei höherer Temperaturbelastung unter Raumtemperatur und bei +30 °C. Die Vertrauensbereiche nehmen mit zunehmender Temperatur und Lagerdauer sehr stark zu, die Extrakte unterscheiden sich deutlich in ihrem Abbauverhalten. Während bei Raumtemperatur eine Abnahme auf 58 % nach 24-wöchiger Lagerung zu verzeichnen ist, werden bei +30 °C nach 18 Wochen nur noch 10-20 % des ursprünglichen Hyperforingehaltes gefunden, mit allerdings sehr hohen Streuungen.

### 7.5.1.2 Stabilität unter Lichteinfluss

Zur Untersuchung der Lichtabhängigkeit der Zersetzung werden hyperforinangereicherte CO<sub>2</sub>-Extrakte einer Lichtquelle mit 15 W (Neonlicht) ausgesetzt. Zur Ausschaltung von Temperatureinflüssen werden Referenzproben in derselben Lichtkammer dicht verschlossen in einem Metallbehältnis gelagert. Der Hyperforingehalt von Lichtproben und Referenzproben wird zeitabhängig analysiert. Die Daten zur Lagerstabilität unter Lichteinfluss über 24 Wochen sind in Abb. 7-5 wiedergegeben. Der Verlauf der Kurven unter Lichteinfluss bzw. in Dunkelheit bei identischer Lagertemperatur von 25 °C unterscheiden sich deutlich, jedoch

zum Ende des Untersuchungszeitraumes nicht mehr signifikant. Die starken Streuungen deuten auch hier auf ein sehr unterschiedliches Abbauverhalten der einzelnen Extrakte hin. Ohne Lichteinfluss erhält man nach 24-wöchiger Lagerdauer noch 38 % des ursprünglichen Gehaltes, unter Lichteinfluss sind es innerhalb 18 Wochen noch lediglich 10 %. Der Abbau von Hyperforin in den CO<sub>2</sub>-Extrakten läuft unter Lichteinfluss somit deutlich schneller ab.

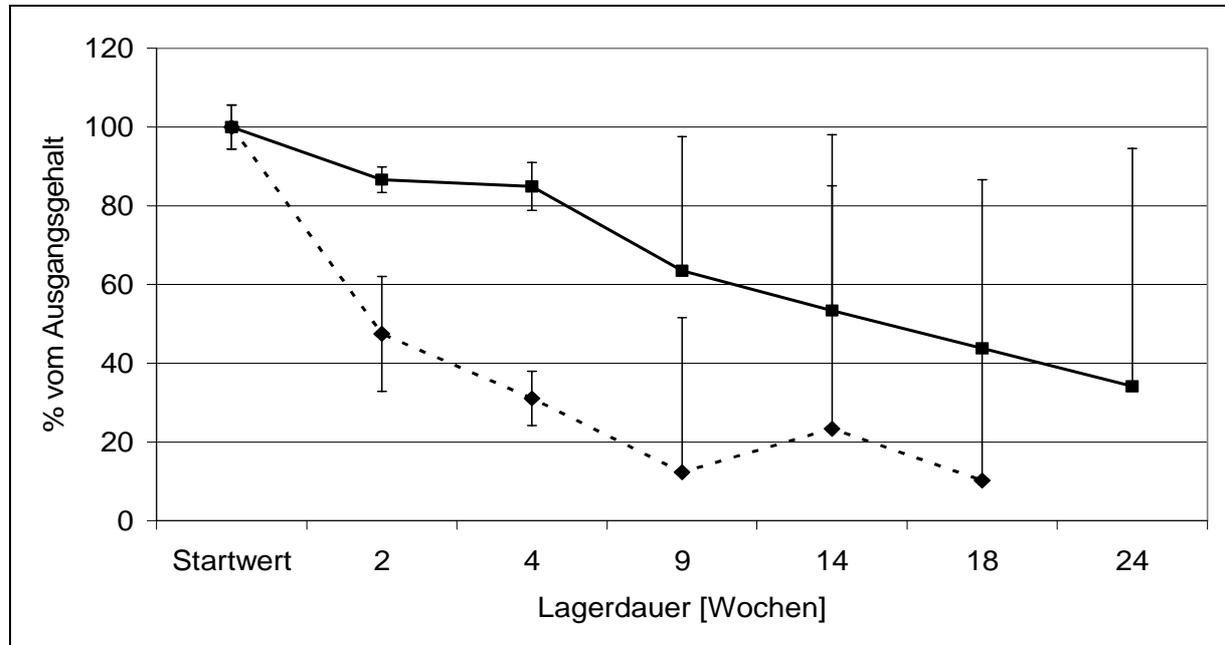


Abb. 7-5 Stabilität der Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakte in Abhängigkeit vom Lichteinfluss;  
(—■—) Dunkelheit/25 °C, (---◆---) Licht/25 °C

### 7.5.2 Lagerstabilität der Einschlussverbindungen

Nach der Gehaltsbestimmung von Hyperforin in den Komplexen als Startanalyse werden diese entsprechend den reinen CO<sub>2</sub>-Extrakten einer Stabilitätsuntersuchung bei unterschiedlichen Lagertemperaturen unterzogen. Die Bedingungen sind -30 °C als Referenztemperatur, Raumtemperatur mit und ohne Lichteinfluss, sowie +30 °C. Auf Lagerung im Kühlschrank bei +5 °C wird angesichts der vergleichsweise guten Lagerstabilität von reinen Extrakten unter diesen Bedingungen verzichtet. Während die Startanalyse als Dreifachbestimmung durchgeführt wird, basieren die fortlaufenden Gehaltsbestimmungen von Hyperforin in den Komplexen auf einer einfachen Bestimmung.

In Abb. 7-6 ist der Verlauf des Hyperforingehaltes in den Komplexen während einer 16-wöchigen Lagerung bei +30 °C, Raumtemperatur und unter Lichteinfluss für 1,8-Methyl-β-CD bei Massenverhältnissen M-β-CD zu Komplex von 8:1 und 16:1 gegenüber gestellt. Der grundlegende Verlauf der Kurven ist mehr oder weniger unabhängig von der eingesetzten

Menge an M- $\beta$ -CD. Der Abbau erfolgt sehr schnell. Bei Raumtemperatur ohne Lichteinfluss nimmt der Gehalt innerhalb von 9 Wochen auf rund 30 % des Ausgangsgehalts ab. Lagerung bei +30 °C oder unter Lichteinfluss führt zu einem noch schnelleren Abbau. Die relativ geringen Spannweiten sind ein Indiz dafür, dass sich die beiden unter identischen Herstellbedingungen gewonnenen Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexe hinsichtlich ihrer Stabilität sehr ähnlich verhalten. Die beobachtete Konstanz der Werte bei +30 °C und Raumtemperatur innerhalb von 2 bzw. 4 Wochen erscheint angesichts des anschließend rasch erfolgenden Abbaus von Hyperforin als sehr widersprüchlich. Wie Abb. 7-7 zeigt, unterliegt die Gehaltsbestimmung in Form einer Dreifachbestimmung großen Schwankungen, die auf Inhomogenitäten zurückzuführen sind. Diese Inhomogenitäten dürften auch für dieses widersprüchliche Verhalten der Komplexe verantwortlich sein.

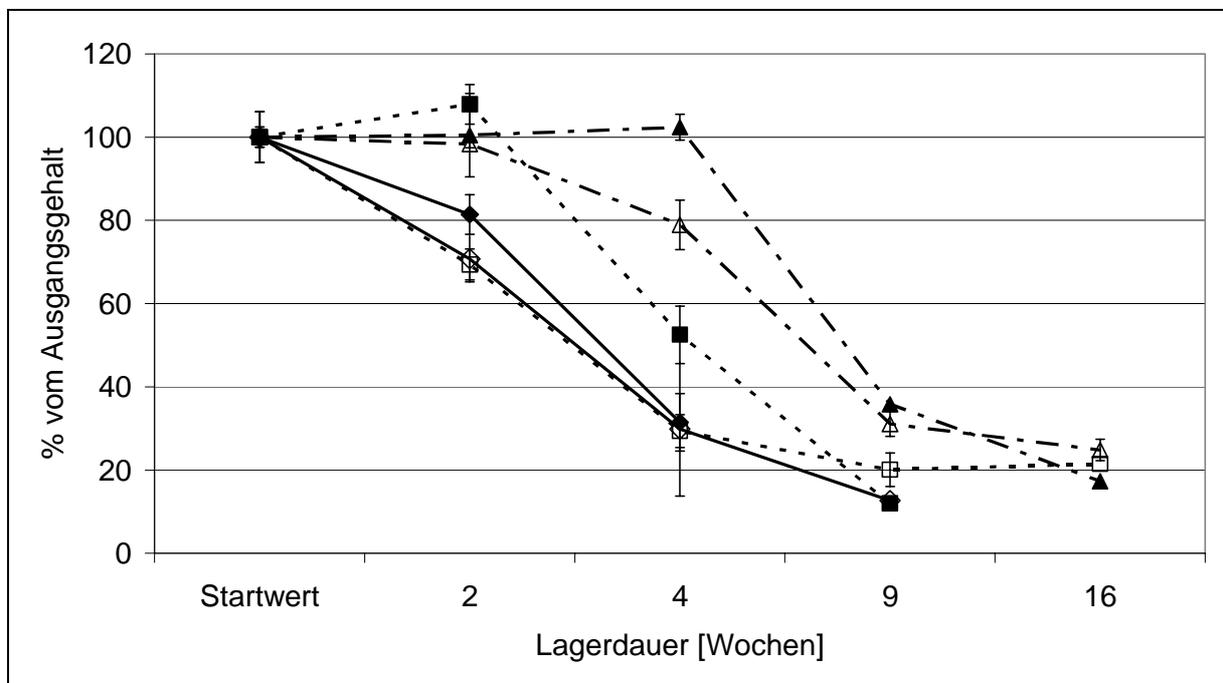


Abb. 7-6 Stabilität von Komplexen aus 8:1 und 16:1 1,8-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin:Extrakt in Abhängigkeit von der Lagertemperatur; ( $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ,  $\blacklozenge$ ) 8:1, ( $\triangle$ ,  $\square$ ,  $\diamond$ ) 16:1, (---) Raumtemperatur, (.....) +30 °C, (—) Licht; Fehlerbalken repräsentieren Spannweiten ( $n = 2$  Komplexe)

In Abb. 7-8 ist der Verlauf des Hyperforingehaltes für ein Massenverhältnis M- $\beta$ -CD:Extrakt von 8:1 bei Einsatz von M- $\beta$ -CD im Separator als Festsubstanz und in Form einer methanolisch wässrigen Lösung gegenübergestellt. In Komplexen, die auf letztere Art und Weise gewonnen werden, verläuft der Abbau von Hyperforin wesentlich schneller, als bei Einsatz von M- $\beta$ -CD als Festsubstanz. Innerhalb von 4 Wochen fällt der Hyperforingehalt auf unter 20 % des Ausgangsgehaltes ab.

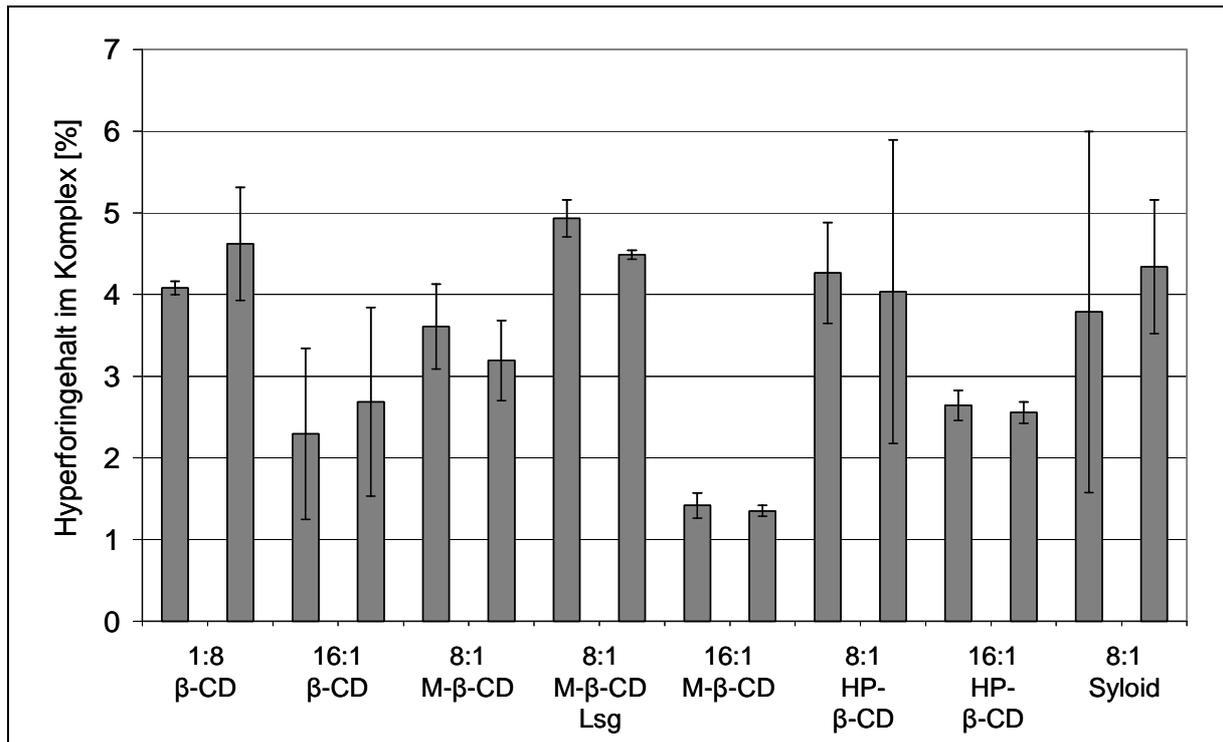


Abb. 7-7 Hyperforingehalt im Komplex zu Beginn der Einlagerungen

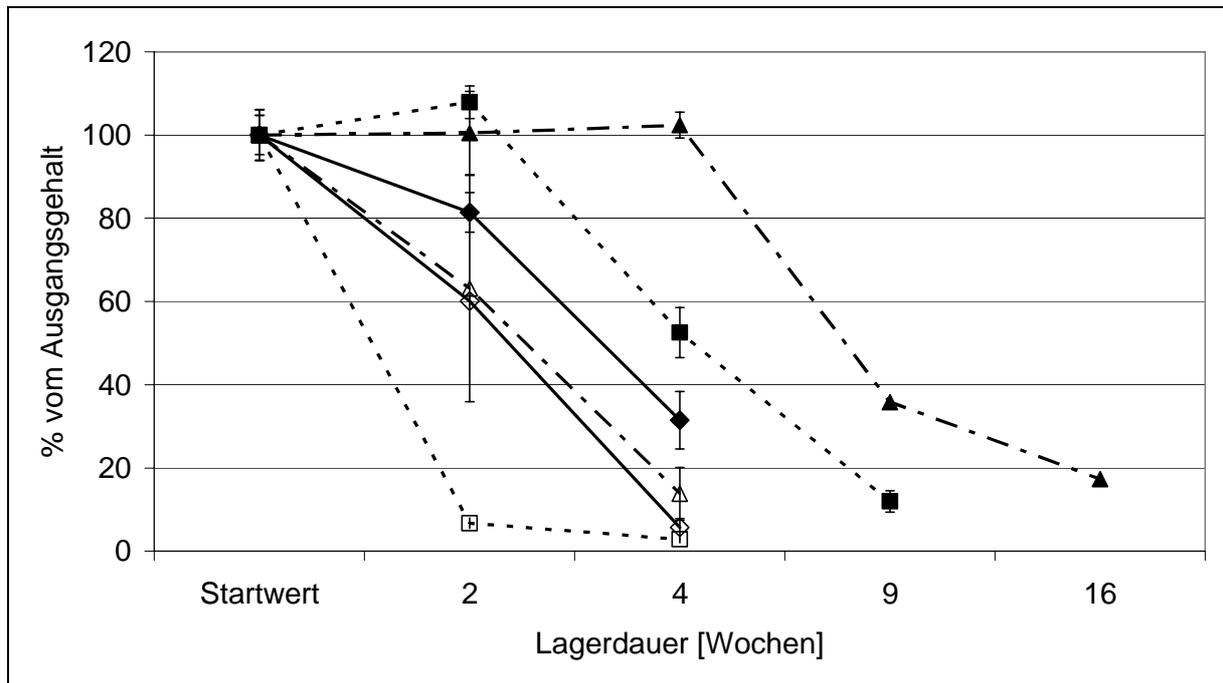


Abb. 7-8 Stabilität von Komplexen aus 8:1 1,8-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin:Extrakt in Abhängigkeit von der Lagertemperatur; ( $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ,  $\blacklozenge$ ) 8:1, ( $\triangle$ ,  $\square$ ,  $\diamond$ ) 8:1 in Lösung (---) Raumtemperatur, (.....) +30 °C, (—) Licht; Fehlerbalken repräsentieren Spannweiten (n = 2 Komplexe)

Ähnlich schnell verläuft der Abbau bei Einsatz von HP- $\beta$ -CD (siehe Abb. 7-9). Der Verlauf der Kurven ist von der eingesetzten Menge an HP- $\beta$ -CD unabhängig. Nach anfänglicher Konstanz fällt der Hyperforingehalt bei Lagerung unter Raumtemperatur innerhalb von 4 Wochen auf 30-50 % des Ausgangsgehaltes ab. Lichteinfluss und +30 °C bewirken eine noch schnellere Abbaurrate. Die Kurven für das Abbauverhalten von Hyperforin in Gegenwart von Syloid sind nicht abgebildet. Während bei 23-wöchiger Lagerung bei -30 °C nur ein geringfügiger Abbau zu verzeichnen ist, sinkt der Hyperforingehalt bei allen anderen Lagerbedingungen innerhalb von 2 Wochen auf unter 20 %.

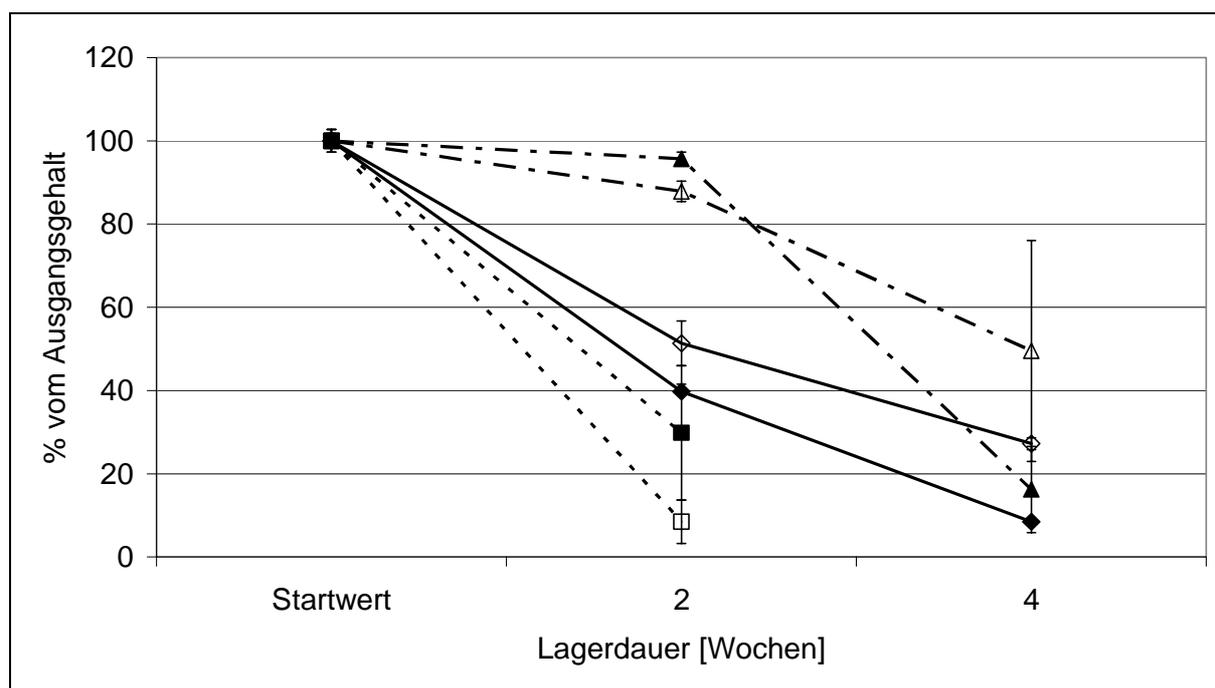


Abb. 7-9 Stabilität von Komplexen aus 8:1 und 16:1 Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin:Extrakt in Abhängigkeit von der Lagertemperatur; (▲, ■, ◆) 8:1, (△, □, ◇) 16:1 in Lösung (- · -) Raumtemperatur, (.....) +30 °C, (—) Licht; Fehlerbalken repräsentieren Spannweiten (n = 2 Komplexe)

## 7.6 Bestimmung der Einschussraten von Hyperforin in $\beta$ -Cyclodextrin

Um der Ursache für die Defizite in der Wiederfindung von Hyperforin in den Komplexen und die gegenüber den reinen Extrakten unveränderte oder sogar verschlechterte Stabilität auf den Grund zu gehen, werden die Einschussraten von Hyperforin in unsubstituiertes  $\beta$ -CD mittels einer Hexan-Wasch-Methode in Anlehnung an Waleczek et al. (2002) bestimmt. Diese Methode basiert darauf, dass der Komplex zunächst mit einem organischen Lösungsmittel, in dem die zu analysierende Substanz sehr leicht löslich, der Komplex jedoch unlöslich ist, gewaschen wird, um an der Oberfläche adhärirtes, jedoch nicht eingeschlossenes Hy-

perforin abzuwaschen (Loftsson 1999). Um zu vermeiden, dass auf diese Weise auch komplexiertes Hyperforin ausgewaschen wird, darf der Waschschrift nur unter Eintrag von geringen mechanischen Kräften erfolgen. Als Waschlösungsmittel kommt n-Hexan zum Einsatz. Nach Sedimentation des ungelösten Komplexes bzw. reinem  $\beta$ -CD wird die Hexanphase abgenommen und deren Hyperforingehalt mittels HPLC bestimmt. Die darin gefundene Masse an Hyperforin repräsentiert den nicht eingeschlossenen Anteil. Der Rückstand wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Da dieses nicht direkt als Lösungsmittel für die HPLC eingesetzt werden kann, wird die Lösung mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) versetzt und 12 Stunden equilibriert. Dabei fällt reines  $\beta$ -CD als weiße, Festsubstanz teilweise wieder aus. Die aus dieser Lösung bestimmte Masse an Hyperforin repräsentiert den in den Komplex eingeschlossenen Anteil. Die exakte Vorgehensweise ist Abschnitt 8.4.4 auf Seite 117 zu entnehmen. Da es sich um eine Konventionmethode handelt und insbesondere der nicht eingeschlossene Anteil in der Waschphase durch die Art und Menge des Lösungsmittels, Komplex/Lösungsmittelverhältnis, Standzeiten und Energieeintrag stark variieren kann, ist es notwendig, diese Vorgehensweise strikt einzuhalten.

Tab. 7-4 *Einschlussraten von Hyperforin in  $\beta$ -Cyclodextrin, bestimmt mit der Hexan-Wasch-Methode; Mittelwert  $\pm$  sdv ( $n = 3$  Proben)*

	CD:Extrakt 8:1		CD:Extrakt 16:1	
	Komplex 1	Komplex 2	Komplex 1	Komplex 2
Hyperforin in Waschphase [g/100g Komplex]	3,21 $\pm$ 0,25	3,35 $\pm$ 0,34	1,46 $\pm$ 0,09	1,60 $\pm$ 0,12
Hyperforin eingeschlossen [g/100g Komplex]	1,29 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,35	0,63 $\pm$ 0,07	0,65 $\pm$ 0,21
Gesamthyperforin im Kom- plex [g/100g Komplex]	4,50 $\pm$ 0,23	4,85 $\pm$ 0,20	2,09 $\pm$ 0,15	2,25 $\pm$ 0,19
Einschlussrate [%]	28,7 $\pm$ 2,3	30,9 $\pm$ 6,9	30,1 $\pm$ 1,4	28,6 $\pm$ 7,2
Hyperforin nach Direktana- lyse [g/100g Komplex]	4,57 $\pm$ 0,08	5,04 $\pm$ 0,41	2,23 $\pm$ 0,08	2,62 $\pm$ 0,20

Die Ergebnisse der Bestimmung der Einschlussrate für die Komplexe aus unsubstituiertem  $\beta$ -CD bei einem Massenverhältnis  $\beta$ -CD:Extrakt von 8:1 bzw. 16:1 sind in Tab. 7-4 zusammengestellt. Die Tabelle gibt jeweils die Masse an Hyperforin in der Waschphase, in der DMSO-Phase, sowie die Gesamtmasse als Summe und die Einschlussrate wieder. Weiter-

hin stellt sie das Ergebnis einer direkten Analyse des Hyperforingehaltes im Komplex ohne Unterscheidung zwischen eingeschlossenem und nicht eingeschlossenem Anteil gemäß Abschnitt 8.4.1.2 auf Seite 113 gegenüber. Die Einschlussrate bestimmt nach der Hexan-Wasch-Methode beträgt unabhängig von der eingesetzten Menge an  $\beta$ -CD ca. 30 %. Die Summe aus eingeschlossenem und nicht eingeschlossenem Anteil an Hyperforin liefert von der Größenordnung her übereinstimmende Werte mit denen einer direkten Analyse des Hyperforingehaltes. Letztere liefert jedoch generell höhere Werte, die Abweichungen liegen zwischen 1,6 und 16,4 %. An dieser Stelle sei angemerkt, dass eine Bestimmung der Einschlussrate für Komplexe aus substituierten  $\beta$ -CD mit Hilfe einer einfachen Waschmethode nicht ohne weiteres möglich ist, da diese im Gegensatz zu unsubstituierten CD in zahlreichen organischen Lösungsmitteln löslich sind, und so eine Unterscheidung zwischen adhäriertem und eingeschlossenem Anteil nicht möglich ist.

## **7.7 Diskussion der Ergebnisse**

### **7.7.1 Stabilität der reinen CO<sub>2</sub>-Extrakte**

Hyperforin unterliegt als Phloroglucinderivat unter Wärmeeinfluss einem raschen oxidativen Abbau. Die Stabilität von Hyperforinisolaten mit einer Reinheit von > 99,9 % bei Lagerung über 8 Monate untersuchen Orth et al. (1999a). Dabei zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Stabilität von der Lagertemperatur. Lagerung bei -30 °C führt zu einem Abbau auf rund 92 % des Ausgangsgehaltes, nach 8-monatiger Lagerung bei +4 oder +20 °C finden sich noch 76 % bzw. 55 % des ursprünglich vorhandenen Hyperforins. Lagerung unter Stickstoffatmosphäre führt zu einer deutlichen Stabilitätsverbesserung. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Lagerstabilität von Hyperforin beziehen sich nicht auf Reinhyperforin sondern auf einen hyperforinangereicherten CO<sub>2</sub>-Extrakt mit ca. 35 % Hyperforin. Die Extraktmatrix besteht aus einer Vielzahl lipophiler Begleitstoffe, die auf Grund ihrer Löslichkeit in überkritischem Kohlendioxid ebenfalls im Extrakt angereichert werden. Die Untersuchung dieser Begleitstofffraktion mittels GC-MS-Untersuchungen ist Gegenstand von Kapitel 6. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang insbesondere Cuticularwachse.

Die Ergebnisse bestätigen im Wesentlichen die von Orth et al. (1999a) gemachten Beobachtungen zur Stabilität von Hyperforin. Höhere Temperaturen führen zu höheren Abbauraten. Ein hyperforinangereicherter CO<sub>2</sub>-Extrakt zeigt innerhalb von 24 Wochen bei -30 °C eine Gehaltsabnahme von rund 2 %, diese steigt bei +5 °C bzw. Raumtemperatur auf 4 bzw. 42 % an (siehe Abb. 7-4). Auffällig ist der deutliche Unterschied in der Abbaurate zwischen Reinhyperforin bei Orth et al. (1999a) und einem hyperforinangereichertem CO<sub>2</sub>-Extrakt bei einer Lagertemperatur von ca. +5 °C. Während Reinhyperforin innerhalb von acht Monaten

auf 76 % abgebaut wird, zeigt ein hyperforinangereicherter CO<sub>2</sub>-Extrakt innerhalb von 24 Wochen lediglich einen Abbau auf 96 %. Offensichtlich führt die Einbettung von Hyperforin in die lipophile Matrix der co-extrahierten Begleitstoffe zu einer Stabilisierung. Bei einer tieferen Temperatur ist dieser Effekt – wenn überhaupt – nur gering ausgeprägt und verschwindet bei Raumtemperatur völlig. Eine Erhöhung der Lagertemperatur auf +30 °C führt zu einer zusätzlichen Beschleunigung des Hyperforinabbaus. Je höher die Lagertemperatur und je länger die Lagerdauer, desto stärkere Streuungen treten zu den einzelnen Probezeitpunkten auf. Dies ist ein Indiz dafür, dass die einzelnen der Stabilitätsprüfung zu Grunde liegenden Extrakte trotz identischer Herstellungsweise und vergleichbarem Hyperforingehalten ein sehr unterschiedliches Abbauverhalten an den Tag legen. Das bedeutet, dass in einzelnen Extrakten der Abbau bereits in Gang gesetzt wird, während andere noch relativ stabil sind.

Neben Wärme zeigt auch Lichteinfluss einen negativen Effekt auf die Stabilität von Hyperforin. So finden Orth et al. (2000) für gelöstes Hyperforin eine signifikant schnellere Zersetzung unter Lichteinfluss verglichen mit Lagerung unter Ausschluss von Licht. Die vorliegenden Stabilitätsdaten zur Lagerung unter Lichteinfluss zeigen initial einen signifikant schnelleren Abbau von Hyperforin (siehe Abb. 7-5). Während nach 2-wöchiger Lagerung unter Ausschluss von Licht noch 90 % des Hyperforins gefunden werden, sind es innerhalb desselben Zeitraums unter Lichteinfluss lediglich 50 %. Mit zunehmender Lagerdauer gleichen sich die Abbauraten mehr und mehr an. Wie bei Lagerung unter erhöhter Temperatur nehmen die Streuungen zwischen den einzelnen Extrakten mit zunehmender Lagerdauer drastisch zu. Dies lässt wiederum auf ein sehr unterschiedliches Abbauverhalten der einzelnen Extrakte schließen.

Alles in allem zeigen die Ergebnisse zur Lagerstabilität von Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten das erwartete Abbauverhalten von Hyperforin. Mit zunehmender Lagerdauer nehmen die Streuungen zwischen den einzelnen Extrakten stark zu. Höhere Temperaturen führen ebenso zu schnellerem Abbau wie Lagerung unter Lichteinfluss. Die Einbettung von Hyperforin in die lipophile Matrix der CO<sub>2</sub>-Extrakte bewirkt eine Verbesserung der Stabilität.

### **7.7.2 Stabilität von Hyperforin in $\beta$ -Cyclodextrin-Einschlussverbindungen**

Wie in Abschnitt 7.2 dargelegt finden sich in der Literatur verschiedene Ansätze zur Stabilisierung von Hyperforin in Johanniskraut-Extrakten. Einer davon ist die Bildung von Einschlussverbindungen mit Cyclodextrinen unterschiedlicher Ringgröße und Substitution. Neben einer Stabilitätsverbesserung von Hyperforin in solchen Komplexen (Orth et al. 2000)

ist eine verbesserte Löslichkeit und damit eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Hyperforin aus diesen Komplexen zu erwarten (Hedges 1998). Als besonders erweist sich der Einschluss in M- $\beta$ -CD mit Hilfe der Lösungs- oder Copräzipitationsmethode (Orth et al. 2000). Der Einsatz von überkritischem CO<sub>2</sub> zur Bildung von CD-Einschlussverbindungen ist in der Literatur prinzipiell beschrieben. In der Regel erfolgt die Komplexierung unter überkritischen Bedingungen, insbesondere bei hohen Drücken. Adda und Lorne (1991) verwenden  $\beta$ -CD als „trapping“ Medium im Endabscheidebehälter in flüssigem Zustand des CO<sub>2</sub> und erreichen auf diese Weise eine erhöhte Wiederfindung flüchtiger Bestandteile eines Kamillen-CO<sub>2</sub>-Extraktes. Im Rahmen dieser Arbeit wird versucht, dieses Prinzip auf die Bildung von Einschlussverbindungen aus Hyperforin und  $\beta$ -CD unterschiedlicher Substitution zu übertragen.

Die molaren Verhältnisse zwischen Gastmolekül und Komplexierungsagens lassen sich anhand von Extraktionen ohne Zusatz von  $\beta$ -CD in den Endabscheidebehälter abschätzen. Die insgesamt für einen Einschluss zur Verfügung stehende Masse an Hyperforin ergibt sich aus der Masse im Extrakt und dem Anteil der nicht aus dem Endabscheider entnehmbar ist. Legt man dies der Berechnung der molaren Verhältnisse zu Grunde, so erhält man zwei Verhältnisniveaus: 6,6-8,1:1 und 13,2-16,2:1 ( $\beta$ -CD:Hyperforin), die Spannen ergeben sich aus den unterschiedlichen molaren Massen von  $\beta$ -CD (1135 g/mol), M- $\beta$ -CD (1300 g/mol) und HP- $\beta$ -CD (1400 g/mol). Damit liegen die Verhältnisse in dem von Orth (1999) untersuchten Bereich, der von einem molaren Verhältnis von 12:1 ausgeht. Allerdings sollte bedacht werden, dass die Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakte 35 % Hyperforin enthalten. Den Rest bilden co-extrahierte, insbesondere lipophile Begleitstoffe (siehe Abschnitt 6.2.1.2 ab Seite 67). Diese stehen zum Teil ebenfalls für einen Einschluss zur Verfügung, so dass sie um die Bindungsstellen der  $\beta$ -CD-Moleküle konkurrieren.

Bei Lagerung über mehrere Wochen zeigt sich weder bei Raumtemperatur noch bei +30 °C oder Lagerung unter Lichteinfluss eine Verbesserung der Stabilität gegenüber reinen Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten. Sowohl nach Einschluss von Hyperforin in M- $\beta$ -CD als auch in HP- $\beta$ -CD verläuft der Abbau schneller. Höhere Verhältnisse an  $\beta$ -CD bringen keine Verbesserung der Stabilität (siehe Abb. 7-6, Abb. 7-8 und Abb. 7-9). Bei Bestimmung des Ausgangshyperforingehaltes als Dreifachbestimmung zeigen sich große Streuungen, welche auf ausgeprägte Inhomogenitäten in den Komplexen hindeuten (siehe Abb. 7-7). Alles in allem zeigt ein In-line-Einschluss von Hyperforin nicht den erhofften Effekt auf die Stabilität, sondern wirkt sich im Gegenteil negativ aus. Die Ergebnisse stehen damit zunächst im Widerspruch zu der von Orth et al. (2000) gezeigten Stabilisierung von Hyperforin insbesondere in Anwesenheit von M- $\beta$ -CD. Die Bestimmung der Wiederfindung in den Komplexen auf Basis der insgesamt während einer Extraktion für einen Einschluss zur Verfügung stehenden Mas-

se an Hyperforin weist, mit Ausnahme für M- $\beta$ -CD in gelöster Phase, ein Defizit zwischen 20 und 50 % auf. Eine Lagerung bei -30 °C über 9 bzw. 15 Wochen zeigt nur geringfügige Veränderungen der Wiederfindung von Hyperforin, die analytisch bedingt sind. Daraus lässt sich schließen, dass bei einer tiefen Temperatur von -30 °C Hyperforin in den Komplexen über 23 Wochen als stabil betrachtet werden kann. Dies stimmt mit den Ergebnissen der reinen Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakte überein, für die bei identischen Bedingungen und innerhalb des gleichen Zeitraumes nur eine geringfügige Abnahme des Hyperforingehaltes beobachtet wird. Für die beobachteten Defizite sind grundsätzlich zwei Ursachen denkbar. Zum einen könnten sie darauf zurückzuführen sein, dass zwischen verschiedenen Extraktionen starke Schwankungen der Hyperforinausbeute im Separator auftreten. Dagegen sprechen die Vorversuche bei denen Ausbeute und Hyperforingehalt auf Basis von 6 Extrakten bestimmt werden und die zeigen, dass Streuungen zwischen verschiedenen Extrakten äußerst gering sind (siehe Tab. 7-3). Weiterhin sind die geringen Spannweiten bei der Bestimmung der Wiederfindung ein Indiz dafür, dass die unter identischen Bedingungen hergestellten Einschlussverbindungen zu ähnlichen Ergebnissen führen. Die zweite denkbare Ursache für das Defizit ist darin zu suchen, dass die analytische Methode nicht das gesamte Hyperforin des Komplexes erfasst, sondern lediglich den anhaftenden nicht eingeschlossenen Teil. Dies würde auch eine Erklärung für die verschlechterte Stabilität von Hyperforin in den Komplexen liefern.

Eine Bestimmung der Einschlussrate kann erfolgen, indem der Komplex zunächst vorsichtig gewaschen wird, mit dem Ziel anhaftende, nicht eingeschlossene Anteile zu entfernen (Loftsson 1999). Voraussetzung dafür ist der Einsatz eines Lösungsmittels, in dem der Komplex praktisch unlöslich ist, das Gastmolekül sich dagegen sehr gut löst. Die Menge an dazu eingesetztem Lösungsmittel muss im Verhältnis zur Menge an Komplex so gewählt werden, dass eine Sättigung mit Gastmolekülen ausgeschlossen werden kann. Waleczek et al. (2002) entwickeln eine Methode zur Bestimmung der Einschlussrate von Bestandteilen des Kamillenöles in Komplexen mit  $\beta$ -CD unter Verwendung von n-Hexan als Waschlösungsmittel. Orth et al. (1999a) verwendet n-Hexan als Extraktionsmittel für die Gewinnung von Hyperforin aus Johanniskrautblüten und erhält auf diese Weise Extrakte, die bis zu 70 % Hyperforin enthalten. Somit kann n-Hexan als geeignetes Lösungsmittel für das Waschen der Komplexe betrachtet und die von Waleczek et al. (2002) entwickelte Methode auf die Bestimmung der Einschlussrate von Hyperforin in  $\beta$ -CD übertragen werden. Für M- $\beta$ -CD und HP- $\beta$ -CD ist diese Vorgehensweise nicht möglich, da sich die Einschlussverbindungen beider in n-Hexan lösen. Aus diesem Grund wird die Bestimmung der Einschlussrate exemplarisch für Komplexe aus Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakt und unsubstituiertem  $\beta$ -CD durchgeführt.

Die auf diese Weise bestimmte Einschussrate von Hyperforin in unsubstituiertem  $\beta$ -CD liegt unabhängig von der eingesetzten Menge an  $\beta$ -CD bei ca. 30 % (siehe Tab. 7-4). Dieser eingeschlossene Anteil erklärt jedoch nicht das Defizit in der Wiederfindung, da die Gesamtmasse an Hyperforin, die mittels Direktanalyse bestimmt wird, ebenso groß oder größer ist als die Summe der Hyperforinmasse in der Waschphase und in der DMSO-Phase. Dies legt den Schluss nahe, dass auch mit Hilfe der Hexan-Wasch-Methode sich ein Teil des eingeschlossenen Hyperforins einer analytischen Erfassung entzieht. Eine mögliche Sättigung der Lösung kann ausgeschlossen werden. Der Direktanalyse liegt eine 0,8 bis 1,6 %-ige Lösung bzw. Suspension des Komplexes in Dichlormethan/Methanol zu Grunde. In diesem Komplex sind wiederum 6-11 % Komplex enthalten, dies entspricht einer Absoluteinwaage an Extrakt von ca. 90 mg/100 ml. Für die Bestimmung der Einschussrate nach der Hexan-Wasch-Methode werden 300 mg Komplex mit 1 ml n-Hexan versetzt, entsprechend einer Extraktmenge von 18 bzw. 33 mg. In beiden Fällen ist die zu Grunde liegende Masse an Extrakt in der jeweiligen Menge an Lösungsmittel vollständig löslich. Die Wiederfindungsraten nach Direktanalyse bzw. Hexan-Wasch-Methode in Verbindung mit den Einschussraten deuten darauf hin, dass der eingeschlossene Teil des Hyperforins analytisch nicht vollständig erfasst werden kann. Ursache hierfür kann die Ausbildung eines Komplexes sein, der in Lösung kinetisch stabil ist. Nach Szejtli (1998) besteht in Lösung ein dynamisches Gleichgewicht zwischen freiem und eingeschlossenem Gastmolekül entsprechend Gl. 7-2. Daraus lässt sich entsprechend dem Massenwirkungsgesetz eine substanzspezifische Stabilitätskonstante ableiten (Gl. 7-3).



$$K_s = \frac{[\text{CD-Gast}]}{[\text{CD}] \cdot [\text{Gast}]} \quad (7-3)$$

$K_s$	Stabilitätskonstante [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
$[\text{CD}]$	Konzentration an Cyclodextrin [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
$[\text{Gast}]$	Konzentration an Gast [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
$[\text{CD-Gast}]$	Konzentration an Komplex [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]

Je höher die kinetische Stabilität des Komplexes in Lösung, desto weiter liegt das Gleichgewicht auf der Seite des Komplexes, desto größer die Stabilitätskonstante. Daten zur Stabilität von Hyperforin- $\beta$ -CD-Komplexen in Lösung liegen in der Literatur nicht vor, eine umfangreiche Übersicht zu Parametern, die diese Stabilität beeinflussen, gibt Connors (1997).

Auf Grund der Überlegungen zur Wiederfindung von Hyperforin im Komplex mit Hilfe der Hexan-Wasch-Methode und der Tatsache, dass die Einschussrate von Hyperforin in substituierten  $\beta$ -Cyclodextrinen auf Grund deren guter Löslichkeit in n-Hexan nicht bestimmt werden kann, ist eine grobe Abschätzung der Einschussrate lediglich auf Basis des Defizits der Wiederfindung von Hyperforin im Komplex möglich. Hierzu wird postuliert, dass dieses Defizit den eingeschlossenen Anteil von Hyperforin repräsentiert (siehe Abb. 7-2). Daraus ergibt sich für Komplexe mit unsubstituiertem  $\beta$ -CD unabhängig von der Einschussrate 20 %, für M- $\beta$ -CD im Verhältnis 8:1 und 16:1 60 bzw. 50 % und für HP- $\beta$ -CD knapp 20 % bei einem Massenverhältnis von 8:1 und knapp 10 % bei einem Verhältnis HP- $\beta$ -CD zu Extrakt von 16:1. Die vergleichsweise geringen Einschussraten trotz Einsatz eines hohen Überschusses an  $\beta$ -CD können für die verschlechterte Stabilität von Hyperforin in den Komplexen verantwortlich gemacht werden.

Die geringen Einschussraten können auf die Bedingungen im Endabscheider während der Extraktion und Komplexbildung zurückgeführt werden. In diesem bildet sich während der Extraktion ein Niveau an flüssigem  $\text{CO}_2$  aus, in dem Hyperforin und weitere Extraktbestandteile zum Teil in gelöster Form vorliegen. Eine Extraktion von Johanniskraut mit flüssigem  $\text{CO}_2$  bei 64 bar und 25 °C liefert eine Ausbeute von 1,47 % mit einem Hyperforingehalt von  $32,7 \pm 0,14$  % (Mittelwert  $\pm$  sdv, n = 3 Proben). Im Endabscheider herrschen mit 40 bar/8 °C ähnliche Bedingungen, so dass Hyperforin zum überwiegenden Teil in gelöster Form vorliegen dürfte. Löslichkeitsdaten von Cyclodextrinen in flüssigem oder überkritischem  $\text{CO}_2$  liegen in der Literatur nicht vor. Auf Grund des vergleichsweise hohen Molekulargewichtes und der freien Hydroxylgruppen der Glucosemoleküle dürfte sie allerdings vernachlässigbar sein. Somit findet die Komplexbildung unter Bedingungen statt, in denen  $\beta$ -CD in Suspension auf gelöstes Hyperforin trifft. Im Endabscheider herrschen Turbulenzen, die durch ständig einströmendes, flüssiges  $\text{CO}_2$  hervorgerufen werden. Die Bedingungen sind offensichtlich nicht dazu geeignet, Hyperforin in größeren Anteilen in  $\beta$ -CD einzuschließen. Höhere Drücke könnten die Einschussrate evtl. positiv beeinflussen, sind auf Grund der Konstruktion der Extraktionsanlage jedoch nicht möglich.

Komplexe aus Johanniskraut- $\text{CO}_2$ -Extrakt, bei denen M- $\beta$ -CD in Form einer methanolisch-wässrigen Lösung im Endabscheider eingesetzt werden, zeigen eine Wiederfindungsrate von Hyperforin im Komplex von annähernd 100 % (siehe Abb. 7-2). Betrachtet man auch hier das Defizit als eingeschlossenen Anteil des Hyperforins, so ergibt sich in diesem Fall eine Einschussrate von 0 %.. Die Stabilität von Hyperforin in den auf diese Weise hergestellten Komplexen ist deutlich schlechter, als für die, bei denen M- $\beta$ -CD als Feststoff eingesetzt wird. (siehe Abb. 7-8).

Cyclodextrine dienen als Enzymmodelle für verschiedene Reaktionen, die im Rahmen einer Zersetzung auftreten können, u. a. Hydrolyse von Estern und Amiden, Decarboxylierungsreaktionen und Oxidationen (Saenger et al. 1980). Eliseev und Yatsimirskii (1994) beschreiben die Beschleunigung der Oxidation von Catecholen in Anwesenheit von modifizierten Cyclodextrinen. Darüber hinaus muss davon ausgegangen werden, dass bei nicht erfolgtem Einschluss von Hyperforin in  $\beta$ -CD die Moleküle mehr oder weniger vereinzelt auf der Oberfläche des Cyclodextrinmoleküls anhaften und dadurch ein oxidativer Angriff begünstigt wird. Vor diesem Hintergrund lässt sich der Widerspruch zu der von Orth et al. (2000) beobachteten Stabilisierung von Hyperforin in M- $\beta$ -CD erklären. Für Komplexe aus unsubstituiertem  $\beta$ -CD und dem um eine Glucoseeinheit kleineren  $\alpha$ -CD finden die Autoren eine im Vergleich zu 70 %-igem Rohhyperforin verschlechterte Stabilität. Die Einschlussrate von Hyperforin in diese Komplexe wird nicht bestimmt, es liegt jedoch nahe, dass ein Einschluss des relativ großen, voluminösen Hyperforinmoleküls in das kleinere  $\alpha$ -CD sterisch behindert ist und, dadurch ein Abbau wie oben beschrieben begünstigt wird.

Die Stabilität von an Kieselgel 60 gebundenem Hyperforin untersucht Orth (1999) in Abhängigkeit vom Beladungsgrad. Kieselgel 60 wird üblicherweise als Packmaterial für HPLC-Säulen eingesetzt. Es zeigt sich, dass eine Stabilisierung nur bei einem Anteil von maximal 0,1 % Hyperforin bezogen auf die Masse an Kieselgel erfolgt. Höhere Beladungsgrade haben eine beschleunigte Zersetzung von Hyperforin zur Folge. Bei Syloid 244 FP handelt es sich um eine hochdisperse Kieselsäure mit einer hohen inneren Oberfläche. Die nominelle Teilchengröße beträgt 4  $\mu\text{m}$ , die BET-Oberfläche 290  $\text{g}/\text{m}^2$ . Syloid 244 FP ist in der Lage, 170  $\text{g}/100 \text{ g}$  Öl zu adsorbieren (Fiedler 2002). Der Abbau von Hyperforin bei Lagerung unter Lichteinfluss oder Raumtemperatur und höher verläuft in Anwesenheit von Syloid äußerst schnell. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Orth (1999). Bei Einsatz von 16,5 g Syloid und einer Hyperforinmasse im Separator von ca. 1 g beträgt die Beladung 5,7 % (m/m) und erreicht damit eine Größenordnung, für die schon Orth (1999) eine beschleunigte Zersetzung von Hyperforin beschreibt. Geringere Beladungsgrade sind im Rahmen eines In-line-Einschlusses im Separator auf Grunde der geringen Schüttdichte von Syloid nicht zu verwirklichen.

## **7.8 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Extraktstabilität und zum In-line-Einschluss**

Hyperforinangereicherte Johanniskraut- $\text{CO}_2$ -Extrakte zeigen eine vergleichsweise gute Stabilität hinsichtlich des Abbaus von Hyperforin bei Lagertemperaturen von -30 und +5 °C, nach 24-wöchiger Lagerung sind noch 98 bzw. 96 % der Ausgangsmenge an Hyperforin im

Extrakt enthalten. Die Stabilisierung kann auf die Einbettung von Hyperforin in die co-extrahierte lipophile Matrix zurückgeführt werden. Bei Lagerung unter Raumtemperatur und höher reicht dies für eine Stabilisierung jedoch nicht mehr aus. In-line-Einschlüsse von Hyperforin während des Extraktionsprozesses durch Zusatz von 1,8-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M- $\beta$ -CD) und Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) in den Endabscheider führen nicht zu der erwarteten Stabilitätsverbesserung sondern im Gegenteil zu einem beschleunigten Abbau, die auf eine mangelnde Einschussrate auf Grund der Molekülgröße von Hyperforin und geringer Löslichkeit der in flüssigem CO<sub>2</sub> zurückgeführt werden. Bei Analyse des Hyperforingehaltes der Einschussverbindungen zeigt sich, dass sich ein Teil des Hyperforins einer Erfassung entzieht. Aus diesem Anteil kann die Einschussrate von Hyperforin grob abgeschätzt werde. Diese liegt in Abhängigkeit des eingesetzten  $\beta$ -CD zwischen 10 und 50 %. Für den Einschuss von Hyperforin in Cyclodextrine könnten sich Drücke im Bereich von 100 bar und höher als günstig erweisen, die auf Grund der Konstruktion des Endabscheiders jedoch nicht realisierbar sind. Der Einsatz von Syloid, einer hochdispersen Kieselsäure mit hoher innerer Oberfläche als Komplexierungsmittel im Endabscheider zeigt ebenfalls keine Verbesserung der Stabilität von Hyperforin. Dies kann auf einen zu hohen Beladungsgrad der Kieselsäure mit Hyperforin von ca. 6 % zurückgeführt werden, der auf Grund der Bauweise des Separators nicht in Bereiche (< 0,1 %) in denen eine Stabilisierung zu erwarten wäre, verringert werden kann.

# KAPITEL 8

## EXPERIMENTELLER TEIL

### 8.1 Materialien

#### 8.1.1 Droge

Getrocknetes Johanniskraut (Herba Hyperici perforati) wird über die Fa. Lichtwer bezogen.  
Lagerung: licht- und luftgeschützt bei 5 °C

#### 8.1.2 Standardsubstanzen

Hyperforin/Adhyperforin

enthält ca. 75 % Hyperforin

Ch.-B.: SON 056/21

Fa. Dr. Willmar Schwabe

Lagerung: licht- und luftgeschützt bei -70 °C

Hyperforin/Adhyperforin als Dicyclohexylaminsalz

enthält im Hyperforinanteil (= 74,25 % des Salzes) 78,9 % Hyperforin und 19 % Adhyperforin

Ch.-B.: SON 072/13

Fa. Dr. Willmar Schwabe

Lagerung: licht- und luftgeschützt bei -70 °C

n-Hexadecan

Art.-Nr.: 9605

Ch.-B.: S2801005

Fa. Merck

Lagerung: licht- und luftgeschützt bei -30 °C

### 8.1.3 Lösungsmittel und Chemikalien

Tab. 8-1 Lösungsmittel und Chemikalien

Substanz	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
<i>Lösungsmittel für die HPLC</i>		
Acetonitril (gradient grade)	Art.-Nr.: 100030	Fa. Merck
	Art.-Nr.: A/0626/17	Fa. Fisher
Aqua ad injectabilia	Umkehrosrose mit anschließender Destillation	Pharm. Technol. Univ. Tübingen
Phosphorsäure 85%	Art.-Nr: 159382	Fa. Merck
Methanol (gradient grade)	Art.-Nr.: 106007	Fa. Merck
	Art.-Nr.: M/4056/17	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 <sub>2</sub> (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

*Hilfsstoffe für die Komplexierung*

β-Cyclodextrin	Cavamax W7 Pharma Ch.-B.: 019822	Fa. Wacker-Chemie
1,8-Methyl-β-Cyclodextrin	Cavamax W7 M Pharma Ch.-B.: 71P012	Fa. Wacker-Chemie
Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin	Cavitron 82006 Ch.-B.: Y1469	Fa. Cerestar
Hochdisperses Siliciumdioxid	Syloid 244 FP Ch.-B.: 1000011067	Fa. Grace

**8.1.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien***Tab. 8-2 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

## 8.2 Geräte zur allgemeinen Verwendung

Tab. 8-3 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
pH-Meter 761 Calimatic	Fa. Knick
Umkehrosiose-Anlage Hemo-RO	Fa. Millipore
Muldestor	Fa. Wagner & Munz
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H	Fa. Bandelin
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
Lichtkammer RC1TK (15 W, Neon)	Fa. Infors
Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor-R	Fa. Büchi

### 8.3 Datenverarbeitung

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

*Tab. 8-4 Allgemein verwendete Software*

Software	Hersteller/Lieferant
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
CorelDraw 9	Fa. Corel
Isis Draw 2.4	Fa. MDL
VCH Biblio für Windows 32 Bit	Fa. Wiley-VCH

## 8.4 Analytische Verfahren

### 8.4.1 HPLC-Methode zur Bestimmung von Hyperforin

#### 8.4.1.1 Methodenbeschreibung

Die Bestimmung von Hyperforin erfolgt in Anlehnung an die von Orth et al. (1999a) beschriebene Methode.

Geräte	HPLC-Pumpe LC-10AS, Fa. Shimadzu UV-Detektor SPD-6A, Fa. Shimadzu Autoinjektor SIL-9A, Fa. Shimadzu Software zur Datenauswertung LC10, Fa. Shimadzu
Analytische Säule	CC 250/4 Nucleosil 100/5 RP18, 250 x 4 mm Art.-Nr.: 721662.40, Fa. Macherey-Nagel
Vorsäule	CC 8/4 Nucleosil 100/5 RP18, 8 x 4 mm Art.-Nr.: 721602.40, Fa. Macherey-Nagel
Mobile Phase	Acetonitril/Wasser (89,5/10,5 [V/V]), eingestellt auf pH 4,5 mit Phosphorsäure 85 %

Die Bestandteile der mobilen Phase werden mit Hilfe einer Filtrationseinheit aus Glas (Fa. Sartorius) einzeln filtriert (regenerierte Cellulose, Porenweite 0,2 µm, Fa. Sartorius), abgewogen und gemischt. Anschließend wird der pH-Wert eingestellt und 20 min im Ultraschallbad entgast.

Flussrate	1,2 ml/min
Einspritzvolumen	20 µl
Detektion	UV 272 nm (Absorbance 0,32)

Die Berechnung der Konzentration erfolgt über die Peakfläche von Hyperforin aus dem arithmetischen Mittel dreier Einzelbestimmungen nach der Methode des externen Standards. Als externer Standard wird ein Gemisch aus Hyperforin/Adhyperforin (SON 056/21) verwendet, dessen Hyperforingehalt mittels Peakflächenvergleich auf  $74,77 \pm 0,03$  % bestimmt wurde.

#### 8.4.1.2 Probenvorbereitung

##### *Probenvorbereitung CO<sub>2</sub>-Extrakte*

Zwischen 80 und 120 mg getrockneter CO<sub>2</sub>-Extrakt, genau gewogen, werden in 100,0 ml Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) dispergiert, 15 min im Ultraschallbad behandelt, anschließend durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung eingesetzt.

##### *Probenvorbereitung Ausgangsdroge und extrahierte Droge*

Zwischen 3 und 4 g Droge, genau gewogen, werden mit 50,0 ml Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) für 15 min im Ultraschallbad extrahiert, anschließend durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung eingesetzt.

##### *Probenvorbereitung CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexe*

200 bzw. 400 mg getrockneter β-Cyclodextrin-CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplex, genau gewogen, werden in 1 bzw. 2 ml Dimethylsulfoxid gelöst, mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) auf 25,0 ml aufgefüllt, wobei Cyclodextrin zum Teil ausfällt. Nach 15 min im Ultraschallbad wird durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und die klare Lösung direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung eingesetzt.

Komplexe aus substituierten β-Cyclodextrinen bzw. hochdispenser Kieselsäure werden direkt in 25,0 ml Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) gelöst bzw. dispergiert und 15 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und die klare Lösung direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung eingesetzt.

##### *Probenvorbereitung Spüllösung Endabscheider*

Die entnommene, auf 250,0 ml mit Methanol aufgefüllte Spüllösung (siehe 8.5.3), wird durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert, und die klare Lösung direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung eingesetzt.

### 8.4.1.3 Kalibrierung und Validierung

#### *Linearität Hyperforin*

159,1 mg (entsprechend 119,0 mg Hyperforin) externer Standard (SON 056/21) werden in 50,0 ml Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) gelöst (Stammlösung). Ausgehend von dieser Stammlösung werden die Verdünnungsstufen 1:20, 1:10, 3:20, 1:5, 1:4 und 3:10 mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) als Verdünnungsmittel hergestellt. Die so erhaltenen Lösungen werden durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung eingesetzt. Von jeder Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt. Eine lineare Regression der Peakflächen über der Hyperforinkonzentration wird berechnet und daraus Steigung, Achsenabschnitt, Bestimmtheitsmaß und das 95%-Konfidenzintervall der Kalibriergeraden ermittelt.

#### *Systempräzision*

Die Lösung eines CO<sub>2</sub>-Extraktes (100,7 mg/100,0 ml) in Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) wird sechsmal injiziert. Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet.

#### *Methodenpräzision CO<sub>2</sub>-Extraktion*

Aus jeweils 200 g getrocknetem Johanniskraut wird sechsmal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise bei 120 bar, 40 °C und einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> über 40 min ein Extrakt hergestellt. Jeder Extrakt wird in drei Einzelbestimmungen analysiert (siehe 8.4.1.2). Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet.

#### *Methodenpräzision Lösungsmittlextraktion*

Aus jeweils ca. 3 g getrocknetem Johanniskraut, genau gewogen, wird sechsmal unabhängig voneinander ein Extrakt hergestellt und entsprechend analysiert (siehe 8.4.1.2). Mittelwert und relative Standardabweichung werden berechnet.

#### *Richtigkeit (Wiederfindung)*

Die Lösung eines CO<sub>2</sub>-Extraktes (100,7 mg/100,0 ml) in Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) (Stammlösung, 100,0 % Hyperforin) wird 9:10 mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) verdünnt (90,0 % Hyperforin). 58,5 mg Hyperforinstandard (SON 072/13) werden in 20,0 ml Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) gelöst (Spikinglösung). Von der Spikinglösung wird jeweils 1,0 ml entnommen und mit Stammlösung auf 50,0 bzw. 25,0 ml aufgefüllt (108,5 bzw. 118,0 % Hyperforin). Stammlösung, Verdünnung und gespikte Lösungen werden durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und di-

rekt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung eingesetzt. Jede Lösung wird sechsmal analysiert und aus den erhaltenen Peakflächen die Wiederfindungsrate bestimmt.

## 8.4.2 GC-FID-Methode zur Bestimmung der Wachsfraction

### 8.4.2.1 Methodenbeschreibung

Die Bestimmung erfolgt entsprechend der von Ness und Schmidt (1995) beschriebenen Methode.

Geräte	Gaschromatograph HP 5890 Serie II, Fa. Hewlett-Packard Autoinjektor HP 7637A mit Probenteller, 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
	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 µm
Trärgas	Typ	Wasserstoff 5.0
	Total flow	20 ml/min
	Detektorausgang	2 ml/min (entspricht einem Split von 1:10)
Injektionsvolumen	5 µl	
Temperaturprogramm	120 – 170 °C	7 °C/min
	170 – 194 °C	3 °C/min
	194 – 300 °C	5 °C/min
	300 °C	10 min
Interner Standard	288,84 mg n-Hexadecan in 500 ml n-Hexan	

Die Auswertung erfolgt über das Peakflächenverhältnis zu internem Standard. Die Zuordnung der auftretenden Peaks der Wachsfraktion erfolgt entsprechend Reverchon und Senatore (1994).

### 8.4.2.2 Probenvorbereitung

#### *Probenvorbereitung CO<sub>2</sub>-Extrakte*

Zwischen 25 und 45 mg getrockneter CO<sub>2</sub>-Extrakt, genau gewogen, werden mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) versetzt, 1,0 ml der internen Standardlösung zugegeben und mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) auf 50,0 ml aufgefüllt. Nach 15 min im Ultraschallbad wird durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und die erhaltene Lösung direkt als Probenlösung für die GC-Bestimmung eingesetzt.

#### *Probenvorbereitung Ausgangsdroge und extrahierte Droge*

Zwischen 3 und 4 g Droge, genau gewogen, werden mit 40 ml Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) 15 min im Ultraschallbad extrahiert. Der so erhaltene Extrakt wird durch einen Rundfilter filtriert, 1,0 ml der internen Standardlösung zugegeben und mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) auf 50,0 ml aufgefüllt. Anschließend durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und die erhaltene Lösung direkt als Probenlösung für die GC-Bestimmung eingesetzt.

## 8.4.3 GC-MS-Methode zur Bestimmung der Wachsfraktion<sup>5</sup>

### 8.4.3.1 Methodenbeschreibung

Gerät	Gaschromatograph Autosystem XL, Fa. PerkinElmer	
	Turbomass Quadrupole, Fa. PerkinElmer	
Säule	PE-5ms, Fa. PerkinElmer	
	15 m x 0,18 mm I.D. Phenylmethylpolysiloxan Kapillarsäule	
	Filmdicke	0,18 µm
Trärgas	Helium, 1 ml/min	
Injektortemperatur	60 °C	2 min
	320 °C	180 °C/min
Einspritzvolumen	0,5 µl (splitless)	

<sup>5</sup> Für die Durchführung der Messungen danke ich Dr. Franz Hadacek, Universität Wien (Österreich) und Dr. Christoph Seeger, Universität Innsbruck (Österreich)

Temperaturprogramm	60 °C	2 min
	60 – 200 °C	40 °C/min
	200 °C	2 min
	200 – 300 °C	3 °C/min
	300 °C	20 min
Detektor	Temperatur der Ionenquelle	180 °C
	Spannung	70 eV
	Heizstrom	200 µA
	Massenscan	40 – 640 a.m.u

Die Molekulargewichte werden bestimmt durch Identifizierung des  $[M]^+$ -Peaks oder des  $[M-15]^+$ -Fragmentpeaks. Alkane werden durch Vergleich mit kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen identifiziert. Bei anderen Bestandteilen wird versucht, durch sorgfältigen Vergleich mit kommerziell erhältlichen Substanzbibliotheken (Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6. Ausgabe; NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 1.5a) eine Identifizierung durchzuführen. Der relative Gehalt der so identifizierten Substanzen wird berechnet als das Verhältnis der jeweiligen Peakfläche zur Gesamtpeakfläche im TIC Chromatogramm.

#### 8.4.3.2 Probenvorbereitung

10 mg Extrakt werden in 0,5 ml Pyridin gelöst, bei Raumtemperatur mit 0,5 ml N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid/Trimethylchlorosilan (99/1) versetzt und direkt als Probenlösung in das gaschromatographische System injiziert.

#### 8.4.4 Bestimmung der Einschussrate von Hyperforin in $\beta$ -Cyclodextrin/CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexen

Die Bestimmung der Einschussrate von Hyperforin in  $\beta$ -Cyclodextrin/CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexen erfolgt entsprechend Waleczek et al. (2002).

Zwischen 250 und 350 mg  $\beta$ -Cyclodextrin/CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplex, genau gewogen, werden in einem verschraubbaren 15 ml-Zentrifugenglas mit 1,0 ml n-Hexan versetzt und vorsichtig umgeschwenkt. Nach Absetzen der ungelösten Bestandteile wird der Überstand mit einer Pipette abgenommen, in einen 25 ml-Messkolben gegeben und auf 25,0 ml mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) aufgefüllt. Anschließend wird die Lösung durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45 µm filtriert und direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung (siehe 8.4.1) eingesetzt (nicht eingeschlossener Anteil)

Der verbleibende Rückstand wird in 2 ml Dimethylsulfoxid gelöst, mit 10 ml Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) aufgefüllt und verschlossen 12 Stunden im Gefrierschrank (Fa. Siemens) equilibriert. Dabei fällt  $\beta$ -Cyclodextrin zum Teil wieder aus. Die so erhaltene Suspension wird abfiltriert und das Filtrat auf 25,0 ml mit Dichlormethan/Methanol (50/50 [V/V]) aufgefüllt. Die Lösung wird durch einen Membranfilter aus regenerierter Cellulose mit der Porenweite 0,45  $\mu\text{m}$  filtriert und direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung (siehe 8.4.1) eingesetzt (eingeschlossener Anteil).

#### 8.4.5 Teilchengrößenbestimmung mittels Siebanalyse

Gerät	Siebturm Retac 3D, Fa. Retsch
Siebe	Edelstahl, geflochten, Fa. Retsch
lichte Maschenweite	0,355 mm und 1,000 mm oder: 0,500 mm und 1,400 mm
Probenmenge	30 g, genau gewogen
Siebintensität	60 % der maximalen Rüttelintensität
Siebzeit	5 min

Die Auswertung erfolgt gravimetrisch. Die Masse pro Siebfraktion wird prozentual auf die jeweilige Probenmenge berechnet.

## 8.5 Technologische Verfahren

### 8.5.1 Zerkleinerung der Droge

Die Zerkleinerung der Droge erfolgt, falls notwendig, unmittelbar vor der Extraktion.

Gerät	Schneidmühle Pulverisette, Fa. Fritsch
Umdrehungszahl	2860 min <sup>-1</sup>
Siebeinsatz	2 mm, Trapezlochung

### 8.5.2 Gefriertrocknung

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

### 8.5.3 Herstellung der CO<sub>2</sub>-Extrakte

Sämtliche Extraktionen werden auf einer Pilotextraktionsanlage (Fa. Sitec) im Batchverfahren durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Extraktionsanlage findet sich in Kapitel 3.

#### 8.5.3.1 Optimierung der Extraktionsbedingungen

Die untersuchten Kombinationen der Extraktionsbedingungen sind in Tab. 8-5 zusammengestellt. Die fett hervorgehobenen Parameter geben die gewählten Referenzbedingungen wieder. Für alle Versuche wird die 1,2 l-Extraktionshülse verwendet. Die Solltemperatur am Kondensator liegt bei -3 °C, die des Unterkühlers bei -10 °C. Die Extraktionsdauer wird ab dem Moment gemessen, bei dem ein CO<sub>2</sub>-Fluss in der Extraktionshülse auftritt. Das Niveau an flüssigem CO<sub>2</sub> wird über eine Temperaturregelung in der Gasphase des Endabscheiders konstant gehalten. Dazu wird eine Solltemperatur vorgegeben, die ca. 5 °C über der Temperatur in der flüssigen Phase liegt.

Tab. 8-5 Übersicht der untersuchten Extraktionsbedingungen

Drogeneinwaage (m)	200, 300 oder <b>370</b> g (bei $m(\text{CO}_2) = \text{const.}$ ) <sup>6</sup>
Extraktionsdruck (p)	90, <b>120</b> oder 150 bar
Extraktionstemperatur (T)	<b>40</b> oder 50 °C (bei $p = \text{const.}$ ) <sup>7</sup>
CO <sub>2</sub> -Massenfluss ( $\phi$ )	4, <b>8</b> oder 12 kg·h <sup>-1</sup> (bei $m(\text{CO}_2) = \text{const.}$ ) <sup>6</sup>
Extraktionsdauer (t)	1, <b>3</b> oder 5 h
Abscheidebedingungen	<b>40 bar / 8 °C</b> (flüssig CO <sub>2</sub> )

Nach der Extraktion wird der Endabscheider schnell auf Umgebungsdruck entspannt. Hierbei wird durch starke Abkühlung des CO<sub>2</sub> der Extrakt in Trockeneis eingefroren und kann entnommen werden. Die Temperaturregelung des Heizmantels muss vorher ausgeschaltet werden, um die Bildung des Trockeneises zu gewährleisten. Extraktreste, die an den Wänden des Endabscheiders haften, werden so weit wie möglich entnommen. Der Extrakt wird direkt nach Sublimation des CO<sub>2</sub> gefriergetrocknet (siehe 8.5.2). Der lyophilisierte Extrakt wird in einer Fantaschale homogenisiert und vor Licht geschützt und dicht verschlossen bei -70 °C gelagert.

Nicht entnehmbare Restmengen an Extrakt werden durch mehrmaliges Spülen des Endabscheiders mit Methanol in einen 250 ml-Messkolben überführt und unmittelbar entsprechend 8.4.1 analysiert.

Zur Bestimmung der Restgehalte an Hyperforin in der extrahierten Droge wird nach Entspannen des Extraktionsbehälters eine Probe aus der Extraktionshülse entnommen und wie unter 8.4.1 beschrieben analysiert.

<sup>6</sup> Bei veränderter Einwaage bzw. verändertem Massenfluss wird die Extraktionsdauer so angepasst, dass die Gesamtmenge an CO<sub>2</sub>, die das Drogenbett passiert konstant bleibt.

<sup>7</sup> Bei einer Extraktionstemperatur von 50 °C wird der Extraktionsdruck auf 158 bar angepasst, um bei konstanter Dichte des überkritischen CO<sub>2</sub> den Einfluss der Temperatur unabhängig von der einhergehenden Dichteänderung untersuchen zu können.

### 8.5.3.2 Extraktion mit Zwischenabscheidung

Vorgehensweise und Grundeinstellungen entsprechen denen einer Extraktion ohne Zwischenabscheidung. Die Solltemperaturen an Kondensator und Unterkühler liegen bei -3 bzw. -10 °C. Neben der Endabscheidstufe bei 40 bar/8 °C erfolgt eine Zwischenabscheidung bei hinsichtlich Druck und Temperatur variierten Bedingungen. Die Extraktionen erfolgen bei einer Extraktionstemperatur von 40 °C, Extraktionsdruck und CO<sub>2</sub>-Massenfluss werden variiert. Die Bedingungen sind Kapitel 6 ab Seite 63 detailliert aufgeführt.

## 8.5.4 Herstellung der CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexe

### 8.5.4.1 Komplexbildung in dispergierter Phase

Die Herstellung der CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexe erfolgt In-line im Rahmen der Extraktion. Vor der Extraktion werden 16,5 oder 33 g Komplexmierungsmittel in den Endabscheider gegeben. Die dabei angewandten Extraktionsbedingungen sind in Tab. 8-6 zusammengestellt.

Tab. 8-6 Extraktionsbedingungen zur In-line-Herstellung der CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexe

Drogeneinwaage (m)	200 g
Extraktionsdruck (p)	120 bar
Extraktionstemperatur (T)	40 °C
CO <sub>2</sub> -Massenfluss ( $\phi$ )	8 kg·h <sup>-1</sup>
Extraktionsdauer (t)	40 min
Abscheidebedingungen	40 bar / 8 °C (flüssig CO <sub>2</sub> )

Das allgemeine Verfahren und die Einstellungen an Kondensator und Unterkühler entsprechen der unter 8.5.3 beschriebenen Vorgehensweise. Tab. 8-7 gibt die eingesetzten  $\beta$ -Cyclodextrine mit den jeweiligen Substitutionsgraden (DS) und molaren Massen ( $M_r$ ) wieder.

Nach der Extraktion wird der Endabscheider schnell entspannt, der Komplex entnommen und direkt nach Sublimation des dabei gebildeten CO<sub>2</sub> gefriergetrocknet (siehe 8.5.2). Der gefriergetrocknete Komplex wird in einer Reibschale unter gelindem Druck homogenisiert und vor Licht geschützt und dicht verschlossen bei -70 °C gelagert.

Tab. 8-7 *Verwendete Komplexierungsmittel*

Komplexierungsmittel	DS	M <sub>r</sub> [g/mol]
β-Cyclodextrin (β-CD)	-	1135
1,8-Methyl-β-Cyclodextrin (M-β-CD)	1,7 – 1,9	1310 <sup>8</sup>
Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (HP-β-CD)	0,58 – 0,73	1400
Hochdisperses Siliciumdioxid (Syloid)	-	-

#### 8.5.4.2 Komplexbildung in gelöster Phase

16,5 g 1,8-Methyl-β-Cyclodextrin werden in 300 ml Methanol/Wasser (50/50 [V/V]) gelöst und die erhaltene Lösung in den Endabscheider gegeben. Unter Betriebsbedingungen bilden sich im Endabscheider zwei Phasen aus: eine spezifisch schwerere Phase aus flüssigem CO<sub>2</sub> gesättigt mit Methanol/Wasser und eine spezifisch leichtere methanolisch-wässrige Phase mit CO<sub>2</sub> gesättigt. Ein verkürztes Tauchrohr mit Sieblochung (Eigenbau, Pharmazeutische Technologie, Tübingen) wird verwendet, um ein direktes Abscheiden des Extraktes in der methanolisch-wässrigen 1,8-Methyl-β-Cyclodextrin-Lösung zu gewährleisten. Die Extraktion wird bei den in Tab. 8-6 dargestellten Bedingungen durchgeführt.

Nach der Extraktion wird der Endabscheider entspannt, die methanolisch-wässrige Lösung entnommen, und die organische Phase unter Vakuum bei 40 °C Wasserbadtemperatur abgezogen. Die verbleibende, wässrige Phase wird gefriergetrocknet (siehe 8.5.2). Der gefriergetrocknete Komplex wird in einer Reibschale homogenisiert und vor Licht geschützt und dicht verschlossen bei -70 °C gelagert.

<sup>8</sup> Berechnet aus dem mittleren Substitutionsgrad

## 8.5.5 Stabilitätsuntersuchungen

### 8.5.5.1 Stabilitätsuntersuchung der CO<sub>2</sub>-Extrakte

#### *Temperaturabhängigkeit*

Drei unter identischer Vorgehensweise bei 120 bar, 40 °C, einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> über 40 min hergestellte CO<sub>2</sub>-Extrakte (siehe 8.5.3) werden auf je vier Vials aufgeteilt, verbördelt und bei -30, +5 °C, Raumtemperatur oder +30 °C lichtgeschützt und luftdicht verschlossen eingelagert. Der Hyperforingehalt wird unmittelbar vor der Einlagerung und im Folgenden zeitabhängig mittels HPLC bestimmt (siehe 8.4.1).

#### *Lichtabhängigkeit*

Drei unter identischer Vorgehensweise bei 120 bar, 40 °C, einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> über 40 min hergestellte CO<sub>2</sub>-Extrakte (siehe 8.5.3) werden auf je zwei Vials aufgeteilt, verbördelt und unter Lichteinfluss (15 W, Neon) bei Dunkelheit und gleicher Temperatur luftdicht verschlossen eingelagert. Der Hyperforingehalt wird unmittelbar vor der Einlagerung und im Folgenden zeitabhängig mittels HPLC bestimmt (siehe 8.4.1).

### 8.5.5.2 Stabilitätsuntersuchung der CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexe

Zwei unter identischer Vorgehensweise (siehe 8.5.4) CO<sub>2</sub>-Extrakt-Komplexe werden auf je vier Pulvergläser aufgeteilt und bei -30 °C, Raumtemperatur/Licht, Raumtemperatur/Lichtschutz und +30 °C luftdicht verschlossen eingelagert. Der Hyperforingehalt wird unmittelbar vor der Einlagerung und im Folgenden zeitabhängig mittels HPLC bestimmt (siehe 8.4.1).

# KAPITEL 9

## ZUSAMMENFASSUNG

Zubereitungen aus methanolisch- oder ethanolisch-wässrigen Trockenextrakten von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) spielen eine große Rolle in der Behandlung leichter bis mittelschwerer depressiver Erkrankungen. Während die Wirksamkeit von Johanniskrautextrakt-Präparaten in zahlreichen klinischen Studien belegt werden konnte, ist die Frage nach den wirksamkeitsbestimmenden antidepressiven Inhaltsstoffen heute mehr denn je Gegenstand einer kontrovers geführten Diskussion. Ergebnisse pharmakologischer Studien lassen darauf schließen, dass dem Phloroglucinderivat Hyperforin als potentem Hemmstoff der Serotonin-Wiederaufnahme in die präsynaptische Membran eine zentrale Bedeutung zukommt. Die USP 26/NF 21 trägt dieser Tatsache Rechnung und fordert in den Monographien „St John's Wort“ und „Powdered St John's Wort Extract“ Mindestgehalte sowohl für Hypericin als auch für Hyperforin. Als Phloroglucinderivat weist Hyperforin eine hohe Lipophilie auf und unterliegt bei unsachgemäßer Lagerung unter Einfluss von Wärme und Licht einem raschen oxidativen Abbau.

Die Extraktion von pflanzlichen Materialien mit überkritischem Kohlendioxid hält in den 1970er Jahren Einzug in die Nahrungsmittelindustrie. Erste industrielle Anwendungen sind die Entcoffeinierung von Kaffee und die Gewinnung von Hopfenextrakten. Von Mitte der 1980er Jahre an wird das Verfahren auf pharmazeutisch relevante Drogen ausgeweitet. Auf Grund seiner moderaten kritischen Parameter ( $p_c = 73$  bar,  $T_c = 31$  °C), seiner Nichtbrennbarkeit, physiologischen Unbedenklichkeit und leichten Verfügbarkeit ist Kohlendioxid das im Nahrungsmittelsektor und im pharmazeutischen Bereich am häufigsten eingesetzte überkritische Solvent. Reines überkritisches CO<sub>2</sub> ist zu den lipophilen Lösungsmitteln zu zählen und ist damit für die selektive Anreicherung von Hyperforin aus Johanniskraut geeignet.

Auf einer **CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage im Pilotmaßstab** mit einem 1,2 l-Extraktionsbehälter werden die Extraktionsbedingungen hinsichtlich einer möglichst hohen **Anreicherung von Hyperforin** im Extrakt optimiert. Dabei wird auch Augenmerk auf die Extraktionsbilanz und Zersetzungstendenz von Hyperforin zu seinem Zwischenabbauprodukt gelegt. Um den Massentransferwiderstand beim Übergang von Hyperforin aus der Droge in das Extraktionsmedium zu verringern, wird die Droge vor der Extraktion in einer Schneidmühle zerkleinert. Die Ausbeute der gefriergetrockneten Extrakte wird ermittelt und nach Homogenisation der zähen, klebrigen Extrakte deren Hyperforingehalt mittels HPLC bestimmt. Im Rahmen der Optimie-

rung der Extraktionsbedingungen werden die Parameter Extraktionsdruck (90, 120 und 150 bar), Extraktionstemperatur (40 und 50 °C), CO<sub>2</sub>-Massenfluss (4, 8 und 12 kg·h<sup>-1</sup>) und Extraktionsdauer (1, 3 und 5 h) variiert. Eine Erhöhung des **Extraktionsdruckes** von 90 auf 120 bar führt in Folge einer erhöhten Dichte und damit verbunden einer gesteigerten Lösungskapazität des Extraktionsfluids zu einer um ca. 30 % erhöhten Extraktausbeute. Einen geringeren Anstieg von ca. 10 % beobachtet man bei einer Verlängerung der **Extraktionsdauer** von 1 auf 3 h auf Grund einer höheren Gesamtmenge an Lösungsmittel, die das Drogenbett durchströmt. Während in beiden Fällen die Extraktausbeute ansteigt, nimmt der Hyperforingehalt der Extrakte von 35 auf 25 % ab. Dies ist auf eine vermehrte Extraktion von unerwünschten Begleitstoffen in Folge einer verringerten Selektivität des Extraktionsmediums zurückzuführen. Eine weitere Erhöhung des Extraktionsdruckes bzw. Verlängerung der Extraktionsdauer führt nur zu einem geringen Anstieg der Ausbeute, während der Hyperforingehalt unverändert bleibt. Die Steigerung der **Extraktionstemperatur** von 40 °C auf 50 °C bei konstanter Dichte (Erhöhung des Druckes von 120 auf 158 bar) liefert eine höhere Extraktausbeute und wiederum einen verringerten Hyperforingehalt der Extrakte, dies kann auf eine verstärkte Extraktion flüchtiger Bestandteile wie z. B. Cuticularwachse zurückgeführt werden. Der **CO<sub>2</sub>-Massenfluss** hat keinen Einfluss auf das Extraktionsergebnis. Dies lässt den Schluss zu, dass die Löslichkeit von Hyperforin und anderen co-extrahierten Pflanzenbestandteilen im überkritischen Kohlendioxid als der dominierende Vorgang des Extraktionsprozesses betrachtet werden kann.

Die Erstellung einer **Extraktionsbilanz** zeigt, dass lediglich zwischen 52 und 67 % des insgesamt in der Droge vorhandenen Hyperforins im CO<sub>2</sub>-Extrakt erscheinen, während zwischen 10 und 20 % in der extrahierten Droge verbleiben. Bezieht man den nicht aus dem Endabscheider entnehmbaren Anteil von ca. 10 % in die Bilanz mit ein, so ergibt sich eine Gesamtwiederfindung von bis zu 95 % und damit eine annähernd ausgeglichene Bilanz.

Ein Vergleich des Peakflächenverhältnisses von Orthoforin, dem Zwischenabbauprodukt von Hyperforin, zu Hyperforin in der Ausgangsdroge und in den Extrakten gibt Aufschluss über eine **Zersetzungstendenz während der Extraktion**. Das Verhältnis wird durch eine Extraktion bei 90 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h und 120 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/1 h nicht verändert. Alle anderen untersuchten Bedingungen führen zu einem Anstieg dieses Verhältnisses um ca. 10 %. In diesem Zusammenhang stellt sich heraus, dass bereits die Zerkleinerung in der Schneidmühle zu einer Erhöhung des Peakflächenverhältnisses zu Gunsten von Orthoforin führt. Ein Vergleich der Extraktion von zerkleinerter mit unzerkleinerter Droge bei 120 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/3 h zeigt, dass sich die Zerkleinerung positiv auf die Wiederfindung von Hyperforin im Extrakt, jedoch negativ auf das Orthoforin/Hyperforin-Peakflächenverhältnis auswirkt.

Zieht man alle Ergebnisse in Betracht, so erweist sich hinsichtlich Ausbeute und Hyperforin-gehalt eine Extraktion bei 120 bar/40 °C über 1 h bei einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 8 kg·h<sup>-1</sup> als optimal. Bei Einsatz von zerkleinerter Droge erhält man unter diesen Bedingungen ca. 1,7 % Extrakt bezogen auf die Ausgangsmasse an Droge bei einem Gehalt an Hyperforin von 33 %, dies entspricht einer Wiederfindung von Hyperforin im Extrakt von 63 %. Eine Zersetzung von Hyperforin ist unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten. Da eine Zerkleinerung in der Schneidmühle sich negativ auf die Stabilität auswirkt, wird der Einsatz von unzerkleinerter Droge bevorzugt.

Gefriergetrocknete Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakte haben ein **inhomogenes Erscheinungsbild** und lassen sich auf manuellem Weg in einen hyperforinreichen und einen wachsreichen Teil trennen. Der hyperforinreiche Teil repräsentiert die Hauptmasse des Extraktes und enthält ca. 90 % des gesamten Hyperforins im Extrakt. Mittels gaschromatographischer Trennung und Flammenionisationsdetektion lassen sich in der **Wachsfraction** vier homologe n-Alkane der Kettenlänge C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>, und C<sub>33</sub> nachweisen und quantifizieren. Der Hauptanteil entfällt dabei auf das **C<sub>29</sub>-n-Alkan (Nonacosan)**. Dies wird durch **GC-MS Untersuchungen** bestätigt. Auf diesem Wege können eine Reihe weiterer Bestandteile der Wachsfraction identifiziert werden. Neben ungeradzahligen n-Alkanen sind dies geradzahlige n-Alkanole und Fettsäuren der Kettenlänge C<sub>24</sub>-C<sub>30</sub> bzw. C<sub>14</sub>-C<sub>32</sub>. Unter den freien Fettsäuren dominiert die Palmitinsäure (C<sub>16</sub>) ebenso wie in den Wachsestern, die in Kettenlängen zwischen C<sub>29</sub> und C<sub>48</sub> in der Wachsfraction auftreten. Desweiteren können ein Sesquiterpenalkohol (Neroldiol), zwei Diterpene (Nephytadien und Phytol) und insgesamt sechs Triterpene (β-Sitosterol, β-Stigmasterol, Nervisterol, Squalen, β-Amyrin und Lupeol) nachgewiesen werden. Die überwiegende Zahl der identifizierten Substanzen ist den Cuticularwachsen zuzuordnen. Diese sind auf der Oberfläche des Pflanzenmaterials lokalisiert und erfüllen in erster Linie Schutzfunktionen. Das Auftreten der ungesättigten Fettsäuren Öl- und Linolsäure im Extrakt deuten darauf hin, dass in untergeordnetem Maße auch das Zellinnere aufgeschlossen wird.

Bei der Extraktion von ätherischen Ölen mit überkritischem Kohlendioxid kann durch eine isobare **Zwischenabscheidung** bei Temperaturen um 0 °C eine weitgehende Abtrennung der Wachse erreicht werden. Es zeigt sich, dass sich auf Grund der Konstruktion der Extraktionsanlage solch tiefe Temperaturen im Zwischenabscheider nicht realisieren lassen. In Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen liegt die mittlere Temperatur im Fluidzyklon zwischen 21 und 26 °C und ist starken Schwankungen unterworfen. Die relativ hohen Temperaturen lassen sich zum einen auf die geringe Leistung des Kühlthermostaten, zum anderen auf die kurze Kühlstrecke, die für eine Abkühlung des überkritischen Fluids ausgehend von der jeweiligen Extraktionstemperatur zur Verfügung steht, zurückführen. Nach einer Ex-

traktion bei 200 bar/40 °C bzw. 196 bar/60 °C fallen nennenswerte Mengen von ca. 1,2 g Wachs im Zwischenabscheider an, deren Gehalt an C<sub>29</sub>-n-Alkan 18 bzw. 15 % beträgt. Im Falle einer Extraktion bei 200 bar/40 °C entspricht dies einem Anteil von ca. 60 % des insgesamt extrahierten Nonacosans der im Zwischenabscheider anfällt. Dennoch ist die gesamte Menge an Wachs im Endabscheider nicht merklich verringert.

Durch Einsatz eines leistungsfähigeren Thermostaten gelingt es, bei Extraktionsbedingungen von 90 bzw. 120 bar/40 °C die Temperatur im Fluidzyklon auf Werte zwischen 5 und 16 °C zu senken. Ein halbiertes CO<sub>2</sub>-Massenfluss wirkt sich ebenfalls positiv aus, da pro Zeiteinheit weniger überkritisches Kohlendioxid ausgehend von der Extraktionstemperatur abgekühlt werden muss. Dennoch fällt unter diesen Bedingungen keine nennenswerte Menge an Wachs im Zwischenabscheider an. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei moderaten Extraktionsdrücken Begleitstoffe in geringerem Ausmaß extrahiert werden. Ein Vergleich der Endabscheiderfraktion nach einer Extraktion bei 90 bar/40 °C mit und ohne Zwischenabscheidung zeigt, dass der Hyperforingehalt im Endabscheider sich durch eine Zwischenabscheidung bei einer kurzen Extraktionsdauer von 40 min nicht über 40 % hinaus steigern lässt, obwohl der Gehalt an C<sub>29</sub>-n-Alkan in der Endabscheiderfraktion ungefähr halbiert wird. Bei einer Verdreifachung der Extraktionsdauer auf zwei Stunden führt die Zwischenabscheidung zu einem Anstieg des Hyperforingehaltes im Endabscheider von 37 auf 41 %. Weitere apparative Änderungen, wie der Einsatz eines noch leistungsfähigeren Thermostaten, die Installation einer effektiven Temperaturregelung im Fluidzyklon sowie der Einbau von Ventilheizungen könnten die Abscheidung von Wachsen im Fluidzyklon positiv beeinflussen.

Im Rahmen der **Stabilitätsuntersuchungen** von Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten werden insgesamt sechs Extrakte aus 200 g unzerkleinertem Johanniskraut unter identischer Vorgehensweise bei 120 bar/40 °C/8 kg·h<sup>-1</sup>/0,67 h hergestellt. Daraus ergibt sich eine Ausbeute von 0,99 ± 0,07 % bei einem Hyperforingehalt von 34,7 ± 0,8 % (Mittelwert ± sdv, n = 6). Das Verfahren zur Anreicherung von Hyperforin aus Johanniskraut mit reinem überkritischem CO<sub>2</sub> kann somit als sehr gut reproduzierbar bezeichnet werden.

CO<sub>2</sub>-Extrakte von *Hypericum perforatum* L zeigen während einer 24-wöchigen Lagerung bei +5 °C eine nur geringfügige Abnahme des Hyperforingehaltes auf 96 % vom Ausgangsgehalt. Verglichen mit Stabilitätsuntersuchungen aus der Literatur mit 70 %-igem Rohhyperforin bedeutet dies eine deutliche Stabilisierung, die auf die Einbettung von Hyperforin in die lipophile

Extraktmatrix zurückzuführen ist. Dieser Effekt reicht jedoch nicht aus, um bei höheren Lagertemperaturen oder Lagerung unter Lichteinfluss eine Stabilisierung zu erzielen.

Durch Zusatz verschiedener **Cyclodextrine** ( $\beta$ -Cyclodextrin, 1,8-Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin) im Massenverhältnis Cyclodextrin zu Extrakt von 8:1 bzw. 16:1 in den Endabscheider werden die Möglichkeiten und Grenzen eines **In-line-Einschlusses** von Hyperforin in flüssigem Kohlendioxid untersucht. Die Komplexe sind auch nach Homogenisation in der Reibschale sehr inhomogen. Die Wiederfindung von Hyperforin in den Komplexen weist Defizite zwischen 20 und 50 % auf. Mit Hilfe einer Hexan-Wasch-Methode wird eine **Einschlussrate von Hyperforin** in unsubstituiertes  $\beta$ -Cyclodextrin von ca. 30 % ermittelt, unabhängig von der eingesetzten Menge an  $\beta$ -Cyclodextrin. Die Summe aus eingeschlossenem und nicht eingeschlossenem Anteil liefert vergleichbare Werte wie eine Direktanalyse der Komplexe, bei der diese gelöst und im Ultraschallbad behandelt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass sowohl bei der Hexan-Wasch-Methode als auch bei einer Direktanalyse ein gewisser Anteil des Hyperforins nicht erfasst wird. Unter der Voraussetzung, dass dies den eingeschlossenen Teil repräsentiert, kann aus dem Defizit in der Wiederfindung die Einschlussrate abgeschätzt werden. Auf Grund der mangelnden Einschlussraten führt keines der untersuchten  $\beta$ -Cyclodextrine zu einer Verbesserung der Stabilität von Hyperforin in den Komplexen. Die Zersetzung verläuft im Gegenteil schneller als bei reinen Johanniskraut-CO<sub>2</sub>-Extrakten. Dies kann auf eine Anlagerung von Hyperforin an die Oberfläche der  $\beta$ -Cyclodextrine und damit zu einer Vereinzelung der Moleküle zurückgeführt werden. Die Bedingungen im Endabscheider sind somit nicht geeignet, um Hyperforin effektiv mit hohen Raten in  $\beta$ -Cyclodextrine einzuschließen.

Die Verwendung von **hochdisperser Kieselsäure** im Rahmen der In-line-Herstellung von Komplexen führt ebenfalls zu keiner Verbesserung der Stabilität von Hyperforin. Dies ist auf den bekannten Effekt zurückzuführen, dass Kieselsäure in nur geringen Beladungsgraden von 0,1 % oder geringer einen stabilisierenden Effekt auf Hyperforin zeigt. Der Beladungsgrad in dieser Untersuchung beträgt demgegenüber ca. 6 %.

Alles in allem zeigt die vorliegende Arbeit den positiven Aspekt einer reproduzierbaren Anreicherung von Hyperforin aus *Hypericum perforatum* L. mittels überkritischem Kohlendioxid unter schonenden Bedingungen auf. Der Hyperforingehalt der resultierenden Extrakte beträgt bis zu 40 %, dies entspricht einem Anreicherungsfaktor gegenüber der Droge von knapp 50. Einer möglichst quantitativen Abtrennung von abgeschwemmten Cuticularwachsen durch eine Zwischenabscheidestufe sind apparative Grenzen gesetzt. Unter optimalen Extraktionsbedingungen fällt die Hauptmenge an extrahierten Cuticularwachsen im Endab-

scheider an. Die Einbettung von Hyperforin in die lipophile Extraktmatrix wirkt sich stabilisierend aus, so dass eine vollständige Abtrennung der Cuticularwachse nicht unbedingt erwünscht ist. Die Möglichkeit der Herstellung von In-line-Einschlussverbindungen mit  $\beta$ -Cyclodextrinen zur weitergehenden Stabilisierung von Hyperforin ist ebenfalls apparativ begrenzt. Das Verfahren führt nicht zu den erwünschten hohen Einschussraten und damit zu keiner gegenüber den reinen CO<sub>2</sub>-Extrakten verbesserten Stabilität. Hochangereicherte Extrakte von Hyperforin aus *Hypericum perforatum* L. können als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Hyperforin-Referenzsubstanz für analytische Zwecke dienen. Inwieweit sich solch ein Spezialextrakt, der an nur einem der potentiell wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe angereichert ist, auf dem Arzneimittelmarkt durchsetzen kann, ist auf Grund der gegenwärtigen Zulassungskriterien fraglich. Dennoch sind sie von Interesse für die Untersuchung pharmakodynamischer Effekte in-vitro und in-vivo im Zuge der Aufklärung des antidepressiven Wirkmechanismus von Johanniskraut.

# KAPITEL 10

## LITERATURVERZEICHNIS

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

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

US Patent US 5073267 (1991)

Anitescu, G.; Doneanu, C. und Radulescu, V.

„Isolation of coriander oil: comparison between steam distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction“

Flavour Frag. J. **12**, 173-176 (1997)

Barnes, J.; Anderson, L. A. und Phillipson, J. D.

„St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties“

J. Pharm. Pharmacol. **53**, 583-600 (2001)

Bauer, K. H.; Frömmling, K.-H. und Führer, C.

„Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie“

7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 160-164 (2002a)

Bauer, S.; Störmer, E.; Johne, A.; Krüger, H.; Budde, K.; Neumayer, H. H.; Roots, I. und Mai, I.

„Alterations in cyclosporin A pharmacokinetics and metabolism during treatment with St John's Wort in renal transplant patients“

„B. J. Clin. Pharmacol. **55**, 203-211 (2002b)

Battacharya, S. K.; Chakrabarti, A. und Chatterjee, S. S.

„Activity profiles of two hyperforin-containing *Hypericum* extracts in behavioral models“

Pharmacopsychiat. **31, Supplement**, 22-29 (1998)

Bender, E.

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

Proc. 5<sup>th</sup> Sym. Thermophys. Prop. **5**, 227-235 (1970)

Bennett, G. J. und Lee, H.-H.

„Xanthones from *Guttiferae*“

Phytochemistry **28**, 967-998 (1989)

Berghöfer, R.

„Analytik und Isolierung phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. aus Anbau und Wildvorkommen und Vergleich mit anderen heimischen *Hypericum*-Arten“

Dissertationes botanicae **106**, Cramer Berlin, 44-45 und 47-76 (**1987**)

Biber, A.; Fischer, H.; Römer, A. und Chatterjee, S. S.

„Oral bioavailability of hyperforin from *Hypericum* extracts in rats and human volunteers“

Pharmacopsychiat. **31, Supplement**, 36-43 (**1998**)

Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Morgenni, F. Mazzi, G. und Vincieri, F. F.

„Evaluation of chemical stability of St. John's Wort commercial extract and some preparations“

Int. J. Pharm. **213**, 199-208 (**2001**)

Bladt, S. und Wagner, H.

„MAO-Hemmung durch Fraktionen und Inhaltsstoffe von *Hypericum*-Extrakt“

Nervenheilkunde **12**, 349-352 (**1993**)

Bombardelli, E. und Morazzoni, P.

„*Hypericum perforatum*“

Fitoterapia **66**, 43-68 (**1995**)

Bork, P. M.; Bacher, S.; Schmitz, M. L.; Kaspers, U. und Heinrich, M.

„Hypericin as a non-antioxidant inhibitor of NF- $\kappa$ B“

Planta Med. **65**, 297-300 (**1999**)

Brolis, M.; Gabetta, B.; Fuzzati, N.; Pace, R.; Panzeri, F. und Peterlongo, F.

„Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*“

J. Chromatogr. A **825**, 9-16 (**1998**)

Brondz, I.; Greibrokk, T.; Groth, P. A. und Aasen, A. J.

„The relative stereochemistry of hyperforin – an antibiotic from *Hypericum perforatum* L.“

Tetrahedron Lett. **23**, 1299-1301 (**1982**)

Brondz, I.; Greibrokk, T. und Aasen, A. J.

„n-Alkanes of *Hypericum perforatum*: a revision“

Phytochemistry **22**, 295-296 (**1983a**)

Brondz, I.; Greibrokk, T. und Aasen, A. J.

„n-1-Alkanols of *Hypericum perforatum*“

J. Nat. Prod. **46**, 940-941 (**1983b**)

Brondz, I; Greibrokk, T.; Groth, P. A. und Aasen, A. J.

„The absolute configuration of hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L., based on the crystal structure determination of its p-bromobenzoate ester“

Acta Chem. Scand. A **37**, 263-265 (1983c)

Brunner, G.

„Gas extraction“

Steinkopf Darmstadt, 6-21 und 60-74 (1994)

Bühler

Schreiben vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte an den Bundesverband der Arzneimittelhersteller e. V. vom 7. 9. 1995

Gesch.-Z- G VIII 3.9-7144-00-378/95

Buse Gase GmbH & Co

„Eigenschaften der Kohlensäure“

4. Auflage (1992)

Butterweck, V. und Nahrstedt A.

„Phytochemie und Pharmakologie – Was ist bekannt über Johanniskraut?“

Pharm. Unserer Zeit **32**, 212-219 (2003)

Butterweck, V.; Petereit, F.; Winterhoff, H. und Nahrstedt, A.

„Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test“

Planta Med. **64**, 291-294 (1998)

Butterweck, V.; Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A. und Winterhoff, H.

„Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test“

Planta Med. **66**, 3-6 (2000)

Butterweck, V.; Korte, B. und Winterhoff, H.

„Pharmacological and endocrine effects of *Hypericum perforatum* and hypericin after repeated treatment“

Pharmacopsychiat. **34**, Supplement 1, S2-S7 (2001)

Bystrov, N. S.; Chernov, B. K.; Dobrynin, V. N. und Kolosov, M. N.

„The structure of hyperforin“

Tetrahedron Lett. **32**, 2791-2794 (1975)

Calapari, G.; Crupi, A.; Firenzuoli, F. Inferra, G. Ciliberto, G. Parisi, A.; De Sarro G. und Caputi, A. P.

„Interleukin-6 involvement in antidepressant action of *Hypericum perforatum*“

Pharmacopsychiat. **34, Supplement 1**, S8-S10 (2001)

Castor, T. P.; Tyler, T. A. und Student, R. J.

„Methods for making *Hypericum* fractions and St. John's Wort products“

US Patent US 6291241 (2001)

Catchpole, O. J.; Grey, J. B. und Smallfield, B. M.

„Near-critical extraction of sage, celery and coriander seed“

J. Supercrit. Fluids **9**, 273-279 (1996)

Catchpole, O. J.; Perry, N. B.; da Silva, B. M. T.; Grey, J. B. und Smallfield, B. M.

„Supercritical extraction of herbs I: Saw Palmetto, St John's Wort, Kava Root and Echinacea“

J. Supercrit. Fluids **22**, 129-138 (2002)

Chandler, K.; Pouillot, F. L. L. und Eckert, C. A.

„Phase equilibria of alkanes in natural gas systems. 3. Alkanes in carbon dioxide“

J. Chem. Eng. Data **41**, 6-10 (1996)

Charoenchaitrakool, M.; Deghani, F. und Foster, N. R.

„Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- $\beta$ -cyclodextrin“

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

Chatterjee, S. S.; Nöldner, M.; Koch, E. und Erdelmeier, C.

„Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility

Pharmacopsychiat. **31, Supplement**, 7-15 (1998)

Chatterjee, S. S.; Biber, A. und Weibezahn, C.

„Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin“

Pharmacopsychiat. **34, Supplement 1**, S11-S19 (2001)

Chi, J. D. und Franklin, M.

„Measurement of hyperforin a constituent of St John's Wort in plasma by high-performance liquid chromatography“

J. Chromatogr. B. **735**, 285-288 (1999)

- Choi, Y. H.; Kim, J.; Noh, M. J.; Park, E. M. und Yoo, K.-P.  
„Extraction of epicuticular wax and nonacosan-10-ol from Ephedra herb utilizing supercritical carbon dioxide“  
Korean J. Chem. Eng. **13**, 216-219 (1996)
- Choi, Y. H.; Kim, J.; Noh, M. J.; Choi, E. S. und Yoo, K.-P.  
„Comparison of supercritical carbon dioxide extraction with solvent extraction of nonacosan-10-ol,  $\alpha$ -amyrin acetate, squalene and stigmasterol from medicinal plants“  
Phytochem. Anal. **8**, 233-237 (1997)
- Connors, K. A.  
„The stability of cyclodextrin complexes in solution“  
Chem. Rev. **97**, 1325-1357 (1997)
- Cramer, F. und Henglein, F. M.  
„Gesetzmäßigkeiten bei der Bildung von Adukten der Cyclodextrine“  
Chem. Ber. **90**, 2561-2571 (1957)
- Cui, Y. und Ang, C. Y. W.  
„Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of phloroglucinols in St. John's Wort (Hypericum perforatum L.)“  
J. Agric. Food Chem. **50**, 2755-2759 (2002)
- Cui, Y.; Gurley, B.; Ang, C. Y. W. und Leaky, J.  
„Determination of hyperforin in human plasma using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection“  
J. Chromatogr. B **780**, 129-135 (2002)
- Czygan, F.-C.  
„Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrauts – Vom 2500 Jahre alten Apotropaikum zum aktuellen Antidepressivum“  
Pharm. Unserer Zeit **32**, 184-190 (2003)
- D'Alpaos, M.; Traldi, P.; Pallado, P. und Gorgoglione, D.  
„Extraction and fractionation of ginger flavour with supercritical carbon dioxide“  
Riv. Ital. EPPOS **Spec. Num.** 200-207 (1997)
- de Kraker, F.  
in Vetter, G.  
„Handbuch Dosieren“  
2. Auflage, Vulkan-Verlag Essen, 527-534 (2001)

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 sulfuric et l'essence de pétrol rectifiée“

Ann. chim. phys. **21**, 127-132, 178-182 (**1822**)

Della Porta, G.; Taddeo, R.; D'Urso, E. und Reverchon, E.

„Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO<sub>2</sub> extraction“

Lebensm.-Wiss. Technol. **31**, 454-460 (**1998**)

Della Porta, G.; Porcedda, S.; Marongiu, B. und Reverchon, E.

„Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction“

Flavour Frag. J. **14**, 214-218 (**1999**)

Di Matteo, V.; Di Giovanni, G.; Di Mascio, M. und Esposito, E.

„Effect of acute administration of Hypericum perforatum-CO<sub>2</sub> extract on dopamine and serotonin release in the rat central nervous system“

Pharmacopsychiat. **33**, 14-18 (**2000**)

Dimpfel, W.; Schober, F. und Mannel, M.

„Effects of a methanolic extract and a hyperforin-enriched CO<sub>2</sub> extract of St. John's Wort (Hypericum perforatum) on intracerebral field potentials in the freely moving rat (Tele-Stereo-EEG)“

Pharmacopsychiat. **21**, **Supplement**, 30-35 (**1998**)

Doneanu, C. und Anitescu, G.

„Supercritical carbon dioxide extraction of Angelica archangelica L. root oil“

J. Supercrit. Fluids **12**, 59-67 (**1998**)

Dürr, D.; Stieger, B.; Kullack-Ublick, G. A.; Rentsch, K. M.; Steinert, H. C.; Meier, P. J. und Fattinger, K.

„St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4“

Clin. Pharmacol. Ther. **68**, 589-504 (**2000**)

Eckert, G. P. und Müller, W. E.

„Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes“

Pharmacopsychiat. **34**, **Supplement 1**, S22-S25 (**2001**)

Eliseev, A. V. und Yatsimirskii, A. K.

„Dual effect of cyclodextrins on catechol autooxidation“

J. Org. Chem. **59**, 264-265 (**1994**)

- Erdelmeier, C.; Grethlein, E.; Lang, F.; Oschmann, R. und Stumpf, K.-H.  
„Stable extract of *Hypericum perforatum* L., a method for producing the same, and corresponding pharmaceutical preparations“  
US Patent US 6241988 **(2001a)**
- Erdelmeier, C.; Grethlein, E.; Lang, F.; Oschmann, R. und Stumpf, K.-H.  
„Stable extract of *Hypericum perforatum* L., process for preparing the same and pharmaceutical compositions“  
US Patent US 6280736 **(2001b)**
- Ergänzungsbuch zum DAB 6  
„Oleum Hyperici“  
Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch in der 6. Ausgabe, 366-367 **(1953)**
- Esquivel, M. M.; Ribeiro, M. A. und Bernardo-Gil, M. G.  
„Supercritical extraction of savory oil: study of antioxidant activity and extract characterization“  
J. Supercrit. Fluids **14**, 129-138 **(1999)**
- Falk, H. und Schmitzberger, W.  
„On the nature of „soluble“ hypericin in *Hypericum* species“  
Monatsh. Chem. **123**, 731-739 **(1992)**
- Fiedler, H. P.  
„Lexikon der Hilfsstoffe“  
5. Auflage, Editio-Cantor-Verlag, Aulendorf, 1632-1633 **(2002)**
- Franklin, M. und Cowen, P. J.  
„Researching the antidepressant actions of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) in animals and man“  
Pharmacopsychiat. **34**, Supplement 1, S29-S37 **(2001)**
- Freudenberg, K. und Meyer-Delius, M.  
„Über die Schardinger-Dextrine aus Stärke“  
Ber. Dtsch. Chem. Ges. **71**, 1596-1601 **(1938)**
- Freudenberg, K.; Plankenhorn, E. und Knauber, H.  
„Schardinger's Dextrins“  
Chem. Ind. 731-735 **(1947)**

Fuzzati, N.; Gabetta, B.; Streponi, I.; Villa, F.

„High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and multiple mass spectrometry studies of hyperforin degradation products“

J. Chromatogr. A **926**, 187-198 (2001)

Gambarana C.; Tolu, P. L.; Masi, F.; Rinaldi, M.; Giachetti, D.; Morazzoni, P.  
und De Montis, M. G.

„A study of the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* on animal models“

Pharmacopsychiat. **34, Supplement 1**, S42-S44 (2001)

Ghosal, S.

„St. John's Wort composition“

US Patent US 6224906 (2001)

Gobbi, M.; Maia, M.; Pirona, L.; Morazzoni, P. und Menneni, T.

„In-vitro binding studies with two *Hypericum perforatum* extracts – hyperforin, hypericin and biapigenin – on 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepine, Sigma, NPY-Y<sub>1</sub>/Y<sub>2</sub> receptors and dopamine transporters“

Pharmacopsychiat. **34, Supplement 1**, S45-S48 (2001)

Gottwald, W.

„Statistik für Anwender“

Wiley-VCH Weinheim, 96-104 (2000)

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

„Supercritical fluid chromatography“

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

Greeson, J. M.; Sanford, B. und Monti, D. A.

„St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological and clinical literature“

„Psychopharmacol. **153**, 402-414 (2001)

Griffiths, D. W.; Robertson, G. W.; Shepherd, T.; Birch, A. N. E.; Gordon, S. C.  
und Woodford, J. A. T.

„A comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers“

Phytochemistry **55**, 111-116 (2000)

Gurevich, A. J.; Dorynin, V. N.; Kolosov, M. N.; Popravko, S. A.; Ryabova, I. D.;  
Chernov, B. K.; Derbentseva, B. E.; Aizenman, B. E. und Garagulya, A. D.

„Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L.“

Antibiotiki **16**, 510-513 (1971)

Hagenström, U.

„Das Vorkommen einer antibakteriellen Fraktion in den Kapseln einiger Hypericum-Arten“  
Arzneimittel-Forsch. **5**, 155 (1955)

Hannay, J. B. und Hogarth, J.

„On the solubility of solids in gases“  
Proc. Roy. Soc. (London) **29**, 324-326 (1879)

Hawthorne, S. B.

„Analytical-scale supercritical fluid extraction“  
Anal. Chem. **62**, 633A-642A (1990)

Hedges, A. R.

„Industrial applications of cyclodextrins“  
Chem. Rev. **98**, 2035-2044 (1998)

Hennessy, M.; Kelleher, D.; Spiers, J. P.; Barry, M.; Kavanagh, P.; Back, D. Mulchay F.  
und Feely, J.

„St John's Wort increases expression of P-glycoprotein: implications for drug interactions“  
Brit. J. Clin. Pharmacol. **53**, 75-82 (2002)

Hölzl, J. und Ostrowski, E.

„Johanniskraut (Hypericum perforatum L.) – HPLC-Analyse der wichtigsten Inhaltsstoffe und deren Variabilität in einer Population“  
Dtsch. Apoth. Ztg. **127**, 1227-1230 (1987)

Hölzl, J.; Sattler, S. und Schütt, H.

„Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva?“  
Pharm. Ztg. **139**, 3959-3977 (1994)

ICD-10

„International statistical classification of diseases and related health problems  
World Health Organization, **Band 1**, Genf (1992)

ICH Q2A

„Validation of analytical procedures“  
International Conference on Harmonisation, 1-5 (1994)

ICH Q2B

„Validation of analytical procedures: methodology“  
International Conference on Harmonisation, 1-8 (1996)

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

„Isolation of plant products by supercritical-fluid extraction“

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

Jensen, A. G.; Hansen, S. H. und Nielsen, E. Ø.

„Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity“

Life Sci. **68**, 1593-1605 (2001)

Jetter, R. und Riederer, M.

„Homologous long-chain  $\delta$ -lactones in leaf cuticular waxes of *Cerithe minor*“

Phytochemistry **50**, 1359-1364 (1999)

Jetter, R. und Riederer, M.

„Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds“

J. Chem. Ecol. **26**, 399-412 (2000)

Johne, A. und Roots, I.

„Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und –interaktionen – Woran sollte man denken bei der Gabe von Johanniskrautpräparaten?“

Pharm. Unserer Zeit **32**, 242-246 (2003)

Johne, A.; Brockmöller, J.; Bauer, S.; Maurer, A.; Langheinrich, M. und Roots I.

„Pharmacokinetic interaction of digoxin with herbal extract from St John's Wort (*Hypericum perforatum*)“

Clin. Pharmacol. Ther. **66**, 338-345 (1999)

Johne, A.; Mai, I.; Bauer, S.; Krüger, H.; Arold, G.; Störmer, E.; Gerloff, T. und Roots, I.

„Übersicht zu Interaktionsstudien mit Johanniskrautextrakten“

in Schulz, V.; Rietbrock, N.; Roots, I. und Loew, D.

„Phytopharmaka“, **Band 7**, 149-161, Steinkopff-Verlag Darmstadt (2001)

Johne, A.; Schmider, J.; Brockmöller, J.; Stadelmann, A. M.; Störmer, E.; Bauer, S.;

Scholler, G.; Langheinrich, M. und Roots, I.

„Decreased plasma levels of amitriptyline and its metabolites on comedication with an extract from St John's Wort (*Hypericum perforatum*)“

J. Clin. Psychopharmacol. **22**, 46-54 (2002)

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

„Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide“

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

- Kamihira, M.; Asai, T.; Yamagata, Y.; Taniguchi, M. und Kobayashi, T.  
„Formation of inclusion complexes between cyclodextrins and aromatic compounds under pressurized carbon dioxide“  
J. Ferment. Bioeng. **69**, 350-353 (1990)
- Kaul, R.  
„Johanniskraut – Botanik, Inhaltsstoffe, Qualitätskontrolle, Pharmakologie, Toxikologie und Klinik“  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 18-19 und 39 (2000)
- Kikuchi, T.; Kadota, S. Suehara, H. und Namba, T.  
„Occurrence of non-conventional side chain sterols in an orchidaceous plant, Nervilla purpurea Schlechter and structure of nervisterol“  
Chem. Pharm. Bull. **30**, 370-373 (1982)
- Klesper, E.; Corwin, A. H. und Turner, D. A.  
„High pressure gas chromatography above critical temperatures“  
J. Org. Chem. **27**, 700-701 (1968)
- Klusa, V.; Germane, S.; Nöldner, M. und Chatterjee, S. S.  
„Hypericum extract and hyperforin: memory enhancing properties in rodents“  
Pharmacopsychiat. **34, Supplement 1**, S61-S69 (2001)
- Komiyama, M. und Bender, M. L.  
„Importance of apolar binding in complex formation of cyclodextrins with adamantane carboxylate“  
J. Am. Chem. Soc. **100**, 2259-2260 (1978)
- Kommission E  
„Hyperici herba (Johanniskraut)“  
Bundesanzeiger **Nr. 228** vom **05. 12. 1984**
- Krishtal, O.; Lozovaya, N.; Fisunov, A.; Tsintsadze, T.; Pankratov, Y.; Kopanitsa, M. und Chatterjee, S. S.  
„Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of Hypericum perforatum“  
Pharmacopsychiat. **34, Supplement 1**, S74-S82 (2001)
- Laakmann, G.; Schüle, C.; Baghai, T. und Kieser, M.  
„St. John's Wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy“  
Pharmacopsychiat. **31, Supplement**, 54-59 (1998)

- Langosch, J. M.; Zhou, X.-Y.; Heinen, M.; Chatterjee, S. S.; Nöldner, M. und Walden, J.  
„Effects of *Hypericum perforatum* L on evoked potentials in Guinea pig hippocampal slices“  
*Pharmacopsychiat.* **34, Supplement 1**, S83-S88 (2001)
- Lapke, C.; Schilcher, H. und Riedel, E.  
„GABA in *Hypericum perforatum* L. and in other herbal drugs“  
Abstracts of Lectures and Poster Presentations of the 44<sup>th</sup> Annual Congress of the Society  
for Medicinal Plant research, Prag, Poster Abstract **P63 (1996)**
- Limbeck, A. und Puxbaum, H.  
„A GC-MS method for the determination of polar organic compounds in atmospheric sam-  
ples“  
*Int. J. Environ. An. Ch.* **73**, 329-343 (1999)
- Linde, K.; Ramirez, G.; Mulrow, C. D.; Pauls, A.; Weidenhammer, W. und Melchart, D.  
„St John's Wort for depression – an overview and meta-analysis of randomised clinical trials“  
*Brit. Med. J.* **313**, 253-258 (1996)
- Liong, K. K.; Wells, P. A. und Foster, N. R.  
„Diffusion in supercritical fluids“  
*J. Supercrit. Fluids* **4**, 91-108 (1991)
- Loftsson, T.  
„Pharmaceutical applications of  $\beta$ -cyclodextrin“  
*Pharm. Technol. Eur.* **11 (10)**, 20-32 (1999)
- Mai, I; Krüger, H.; Budde, K.; Johne, A.; Brockmüller, J.; Neumayer, H. H. und Roots, I.  
„Hazardous pharmacokinetic interactions of Saint John's Wort (*Hypericum perforatum*) with  
the immunosuppressant cyclosporin“  
*Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **38**, 500-502 (2000)
- Maisenbacher, P. und Kovar, K.-A.  
„Analysis and stability of *Hyperici oleum*“  
*Planta Med.* **58**, 351-354 (1992a)
- Maisenbacher P. und Kovar, K.-A.  
„Adhyperforin: a homologue of hyperforin from *Hypericum perforatum*“  
*Planta Med.* **58**, 291-292 (1992b)
- Martins, C. M. C.; Mesquita, S. M. M. und Vaz, W. L. C.  
„Cuticular waxes of the holm (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) and Cork  
(*Q. suber* L.) oaks“  
*Phytochem. Anal.* **10**, 1-5 (1999)

- Mira, B.; Blasco, M.; Subirats, S. und Berna A.  
„Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oils from orange peel“  
J. Supercrit. Fluids **9**, 238-243 (1995)
- Misane, I. und Ögren, S. O.  
„Effects of Hypericum perforatum (St. John's Wort) on passive avoidance in the rat: evaluation of potential neurochemical mechanisms underlying its antidepressant activity“  
Pharmacopsychiat. **34, Supplement 1**, S89-S97 (2001)
- Modey, W. K.; Mulholland, D. A. und Raynor, M. W.  
„Analytical supercritical fluid extraction of natural products“  
Phytochem. Anal. **7**, 1-15 (1996)
- Moore, L. B.; Goodwin, B.; Jones, S. A.; Wisely, G. B.; Serbjit-Singh, C. J.; Wilson, T. M. Collins, J. L. und Kliewer, S. A.  
„St John's Wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor“  
Proc. Natl. Acad.Sci. USA **97**, 7500-7502 (2000)
- Moriyoshi, T.; Kita, T. und Uosaki, Y.  
„Static relative permittivity of carbon dioxide and nitrous oxide up to 30 MPa“  
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **97**, 589-596 (1993)
- Müller, W. E. und Holoubek, G.  
„Pharmakologie von Johanniskrautextrakt – Plausibilität für eine therapeutische Anwendung als Antidepressivum?“  
Pharm. Unserer Zeit **32**, 220-226 (2003)
- Müller, W. E.; Rolli, M.; Schäfer, C. und Hafner, U.  
„Effects of Hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity“  
Pharmacopsychiat. **30, Supplement**, 102-107 (1997)
- Müller, W. E.; Singer, A.; Wonnemann, M.; Hafner, U.; Rolli, M. und Schäfer, C.  
„Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of Hypericum extract“  
Pharmacopsychiat. **31, Supplement**, 16-21 (1998)
- Müller, W. E.; Singer, A. und Wonnemann, M.  
„Johanniskraut – vom Nerventee zum modernen Antidepressivum“  
Dtsch. Apoth. Ztg. **139**, 1741-1750 (1999)

Nahrstedt, A. und Butterweck, V.

„Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L.“  
Pharmacopsychiat. **30, Supplement**, 129-134 (1997)

Ness, A. und Schmidt, P. C.

„Kamillenpräparate – Beispiel für die Stabilisierung von Phytopharmaka“  
Dtsch. Apoth. Ztg. **135**, 3598-3608 (1995)

Nielsen, H. und Arends, P.

„Structure of the Xanthonolignid Kielcorin“  
Phytochemistry **17**, 2040-2041 (1978)

Nöldner, M.

„Johanniskraut und Arzneimittelinteraktionen“  
Dtsch. Apoth. Ztg. **141**, 3627-3630 (2001)

Obach, R. S.

„Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St John's Wort, an herbal preparation used in treatment of depression“  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **294**, 88-95 (2000)

Orth, H. C. J.

„Isolierung, Stabilität und Stabilisierung von Hyperforin und Identifizierung seines Hauptbauproduktes aus *Hypericum perforatum* L.“  
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, 90-92, 130-132 und 147 (1999)

Orth, H. C. J.; Rentel, C. und Schmidt, P. C.

„Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L.“  
J. Pharm. Pharmacol. **51**, 193-200 (1999a)

Orth, H. C. J.; Hauer, H.; Erdelmeier, C. A. J. und Schmidt P. C.

„Orthofofin: the main degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* L.“  
Pharmazie **54**, 76-77 (1999b)

Orth, H. C. J. und Schmidt, P. C.

„Stability and stabilization of hyperforin“  
Pharm. Ind. **62**, 60-63 (2000)

Oszagván, M.; Simándi, B.; Sawinsky, J.; Kéry, Á.; Lemberovics, E. und Fekete, J.

„Supercritical fluid extraction of volatile compounds from lavender and thyme“  
Flavour Frag. J. **11**, 157-165 (1996)

- Perfumi, M.; Panocka, I.; Ciccocioppo, R.; Vitali, D.; Froidi, R. und Massi, M.  
„Effects of a methanolic extract and a hyperforin-enriched CO<sub>2</sub> extract of *Hypericum perforatum* on alcohol intake in rats“  
*Alcohol Alcoholism* **36**, 199-206 (2001)
- Perrut, M.; Jung, J.; Leboeuf, F. und Fabing, I.  
„Procede de fabrication de complexes hôtes-client“  
Patent WO 02/089851 (2002)
- Ph. Eur. 4  
„St John's Wort“  
in *European Pharmacopoeia* **4**, Supplement **4.5**  
Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe Straßburg, 3778 (2003)
- Rashotte, A. M.; Jenks, M. A. und Feldmann, K. A.  
„Cuticular waxes on eceriferum mutants of *Arabidopsis thaliana*“  
*Phytochemistry* **57**, 115-123 (2001)
- Reichling, J.; Weseler, A. und Saller, R.  
„A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L.“  
*Pharmacopsychiat.* **34**, Supplement 1, S116-S118 (2001)
- Reis-Vasco, E. M. C.; Coelho, J. A. P. und Palavra, A. M. F.  
„Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydrodistillation“  
*Flavour Frag. J.* **14**, 156-160 (1999)
- Reverchon, E.  
„Fractional separation of SCF extracts from majoram leaves: mass transfer and optimization“  
*J. Supercrit. Fluids* **5**, 256-261 (1992)
- Reverchon, E.  
„Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil“  
*AIChE J.* **42**, 1765-1771 (1996)
- 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. und Stassi, A.  
„Solubilities of solid octacosane and triacontane in supercritical carbon dioxide“  
*J. Chem. Eng. Data* **38**, 458-460 (1993)

- Reverchon, E.; Ambruosi, A. und Senatore, F.  
„Isolation of peppermint oil using supercritical CO<sub>2</sub> extraction“  
Flavour Frag. J. **9**, 19-23 (**1994a**)
- Reverchon, E.; Sesti Osséo, L. und Gorgolione, D.  
„Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of basil oil: characterization of products and process modeling“  
J. Supercrit. Fluids **7**, 185-190 (**1994b**)
- Reverchon, E.; Della Porta, G. und Senatore, F.  
„Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and fractionation of lavender essential oil and waxes“  
J. Agric. Food Chem. **43**, 1654-1658 (**1995a**)
- Reverchon, E.; Taddeo, R. und Della Porta, G.  
„Extraction of sage oil by supercritical CO<sub>2</sub>: influence of some process parameters“  
J. Supercrit. Fluids **8**, 302-309 (**1995b**)
- Rommelspacher, H.; Siemanowitz, B. und Mannel M.  
„Acute and chronic actions of dry methanolic extract of *Hypericum perforatum* and a hyperforin-rich extract on dopaminergic and serotonergic neurones in rat nucleus accumbens“  
Pharmacopsychiat. **34**, Supplement 1, S119-S126 (**2001**)
- Saenger, W.  
„Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie“  
Angew. Chem. **92**, 343-361 (**1980**)
- Schellenberg, R.; Sauer, S. und Dimpfel, W.  
„Pharmacodynamic effects of two different *Hypericum* extracts in healthy volunteers measured by quantitative EEG“  
Pharmacopsychiat. **31**, Supplement 1, 44-53 (**1998**)
- Schempp, C. M.; Lüdtkke, R.; Winghofer, B. und Simon, J. C.  
„Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract (St. John's Wort) on skin sensitivity to solar radiation“  
Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. **16**, 125-128 (**2000a**)
- Schempp, C. M.; Winghofer, B.; Lüdtkke, R.; Simon-Haarhaus, B.; Schöpf, E. und Simon, J. C.  
„Topical application of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits allostimulatory capacity of epidermal cells“  
Brit. J. Dermatol. **142**, 979-984 (**2000b**)

- Schempp, C. M.; Müller, K. A.; Winghofer, B.; Schöpf, E. und Simon, J. C.  
„Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) – eine Pflanze mit Relevanz für die Dermatologie“  
*Hautarzt* **53**, 316-321 (2002)
- Schüle, C.; Baghai, T.; Ferrera, A. und Laakmann, G.  
„Neuroendocrine effects of *Hypericum* extract WS 5570 in 12 healthy male volunteers“  
*Pharmacopsychiat.* **34, Supplement 1**, S127-S133 (2001)
- Schütt, H. und Schulz, V.  
„*Hypericum*“  
in „Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis“  
Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H. und Schneider G. (Hrsg.)  
Springer Berlin, **Band 4**, 474-495 (1993)
- Schulz, V.  
„Incidence and clinical relevance of interactions and side effects of *Hypericum* preparations“  
*Phytomedicine* **8**, 152-160 (2001)
- Schulz, V.  
„Clinical trials with *Hypericum* extracts in patients with depression – results, comparisons, conclusions for therapy with antidepressant drugs“  
*Phytomedicine* **9**, 468-474 (2002)
- Schulz, V.  
„Johanniskrautextrakte vs. Synthetika – Neue Therapiestudien und Metaanalysen“  
*Pharm. Unserer Zeit* **32**, 228-234 (2003)
- Simándi, B.; Deák, A.; Rónyai, E.; Yanxiang, G.; Veress, T.; Lemberovics, É; Then, M.;  
Sass-Kiss, Á. und Vámos-Falusi, Z.  
„Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of fennel oil“  
*J. Agric. Food Chem.* **47**, 1635-1640 (1999)
- Simmen, U.; Higelin, J.; Berger-Büter, K.; Schaffner, W. und Lundstrom, K.  
„Neurochemical studies with St. John's Wort in-vitro“  
*Pharmacopsychiat.* **34, Supplement 1**, S137-S142 (2001)
- Singer, A.; Wonnemann, M. und Müller, W. E.  
„Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>“  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 1363-1368 (1999)

- Sloley, B. D.; Urichuk, J. L.; Ling, L.; Gu, L.-D.; Coutts, R. T.; Pang, P. K. T. und Shan, J.  
„Chemical and Pharmacological evaluation of Hypericum perforatum extracts“  
Acta Pharmacol. Sin. **21**, 1145-1152 (2000)
- Sovova, H.; Kromers, R.; Kučera, J. und Jež, J.  
„Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil“  
Chem. Eng. Sci. **49**, 2499-2505 (1994)
- Stahl, E.; Quirin, K.-W. und Gerard, D.  
„Solubilities of soybean oil, jojoba oil and cuticular wax in dense carbon dioxide“  
Fette Seifen Anstrichm. **85**, 458-462 (1983)
- Stahl, E.; Quirin, K.-W. und Gerard, D.  
„Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination“  
Springer Berlin, 1-260 (1987)
- Stojanovic, G.; Palic, R.; Tarr, C. H.; Reddy, C. M. und Marinkovic, O.  
„n-Alkanes and fatty acids of Hypericum perforatum, Hypericum maculatum and Hypericum  
olympicum“  
Biochem. Syst. Ecol. **31**, 223-226 (2003)
- Suzuki, O.; Katsumata, Y.; Oya, M.; Bladt, S. und Wagner, H.  
„Inhibition der Monoamino-Oxidase durch Hypericin“  
Planta. Med. **3**, 272-274 (1984)
- Szejtli, J.  
„Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry“  
Chem. Rev. **98**, 1743-1753 (1998)
- Thiede, H.-M. und Walper, A.  
„MAO- und COMT-Hemmung durch Hypericum-Extrakte und Hypericin“  
Nervenheilkunde **12**, 346-348 (1993)
- Tyrer, D.  
„Solubilities below and above the critical temperature“  
J. Chem. Soc. **97**, 621-632 (1910)
- USP 26/NF 21  
„Validation of compendial methods“  
in United States Pharmacopeia **26**/National Formulary **21**  
United States Pharmacopeial Convention Rockville, 2439-2442 (2003a)

USP 26/NF 21

„St John's Wort“ und „Powdered St John's Wort Extract“

in United States Pharmacopeia **26**/National Formulary **21**

United States Pharmacopeial Convention Rockville, 2826-2829 (**2003b**)

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

„Application of supercritical carbon dioxide for the preparation of a piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin inclusion compound“

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

Vizthum, O. und Hubert, P.

„Verfahren zur Herstellung von Hopfenextrakten“

Ger. DE 2 127 618 (**1971**)

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

„Preparation and stability of a chamomile ointment containing a supercritical carbon dioxide chamomile extract/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex“

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

Whiskey, E.; Werneke, U. und Taylor, D.

„A systematic review and meta-analysis of Hypericum perforatum in depression: a comprehensive clinical review“

Int. Clin. Psychopharm. **16**, 239-252 (**2001**)

Wonnemann, M.; Singer, A.; Siebert, B. und Müller, W. E.

„Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St. John's Wort“

Pharmacopsychiat. **34**, Supplement 1, S148-S151 (**2001**)

Wurglics, M.; Westerhoff, K.; Kaunzinger, A.; Wilke, A.; Baumeister, A.; Dressman, J. und Schubert-Zsilavec, M.

„Comparison of german St John's Wort products according to hyperforin and total hypericin content“

J. Am. Pharm. Assoc. **41**, 560-566 (**2001**)

Zosel, K.

„Verfahren zur Entcoffeinierung von Kaffee“

Ger. Offen. DE 2 005 293 (**1970**)

Zosel, K.

„Praktische Anwendung der Stofftrennung mit überkritischen Gasen“

Angew. Chem. **90**, S748-755 (**1978**)

# KAPITEL 11

## ANHANG

### 11.1 Farbige Abbildungen

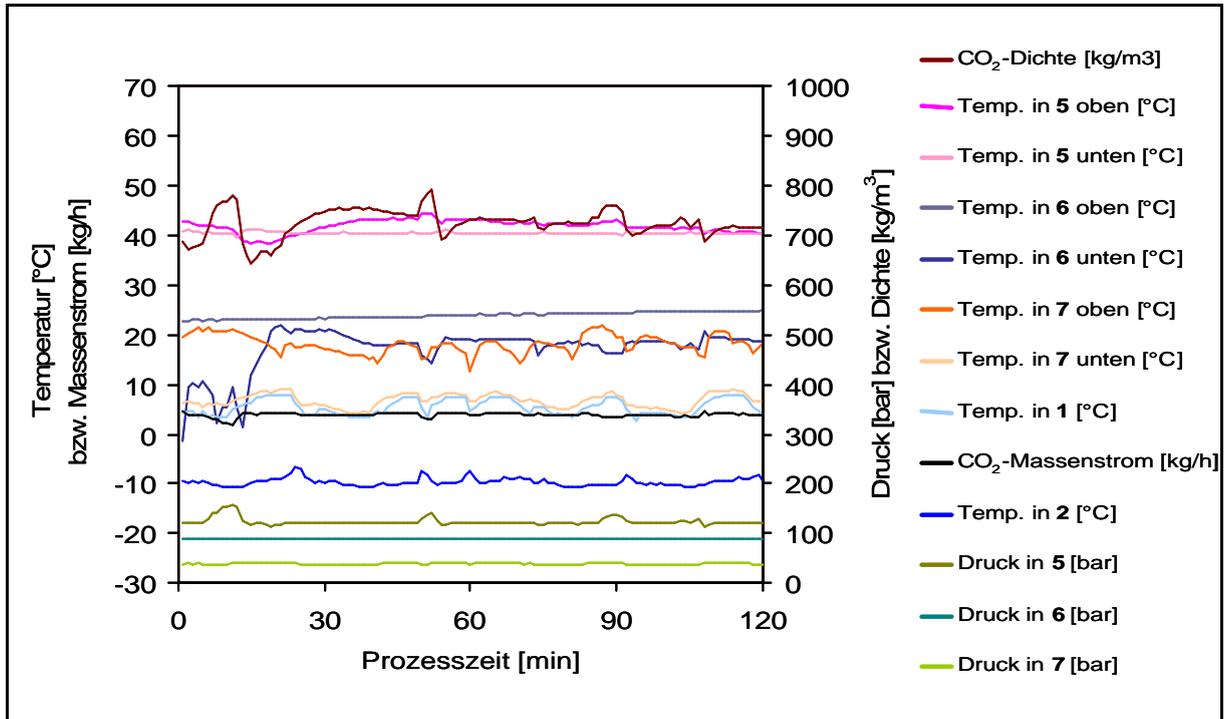


Abb. 3-9 Exemplarische Gesamtübersicht über einen Extraktionsprozess mit allen aufgezeichneten Messdaten (Legende entsprechend Abb. 3-1 auf Seite 22)



Abb. 6-2 Optischer Vergleich des hyperforin- und wachsreichen Anteils im Endabscheider

## 11.2 Messdaten zur Kalibrierung und Validierung der quantitativen Bestimmung von Hyperforin

Tab. 11-1 Messdaten der Kalibrierung von Hyperforin

	Konzentration Hyperforin [mg/100 ml]	Flächen- einheiten Hyperforin	Konzentration Hyperforin [mg/100 ml]	Flächen- einheiten Hyperforin
	12,228	54571	24,457	111741
	12,228	55907	24,457	111382
	12,228	55719	24,457	111483
	12,228	56108	24,457	111802
	12,228	56148	24,457	111570
	12,228	55679	24,457	110392
<b>Mittelwert</b>		<b>55689</b>		<b>111395</b>
<b>realsdv [%]</b>		<b>1,04</b>		<b>0,46</b>
<b>var (y)</b>		<b>3,37E+05</b>		<b>2,66E+05</b>
	36,685	164022	48,913	224821
	36,685	164913	48,913	226437
	36,685	165435	48,913	228603
	36,685	163266	48,913	230662
	36,685	162634	48,913	229028
	36,685	163825	48,913	230308
<b>Mittelwert</b>		<b>164016</b>		<b>228310</b>
<b>realsdv [%]</b>		<b>0,63</b>		<b>1,00</b>
<b>var (y)</b>		<b>1,07E+06</b>		<b>5,16E+06</b>
	61,141	286044	73,370	336627
	61,141	283045	73,370	333609
	61,141	285494	73,370	337469
	61,141	284484	73,370	335395
	61,141	284321	73,370	335365
	61,141	282653	73,370	335671
<b>Mittelwert</b>		<b>284340</b>		<b>335689</b>
<b>realsdv [%]</b>		<b>0,47</b>		<b>0,39</b>
<b>var (y)</b>		<b>1,76E+06</b>		<b>1,71E+06</b>

Tab. 11-2 Messdaten zur Systempräzision und Wiederfindung für Hyperforin

Konz. [mg/100 ml]	33,387	30,048	36,147	38,906
Soll-Gehalt [%]	100,00	90,00	108,27	116,53
<hr/>				
berechnete Konz.	33,371	30,385	35,452	39,357
Hyperforin	32,629	30,611	37,015	38,336
[mg/100 ml]	33,435	30,617	36,295	39,161
	33,293	31,486	36,169	40,385
	33,645	30,413	36,921	38,502
	33,951	30,225	36,331	39,911
<b>Mittelwert (Ist-Gehalt)</b>	<b>33,387</b>	<b>30,623</b>	<b>36,364</b>	<b>39,275</b>
<b>realsdv [%]</b>	<b>1,32</b>	<b>1,46</b>	<b>1,56</b>	<b>2,02</b>
<hr/>				
Ist-Gehalt [%]		91,72	108,92	117,64
<b>Wiederfindungsrate [%]</b>		<b>101,91</b>	<b>100,60</b>	<b>100,95</b>

Tab. 11-3 Messdaten der Methodenpräzision für Hyperforin bei sechsmaliger Herstellung eines Lösungsmittlextraktes

Konzentration	jeweils ca. 50 mg/100 ml		
	1	2	3
Konz. [mg/100 ml]	49,322	53,319	46,850
Hyperforin	49,673	52,435	46,683
	49,714	52,519	46,239
<b>Mittelwert (Ist-Gehalt)</b>	<b>49,570</b>	<b>52,758</b>	<b>46,591</b>
<b>realsdv [%]</b>	<b>0,43</b>	<b>0,92</b>	<b>0,68</b>
	4	5	6
Konz. [mg/100 ml]	49,100	52,321	51,918
Hyperforin	49,151	52,117	51,982
	49,218	52,372	52,016
<b>Mittelwert (Ist-Gehalt)</b>	<b>49,156</b>	<b>52,270</b>	<b>51,972</b>
<b>realsdv [%]</b>	<b>0,12</b>	<b>0,26</b>	<b>0,10</b>
<hr/>			
<b>Mittelwert (n = 18)</b>	<b>50,386</b>		
<b>realsdv [%]</b>	<b>4,72</b>		

Tab. 11-4 Messdaten zur Methodenpräzision für Hyperforin bei sechsmaliger Herstellung eines CO<sub>2</sub>-Extraktes

Konzentration	jeweils ca. 35 mg/100 ml		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Konz. [mg/100 ml]	34,286	34,267	33,183
Hyperforin	34,813	34,518	34,155
	35,520	35,978	33,603
<b>Mittelwert (Ist-Gehalt)</b>	<b>34,873</b>	<b>34,921</b>	<b>33,647</b>
<b>realsdv [%]</b>	<b>1,78</b>	<b>2,65</b>	<b>1,45</b>
	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Konz. [mg/100 ml]	35,749	33,062	36,060
Hyperforin	34,935	34,914	34,422
	35,894	33,265	35,382
<b>Mittelwert (Ist-Gehalt)</b>	<b>35,526</b>	<b>33,747</b>	<b>35,288</b>
<b>realsdv [%]</b>	<b>1,46</b>	<b>3,01</b>	<b>2,33</b>
<b>Mittelwert (n = 18)</b>	<b>34,667</b>		
<b>realsdv [%]</b>	<b>2,28</b>		

### 11.3 Firmenverzeichnis

Advantech Europe GmbH, Kolberger Straße 7, D-40599 Düsseldorf  
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  
Bourdon-Haenni GmbH, Hofener Straße 122, D-70372 Stuttgart  
Büchi Labortechnik GmbH, Am Porscheplatz 5, D-45127 Essen  
Cerestar Deutschland GmbH, Cerestarstraße 2, D-47809 Krefeld  
Corel Co., Edison Straße 6, D-85716 Unterschleißheim  
Danfoss GmbH, Carl-Legien-Straße 8, 63073 Offenbach  
Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., Willmar-Schwabe-Straße 4, D-76227 Karlsruhe  
Eurotherm Deutschland GmbH, Ottostraße 1, D-65694 Limburg a. d. L.  
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  
Hewlett-Packard GmbH, Herrenberger Straße 140, D-71034 Böblingen  
Infors GmbH, Tannenweg 2, D-85254 Einsbach  
Julabo Labortechnik GmbH, Eisenbahnstraße 45, D-77960 Seelbach  
Kämmer Ventile GmbH, Manderscheidtstraße 19, D-45141 Essen  
Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Beuckestraße 22, D-14163 Berlin  
Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Pfarrstraße 41/43, D-97922 Lauda-Königshofen  
Lewa Herbert Ott GmbH & Co., Ulmer Straße 10, D-71229 Leonberg  
Leybold Vakuum GmbH, Bonner Straße 498, D-50968 Köln  
Lichtwer Pharma AG, Wallenroder Straße 8-10, D-13435 Berlin  
Liebherr Hausgeräte GmbH, Memminger Straße 77-79, D-88416 Ochsenhausen  
Macherey-Nagel GmbH, Valenciener Straße 11, D-52355 Düren  
MDL Informations Systems GmbH, Theodor-Heuss-Allee 108, D-60486 Frankfurt  
Memmert GmbH & Co. KG, Äußere Rittersbacher Straße 38, D-91126 Schwabach  
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  
PerkinElmer Instruments GmbH, Ferdinand-Porsche-Ring 17, D-63110 Rodgau-Jügesheim  
Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Werner-von-Siemens-Straße 1, D-77656 Offenburg  
Retsch GmbH & Co. KG, Rheinische Straße 36, D-42781 Haan

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

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, Safayhi, Schmidt, Schultz, Wahl, Wankmüller



# LEBENS LAUF

8. November 1974	geboren in Sulz am Neckar als erstes von drei Kindern von Anneliese Römpp (geb. Hege) und Alfons Römpp
1981-1983	Grundschule Marschalkenzimmern
1983-1985	Grundschule Weiden
1985-1991	Realschule Dornhan
1991-1994	Gymnasium am Rosenberg, Oberndorf am Neckar
1994	Abschluss mit der „Allgemeinen Hochschulreife“
Oktober 1994-Oktober 1998	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
September 1996	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1998	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1998-April 1999	Praktikum in der Schwaben-Apotheke, Stuttgart
Mai 1999-Oktober 1999	Praktikum bei der Bayer AG, Leverkusen
November 1999	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1999	Approbation zum Apotheker
seit Januar 2000	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen. Beginn der Dissertation „Anreicherung und In-line-Einschluss von Hyperforin aus <i>Hypericum perforatum</i> L. mittels überkritischer CO <sub>2</sub> Extraktion“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt
März 2003	Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie