

**SCHLEPPMITTELEINSATZ IN DER KOHLENDIOXIDEXTRAKTION
HYDROPHILER PFLANZENINHALTSSTOFFE
UND VORHERSAGE DER EXTRAHIERBARKEIT**

DISSERTATION

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

2005

vorgelegt von

MARTINA GÜNTHER

Tag der Prüfung der mündlichen Prüfung

18. März 2005

Dekan

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter

Prof. Dr. P. C. Schmidt

2. Berichterstatter

Prof. Dr. S. Laufer

Die vorliegende Arbeit entstand unter 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. Seine Betreuung und ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie die Schaffung optimaler Arbeitsbedingungen waren mir stets eine große Hilfe. Insbesondere sein Einsatz für die Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie, die Möglichkeit an Kongressen und Tagungen teilzunehmen, sowie die Organisation von Exkursionen haben dazu beigetragen meinen technologischen Horizont zu erweitern und mein Interesse für das Gebiet der Pharmazeutischen Technologie zu fördern. 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. Ich möchte ihm und seiner Mitarbeiterin Frau Katharina Bauer großen Dank für die Durchführung der in-vitro Untersuchungen meiner Extrakte aussprechen.

Den Herren Dr. Karl G. Wagner und Martin Maus, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls Universität Tübingen, gilt mein Dank für die Ermöglichung des Molecular Modellings sowie deren Diskussionsbereitschaft.

Der Firma Schwabe GmbH & Co., Karlsruhe, danke ich für die Bereitstellung des Drogenmaterials, ebenso der Firma Lichtwer Pharma AG, Berlin, und der Firma Fujisawa Deutschland GmbH, München, für die Überlassung von kommerziellen Extrakten.

Für die Ermöglichung der Kompaktierungsversuche sowie der stets freundlichen Hilfsbereitschaft danke ich Herrn Dr. Martin Bultmann, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, ganz herzlich.

Frau Dr. Sonja Sturm, Lehrstuhl für Pharmakognosie der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Österreich, gebührt mein besonderer Dank für die Durchführung der LC-MS Analysen.

Herrn Joachim Mannhardt der Firma J&M GmbH danke ich herzlich für die rasche und großzügige Bereitstellung des TLC-Scanners. Bei seinen Mitarbeitern und Herrn Prof. Dr. Bernd Spangenberg möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen sehr bedanken.

Ebenso danke ich Frau Dr. D. Vinga Szabó und ihrer Mitarbeiterin Frau Dr. Sabine Schlabach für die rasche Dichtebestimmung der Referenzsubstanzen.

Herrn Geiger und seinem Werkstatt-Team danke ich für die stets sehr schnelle Hilfe bei kleineren Reparaturen, sowie Frau Söllinger und Herrn Walker in der Chemikalienausgabe für ihre ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Art.

Bei Frau Renate Beer, Frau Martina Brenn und Herrn Klaus Wehying bedanke ich mich für jegliche Unterstützung während meiner Zeit am Lehrstuhl. Im Besonderen möchte ich meinen Dank Herrn Roland Walker aussprechen, der mir mit seiner Hilfsbereitschaft und seinem Ideenreichtum bei der CO₂-Extraktion tatkräftig zur Seite stand.

Meinen ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen.

Frau Stefanie Christian gebührt mein herzlichster Dank für ihre fachliche und menschliche Unterstützung. Mit ihr Freude und Sorgen teilen zu dürfen hat zum Gelingen dieser Arbeit genauso beigetragen wie die zahlreichen Diskussionen und das rasche und sorgfältige Korrekturlesen des Manuskriptes und anderer wissenschaftlicher Beiträge.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Michael Heitmüller, der durch sein reges Interesse und seiner Freundschaft den Fortgang meiner Arbeit zu jedem Zeitpunkt sehr unterstützt hat.

Meiner Familie gilt allergrößter Dank nicht nur für die liebevolle Unterstützung sondern vor Allem für den starken privaten Rückhalt, der zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Jeder Tag bringt Freude und Leid.

Auch aus Steinen, die in den Weg gelegt werden,
kann man Schönes bauen.

(Goethe)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
2.	Extraktion mit überkritischen Gasen	3
2.1	Überkritische Gase	3
2.1.1	Der überkritische Zustand	3
2.1.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften überkritischer Gase	4
2.1.3	Überkritisches Kohlendioxid	7
2.2	Extraktionen mit Schlepptmittel modifiziertem Kohlendioxid	7
2.2.1	Phasendiagramme	9
2.2.2	Der unterkritische Zustand	11
2.3	Thermodynamik des Extraktionsprozesses	13
3.	Drogen	17
3.1	Harpagophytum procumbens	17
3.1.1	Allgemeines, Verbreitung, Botanik	17
3.1.2	Inhaltsstoffe	17
3.1.3	Pharmakologie und Anwendung	20
3.2	Aesculus hippocastanum	21
3.2.1	Allgemeines, Verbreitung, Botanik	21
3.2.2	Inhaltsstoffe	21
3.2.3	Pharmakologie und Anwendung	24
4.	Analytik der Drogeninhaltsstoffe	26
4.1	Analytik der Inhaltsstoffe von Harpagophytum procumbens	26
4.1.1	Qualitative Dünnschichtchromatographie von Harpagosid	26
4.1.2	Qualitative Dünnschichtchromatographie der Zucker	27
4.1.3	Identifizierung der Inhaltsstoffe mittels LC-MS	28
4.1.4	Quantitative Bestimmung von Harpagosid mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie	28
4.1.5	Quantitative Bestimmung von Harpagosid mittels Dünnschichtchromatographie	32
4.1.6	Vergleich der quantitativen Bestimmungsmethoden	34

4.1.7	Zusammenfassung	35
4.2	Analytik der Inhaltsstoffe von <i>Aesculus hippocastanum</i>	36
4.2.1	Qualitative Dünnschichtchromatographie von Aescin	37
4.2.2	Quantitative Dünnschichtchromatographie von Aescin	38
5.	Optimierung der Extraktionsbedingungen	41
5.1	Extraktionen der sekundären Wurzeln von <i>Harpagophytum procumbens</i>	41
5.1.1	Untersuchung des Einflusses verschiedener Extraktionsbedingungen	42
5.1.1.1	Vorextraktion	42
5.1.1.2	Hauptextraktion	45
5.1.2	Einfluss des Zerkleinerungsgrades der Droge	53
5.1.3	Massenbilanz der Extraktionen	54
5.1.4	Zusammenfassung	55
5.2	Extraktion der Samen von <i>Aesculus hippocastanum</i>	57
5.2.1	Untersuchung des Einflusses verschiedener Extraktionsbedingungen	57
5.2.1.1	Vorextraktion	58
5.2.1.2	Hauptextraktion	59
5.2.2	Massenbilanz der Extraktionen	64
5.2.3	Zusammenfassung	65
5.3	Vergleich der Extraktionsbedingungen der Drogen	66
6.	In-vitro Untersuchungen von <i>Harpagophytum procumbens</i> Extrakten	67
6.1	Arachidonsäurekaskade	69
6.2	Cyclooxygenase-2 Hemmung durch <i>Harpagophytum</i> -Extrakte	71
6.3	5-Lipoxygenase Hemmung durch <i>Harpagophytum</i> -Extrakte	72
6.4	Zusammenfassung	74
7.	Simulation der Extraktionen mittels Molecular Modelling	75
7.1	Löslichkeitsparameter	77
7.1.1	Theoretische Grundlagen	77
7.1.2	Berechnung von Löslichkeitsparametern mittels Molecular Modelling	78
7.1.3	Vergleich der Polarität der Pflanzeninhaltsstoffe	80
7.1.4	Vergleich der Polarität der Extraktionsmedien	81

7.2	Vorhersage der Extrahierbarkeit pflanzlicher Inhaltsstoffe und Korrelation mit experimentellen Daten	83
7.3	Zusammenfassung	87
8.	Experimenteller Teil	88
8.1	Materialien	88
8.1.1	Drogen	88
8.1.2	Handelsextrakte	88
8.1.3	Standardsubstanzen	88
8.1.4	Lösungsmittel und Chemikalien	89
8.1.5	sonstige Verbrauchsmaterialien	90
8.2	Allgemein verwendete Geräte	91
8.3	Datenverarbeitung	92
8.4	Analytische Verfahren	92
8.4.1	Qualitative Dünnschichtchromatographie	92
8.4.1.1	Nachweis der Zucker aus Harpagophytum procumbens	92
8.4.1.2	Nachweis von Harpagosid	93
8.4.1.3	Nachweis von Aescin	93
8.4.2	LC-MS Identifizierung der Harpagophytum-Extrakte	94
8.4.3	Quantitative Bestimmung der Extraktivstoffe	95
8.4.3.1	Quantitative Bestimmung von Harpagosid mittels HPLC	95
8.4.3.2	Quantitative Bestimmung von Harpagosid und Aescin mittels HPTLC	97
8.4.4	Wasserbestimmung nach Karl-Fischer	100
8.4.5	Partikelgrößenbestimmung der Drogen	101
8.4.5.1	Siebanalyse	101
8.4.5.2	Laserbeugungsspektroskopie	101
8.5	Technologische Verfahren	102
8.5.1	Zerkleinerung der Droge	102
8.5.2	Granulation der Droge	102
8.5.2.1	Feuchtgranulierung	102
8.5.2.2	Walzenkompaktierung	102

8.5.3	Beschreibung der Hochdruckextraktionsanlage	103
8.5.4	Optimierung der Extraktionsbedingungen	105
8.5.4.1	Vorextraktion	106
8.5.4.2	Hauptextraktion	107
8.5.5	Trocknung der CO ₂ -Extrakte	107
8.6	In-vitro Untersuchungen der Teufelskrallenextrakte	107
8.6.1	Cyclooxygenase-2 (COX-2) Hemmung	108
8.6.2	5-Lipoxygenase (5-LO) Hemmung	110
8.7	Molecular Modelling	112
8.7.1	Dichtebestimmung	112
8.7.2	Simulationsverfahren	112
8.7.2.1	Simulation der Pflanzeninhaltsstoffe	113
8.7.2.2	Simulation der überkritischen Extraktionsmedien	114
8.7.2.3	Simulation der unterkritischen Extraktionsmedien	114
9.	Zusammenfassung	115
10.	Literaturverzeichnis	120
11.	Anhang	133
11.1	Messdaten der LC-MS Analyse eines CO ₂ -Teufelskrallenextraktes	133
11.2	Messdaten der Kalibrierung und Validierung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Harpagosid	136
11.3	Messdaten der Kalibrierung und Validierung der HPTLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Harpagosid	138
11.4	Messdaten der Kalibrierung und Validierung der HPTLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Aescin	140
11.5	Firmenverzeichnis	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Art.-Nr.	Artikelnummer
bzw.	beziehungsweise
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
EOS	Zustandsgleichung
et al.	et alii
Fa.	Firma
Gl.	Gleichung
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
Kap.	Kapitel
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leukotrien B ₄
5-LO	5-Lipoxygenase
m/m	Massenanteile
M _r	Molekulargewicht
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PMN	polymorphnucleare neutrophile Granulozyten
PP	Polypropylen
R _f	Retentionsfaktor
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
Tab.	Tabelle
USP	United States Pharmacopeia
V/V	Volumenanteile

Besondere Hinweise:

Die Fehlerbalken in den Abbildungen geben den 95 %-Vertrauensbereich des Mittelwertes an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht beziehungsweise vorgestellt:

Publikationen

M. Günther, S. Laufer und P. C. Schmidt

”High anti-inflammatory activity of harpagoside enriched extracts obtained from solvent modified super- and subcritical carbon dioxide extraction of the roots of *Harpagophytum procumbens*”

Phytochem. Anal., zur Publikation angenommen

M. Günther und P. C. Schmidt

”Comparison between HPLC and HPTLC-densitometry for the determination of harpagoside from *Harpagophytum procumbens* CO₂-extracts”

J. Pharm. Biomed. Anal., zur Publikation angenommen

M. Günther, M. Maus, K. G. Wagner und P. C. Schmidt

“Hydrophilic solutes in modified carbon dioxide extraction -Prediction of the extractability using molecular dynamic simulation”

Eur. J. Pharm. Sci., zur Publikation angenommen

Kongressbeiträge

M. Günther und P. C. Schmidt

”Überkritischer Extrakt der Teufelskralle unter Berücksichtigung des ternären Systems Kohlendioxid/Alkohol/Wasser”

Poster, DPhG Jahrestagung Berlin 2002, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 335, Suppl. 1, S. 112 (2002)

M. Günther, S. Laufer und P. C. Schmidt

”Enrichment of harpagoside from devil’s claw (*Harpagophytum procumbens* DC) by using modified carbon dioxide”

Vortrag, APV Jahrestagung, Nürnberg, 2004

Proc. 5th World Meeting ADRITELF/APS/APV/€APB/GSIA SSPI/PTF/SPH/VDI, S. 381-382 (2004)

M. Günther und P. C. Schmidt

”Selektive Anreicherung hydrophiler Drogenbestandteile mittels Kohlendioxidextraktion”

Vortrag, DPhG Doktorandentagung Freudenstadt 2004

M. Günther und P. C. Schmidt

”Quantitative determination of harpagoside in *Harpagophytum procumbens* extracts by HPTLC-densitometry and HPLC”

Poster, TLC Symposium, Budapest, Ungarn 2004

P. C. Schmidt und M. Günther

”Selective enrichment of hydrophilic constituents of crude drugs by using modified carbon dioxide”

Poster, Jahrestagung der Polnischen Pharmazeutischen Gesellschaft, Breslau, Polen 2004

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Phytopharmaka stellen eine wichtige Gruppe von Arzneimitteln dar. Sie spielen vor allem in der Selbstmedikation eine große Rolle, da sie im Allgemeinen, im Vergleich zu synthetischen Arzneimitteln, weniger Nebenwirkungen aufweisen. Als Beispiel sei die Behandlung leichter bis mittelschwerer Fälle von Arthritis genannt, die vorzugsweise mit Teufelskrallenpräparaten behandelt werden. Die Alternative stellen nicht steroidale Antirheumatika (NSAR) dar, die jedoch aufgrund der häufig auftretenden gastrointestinalen Nebenwirkungen nur in akuten Fällen eingesetzt werden sollten. Den Extrakten der Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens* DC.) ist bis dato noch keine derartige Begleitwirkung nachgewiesen worden. Des Weiteren werden Phytopharmaka zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt, bei denen synthetische Wirkstoffe im Vergleich zu pflanzlichen Extrakten keine bessere Wirkung erzielen. Die Therapie mit Extrakten der Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum* L.) bei chronischer Veneninsuffizienz zeigt den gleichen oder einen besseren Behandlungserfolg wie synthetische Alternativen.

Selten sind aus pflanzlichen Zubereitungen Inhaltsstoffe bekannt, die als Reinsubstanz die gleiche Wirksamkeit aufweisen wie der Gesamtextrakt. Aus diesem Grunde hängt die Qualität eines Extraktes von dessen chemischer Gesamtzusammensetzung ab. Diese ist vom verwendeten Drogenmaterial und vor allem vom Herstellungsverfahren abhängig. Herkömmliche Extraktionsmethoden stellen die Mazeration oder Perkolation mit wässrig-alkoholischen Extraktionsmitteln dar. Reinigungs- und Aufbereitungsschritte können zu einer Anreicherung pharmakologisch wichtiger Substanzen führen. Eine Alternative zu diesen Verfahren ist seit einigen Jahren die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (CO₂). Derzeit befinden sich zwei CO₂-Extrakte, Petadolex[®] (Pestwurz) und Serenoa ratiopharm[®] (Sägepalme) auf dem deutschen Markt. Obwohl sich die Extraktion mittels CO₂ etabliert hat, können sich diese Extrakte aufgrund der Zulassungsanforderungen nur schwer durchsetzen. Pflanzenextrakte, die, im Vergleich zu kommerziellen Extrakten, durch ein anderes Extraktionsverfahren hergestellt werden, gelten als neuer Wirkstoff, für den sämtliche Nachweise zur Pharmakologie und Toxikologie erbracht werden müssen.

Überkritisches Kohlendioxid ist ein lipophiles Extraktionsmittel und besitzt somit eine hohe Selektivität für unpolare Inhaltsstoffe. Aufgrund der niedrigen kritischen Temperatur von 31 °C können thermolabile Inhaltsstoffe unter schonenden Bedingungen extrahiert werden. Weiterhin bietet die CO₂-Atmosphäre während der Extraktion optimale Bedingungen für oxidationsempfindliche Substanzen. Da die meisten pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe

hydrophil sind, soll die CO₂-Extraktion auf hydrophile Naturstoffe ausgeweitet werden. Dazu müssen dem CO₂ Schleppmittel zugesetzt werden, die die Polarität des Extraktionsmittels erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Möglichkeiten der Extraktion und Anreicherung polarer Inhaltsstoffe mittels CO₂-Extraktion unter Schleppmittelzusatz am Beispiel der Teufelskralle und der Rosskastanie untersucht werden. Diese Arzneipflanzen enthalten unterschiedliche polare Inhaltsstoffe, die zur optimalen Extrahierbarkeit verschieden polare Extraktionsmittel erfordern. Dabei wird eine Optimierung des Gehaltes einer hydrophilen wirksamkeitsbestimmenden Substanz, der Extraktausbeute und der Zusammensetzung der Extrakte vorgenommen. Der wichtigste Einflussparameter, die Schleppmittelart, wird an n-Butanol, n-Propanol, Ethanol und Methanol in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen unter Berücksichtigung der Extraktionsparameter Temperatur und Druck betrachtet. Des Weiteren wird der Polaritätsunterschied bei Extraktionen im über- und unterkritischen Bereich untersucht.

Unterschiedlich hydrophile Inhaltsstoffe und Extraktionsmittel sollen hinsichtlich ihrer Polarität charakterisiert werden, um die Extrahierbarkeit polarer Substanzen in CO₂/Schleppmittelgemischen vorhersagen zu können. Mittels Computersimulationen soll ein Maß für die Polarität berechnet werden, das die Vorhersage der Polarität des benötigten Schleppmittels ermöglicht. Die berechneten Daten werden mit den experimentell bestimmten Resultaten verglichen und korreliert.

Am Beispiel von *Harpagophytum procumbens* DC. soll ein Vergleich optimierter CO₂-Extrakte mit einem Handelsextrakt sowohl im Hinblick auf den Gehalt der Leitsubstanz Harpagosid, als auch auf die Extraktzusammensetzung erfolgen. Weiterhin werden die unterschiedlich hergestellten Extrakte mittels eines in-vitro Testes auf ihre entzündungshemmenden Eigenschaften untersucht.

2. EXTRAKTION MIT ÜBERKRITISCHEN GASEN

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts wird von de la Tour (1822) erstmals das Verschwinden der Phasengrenze zwischen dem gasförmigen und flüssigen Zustand beschrieben. Das Auftreten einer überkritischen Phase kann nach Überschreiten einer bestimmten Temperatur für Ethanol, Diethyl- und Petrolether beobachtet werden. Der „kritische Punkt“ wird 1869 von Andrews definiert, nachdem er feststellt, dass sich Gase oberhalb einer bestimmten Temperatur nicht mehr durch eine Druckerhöhung verflüssigen lassen. Oberhalb des kritischen Punktes zeigen die Gase eine erhöhte Lösungskapazität für Feststoffe (Hannay und Hogarth, 1879). Bereits 1910 wird die Dichte als entscheidende Größe für die erhöhte Lösungskapazität verantwortlich gemacht (Tyrer, 1910).

Die Anwendung dieser Beobachtungen wird zur Fraktionierung natürlicher und synthetischer Öle genutzt und weitet sich schließlich auf den Bereich der Naturstoffextraktion aus (Zosel, 1978). Die folgenden Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der Extraktion und Fraktionierung unterschiedlicher Naturstoffe, wie beispielsweise ätherische Öle, Alkaloide oder Steroide. Die ersten großtechnischen industriellen Extraktionen werden zur Entcoffeinierung von Rohkaffee (Zosel, 1970) und zur Gewinnung von Hopfenextrakt (Vitzthum und Hubert, 1971) eingesetzt. Eine umfassende Übersicht über Fraktionierungen und Extraktionen geben Stahl et al. (1987). Überkritische, im analytischen Maßstab durchgeführte Extraktionen sind von Modey et al. (1996) zusammengestellt. Kaiser et al. (2001) geben eine Literaturübersicht pharmazeutisch relevanter Verfahren mit Hilfe überkritischer Gase. Dabei wird bevorzugt die Extraktion pharmakologisch interessanter Substanzen aus pflanzlichen Matrices sowohl im analytischen als auch präparativen Maßstab betrachtet.

2.1 *Überkritische Gase*

2.1.1 **Der überkritische Zustand**

Der kritische Punkt einer Substanz ist durch eine kritische Temperatur T_c und einen kritischen Druck p_c definiert. Dieser befindet sich in einem Druck-Temperatur-Diagramm am Ende der Dampfdruckkurve (Abb. 2-1). Der überkritische Bereich ist erreicht, wenn die Temperatur und der Druck oberhalb des jeweiligen kritischen Wertes liegen. Dieser Zustand kann durch Verdichtung eines Gases bei überkritischer Temperatur oder durch Erwärmung einer Flüssigkeit bei überkritischem Druck erreicht werden. Der Übergang in den überkritischen Zustand

ist ein kontinuierlicher Prozess bei dem keine definierte Phasengrenze überschritten wird. Demzufolge findet keine sprunghafte, sondern eine kontinuierliche Änderung der physikalischen Eigenschaften statt.

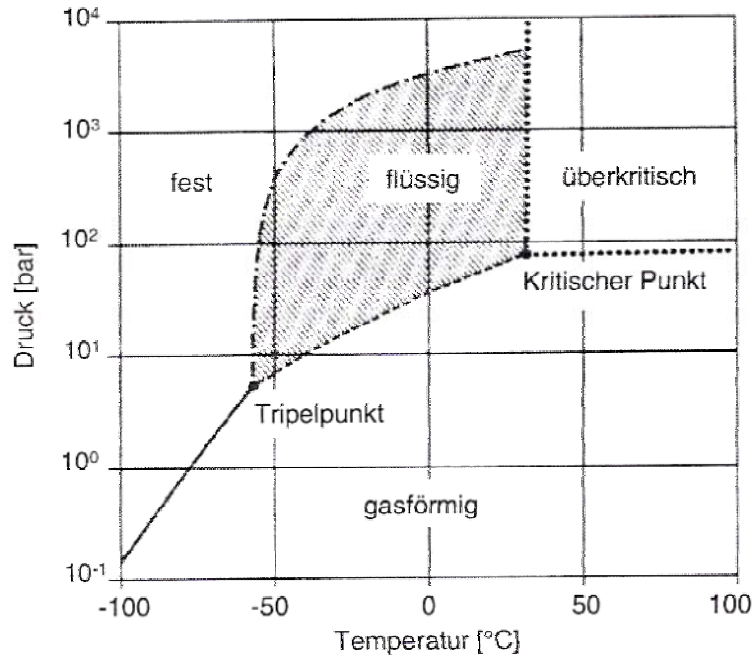


Abb. 2-1 Definition des überkritischen Zustand am Beispiel von CO_2 (Buse, 1992).

2.1.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften überkritischer Gase

Physikalisch-chemische Eigenschaften, wie Dichte, Viskosität und Diffusionskoeffizient können Lösungseigenschaften von Substanzen beeinflussen. Tab. 2-1 gibt einen Vergleich dieser Eigenschaften für Flüssigkeiten, Gase und überkritische Gase wieder.

Tab. 2-1 Vergleich physikalisch-chemischer Eigenschaften von Gasen, Flüssigkeiten und überkritischen Gasen (Gouw und Jentoft, 1972)

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

Verdichtete Gase haben sowohl Eigenschaften einer Flüssigkeit als auch eines Gases. Die Dichte eines überkritischen Gases ist einer Flüssigkeit sehr ähnlich. Im Gegensatz dazu hat die Verdichtung eines Gases keinen Einfluss auf die Viskosität, während sich der Diffusionskoeffizient den Werten einer Flüssigkeit annähert.

Die flüssigkeitsähnliche Dichte der überkritischen Gase ist für die Lösungskapazität schwerflüchtiger Substanzen bei niedrigen Temperaturen verantwortlich. Die Dichte ist von Druck und Temperatur abhängig. Den Einfluss des Druckes auf die Dichte zeigt Abb. 2-2 am Beispiel von CO₂. In Druckbereichen, größer 200 bar, verändert sich die Dichte nur geringfügig in Abhängigkeit vom Druck. Mit zunehmender Temperatur sinkt die Dichte. Demzufolge führt steigender Druck und fallende Temperatur zu hohen Dichten und daraus resultierend eine erhöhte Löslichkeit. Unter isothermen Bedingungen kann die Löslichkeit durch eine Drucksteigerung erhöht werden, unter isobaren Bedingungen bewirkt ein Temperaturabfall den gleichen Effekt. Die Löslichkeit kann unter isochoren (konstanter Dichte) Bedingungen mit zunehmender Temperatur, die eine Erhöhung des Dampfdruckes und somit eine erhöhte Flüchtigkeit der zu lösenden Substanz bewirkt, gesteigert werden. Demzufolge lassen sich durch die Wahl der Extraktionsparameter Druck und Temperatur unterschiedliche Lösungskapazitäten für CO₂ einstellen.

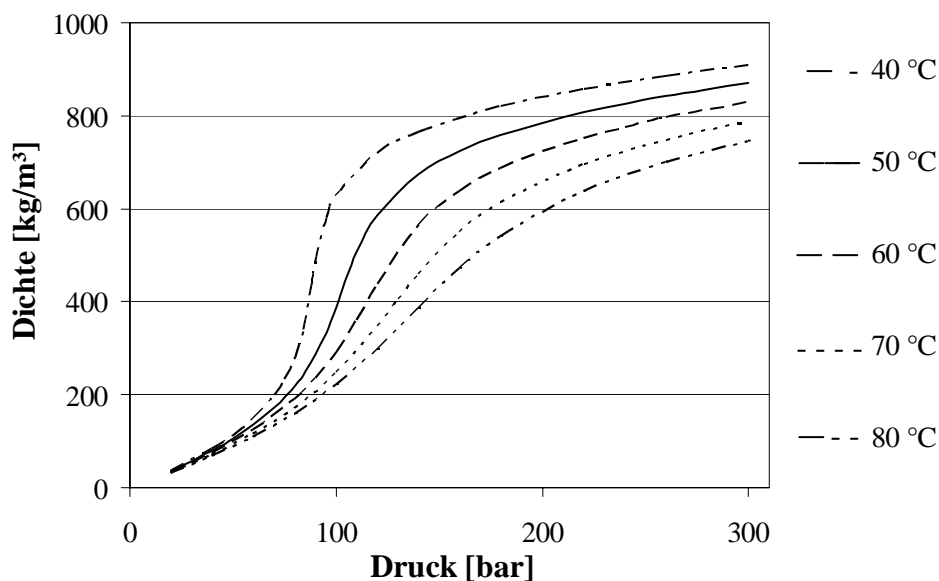


Abb. 2-2 Dichte von CO₂ in Abhängigkeit von Druck und Temperatur (Daten aus Moriyoshi et al., 1993)

Die relative Dielektrizitätskonstante ϵ ist ein Maß für die Polarität eines Lösungsmittels und damit die Fähigkeit polare Substanzen zu lösen. Sie ist ebenfalls von Druck und Temperatur abhängig (Abb. 2-3). Die Kurvenverläufe von Abb. 2-3 sind den in Abb. 2-2 ähnlich. Nahe des kritischen Punktes, für CO₂ bei 73 bar und 31 °C, ist die Zunahme der Dichte und der Dielektrizitätskonstanten am deutlichsten ausgeprägt. Da die ermittelten Dielektrizitätskonstanten niedrig sind, handelt es sich bei reinem überkritischem CO₂ um ein sehr lipophiles Lösungsmittel. Im Vergleich dazu weist Ethanol bei 20 °C und Atmosphärendruck eine Dielektrizitätskonstante von 25,7 und Wasser von 80,4 auf.

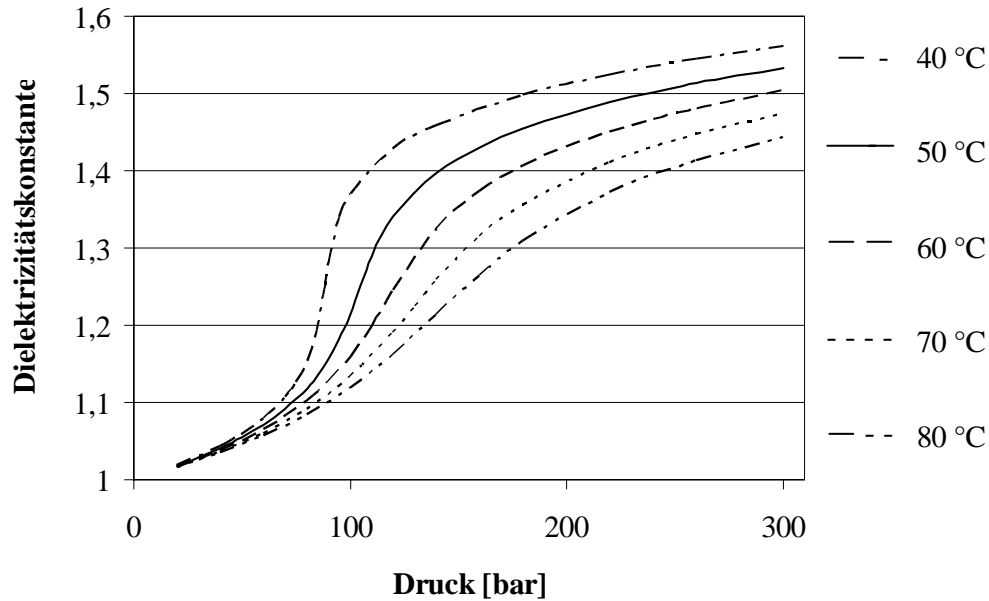


Abb. 2-3 Relative Dielektrizitätskonstante von CO_2 in Abhängigkeit von Druck und Temperatur (Daten aus Moriyoshi et al., 1993)

Des weiteren spielt das Massentransportverhalten einer zu lösenden Substanz, das durch den Diffusionskoeffizienten bestimmt wird, eine wichtige Rolle. Der Massenfluss wird durch das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz beschrieben und stellt die Abhängigkeit dessen vom Konzentrationsgradienten über die Diffusionsstrecke dar (Gl. 2-1).

$$J = -D * \frac{dc}{dx} \quad (\text{Gl. 2-1})$$

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

Der Diffusionskoeffizient ist, gemäß der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 2-2), proportional zur Temperatur und umgekehrt proportional zur Viskosität des umgebenden Mediums.

$$D = \frac{k * T}{6 * \pi * d * \eta} \quad (\text{Gl. 2-2})$$

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

Daraus folgt, dass der Diffusionskoeffizient einerseits durch niedrige Viskosität und andererseits durch erhöhte Temperatur, ansteigt. Dadurch wird der Massenfluss der zu lösenden Substanz im verdichteten Gas beschleunigt.

2.1.3 Überkritisches Kohlendioxid

Das am häufigsten verwendete Gas zur Extraktion im überkritischen Bereich ist Kohlendioxid (CO_2), das niedrige kritische Parameter von 31 °C und 73 bar aufweist. Diese lassen sich technisch leicht realisieren und erlauben schonende Extraktionen für thermolabile Substanzen. Darüber hinaus ist es physiologisch unbedenklich, keimfrei, bakteriostatisch, weder brennbar noch explosiv, umweltfreundlich, preiswert und in großen Mengen verfügbar.

Der symmetrische, lineare Aufbau des Moleküls ist für die lipophilen Eigenschaften im überkritischen Zustand verantwortlich. Das CO_2 -Molekül weist kein permanentes Dipolmoment auf, wodurch auch die geringe Dielektrizitätskonstante (Abb. 2-3) erklärt werden kann. Aufgrund dessen stellt überkritisches CO_2 ein Lösungsmittel mit hoher Selektivität für lipophile Substanzen dar. Im Allgemeinen sind überkritische Gase schwache Lösungsmittel mit geringer Lösungskapazität. Daher erfordern Extraktionen mit überkritischen Gasen einen höheren Lösungsmitteldurchsatz im Vergleich zu herkömmlichen Extraktionsverfahren. Die Lösungskapazität kann allerdings durch Zusatz von hydrophilen, organischen Lösungsmitteln verbessert werden.

2.2 Extraktionen mit Schleppmittel modifiziertem Kohlendioxid

Ein Zusatz von Schleppmitteln zu überkritischem Gas wird erforderlich, um polare Substanzen zu extrahieren, da eine Dichteerhöhung des überkritischen CO_2 nicht ausreicht, um die Lösungskapazität des Extraktionsmittels ausreichend zu steigern (Walsh et al., 1987). Für die verbesserte Lösungskapazität sind chemische Wechselwirkungen verantwortlich. Walsh et al. (1987) gehen davon aus, dass es zu einer Assoziation der Schleppmittelmoleküle mit den zu lösenden Molekülen der Festsubstanz kommt. Dabei ist der Anstieg der Löslichkeit nicht von der Polarität des zugesetzten Schleppmittels, sondern von der Fähigkeit als Protonendonor oder -Akzeptor zu fungieren, abhängig. Eckart et al. (1993) machen zusätzlich physikalische Interaktionen für den Anstieg der Lösungskapazität verantwortlich. Dipolkräfte spielen dabei sowohl zwischen den Schleppmittelmolekülen als auch zwischen Schleppmittel und zu lösender Substanz eine Rolle. Als Folge daraus ergibt sich eine Erhöhung der Dielektrizitätskonstanten ϵ . Messungen von ϵ werden von Roskar et al. (1992) mit Schleppmittel Methanol durchgeführt, das in verschiedenen Konzentrationen überkritischem CO_2 bei einer

definierten Temperatur zugesetzt wird (Abb. 2-4). Exemplarisch bei 35 °C dargestellte Resultate zeigen einen klaren Anstieg der Dielektrizitätskonstanten mit steigendem Methanolzusatz im Vergleich zu reinem CO₂. Die Untersuchung unterschiedlicher Temperaturen bei einem definierten Methanolzusatz zeigt, wie in Abb. 2-3 dargestellt, einen Abfall von ϵ mit steigender Temperatur. Jeong und Chesney (1999) stellen eine Liste häufig verwendeter Schleppmittel auf und charakterisieren diese mittels ihrer Lewis-Säure und -Base Eigenschaften, sowie deren Polarisierbarkeit. Da alle angeführten Eigenschaften bei Methanol am stärksten ausgeprägt sind, eignet sich dieses Schleppmittel für Extraktionen polarer Substanzen.

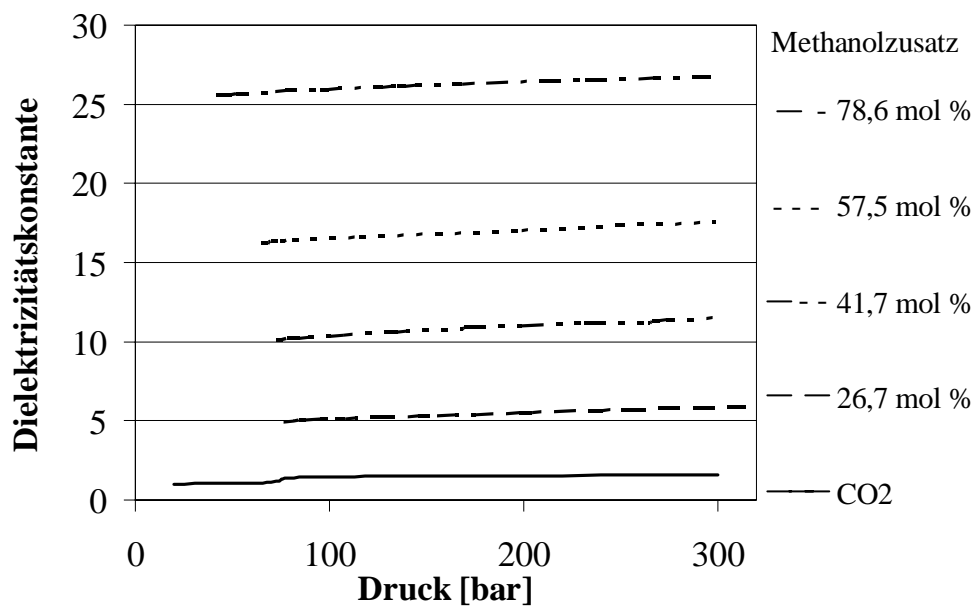


Abb. 2-4 Relative Dielektrizitätskonstante von CO₂/Methanol in Abhängigkeit vom Druck und der Schleppmittelkonzentration bei 35 °C (Roskar et al., 1992)

Eine Übersicht zur Extraktion polarer und ionischer Substanzen mittels überkritischem CO₂ geben Luque de Castro und Tena (1996).

Extraktionen mit Schleppmittelzusatz werden in der Literatur von verschiedenen Autoren beschrieben, wobei sich die Anwendungsgebiete unterscheiden. Lipophile Kakaobutter, die sich mit reinem überkritischem CO₂ nicht vollständig extrahieren lässt, kann unter Zusatz von Ethanol als Schleppmittel vermehrt extrahiert werden, wobei die zugesetzte Ethanolkonzentration eine erhebliche Rolle spielt (Li und Hartland, 1992). Schleppmittel werden häufiger zur Extraktion polarer Pflanzeninhaltsstoffe verwendet. Dabei wird zwischen polaren Substanzen mit und ohne Glykosidanteil unterschieden. Die meisten Aglyka kommen aus der Substanzklasse der Flavonoide. Isoflavone aus Sojabohnenprodukten lassen sich bevorzugt mit 20 %igem Ethanolzusatz extrahieren (Chandra und Nair, 1996). Le Floch et al. (1998)

extrahieren Flavonoid-Aglyka aus Olivenblättern mit 10%igem Zusatz an Methanol. Die Flavonoidaglyka aus den Wurzeln von *Scutellaria baicalensis* zeigen mit steigendem Methanolzusatz eine verbesserte Ausbeute (Lin et al., 1999). Der Zusatz von 70%igem Methanol kann die Extrahierbarkeit weiter verbessern, da das enthaltene Wasser das Lösungsmittel noch polarer macht. Sowohl van Beek und Taylor (1996) als auch Chiu et al. (2002) beschäftigen sich mit der Extraktion der Ginkgolide aus *Gingko biloba*. Diese gehören zur Klasse der glykosidfreien Inhaltsstoffe und lassen sich mit geringen Schleppmittelzusätzen von 5 % Methanol gut extrahieren, während das Optimum bei einem Zusatz von 24 % Ethanol liegt. Als Referenz liegt eine Soxhlet-Extraktion mit 95 % Ethanol zugrunde.

Glykosidisch gebundene Pflanzeninhaltsstoffe sind zumeist Monoglykoside. Die Flavonoidglykoside Vitexin, Orientin und Rutin werden 1997 von Moraes et al. durch Zusatz von 10 % Methanol aus den Blättern von *Passiflora edulis* extrahiert. Schleppmittelzusätze von 10 und 15 % zeigen keine Unterscheide in Bezug auf die Ausbeuten der Glykoside. Zur gleichen Substanzklasse gehört Naringin, das in der Schale von *Citrus paradisi* enthalten ist. Die Extraktion erfordert einen Zusatz von 15 % Ethanol als Schleppmittel (Giannuzzo et al., 2003). Während Flavonoide im Allgemeinen einen hohen Schleppmittelzusatz benötigen, um ausreichend extrahiert zu werden, genügen bereits 3 % Methanol um 98 % der Alkaloide aus *Colchicum autumnale* zu isolieren (Ellington et al. 2003).

Insgesamt gesehen kann durch Schleppmittel die Polarität des überkritischen CO₂ so weit erhöht werden, dass polare Substanzen extrahierbar sind. Der Zusatz des Schleppmittels und dessen Menge richtet sich dabei nach der zu isolierenden Substanz.

2.2.1 Phasendiagramme

Binäre Extraktionsmittel bestehen aus den Komponenten Kohlendioxid und dem jeweiligen Schleppmittel. In der zu extrahierenden Pflanzenmatrix ist Wasser lokalisiert, das während der Extraktion in das Extraktionsmittel gelangt, so dass aus einem binären System ein ternäres System wird. Demzufolge müssen bei Extraktionen mit Schleppmitteln ternäre Phasendiagramme berücksichtigt werden. Abb. 2-5 zeigt das ternäre Phasendiagramm von Kohlendioxid/Ethanol/Wasser bei 60 °C. Die Daten zur Erstellung der Phasengrenze und dem daraus resultierenden Phasendiagramm werden den in Tab. 2-3 angeführten Literaturstellen entnommen.

Im ternären Phasendiagramm befindet sich das überkritische, einphasige Gebiet oberhalb der Phasengrenze (Abb. 2-5) und das zweiphasige, unterkritische Gebiet (Kap. 2.2.2) unterhalb der Phasengrenze. Bei gleichbleibender Temperatur und steigendem Druck wandert die

Phasengrenze in Richtung 2-Phasen-Gebiet. Wenn bei gleichbleibendem Druck die Temperatur verändert wird, wandert diese Phasengrenze mit sinkenden Temperaturen in die gleiche Richtung. Dies hat zur Folge, dass die Wassermenge im System größer werden kann, um sich weiterhin im überkritischen Gebiet zu befinden.

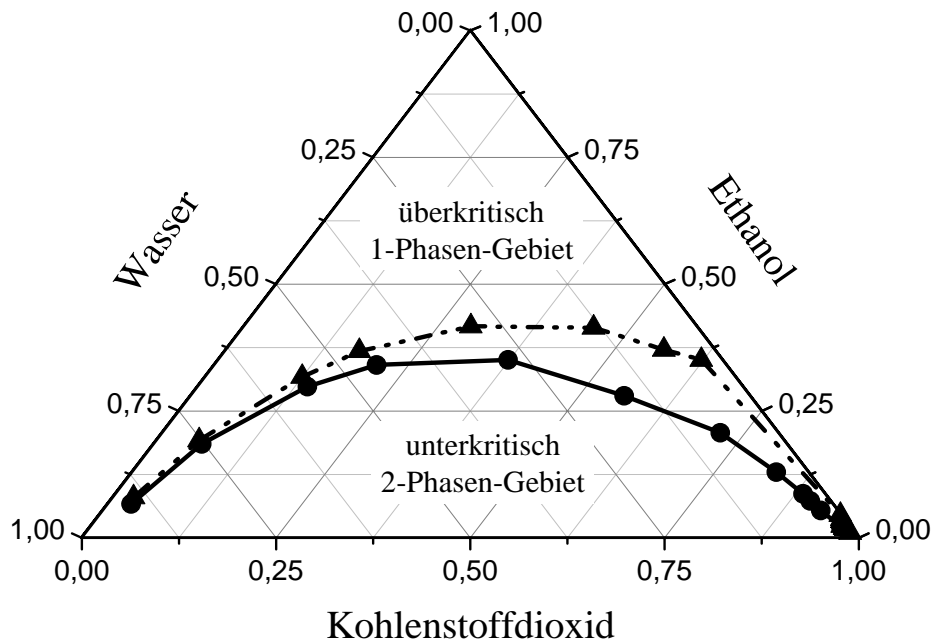


Abb. 2-5 Ternäres Phasendiagramm von CO_2 /Ethanol/Wasser bei 60 °C , 101 bar (▲) und 142 bar (●) (Daten aus Lim et al., 1994).

Zur Überprüfung der Relevanz ternärer Phasendiagramme werden im Rahmen dieser Arbeit Extraktionen mit einem Schleppmittelanteil von 25 % im überkritischen Bereich bei 200 bar und 40 °C durchgeführt. Der Wassergehalt der Ausgangsdroge sowie der extrahierten Droge wird nach Karl-Fischer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2-2 zusammengefasst.

Tab. 2-2 Maximaler Wassergehalt ($n = 9$) der Ausgangsdroge und der mit CO_2 und CO_2 /Schleppmittel extrahierten Droge (Mittelwert \pm 95 % Konfidenzintervall)

Drogenmaterial: Teufelskralle	Wassergehalt [Massenprozent]
Ausgangsdroge	$9,4 \pm 0,5\%$
nach CO_2 -Extraktion	$8,5 \pm 0,6\%$
nach $\text{CO}_2/26\%$ Ethanol Extraktion	$7,3 \pm 0,4\%$
nach $\text{CO}_2/26\%$ Methanol Extraktion	$5,8 \pm 0,5\%$

Der maximal mögliche Wasserverlust der Teufelskralle während der Extraktion beträgt 3,6 %. Dieser Wasserverlust wird für die Berechnung der gesamten Wassermenge im System auf

5 % gerundet, um auch Drogen mit höheren Wasserverlusten zu berücksichtigen. Die Extraktionen dauern, je nach Bedingungen, bis zu 3 Stunden. Bei einer Annahme, dass das Wasser bereits innerhalb der ersten Arbeitsstunde in das System übergeht und 600 g Droge bei einem Massenfluss von $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ extrahiert werden, ergibt sich ein theoretischer Wassergehalt von 0,38 % im ternären System Kohlendioxid/Schleppmittel/Wasser. Unter Berücksichtigung des Phasendiagrammes stellt der resultierende Wassergehalt einen vernachlässigbaren Anteil dar. Der Wasseranteil wird erst interessant, wenn man mit sehr geringen Schleppmittelmengen bei niedrigen Drücken und hohen Temperaturen arbeitet. Da dies jedoch nicht der Fall ist, kann die Berücksichtigung ternärer Phasendiagramme, zugunsten binärer Phasendiagramme (Kap. 2.2.2), vernachlässigt werden.

2.2.2 Der unterkritische Zustand

Extraktionen mit Schleppmitteln erfordern die Berücksichtigung binärer Phasendiagramme. Anhand der Phasengrenze eines Systems können die Extraktionsbedingungen gezielt im über- oder unterkritischen Gebiet gewählt werden. Die Erstellung von Phasendiagrammen erfolgt aus Literaturdaten (Tab. 2-3).

Tab. 2-3 *Literaturübersicht zur Erstellung binärer Phasendiagramme CO_2 /Schleppmittel und ternärer Phasendiagrammen CO_2 /Schleppmittel/Wasser*

Autoren	Jahr	Phasendiagramm	Schleppmittel
Gilbert und Paulaitis	1986	ternär	Ethanol
Jennings et al.	1991	binär	1-Butanol, Ethanol
Lim et al.	1994	binär, ternär	Ethanol
Page et al.	1991	binär	Methanol
Page et al.	1992	binär	Ethanol, Methanol
Semenova et al.	1979	binär	Methanol
Suzuki et al.	1990	binär	1-Propanol, Ethanol, Methanol
Yoon et al.	1993	ternär	Methanol
Yoon et al.	1993	binär	Ethanol, Methanol

In Abb. 2-6 ist exemplarisch ein binäres Phasendiagramm für CO_2 /Methanol bei $72 \text{ }^\circ\text{C}$ dargestellt. Der überkritische Bereich befindet sich oberhalb des kritischen Punktes, der dem Maximum der Phasengrenze entspricht. Wie der Abb. 2-6 zu entnehmen ist, existieren zusätz-

lich eine flüssige und gasförmige Phase über der Phasengrenze, die jedoch unterhalb des kritischen Punktes zu finden sind. Unterhalb der Phasengrenze ist der unterkritische Bereich lokalisiert, der aus einer flüssigen, mit CO_2 gesättigten Schleppmittelpfase und einer gasförmigen, mit Schleppmittel gesättigten CO_2 -Phase besteht. Die Zusammensetzung eines unterkritischen Extraktionsmittels ist am Beispiel von 100 bar und 72°C mit einem Schleppmittelanteil von 26 % Methanol der Abb. 2-6 entnehmbar. Der Arbeitsbereich befindet sich innerhalb des gepunkteten Kreises. Das binäre Gemisch CO_2 /Methanol spaltet sich, entsprechend dem Hebelgesetz (gestrichelte Pfeile) in beide Phasen auf. Die gasförmige Phase besteht aus 6 % Methanol und 94 % CO_2 und die flüssige Phase aus 61 % Methanol und 39 % CO_2 . Das Mengenverhältnis beider Phasen ergibt sich aus dem Längenverhältnis l/l' , so dass in diesem Fall 36 % gasförmige neben 64 % flüssiger Phase vorliegen.

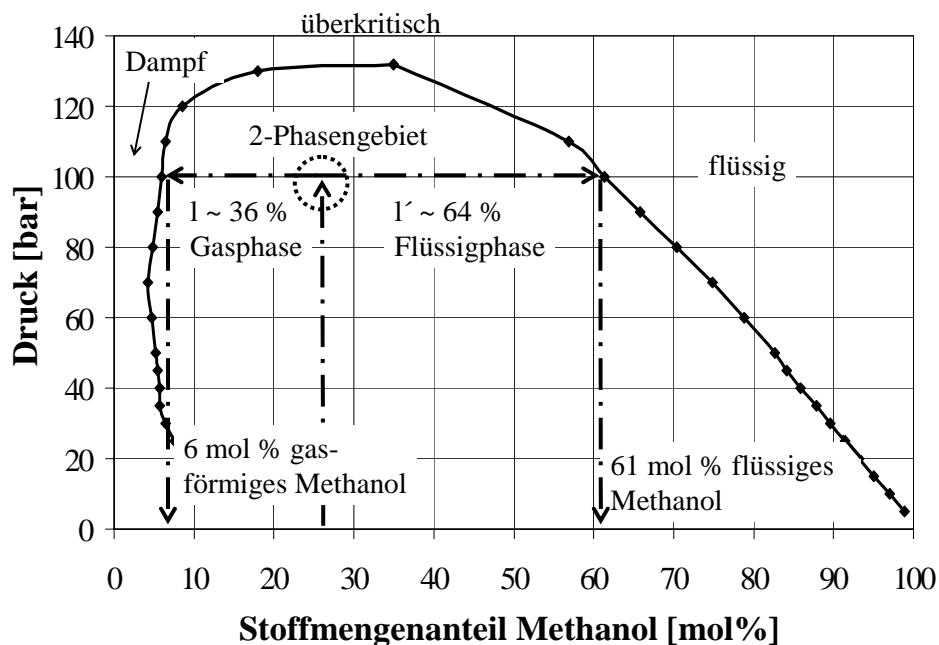


Abb. 2-6 Binäres Phasendiagramm CO_2 /Methanol bei 72°C (Daten aus Semenova et al. 1979) mit Darstellung der Zusammensetzung der unterkritischen Phase.

Der unterkritische Bereich zeichnet sich durch eine sehr hohe Polarität aus. Die Dichte liegt im Bereich von $300\text{-}500\text{ kg/m}^3$, so dass dadurch ein Polaritätsanstieg nicht erklärbar ist. Die Gasphase mit einem geringen Schleppmittelanteil weist eine ähnlich niedrige Lösungskapazität wie reines CO_2 auf. Demzufolge resultiert die hohe Polarität aus zwischenmolekularen Kräften, die vom flüssigen Anteil der binären Mischung ausgeübt werden.

Da die Lage der Phasengrenze vom verwendeten Schleppmittel abhängt, zeigen CO_2 /Ethanol-Gemische bei gleichen Temperaturen andere Phasengrenzen als CO_2 /Methanol-Gemische. Mit steigender Temperatur verschiebt sich die Phasengrenze eines CO_2 /Schleppmittelge-

misches, wie in Abb. 2-7 am Beispiel von Ethanol dargestellt, zu höheren Drücken. Überkritische Extraktionen mit Schleppmittel Ethanol finden bei 40 °C bereits ab einem Extraktionsdruck von 80 bar statt, während dieser Druck bei 60 °C noch weit innerhalb des unterkritischen Bereiches liegt. Der überkritische Bereich beginnt hier erst ab einem Druck von 110 bar. Aus diesem Grunde ist es unerlässlich zur Einstellung der Extraktionsbedingungen die Phasendiagramme zu beachten.

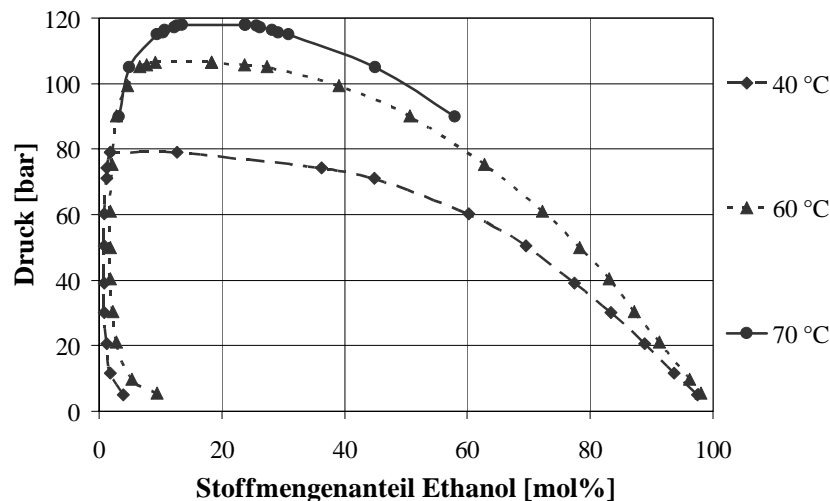


Abb. 2-7 Binäre Phasendiagramme CO_2 /Ethanol in Abhängigkeit der Temperatur (Daten aus Suzuki et al., 1990 und Lim et al., 1994)

2.3 Thermodynamik des Extraktionsprozesses

Kohlendioxid wird während des Extraktionsprozesses im Kreislauf geführt. Das Schleppmittel wird dem bereits verdichteten Gas kontinuierlich zudosiert, so dass das CO_2 /Schleppmittel-Gemisch das Drogenbett durchströmt. Im Separator wird das Schleppmittel zusammen mit den Extraktivstoffen vom CO_2 abgeschieden. Die Zustandsänderung des im Kreislauf geführten Gases kann anhand eines Temperatur-Entropie-Diagrammes veranschaulicht werden (Abb.2-8). Die dabei auftretenden Flächen unter den Kurven einer Zustandsänderung repräsentieren umgesetzte Wärmemengen, entsprechend der Definition für Entropie (Gl. 2-3, Gl. 2-4).

$$S = \frac{Q}{T} \quad (\text{Gl. 2-3})$$

$$dQ = T * dS \quad (\text{Gl. 2-4})$$

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

T Temperatur [K]

Q Wärme [J]

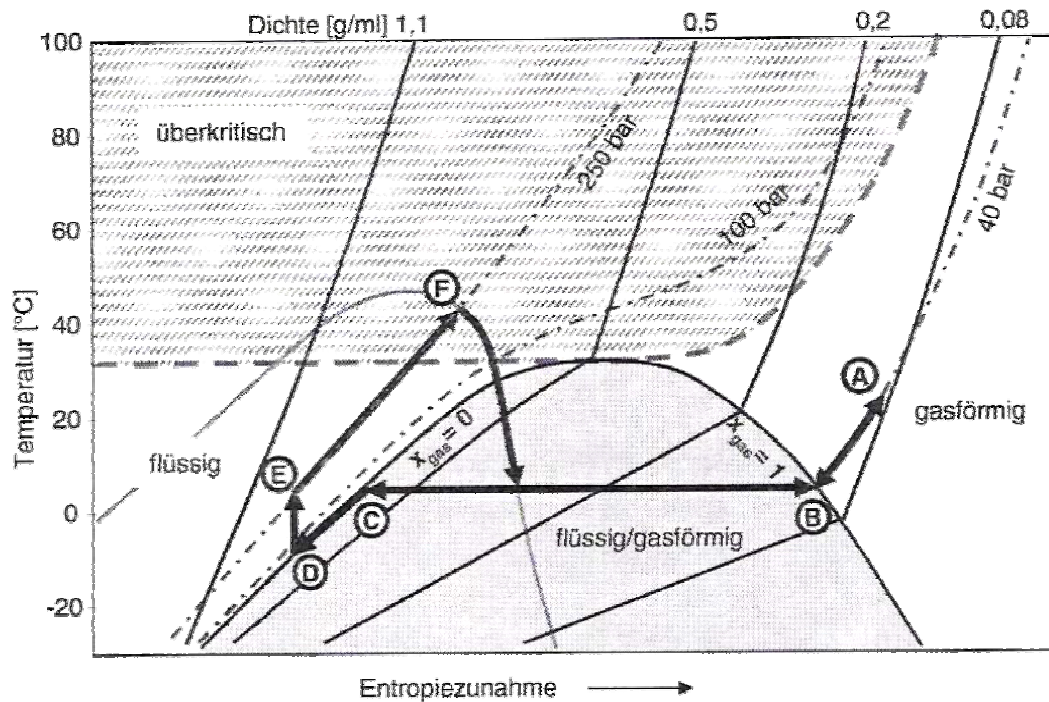


Abb. 2-8 Temperatur-Entropie-Diagramm von CO_2 mit Darstellung des Extraktionskreislaufes.

In Abb. 2-8 sind die Bereiche, in denen CO_2 als homogene gasförmige, flüssige und überkritische Phase, sowie als unterkritisches Zweiphasengebiet flüssig/gasförmig, vorliegt, kenntlich gemacht. Dabei soll die gestrichelte Linie, die das überkritische Gebiet abgrenzt, keine Phasengrenze darstellen, sondern der Veranschaulichung dienen. CO_2 liegt am Punkt *A* bei 40 bar im gasförmigen Zustand vor. Durch isobare Abkühlung erreicht CO_2 die Phasengrenze (*B*) zum unterkritischen Bereich und beginnt bei Eintritt in diese Phase zu kondensieren. Während des Kondensationsvorganges erhöht sich der Stoffmengenanteil an flüssigem Kohlendioxid unter konstantem Druck und konstanter Temperatur. Dabei steigt der Molenbruch an flüssigem CO_2 an. Bei einem Wert von 1 wird die Phasengrenze zum flüssigen Bereich (*C*) erreicht. Um zu gewährleisten, dass CO_2 während der Ansaugphase der Hochdruckpumpe nicht verdampft, wird das flüssige CO_2 unterkühlt (*D*). Anschließend wird es durch die Pumpe auf den Extraktionsdruck von 250 bar verdichtet (*E*). Dieser Prozess wird unter idealen Bedingungen als adiabatisch betrachtet. Ist diese adiabatische Druckerhöhung reversibel, so findet diese unter isentropen Bedingungen (konstante Entropie) statt. Der endgültige Arbeitspunkt bei 40 °C wird durch eine isobare Wärmezufuhr erreicht (*F*). Nach Extraktion erfolgt die Abscheidung durch isenthalpe Drosselung in das Zweiphasengebiet auf 40 bar. Eine vollständige Trennung der Extraktivstoffe von CO_2 wird durch Wärmezufuhr erreicht, so dass CO_2 in den gasförmigen Zustand gelangt (*B-A*) und sich die Lösungskapazität verringert.

Die isenthalpe Drosselung stellt eine Druckreduktion ohne Gewinn von Arbeit dar. Demzufolge verläuft sie immer in Richtung zunehmender Entropie und ist ein adiabatischer, irreversibler Prozess. Reale Gase weisen zwischen den Molekülen anziehende Wechselwirkungen auf, die bei einer Druckreduktion überwunden werden müssen. Da die dazu benötigte Energie bei einem adiabatischen Prozess nicht der Umgebung entzogen werden kann, wird diese dem Gas selbst entzogen. Somit kommt es aufgrund des Joule-Thomson-Effektes während der Drosselung zu einer Abkühlung des Gases. Bei hohen Drücken kann der gegenteilige Effekt auftreten, da es zu einer starken Annäherung der Gasmoleküle kommt. Durch die Annäherung kann das Eigenvolumen der Teilchen abstoßende Kräfte bewirken, die bei Expansion in Form von Wärmeenergie frei wird. Die in realen Gasen herrschenden Anziehungs- und Abstoßungskräfte werden in der p/V/T-Zustandsgleichung von van der Waals berücksichtigt (Gl. 2-5). Diese gehen auch in die Berechnung des Joule-Thomson-Effektes ein, der sich aus der Änderung der Temperatur mit dem Druck bei konstanter Enthalpie ergibt (Gl. 2-6).

$$\left(p + \frac{a}{v^2}\right) * (v - b) = R * T \quad (\text{Gl. 2-5})$$

p Druck [Pa]

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

T Temperatur [K]

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

v molares Volumen des Gases [m³/mol]

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

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

b van der Waals-Konstante [m³·mol⁻¹]

$$\eta_{JT} = \frac{\delta T}{\delta p} = \frac{\frac{2a}{R * T} - b}{c_p} \quad (\text{Gl. 2-6})$$

η_{JT} Joule-Thomson-Koeffizient

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

Die Konstanten a und b können entweder experimentell bestimmt oder aus den kritischen Daten eines Gases über die Gleichungen Gl. 2-7 und Gl. 2-8 ermittelt werden.

$$p_c = \frac{a}{27 * b^2} \quad (\text{Gl. 2-7})$$

$$T_c = \frac{8 * a}{27 * R * b} \quad (\text{Gl. 2-8})$$

p_c kritischer Druck [Pa]

T_c kritische Temperatur [K]

Die van der Waals Zustandsgleichung bildet die Grundlage für die Erstellung weiterer Gleichungen (equations of state, EOS). Dabei sollen experimentell ermittelte Daten in ein mathematisches Modell eingebunden werden, um die Genauigkeit der Berechnungen zu erhöhen. Die Bender-EOS (Bender, 1970) ist eine multiparametrische Gleichung, die für den flüssigen und überkritischen Bereich einer Reinsubstanz, wie beispielsweise CO_2 , sehr genaue empirische Daten liefert. Einen Überblick über weitere Zustandsgleichungen gibt Brunner (1994), wobei auf die Grenzen und Vorteile der Aussagekraft eingegangen wird.

3. DROGEN

3.1 *Harpagophytum procumbens*

3.1.1 Allgemeines, Verbreitung, Botanik

Harpagophytum procumbens DC. (Teufelskralle, Trampelklette, Devil's claw) stammt aus der Familie der Pedaliaceae (Sesamgewächse), die mit 15 Gattungen und ca. 100 Arten in Afrika verbreitet ist. Das Verbreitungsgebiet der Teufelskralle erstreckt sich auf die Kalahari Südafrikas und Namibias.

Die oberirdischen Triebe der Teufelskralle wachsen im Frühjahr mit verzweigten Ranken über den Erdboden. Die Blätter sind gestielt und tief gelappt, während die hellrosa bis purpurnen Blüten mit kurzen Stielen in den Blattachsen wachsen. Die Samenkapseln, nach welchen die Pflanze ihren Namen trägt, bestehen aus zweifächrigen Samenbehältern. Sie sind flach, oval und haben armartige Auswüchse, welche ankerartige Haken tragen. Diese Trampelkletten haften sich an Hufe oder Felle von Tieren, um verbreitet zu werden. Die herausfallenden Samen werden durch die Hufe in die Erde getreten (von Koenen, 1996). Die oberirdischen Pflanzenteile wachsen aus einem weit verzweigten System von Wurzeln und Knollen hervor. Von den Pfahlwurzeln führen Nebenwurzeln zu allen Seiten und bilden rundliche Knollen aus. Die Knollen, auch Sekundärwurzeln genannt, sind wesentlich bitterer und intensiver im Geschmack als die Wurzeln. Demzufolge befinden sich vorwiegend in den Knollen die Wirkstoffe, welche die Teufelskralle als Heilpflanze bekannt gemacht haben (von Koenen, 1996). Die Knollen sind hellbraun bis rotbraun gefärbt und tragen einen dünnen Korkmantel. Zur Drogengewinnung werden die frischen, zum Teil bis zu 600 g wiegenden Sekundärwurzeln zerkleinert und getrocknet. Dabei schrumpft das Gewebe ungleichmäßig, wobei die Kanten schneller erhärten als das innere Gewebe. Die Trocknung muss sofort nach dem Sammeln erfolgen, da die Wurzeln aufgrund ihres hohen Wassergehaltes rasch faulen (Kämpf, 1976).

3.1.2 Inhaltsstoffe

In den Sekundärwurzeln von *Harpagophytum procumbens* DC. sind Kohlenhydrate als Hauptbestandteile, Iridoide sowie 2-Phenylethyllderivate, Fette, Wachse und ubiquitäre Pflanzeninhaltsstoffe enthalten. Die Gruppe der Iridoide wird für die pharmakologische Wirkung (Kap. 3.1.3) verantwortlich gemacht.

Iridoide

Harpagosid ist das Hauptiridoidglykosid in den sekundären Wurzeln der Teufelskralle. Ph. Eur. 5 fordert einen Mindestgehalt von 1,2 % in der Droge. Neben Harpagosid befinden sich noch Harpagid und Procumbid in der Wurzel (Czygan et al., 1977). Harpagosid ist der Zimtsäureester des Harpagids (Abb. 3-1) und Procumbid ist am C₇ des Harpagids hydroxyliert. Procumbid kann unter Wasserabspaltung eine intramolekulare Etherbrücke bilden.

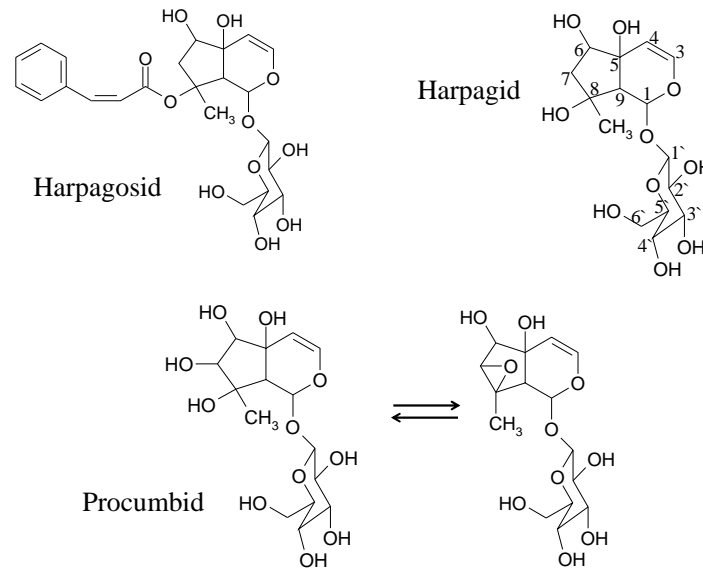


Abb. 3-1 Iridoidglykoside der sekundären Wurzel der Teufelskralle

Drei weitere Iridoidglykoside werden von Kikuchi et al. (1983) aus den Wurzeln von *Harpagophytum procumbens* mit Hilfe von Methanol als Lösungsmittel extrahiert und mittels UV, IR, C-NMR, H-NMR und MS in ihrer Struktur aufgeklärt (Abb. 3-2).

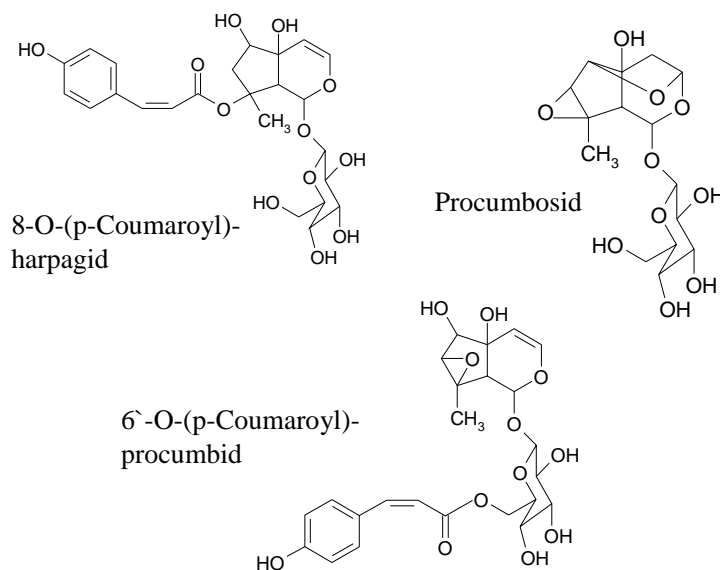
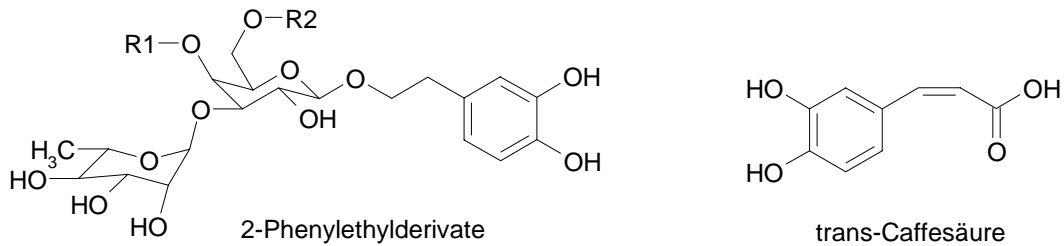


Abb. 3-2 Weitere Iridoidglykoside der sekundären Wurzel der Teufelskralle

Die neu isolierten Glykoside stellen Derivate der bisher bekannten Iridoide dar. Während das Coumaroylharpagid lediglich eine Hydroxylgruppe mehr aufweist als das Harpagosid, ist das Coumaroylprocumbid ein Zimtsäureester von Procumbid. Procumbosid besitzt im Vergleich zu Procumbid eine weitere Etherbrücke zwischen C₃ und C₆.

2-Phenylethylderivate

Zu dieser Substanzklasse gehören drei Substanzen, die sich nur durch zwei Reste unterscheiden (Abb. 3-3).



Substanz	R1	R2
Acteosid	trans-Caffeoyl	-H
Isoacteosid	-H	trans-Caffeoyl
β -(3',4'-Dihydroxyphenyl)-ethyl-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosid	-H	-H

Abb. 3-3 Strukturen der 2-Phenylethylderivate.

Kohlenhydrate

Die Kohlenhydrate stellen, bezogen auf die getrocknete Droge, mit einem Gesamtzuckergehalt von 51 % mengenmäßig die Hauptbestandteile der Sekundärwurzeln dar (Ziller und Franz, 1979). Monosaccharide, wie Glucose und Fructose, sind nur zu 0,2-0,3 % enthalten, während das Disaccharid Saccharose und das Trisaccharid Raffinose zu 2,5-3 % in der Wurzel vorkommen. Den größten Anteil macht das Tetrasaccharid Stachyose mit 46 % aus. Die Stachyose ist aus 1 mol Fructose, 1 mol Glucose und 2 mol Galaktose aufgebaut und in Abb. 3-4 dargestellt.

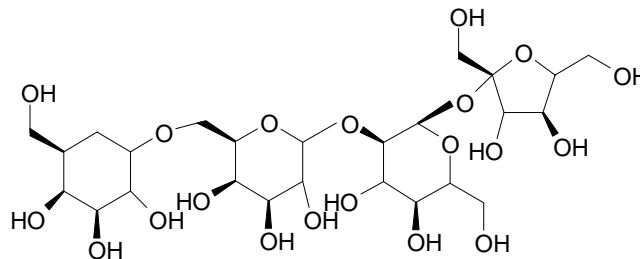


Abb. 3-4 Strukturformel des Tetrasaccharids Stachyose

Weitere Bestandteile

Neben den bisher genannten Substanzgruppen der Iridoide, 2-Phenylethylderivate und den Kohlenhydraten, sind in der Wurzel noch geringe Mengen Flavonverbindungen enthalten. Zu ihnen gehören Flavone und Flavonole, die ausschließlich als Aglyka vorkommen. Ihr Anteil, bestehend aus Fisetin, Kämpferid, Kämpferol und Luteolin, macht nur 0,018 %, bezogen auf die getrocknete Droge, aus (Hagers Handbuch, 1993).

Des Weiteren sind in der Wurzel Droge Fette und Wachse vorhanden (Hagers Handbuch, 1993), zu denen in der Literatur keine genaueren Angaben gemacht werden.

3.1.3 Pharmakologie und Anwendung

In der volkstümlichen Medizin werden die Knollen zerkleinert, getrocknet, mit kaltem Wasser übergossen und ziehen gelassen. Dieser Auszug wird täglich bei Husten, Durchfall und Verstopfung getrunken. Bei Schmerzen wird ein Tee aufgebrüht und getrunken. Die Pflanze ist in weiten Teilen Afrikas als blutreinigend bekannt.

Alkoholische Drogeauszüge finden heutzutage bei Patienten mit Arthrose und Rheuma Verwendung (Wenzel und Wegener, 1995). Eine Therapie mit *Harpagophytum* Extrakten verbessert in allen durchgeführten Studien die Beschwerden. Teilweise kann ein Absetzen der NSAR zugunsten der Extrakte erfolgen (Wenzel und Wegener, 1995, Kap. 6). Eine neue Verwendung der Extrakte aus *Harpagophytum procumbens* DC. stellt der Einsatz bei Arteriosklerose dar (Greither, 2001). Mäuse mit Arterienverletzung zeigen ohne Behandlung eine Verengung der Arterie, so dass das Gefäßvolumen im Vergleich zu einer unverletzten Arterie bis zu 50 % reduziert sein kann. Unter Einnahme eines *Harpagophytum* Extraktes, wird die Verengung der Arterie während des Heilungsprozesses verhindert und die Gefäße behalten das ursprüngliche Volumen bei. Aufgrund dieser Daten wird die Verwendung von wässrig-alkoholischen *Harpagophytum* Extrakten zur Prophylaxe und Behandlung von Arteriosklerose postuliert.

Generell können, sowohl durch Tierexperimente als auch durch in-vitro Untersuchungen, analgetische, antiphlogistische und antirheumatische Wirkungen festgestellt werden (Kap. 6).

3.2 *Aesculus hippocastanum*

3.2.1 Allgemeines, Verbreitung, Botanik

Aesculus hippocastanum L. (Rosskastanie, Horse chestnut) ist die gewöhnliche Rosskastanie aus der Familie der Hippocastanaceae. Der lateinische Name *Aesculus* geht auf die Eichenpezies *Quercus esculus* L. zurück. Die Rosskastanie wurde 1737 irrtümlicherweise von Linneo den Eichen zugeordnet (Bombardelli et al., 1996) und bekam somit den Namen *Aesculus*.

Die gewöhnliche Rosskastanie ist auf dem Balkan, im Kaukasus und in Vorderasien beheimatet und wird zwischenzeitlich in ganz Europa kultiviert. Die großen Blätter des 10-20 m hohen Baumes sind 5- bis 7-zählig gefiedert, wobei die Teilblätter am Rand gezähnt sind. Die Blüten vereinigen sich zu aufrechten Rispen und die Frucht ist eine mit Stacheln besetzte, grüne Kapsel Frucht. Wenn die Frucht reif ist, öffnet sich die Kapsel mit 2 oder 3 Klappen und entlässt den Samen. Pro Kapsel ist ein Samen enthalten, der eine glänzende rotbraune Samenschale trägt. Ein großer, gelblichweißer Hof auf der Samenschale rührt vom Nabelfleck (Hilum) her. Der getrocknete Samen (Hippocastani semen) findet vor allem für pharmazeutische Zwecke Anwendung.

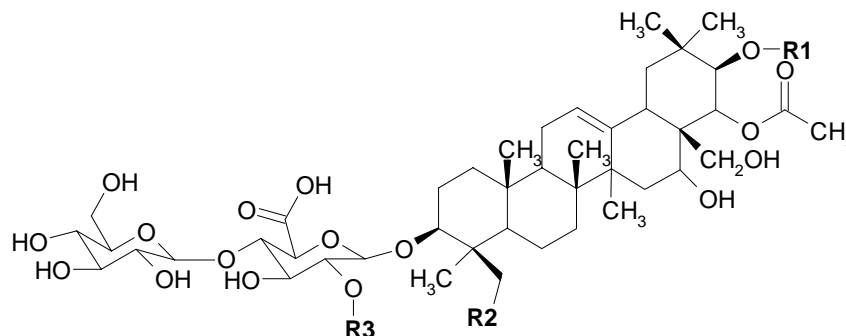
3.2.2 Inhaltsstoffe

Die Inhaltsstoffe der Samenkerne der Rosskastanie weichen in ihrer chemischen Zusammensetzung stark von der Samenschale ab. Da die verwendete Droge sowohl aus den Kernen als auch aus den Schalen besteht, findet man eine Vielzahl unterschiedlicher Inhaltsstoffe.

Triterpensaponine

Triterpensaponine stellen die wirksamen Substanzen der Samen von *Aesculus hippocastanum* dar, von denen das DAB 2004 einen Gehalt von mindestens 3 % fordert. Die Triterpensaponine, auch β -Aescin genannt, sind ein komplex zusammengesetztes Gemisch, das zu über 60 % aus 5 Verbindungen besteht (Yoshikawa et al., 1994): Aescin Ia (24 %), Aescin Ib (17 %), Aescin IIa (13,5 %), Aescin IIb (6 %) und Aescin IIIa (1,5 %) (Abb. 3-5). Die Aglyka der Aescine sind Diester des Protoaescigenins und Barringtonenols C, die über die Hydroxylgruppe am C₃ mit einem verzweigten Trisaccharid verknüpft sind. Die Zusammensetzung des Trisaccharids schwankt zwischen den jeweiligen Aescinkomponenten (Abb. 3-5). Die Hydroxylgruppe an C₂₁ ist mit kurzkettigen Fettsäuren, Tiglin- und Angelicasäure (2-Methyl-2-Butensäure) verestert, während C₂₂ mit der Essigsäure verestert ist.

Des weiteren existieren noch α -Aescin und Kryptoaescin, die sich von β -Aescin durch eine Acylwanderung der Essigsäure von C₂₂ nach C₂₈ unterscheiden (Wagner et al., 1970).



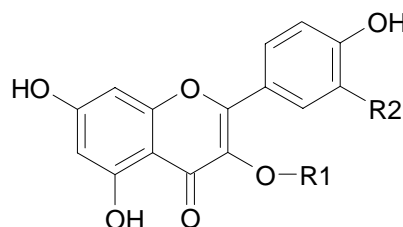
Komponente	Rest R1	Rest R2	Rest R3
Aescin Ia	Tigloyl	-OH	β -D-Glucose
Aescin Ib	Angeloyl	-OH	β -D-Glucose
Aescin IIa	Tigloyl	-OH	β -D-Xylose
Aescin IIb	Angeloyl	-OH	β -D-Xylose
Aescin IIIa	Tigloyl	-H	β -D-Galaktose

Abb. 3-5 Strukturformeln des Triterpensaponingemisches β -Aescin

Die Samen unterschiedlicher Bäume zeigen beträchtliche Unterschiede im Aescingehalt, der in Abhängigkeit der Jahreszeit und der Reife der Samen stark schwankt.

Flavonole

Der totale Flavonoidgehalt der Samen beträgt 0,29 %, berechnet als Rutin. Die Flavonole liegen ausschließlich als Oligosaccharide in den Samen der Rosskastanie vor. Die zugehörigen Aglyka sind Quercitrin und Kämpferol, die entweder am C₃ (R1) oder am C_{3'} (R2) glykosidisch mit einem Zuckerrest oder einer Zuckerkette verbunden sind (Abb. 3-6). Die Zuckerkette kann unterschiedlich zusammengesetzt sein, wobei Glucose, Rhamnose und Xylose als Komponenten zur Verfügung stehen (Hübner, et al., 1999).

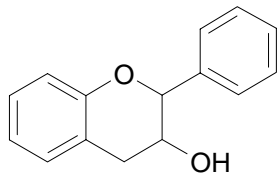


R1	R2
Glucose, Rhamnose, Xylose	- H
- H	Glucose, Rhamnose, Xylose

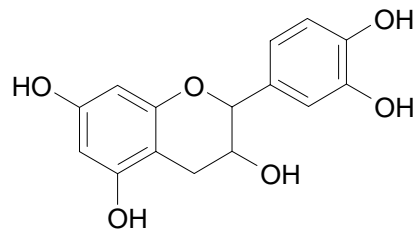
Abb. 3-6 Strukturformel des Flavonol-Oligosaccharid-Grundgerüsts

Gerbstoffe

Den Flavonol-Oligosacchariden verwandte Verbindungen stellen die Proanthocyanidine dar. Sie gehen aus Flavan-3-ol-Einheiten hervor (Abb. 3-7), dessen bekannteste Vertreter Catechin und Epicatechin sind, die sich stereochemisch unterscheiden.



Flavan-3-ol



Catechin/Epicatechin

Abb. 3-7 Strukturformel des Proanthocyanidin-Grundgerüsts

Die Gerbstoffe sind ausschließlich im Perikarp (Fruchtwand) und der Samenschale zu finden. Die Einzelbausteine (Abb. 3-7) kondensieren zu Dimeren, Trimeren und Tetrameren. Dabei resultieren Proanthocyanidine, die aus mehreren Einzelbestandteilen bestehen, die sowohl einfach als auch zweifach miteinander verknüpft sein können (Morimoto et al., 1987).

Ölbestandteile

Der Anteil des fetten Öles im getrockneten Samen beträgt 5-7 % (Bombardelli et al., 1996). Die ölige Komponente besteht aus Glycerolestern verschiedener Fettsäuren, die nach Verseifung mittels gaschromatographischer Analyse quantifiziert werden können (Srijayanta et al., 1999). Die Fettsäuren weisen unterschiedliche Kettenlängen auf, wobei die Palmitinsäure den größten Anteil ausmacht. Des weiteren sind noch Laurin-, Myristin-, Öl-, Arachidon- und Stearinsäure Bestandteil der öligen Komponente, so dass diese sowohl aus gesättigten als auch einfach bis mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufgebaut ist.

Weitere Bestandteile

Außer fettem Öl liegen als Samenreserven unter anderem bis zu 50 % Stärke, 10 % Eiweiße und Kohlenhydrate, wie Saccharose und Glucose vor (Bombardelli et al., 1996). Die frischen Samen enthalten Vitamine der B-Gruppe, wie beispielsweise Vitamin B6 und Riboflavin, sowie Vitamin C (Bombardelli et al., 1996).

3.2.3 Pharmakologie und Anwendung

Bereits 1960 wurde die pharmakologische Wirkung von *Aesculus*-Extrakten den Triterpensaponinen (β -Aescin) zugeschrieben (Lorenz und Marek, 1960). Beim Rattenpfotenödemtest wird den Tieren eine Ovalbumin-Lösung in die Pfote injiziert, die zu einer Ödembildung an der Einspritzstelle führt. Die Auswertung erfolgt über die Messung der Volumenzunahme der Rattenpfote. Unter parenteraler Gabe des Rosskastaniensamenextraktes kann die Ödembildung, im Vergleich zum unbehandelten Tier, drastisch verringert werden. Der Petechien-Test zur Bestimmung der Gefäßresistenz im Kapillargebiet der Haut wird durch Anlegen eines Unterdruckes auf der Rattenhaut überprüft. Die durch den Unterdruck entstehende Saugkraft sorgt für eine petechiale Hautblutung, die ein Maß für die Kapillarresistenz ist. Das Auftreten der Petechialblutung ist nach parenteraler Behandlung mit *Aesculus*-Extrakten verlangsamt. Die Untersuchungen zeigen auch, dass die anti-ödematöse, anti-exsudative und vasoprotektive Wirkung der Rosskastanien-Extrakte vom Aescingehalt abhängig ist. β -Aescin allein zeigt eine deutlich stärkere und langanhaltende Wirkung, während aescinfreie Extrakte keine nachweisbare Wirkung mehr besitzen. Demzufolge kann β -Aescin als wirksame Substanz aus *Aesculus hippocastanum* angesehen werden (Lorenz und Marek, 1960).

Der anti-ödematöse Effekt resultiert aus der Inhibierung des Enzym Hyaluronidase, das die Kittsubstanz zwischen Körperzellen und somit auch zwischen Kapillarwandzellen lockert. Die Hemmung des Enzyms bewirkt eine Stärkung der Gefäßwand und vermindert den Wasseraustritt (Sirtori, 2001). Zusätzlich zeigen die Venen unter Aescintherapie eine gesteigerte Kontraktionsaktivität. Diese wird auf eine erhöhte Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Freisetzung ($PGF_{2\alpha}$) zurückgeführt, da die Reduktase, die Prostaglandin E_2 in $PGF_{2\alpha}$ umwandelt, eine gesteigerte Aktivität aufweist. Die vermehrte Bildung von $PGF_{2\alpha}$ ist für die Erhöhung der Gefäßkontraktilität verantwortlich (Sirtori, 2001).

Die anti-ödematöse, anti-exsudative und vasoprotektive Wirkung, die bereits 1960 von Lorenz und Marek bei intravenöser Applikation von *Aesculus*-Extrakten nachgewiesen wurden, können auch durch orale Applikation erreicht werden. Tabletten mit verzögerter Wirkstofffreisetzung weisen eine Bioverfügbarkeit von 98-120 % auf (Sirtori, 2001). In mehreren klinischen Studien wurden aescinhaltige Tabletten an Patienten mit chronischer Veneninsuffizienz getestet. Im Vergleich zu Placebo- oder Hydroxyethylrutosid-Präparaten führen die aescinhaltigen Präparate jeweils zu einer signifikanten Verbesserung des Beinvolumens, der Schmerzen und des Spannungsgefühls (Sirtori, 2001). Eine weitere Indikation aescinhaltiger Tabletten ist die Behandlung von Hämorrhoiden. Die Schmerzen, Blutungen

und Schwellungen nehmen unter Einfluss der Therapie wesentlich stärker ab, als es in der Placebogruppe beobachtet wird. Endoskopische Untersuchungen bestätigen diese Aussage, wobei eine Verbesserung erst 2 Wochen nach Behandlungsbeginn nachgewiesen werden kann (Sirtori, 2001). Bombardelli et al. (1996) untersuchen die Wirkungsaktivität von Proanthocyanidinen. Diese Substanzklasse weist pharmakologisch interessante Wirkungen auf, wie beispielsweise erhöhte Wundheilungsaktivität, Verhinderung eines UV-induzierten Erythems oder die Inhibierung einiger Enzyme. Diese Resultate können jedoch nur bei hohen Proanthocyanidinkonzentrationen nachgewiesen werden, die in dieser Menge nicht in *Aesculus*-Extrakten enthalten sind.

Eine weitere Wirkung der *Aesculus*-Extrakte stellt die Inhibierung der Angiogenese sowie der Matrix-Metalloproteinase dar (Kim, 2003). Die Angiogenese ist die Neubildung von Blutgefäßen, die an einigen pathologischen Vorgängen beteiligt ist. Einige Beispiele sind Psoriasis, Dermatitis, diabetische Retinopathie, Arteriosklerose oder chronische Entzündungskrankheiten wie Arthritis. Die Angiogenese ist bei der Metastasierung und dem Wachstum von Tumorzellen essentiell, da nur neue Blutgefäße ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe für die schnell wachsenden Zellen bereitstellen können. Es müssen jedoch nicht nur pathologische Vorgänge an der Angiogenese beteiligt sein, denn auch der Abbau extrazellulärer Matrix erfordert die Neubildung von Blutgefäßen. Das wichtigste Enzym ist dabei die Matrix-Metalloproteinase. Pathologische Vorgänge, wie Entzündungen des Zentralnervensystems, Alzheimer, Knochenerkrankungen, Leberfibrose oder Parodontose, können die Expression oder Aktivität des Enzyms steigern. Die Hemmwirkung der Roskastanien-samenextrakte auf die Angiogenese und die Matrix-Metalloproteinase könnten der Anfang neuer Therapiemöglichkeiten sein. Aufgrund der langen Therapiedauer dieser Erkrankungen ist es wichtig, dass die Inhibitoren keine toxischen Wirkungen aufweisen, was bei *Aesculus*-Extrakten bereits belegt ist.

4. ANALYTIK DER DROGENINHALTSSTOFFE

4.1 Analytik der Inhaltsstoffe von *Harpagophytum procumbens*

Die Identifizierung und Quantifizierung von Harpagosid kann nach Ph. Eur. 5 erfolgen. Die qualitative Auftrennung der Extrakte wird mittels Dünnschichtchromatographie und die quantitative Analyse mit Hilfe der HPLC durchgeführt. Die HPLC-Methode beruht auf der von Sticher und Meier (1980) beschriebenen isokratischen HPLC-Analytik mit einem Fließmittel, bestehend aus Methanol/Wasser (1/1, V/V). Zur Quantifizierung anderer Extraktivstoffe, außer Harpagosid, muss auf eine HPLC mit Gradientenprofil zurückgegriffen werden. Guillerault et al. (1994) quantifizieren Coumaroyl-Harpagid und Harpagid neben Harpagosid in *Harpagophytum* Extrakten. Sie verwenden als Fließmittel ebenfalls Wasser/Methanol, gehen dabei aber von einer Methanolkonzentration von 15 % anstelle von 50 % aus. Falls harpagosidhaltige Extrakte komplexer werden, wie beispielsweise von *Scrophularia scorodonia*, liefern die bisher beschriebenen HPLC-Methoden unzureichende Ergebnisse (Diaz et al., 1998). Das Gradientenprofil des Fließmittels Wasser/ Methanol wird komplexer, wobei eine bessere Auftrennung der Extraktbestandteile resultiert.

Um die Iridoide Harpagosid und Harpagid im Extrakt zu bestimmen, haben Vanhaelen et al. (1981) eine gaschromatographische Analysenmethode (GC) entwickelt. Dabei wird zuerst Harpagid quantifiziert. Im zweiten Analysenschritt wird der Extrakt unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert, um Harpagosid in seine Bestandteile Harpagid und Zimtsäure zu spalten. Daraus wird der gesamte Harpagidgehalt bestimmt, so dass anschließend der Harpagosidgehalt berechnet werden kann. Ein Vergleich mit HPLC-Methoden zeigt keinen Unterschied des Harpagosidgehaltes zu der GC-Analytik.

Poukens-Renwart et al. (1996) entwickeln eine dünnschichtchromatographische Quantifizierungsmethode für Harpagosid. Ein methanolischer Auszug der Teufelskralle wird mit Dichlormethan/Methanol (4/1, V/V) auf einer HPTLC-Platte aufgetrennt. Anschließend wird die Platte mit Hilfe eines DC-Scanners im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 268 nm vermessen. Der Vergleich mit einer HPLC-Quantifizierung zeigt eine gute Korrelation.

4.1.1 Qualitative Dünnschichtchromatographie von Harpagosid

Die qualitative Dünnschichtchromatographie wird in Anlehnung an die Ph. Eur. 5 durchgeführt, da das Fließmittel Wasser/Methanol/Ethylacetat (8/15/77, V/V/V) eine gute Trennleistung der Extraktivstoffe erzielt. Die entwickelten HPTLC-Platten werden nach Visualisie-

rung durch Anisaldehyd-Sprühreagenz am Tageslicht ausgewertet. Die Flecken zeigen verschiedene Färbungen und können gut voneinander unterschieden werden. Die Charakterisierung erfolgt über die R_f -Werte. Als Referenzsubstanz wird Harpagosid eingesetzt. Der R_f -Wert der Referenz und der Harpagosidbande im Extrakt stimmen überein. CO_2 -Extrakte, die mit 26 % Ethanol als Schleppmittel hergestellt werden, enthalten alle in Tab. 4-1, aufgeführten Substanzen. Der Handelsextrakt ist frei von Acteosid und lipophilen Substanzen, während alle anderen Extraktivstoffe in deutlich geringeren Mengen vorkommen (Abb. 5-7). Der Handelsextrakt weist jedoch kräftige grüne Zuckerbanden an der Starlinie auf, die in CO_2 -Extrakten schwach ausgeprägt sind oder fehlen. Zur Identifizierung der Zucker wird eine DC, wie in Kap. 4.1.2. beschrieben, durchgeführt.

4.1.2 Qualitative Dünnschichtchromatographie der Zucker

Die Identifizierung der Kohlenhydrate wird analog der Monographie „Saccharose“ der Ph. Eur. 4 durchgeführt. Die resultierenden R_f -Werte sind in Tab. 4-1, aufgelistet.

Tab. 4-1 *R_f -Werte der Substanzen in der qualitativen Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung der Extraktivstoffe in Harpagophytum Extrakten*

DC nach 4.1.1	R_f -Werte	DC nach 4.1.2	R_f -Werte
Saccharose	0,05	Stachyose	0,09
Harpagid	0,13	Raffinose	0,16
2-Phenyl- ethylderivat	0,25	Saccharose	0,26
Harpagosid	0,35	Galaktose	0,31
Acteosid	0,38	Glucose	0,34
lipophile Substanzen	0,5 0,81	Fructose	0,36

Alle angeführten Referenzsubstanzen werden sowohl mit einem Handelsextrakt als auch einem CO_2 -Extrakt verglichen. Alle CO_2 -Extrakte enthalten in geringen Mengen Saccharose, während unterkritische Extrakte zusätzlich kleinste Mengen Raffinose und Stachyose aufweisen. Im Gegensatz dazu besteht der Handelsextrakt fast ausschließlich aus unterschiedlichen Zuckern. Hauptbestandteil ist das Tetrasaccharid Stachyose, gefolgt von gleichen Anteilen Raffinose und Saccharose. Des weiteren sind in geringen Mengen Fructose, Glucose und Galaktose enthalten.

4.1.3 Identifizierung der Inhaltsstoffe mittels LC-MS

Die HPLC-MS Analyse eines CO₂-Extraktes ermöglicht die Zuordnung der Extraktbestandteile zu den Peaks des Chromatogramms (Abb. 4-1).

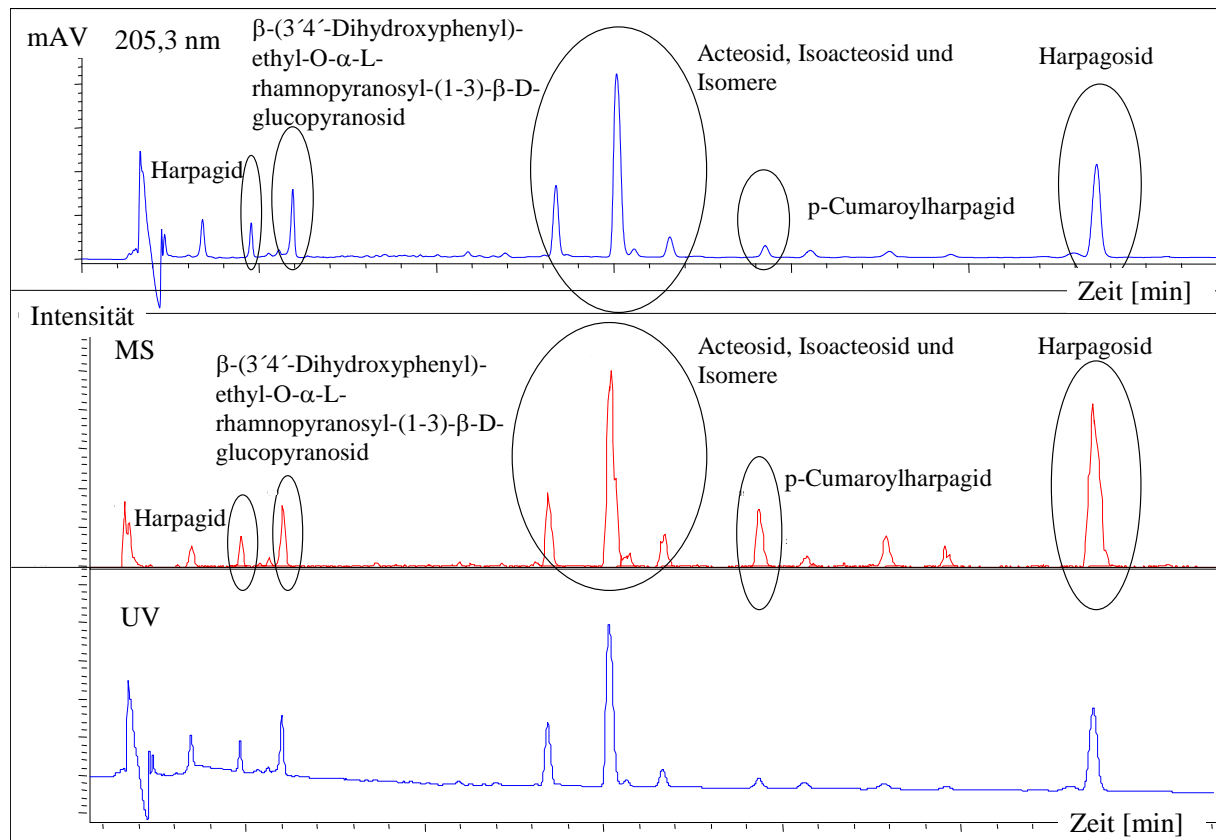


Abb. 4-1 HPLC- und HPLC-MS-Chromatogramm eines CO₂-Extraktes unter Zuordnung der Peaks zu den Extraktivstoffen mit Hilfe der MS-Daten.

Mit Hilfe der MS-Daten (Kap. 11.1) können die HPLC-Peaks den Teufelskrallenextraktbestandteilen zugeordnet werden. Anhand der Retentionszeiten, die die Substanzen im HPLC-Chromatogramm aufweisen, werden die Banden der dünn-schichtchromatographischen (DC) Auftrennung den Extraktbestandteilen zugeordnet (Abb. 5-7). Zusätzlich muss die Anfärbung der DC-Banden beachtet werden, da sich Substanzen mit demselben Struktur-Grundgerüst gleich färben.

4.1.4 Quantitative Bestimmung von Harpagosid mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die quantitative Bestimmung von Harpagosid aus der Teufelskrallenwurzel oder Zubereitungen daraus, wird nach der HPLC-Methode der Ph. Eur. 5 mit folgender Änderung durchgeführt. Bei der Probenaufbereitung mit Methanol als Lösungsmittel fallen die lipophilen Bestandteile nach der Injektion in das HPLC-System, bei Kontakt mit dem Fließmittel aus und verschmutzen die Vorsäule. Aus diesem Grund werden die Proben in Fließmittel, das aus

Methanol/Wasser (1/1, V/V) besteht, gelöst. Dadurch bleiben die lipophilen Bestandteile als unlöslicher Rückstand in der Probenlösung zurück. Der Rückstand wird, vor Einspritzen der Probe in das HPLC-System, mit einem 0,2 µm Filter abfiltriert.

Ein HPLC-Chromatogramm eines CO₂-Extraktes ist in Abb. 4-2 dargestellt. Harpagosid erscheint basisliniengetrennt von anderen Begleitstoffen bei einer Retentionszeit von 9,5 min.

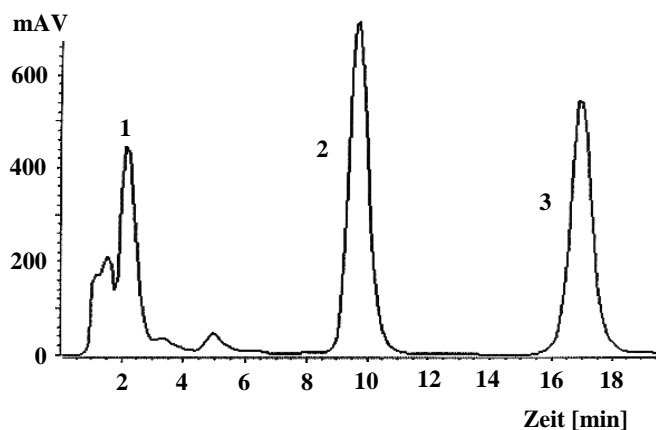


Abb. 4-2 HPLC-Chromatogramm eines Harpagophytum-CO₂-Extraktes;
1 - hydrophile Bestandteile, 2 - Harpagosid, 3 - Methylcinnamat

Tabelle 4-2 enthält die Kalibrierdaten. Die Kalibriergerade wird durch lineare Regression nach der Methode der Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate ermittelt (Gottwald, 2000). Abb. 4-3 zeigt die Kalibriergerade inklusive des 95%igen Vertrauensbereichs, der um Faktor 10 aufgeweitet ist. Er repräsentiert die Unsicherheit des Datenschwerpunktes in y-Richtung sowie die Steigung der Kalibriergeraden. Die Güte der Kalibrierung wird anhand des Residuenplots beurteilt (Abb. 4-4).

Im Rahmen der Validierung der analytischen Methode werden unterschiedliche Parameter nach den Anforderungen der USP 28 bestimmt: Spezifität, Richtigkeit, System- und Methodenpräzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität und Arbeitsbereich. Diese Anforderungen sind deckungsgleich mit den ICH-Guidelines „Validation of analytical procedures“ (ICH Q2A, 1994) und „Validation of analytical procedures: methodology“ (ICH Q2B, 1994).

Die Prüfung auf Spezifität identifiziert den Analyten zweifelsfrei von anderen Komponenten. Dazu wird die Identität durch Vergleich der Retentionszeit mit der Referenzsubstanz Harpagosid erbracht. Zusätzlich wird die Peakreinheit über den Match-Faktor, der durch den Dioden-Array Detektor bestimmt wird, gemessen. Ein Peak ist absolut rein, wenn der Ver-

gleich mit der Referenzsubstanz einen Match-Faktor von 1000 ergibt (Tab. 4-3). Die Richtigkeit der Methode beschreibt den Grad der Übereinstimmung der gemessenen mit den wahren Werten. Die Bestimmung erfolgt mittels der Wiederfindungsrate. Diese wird durch Zudosieren unterschiedlicher Mengen Harpagosid-Standardlösung zu einer Extrakt-Probenlösung bestimmt. Die Ergebnisse (Tab 4-3) zeigen, dass Harpagosid bei dieser Analytik zu jeweils 100 % wieder gefunden werden kann. Die Systempräzision gibt die zufälligen Fehler durch sechsmalige Injektion derselben Extraktprobenlösung an. Die ermittelte niedrige relative Standardabweichung signalisiert, dass ein zufälliger Fehler durch Injektion ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz dazu umfasst die Methodenpräzision den gesamten Vorgang der Probenaufbereitung. Ein CO₂-Extrakt wird sechsmal unter gleichen Bedingungen hergestellt. Die sechs Extraktproben werden nach dem gleichen Verfahren aufbereitet und jeweils dreimal in das HPLC-System injiziert. Aufgrund geringer Abweichungen der ermittelten Harpagosidgehalte, kann die Analysenmethode als präzise angesehen werden. Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste Konzentration der zu messenden Substanz, die mit der geforderten Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann. Die Nachweisgrenze ist die geringste Analytkonzentration in einer Probe, die detektiert, aber nicht quantifiziert werden kann. Sowohl die Bestimmungs- als auch die Nachweisgrenze werden nach Gottwald (2000) berechnet.

Tab. 4-2 Kalibrierdaten der HPLC- und HPTLC-Gehaltsbestimmung von Harpagosid

Parameter	HPLC	HPTLC
Messbereich [mg/100 ml]	18,908 - 403,365	4,296 - 42,296
Anzahl der Konzentrationen	6	6
Zahl der Wiederholungsmessungen	6	6
Datenschwerpunkt	$\bar{x} = 196,24$ $\bar{y} = 72426,5$	$\bar{x} = 22,196$ $\bar{y} = 826,43$
Korrelationskoeffizient	0,99998	0,9977
Reststandardabweichung	309,2	28,18
Verfahrensstandardabweichung	0,8331	0,9467
relative Verfahrensstandardabweichung	0,42 %	4,27 %
Kalibrierfunktion	$f(x) = 371,14x - 406,56$	$f(x) = -0,432x^2 + 48,93x + 33,819$

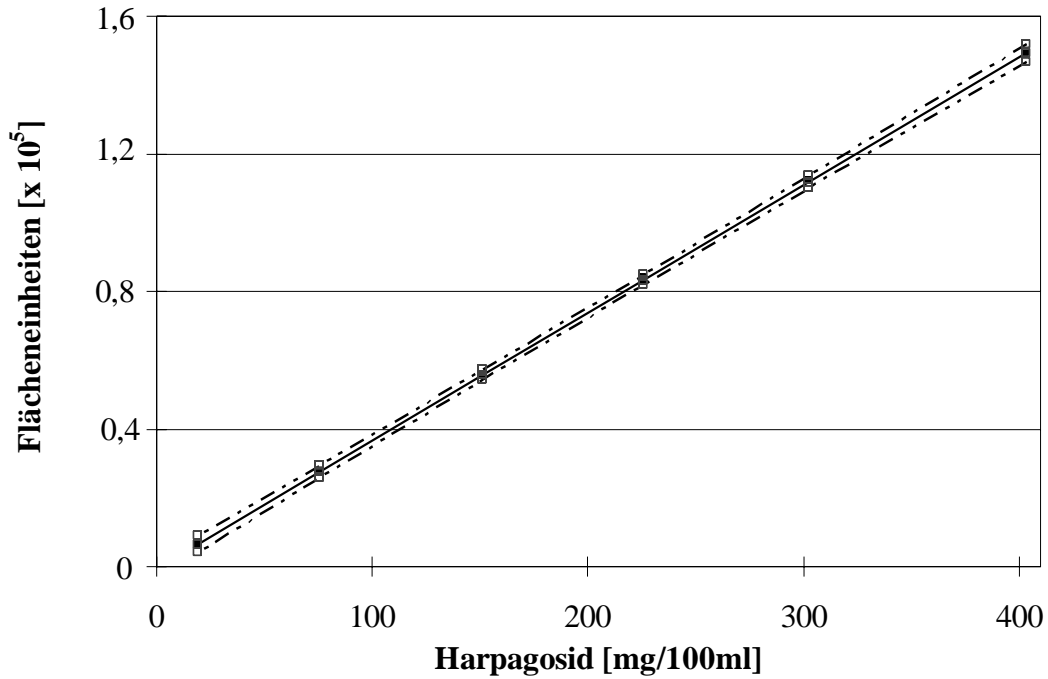


Abb. 4-3 HPLC-Kalibriergerade für Harpagosid; □ Messwerte, — Regressionsgerade, --- 95 % Konfidenzintervall (10fach aufgeweitet)

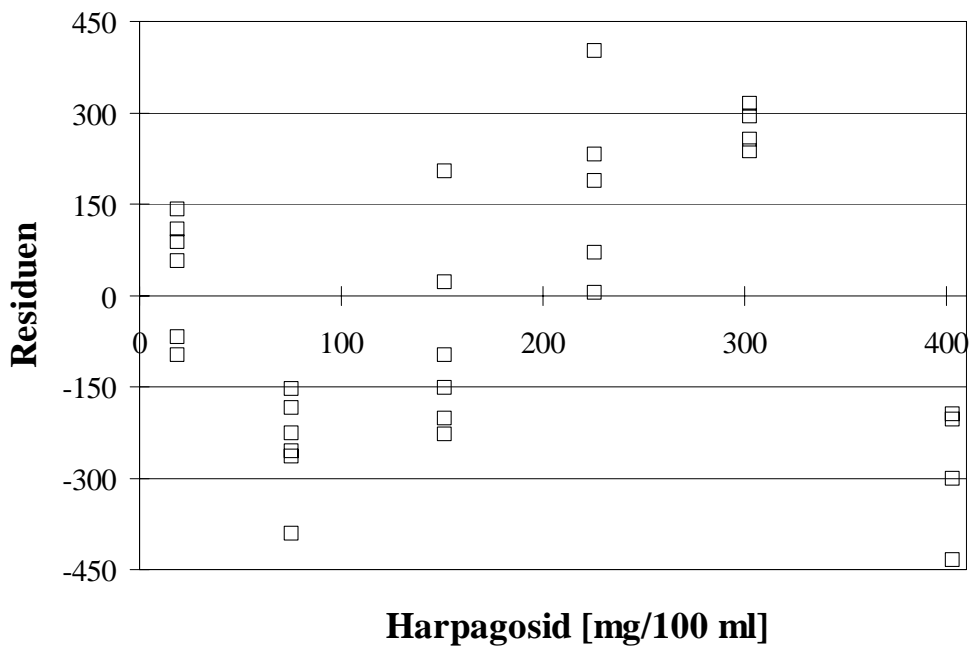


Abb. 4-4 Residuenplot der HPLC-Kalibrierung von Harpagosid

Sämtliche Ergebnisse der Validierung für die quantitative Bestimmung von Harpagosid mittels HPLC gibt Tab. 4-3 wieder. Die Rohdaten der Kalibrierung und Validierung sind in Kap. 11.2 zusammengestellt.

Tab. 4-3 Statistische Daten zur Validierung der HPLC-Methode von Harpagosid

Parameter	Soll-Gehalt [%]	Konzentration [mg/100 ml]	rel. Standardabweichung [%]	Wiederfindungsrate [%]
Systempräzision		228,24 (n = 6)	0,91	
Methodenpräzision		ca. 292 (n = 18)	1,81	
Wiederfindung	90,00	103,71	2,42	98,56
	111,08	129,49	0,65	99,71
	122,15	145,71	0,33	102,03
Bestimmungsgrenze		3,075		
Nachweisgrenze		0,865		
Reinheit	Match-Faktor: 1000			

4.1.5 Quantitative Bestimmung von Harpagosid mittels Dünnschichtchromatographie

Die Quantifizierung von Harpagosid wird zusätzlich mittels HPTLC durchgeführt, um die Probenvorbereitung, die bei der HPLC-Analytik anfällt, zu vereinfachen und die Analysenzeit zu verkürzen. Die HPTLC-Densitometrie bietet sich an, da die lipophilen Inhaltsstoffe, die in CO₂-Extrakten enthalten sind, zusammen mit dem Fließmittel bis zur Fließmittelfront laufen. Die Probe kann direkt in Methanol gelöst und unfiltriert verwendet werden, da die lipophilen Begleitstoffe keine störenden Effekte auf die quantitative Bestimmung von Harpagosid ausüben.

Die Durchführung der HPTLC-Densitometrie erfolgt analog der qualitativen DC, da sowohl Fließmittel als auch Tauchreagenz in diesem Zuge optimiert wurden. Die Vermessung der HPTLC-Platte erfolgt mittels eines DC-Scanners, der mit 50 identischen Lichtleitern ausgestattet ist. Die Lichtleiter transportieren Licht verschiedener Wellenlänge von der Lichtquelle zur HPTLC-Platte und wieder zurück zum Dioden-Array Detektor. Eine genaue Beschreibung des Scanners kann Spangenberg et al. (2000, 2002) entnommen werden. Ein Densitogramm eines CO₂-Extraktes ist in Abb. 4-5 dargestellt.

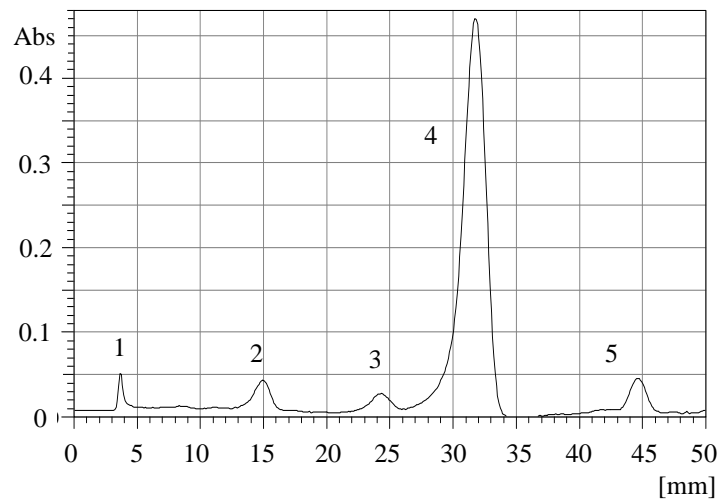


Abb. 4-5 HPTLC-Densitogramm eines Harpagophytum- CO_2 -Extraktes; 1-Zucker, 2-Harpagid, 3-2-Phenylethylderivat, 4-Harpagosid, 5-lipophile Bestandteile

Die Kalibrierung des Systems führt zu einer polynomischen Kalibrierfunktion (Abb. 4-6). Die Berechnung der Kalibrierdaten (Tab. 4-2, S. 30) erfolgt nach Gottwald (2000) und Sachs (2000). Der zugehörige Residuenplot ist in Abb. 4-7 dargestellt. Auf jede HPTLC-Platte werden mehrere Standardkonzentrationen alternierend zu den Extraktproben aufgetragen. Daraus wird für jede Platte eine individuelle Kalibrierung erstellt, um die Unterschiede, die die einzelnen Platten aufweisen können, zu eliminieren. Die internen Plattenkalibrierungen stimmen mit der zuvor durchgeführten Methodenkalibrierung überein.

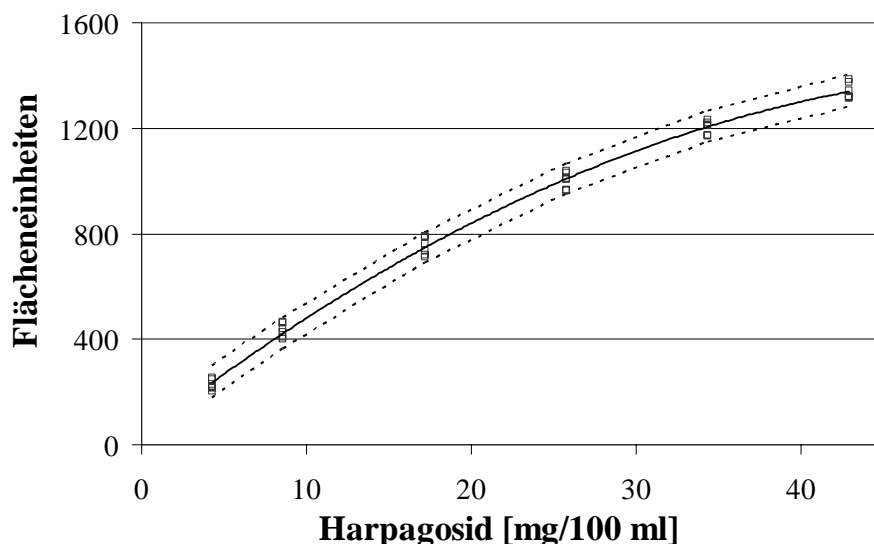


Abb. 4-6 HPLC-Kalibrierung für Harpagosid; \square Messwerte ($n = 6$), — Regressionsgerade, 95 % Konfidenzintervall (10fach aufgeweitet)

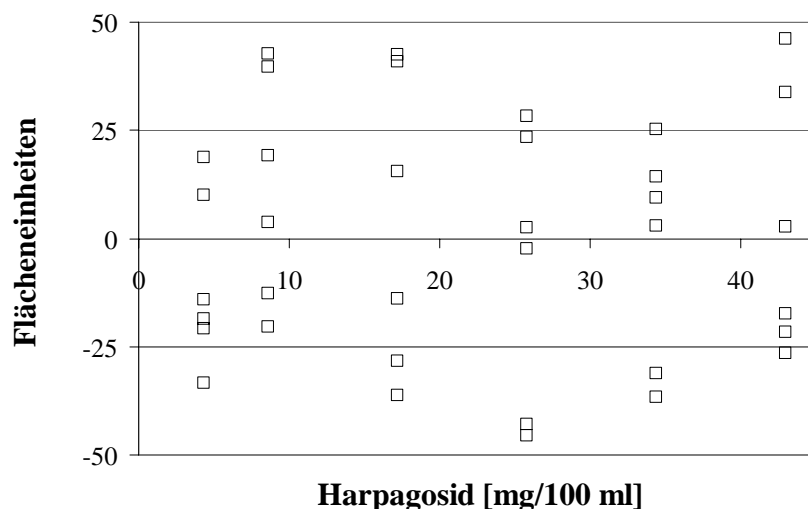


Abb. 4-7 Residuenplot der HPTLC-Kalibrierung von Harpagosid

Die Validierung dieser Methode wird, wie in Kap. 4.1.4 beschrieben, durchgeführt. Die statistischen Daten sind in Tab. 4-4 zusammengestellt und die Rohdaten können aus Kap. 11.3 entnommen werden.

Tab. 4-4 Statistische Daten zur Validierung der HPTLC-Methode von Harpagosid

Parameter	Soll-Gehalt [%]	Konzentration [mg/100 ml]	rel. Standardabweichung [%]	Wiederfindungsrate [%]
Systempräzision		14,98 (n = 6)	1,91	
Methodenpräzision		ca. 18 (n = 18)	3,4	
Wiederfindung	90,00	15,73	1,94	101,48
	110,00	18,70	1,30	98,89
	120,00	20,24	1,72	98,12
Bestimmungsgrenze		8,748		
Nachweisgrenze		2,593		
Reinheit	Match-Faktor: 968			

4.1.6 Vergleich der quantitativen Bestimmungsmethoden

Fünfzehn unterschiedlich hergestellte CO₂-Extrakte werden auf ihren Harpagosidgehalt untersucht. Dazu wird sowohl die HPTLC- als auch die HPLC-Methode herangezogen. Da die Ergebnisse der HPTLC-Bestimmung, im Vergleich zu den Daten der HPLC-Bestimmung, tendenziell geringere Werte ergeben (Abb. 4-8), werden beide Methoden auf statistische

Signifikanz untersucht. Der F- und t-Test auf einem Signifikanzniveau von 99 % zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied beider Analysenmethoden. Demzufolge können beide Quantifizierungsmethoden als gleichwertig angesehen und für die Routineanalytik eingesetzt werden.

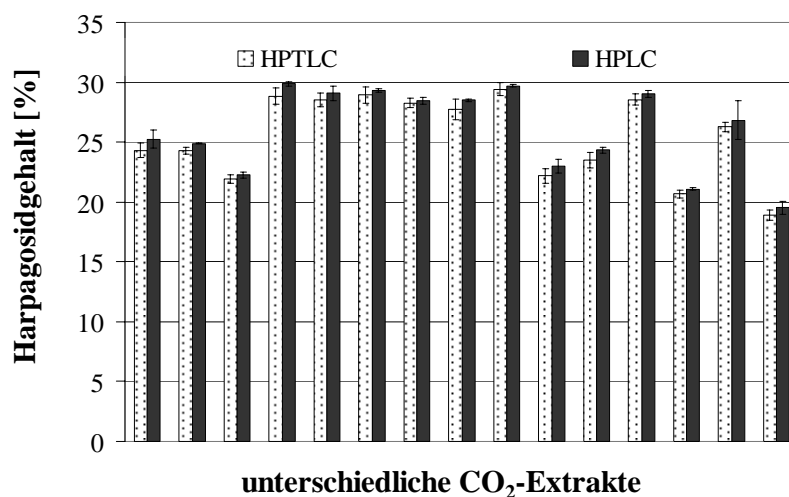


Abb. 4-8 Vergleich der quantitativen Ergebnisse der HPLC- und der HPTLC-Analytik unterschiedlich hergestellter CO₂-Extrakte

Die Gleichwertigkeit der quantitativen HPLC- und HPTLC Bestimmung gilt nicht nur für Extrakte von *Harpagophytum procumbens*, sondern wird in der Literatur auch für Extrakte aus *Caulophyllum thalictroides* (Woldemariam et al., 1997), *Malva Silvestris* (Farina et al., 1995) und *Aesculus hippocastanum* (Kockar et al., 1994) beschrieben. Die HPTLC-Densitometrie ist für komplexe Proben, wie beispielsweise Pflanzenextrakte, eine geeignete Analysenmethode, da sie einfach und schnell durchführbar ist und zugleich präzise Ergebnisse liefert. Dies gilt auch für den Nachweis von Verunreinigungen (Tomankova und Sabartova, 1990a) sowie geringer Mengen von Abbauprodukten (El-Gindy et al., 2001; Tomankova und Sabartova, 1990b) synthetischer Substanzen.

4.1.7 Zusammenfassung

Die pharmakologisch interessanten Inhaltsstoffe der *Harpagophytum* Extrakte können durch dünnschichtchromatographische Trennung qualitativ erfasst werden. Um die enthaltenen, sehr polaren Kohlenhydrate identifizieren zu können, muss auf eine andere DC-Methode zurückgegriffen werden. Die Leitsubstanz Harpagosid lässt sich durch zwei verschiedene Verfahren quantifizieren. Die HPLC Methode, die auf der Vorschrift der Ph. Eur. 5 beruht, muss aufgrund der Extraktzusammensetzung der CO₂-Extrakte modifiziert werden. Die Optimierung der Probenaufbereitung führt zur Filtration der lipophilen Bestandteile vor Injektion in das HPLC-System. Die HPTLC-Densitometrie wird im Hinblick auf die Fließmittelzusammen-

setzung und das Tauchreagenz optimiert. Die Banden des Extraktes können mit Hilfe eines DC-Scanners vermessen und quantifiziert werden. Der Vergleich der Ergebnisse beider analytischer Methoden zeigt, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Verfahren besteht.

4.2 Analytik der Inhaltsstoffe von *Aesculus hippocastanum*

Die Identitätsprüfung von Hippocastani semen erfolgt nach DAB (2004) mittels Dünnschichtchromatographie, die mit der Oberphase der Mischung Eisessig/Wasser/1-Butanol (10/40/50, V/V/V) als Fließmittel durchgeführt wird. Da die Zusammensetzung der Oberphase temperaturabhängig ist, erscheint dieses Fließmittel für quantitative Bestimmungen wenig geeignet. Zur quantitativen Bestimmung des Aescins wird nach DAB (2004) eine kolorimetrische Methode mit Eisen-III-chlorid als Farbreagenz eingesetzt, die eine quantitative Abtrennung polarer Begleitstoffe erfordert. Dies führt zu aufwendigen Reinigungsschritten. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit zahlreiche Versuche unternommen, die Inhaltsstoffe von *Aesculus hippocastanum* durch andere Verfahren zu quantifizieren. Wagner et al. (1985) beschreiben eine isokratische HPLC-Methode mit 35 % Acetonitril/Wasser und einem Zusatz von 1 % Phosphorsäure als Fließmittel. Um eine gute Trennung der Extraktivstoffe zu erzielen, ist eine Vorreinigung der Extrakte erforderlich. Die Filtration durch RP18-Material gewährleistet eine ausreichende Eliminierung unerwünschter Begleitstoffe. Die resultierenden Chromatogramme stimmen zwar qualitativ gut überein, zeigen quantitativ aber Unterschiede. Diese beruhen auf unterschiedlichen Gehalten angelika- und tiglinhaltiger Saponine, die verschiedene Extinktionskoeffizienten besitzen. Um dieses Problem zu umgehen, werden die Proben einer alkalischen Hydrolyse unterzogen und über RP18-Material gereinigt. Die resultierende Analysenlösung wird in einem HPLC-System mit Acetonitril/Wasser/Phosphorsäure als Fließmittel und einem Gradientenprogramm quantifiziert. Burnouf-Radosevich und Delfel (1986) beschreiben eine HPLC Quantifizierung von Triterpensaponinen ohne vorherige Derivatisierung. Ein Zusatz von TFA (Trifluoressigsäure) vermeidet die Ionisation der Saponincarboxylgruppe, so dass eine Peakverbreiterung (Tailing) verhindert wird. Das verwendete Gradientenprofil ermöglicht eine höhere Selektivität im RP-System. Pietta et al. (1989) entwickeln eine isokratische Methode mit einem Fließmittel vom pH-Wert 3,5, das aus Acetonitril/Wasser/20%ige Phosphorsäure (33,5/66,5/0,1, V/V/V) besteht. Der niedrige pH-Wert verhindert das Tailing der Peaks, so dass die Hauptsaponine im Extrakt der Rosskastanie gut basisliniengetrennt quantifiziert werden können. Eine Optimierung der zu verwendenden HPLC-Säule wird von Apers et al. (2000) durchgeführt. Die Untersuchung verschiedener

Säulen mit unterschiedlichen Fließmitteln zeigt eine deutliche Verbesserung der Peakschärfe durch Verwendung einer Säule, die zwischen der Silica- und der RP-Schicht eine weitere hydrophile Schicht besitzt. Diese Zwischenschicht geht Interaktionen mit hydrophilen Substanzen ein, so dass die Trennschärfe der Peaks deutlich verbessert wird.

Die HPTLC-Densitometrie von Saponinen wird bereits 1975 von Franck beschrieben. Die Untersuchung mit butanolhaltigem Fließmittel umfasst ausschließlich eine Variation verschiedener Detektionsreagenzien. Glasl und Ihrig (1984) verwenden das butanolhaltige Fließmittel des DAB. Die Detektion erfolgt mit konzentrierter Schwefelsäure bei 110 °C. Nach der densitometrischen Vermessung der DC-Platte zeigen die Ergebnisse keine Unterschiede zur kolorimetrischen Methode. Renger (1990) verwendet zur HPTLC-Densitometrie der *Aesculus*-Saponine n-Propanol/Ethylacetat/Wasser (4/3/3, V/V/V) als Fließmittel. Nach der Entwicklung wird die Platte in einer methanolischen Eisen-III-chlorid-Lösung getaucht. Eine Variation dieses Verfahrens stellt die Vermessung der HPTLC-Platte ohne vorangehende chemische Derivatisierung dar. Direkt nach der Entwicklung wird die HPTLC-Platte bei 212 nm vermessen (Costantini, 1999). Fließmittel, die Chlorkohlenstoffe enthalten, zeigen eine gute Trennung des Aescins von anderen Begleitstoffen. Während Vanhaelen und Vanhaelen-Fastre (1983) mit 1,2-Dichlorethan/Ethanol/Methanol/Wasser (50/20/20/6, V/V/V/V) arbeiten, verwenden Uberti et al. (1989) Chloroform/Methanol/ Wasser (64/50/10, V/V/V). Die Tauchreagenzien sind leicht unterschiedlich zusammengesetzt, wobei beide Vanillin/Schwefelsäure enthalten. Aescin kann mittels dieser Methoden identifiziert und mit hoher Präzision quantifiziert werden. Aufgrund der hohen Genauigkeit HPTLC-densitometrischer Verfahren, wird im Folgenden der Aescingehalt der CO₂-Extrakte mit Hilfe einer HPTLC-Methode ermittelt.

4.2.1 Qualitative Dünnschichtchromatographie von Aescin

Die qualitative DC wird mit Chloroform/Methanol/Wasser (64/50/10, V/V/V) als Fließmittel durchgeführt. Dieses Fließmittel weist eine gute Trennung der Extraktbestandteile auf, wobei sich das Aescingemisch nicht in seine Einzelbestandteile auftrennt (Abb. 5-14). Das Detektionsreagenz Vanillin/Schwefelsäure lässt Aescin als blau-grauen Fleck erscheinen, während die anderen Extraktbestandteile überwiegend grün gefärbt sind. Durch die eindeutige Trennung kann Aescin mit Hilfe der Referenzsubstanz gut identifiziert werden. Die lipophilen Begleitsubstanzen laufen mit dem Fließmittel an die Front und weisen einen R_F-Wert von 1 auf. Weitere lipophile Substanzen findet man bei geringfügig kleineren R_F-Werten. Aescin weist einen R_F-Wert von 0,39 auf. Polarere Extraktivstoffe in hohen Konzentrationen sind bei

R_f -Werten von 0,28, 0,19 und 0,08 zu finden. Diese Substanzen sind sowohl in CO_2 -Extrakten als auch in Handelsextrakten enthalten, wobei der Handelsextrakt frei von lipophilen Substanzen ist. Dafür enthält der Handelsextrakt sehr polare Inhaltsstoffe, die einen R_f -Wert von 0,05, 0,03 und 0 besitzen. Diese Substanzen sind in CO_2 -Extrakten in vernachlässigbarer Menge oder gar nicht vorhanden.

4.2.2 Quantitative Dünnschichtchromatographie von Aescin

Die quantitative Bestimmung von Aescin erfolgt mittels HPTLC-Densitometrie. Die Methode beruht auf Arbeiten von Uberti et al. (1989) unter Modifizierung des Tauchreagenzes. Nach Lösen der Proben werden diese direkt und mit dem Standard alternierend auf die Platte aufgetragen. Die Standardlösungen werden nach dem Vermessen zu einer internen Plattenkalibrierung benutzt, die mit der zu Beginn erstellten Methodenkalibrierung übereinstimmt.

CO_2 -Extrakte zeigen einen basisliniengetrenten Aescin-Peak im Densitogramm (Abb. 4-9), der mit hoher Reproduzierbarkeit und Präzision quantifiziert werden kann.

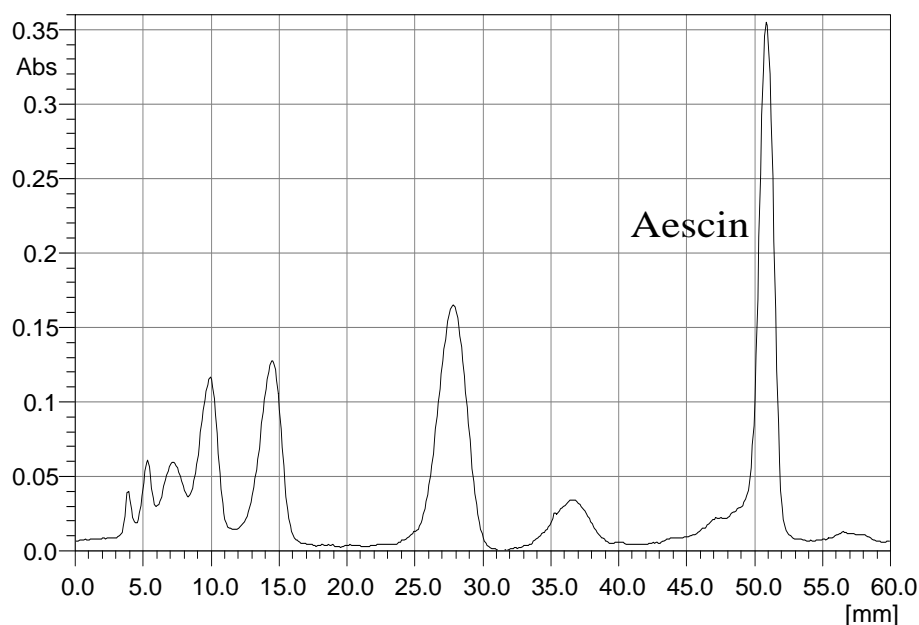


Abb. 4-9 HPTLC-Densitogramm eines *Aesculus*- CO_2 -Extraktes.

Die Methodenkalibrierung der HPTLC-Densitometrie von Aescin erfolgt mit Hilfe einer Aescin-Referenzsubstanz, deren Konzentration in der Lösung gegen die resultierenden Peakflächen aufgetragen wird. Die Kalibrierfunktion ist in Abb. 4-10 und der zugehörige Residuenplot in Abb. 4-11 dargestellt.

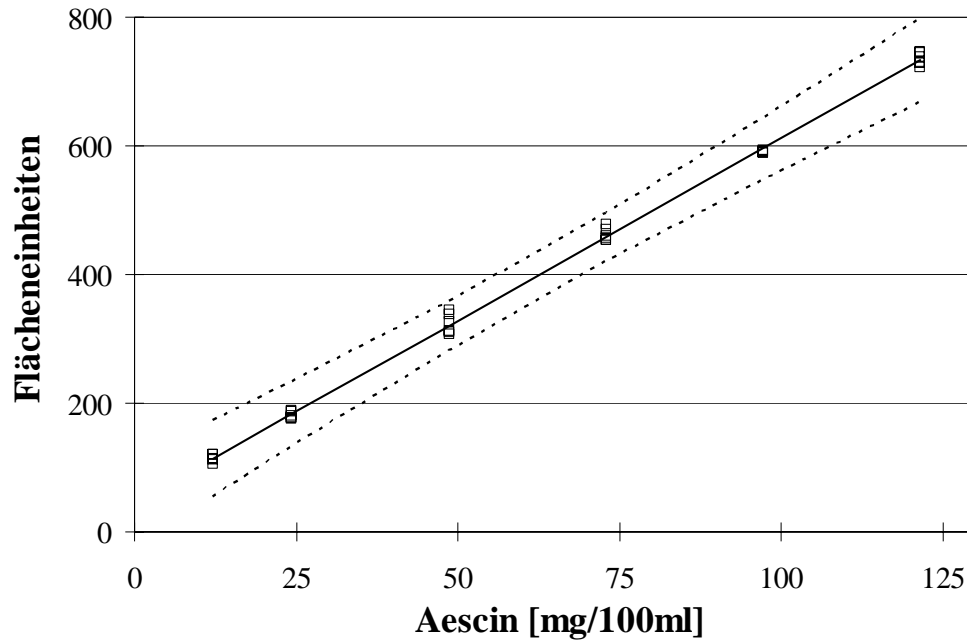


Abb. 4-10 HPTLC-Kalibriergerade für Aescin; □ Messwerte, — Regressionsgerade, 95 % Konfidenzintervall (10fach aufgeweitet)

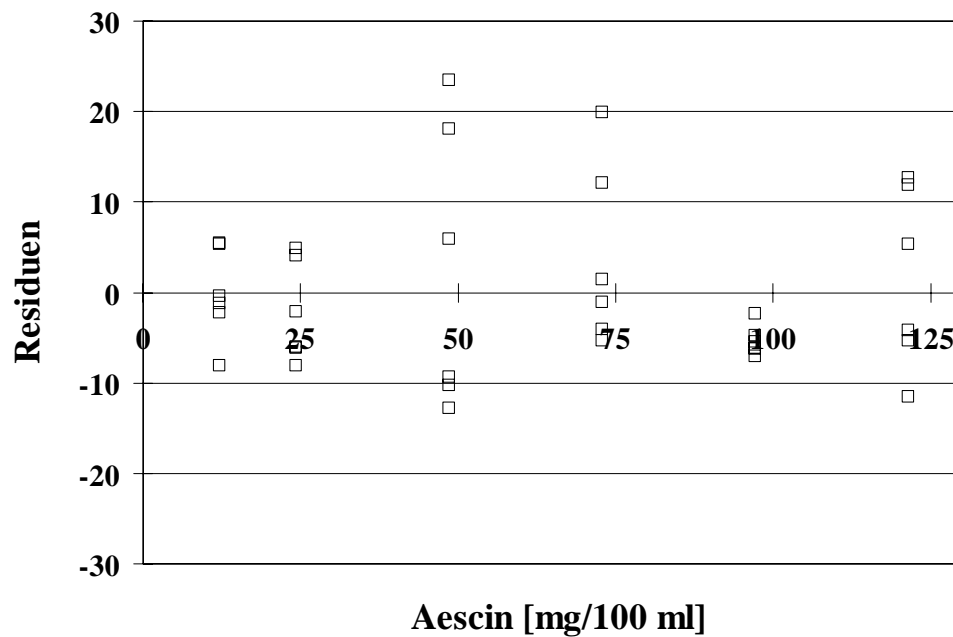


Abb. 4-11 Residuenplot der HPTLC-Kalibrierung von Aescin

Die statistischen Daten der Methodenkalibrierung sind in Tab. 4-5 zusammengestellt, während die Rohdaten im Anhang (Kap. 11.4) eingesehen werden können.

Tab. 4-5 Kalibrierdaten der HPTLC-Gehaltsbestimmung von Aescin

Parameter	HPTLC Aescin
Messbereich [mg/100 ml]	12,15 – 121,50
Anzahl der Konzentrationen	6
Zahl der Wiederholungsmessungen	6
Datenschwerpunkt	$\bar{x} = 62,78$ $\bar{y} = 401,1$
Korrelationskoeffizient	0,9992
Reststandardabweichung	9,246
Verfahrensstandardabweichung	1,6292
relative Verfahrensstandardabweichung	2,60 %
Kalibrierfunktion	$f(x) = 5,675x + 45,201$

Die Validierung der HPTLC-densitometrischen Quantifizierungsmethode von Aescin wird, wie in Kap. 4.1.4 beschrieben, durchgeführt. Die statistischen Daten sind in Tab. 4-6 und die Rohdaten in Kap. 11.4 aufgeführt.

Tab. 4-6 Statistische Daten zur Validierung der HPTLC-Methode von Aescin

Parameter	Soll-Gehalt [%]	Konzentration [mg/100 ml]	rel. Standardabweichung [%]	Wiederfindungsrate [%]
Systempräzision		111,65 (n = 6)	0,31	
Methodenpräzision		ca. 135 (n = 18)	6,30	
Wiederfindung	90,00	47,86	1,29	100,08
	109,15	57,57	2,59	99,29
	118,30	63,47	3,22	101,00
Bestimmungsgrenze		6,022		
Nachweisgrenze		1,7142		
Reinheit	Match-Faktor: 914			

5. OPTIMIERUNG DER EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN

5.1 *Extraktionen der sekundären Wurzeln von Harpagophytum procumbens*

Handelsübliche Extrakte aus den sekundären Wurzeln der Teufelskralle werden entweder mit Wasser oder wässrig-ethanolischen Lösungen hergestellt. Die Ethanolkonzentrationen betragen 30 % (m/m), 40 % (V/V) oder 60 % (V/V), wobei letzteres das gängigste Extraktionsmittel ist. Diese durch Mazeration oder Perkolation hergestellten Extrakte erreichen einen maximalen Harpagosidgehalt von 2,5 %. Die Hauptbestandteile des Extraktes sind Kohlenhydrate, wie zum Beispiel Stachyose oder Raffinose.

Eine Erhöhung des Harpagosidgehaltes kann Chrubasik (1996) erreichen. Ein Extrakt, hergestellt mit heißem Wasser, wird über ein nicht-ionogenes Adsorptionsharz, wie beispielsweise Polyethylen, Polypropylen oder Divinylbenzol-Styrol, geleitet. Die wirksamen Bestandteile werden am Harz adsorbiert, das zunächst mit Wasser gewaschen wird. Der Durchlauf, der verschiedene Zucker und Mineralien enthält, wird verworfen. Die gebundenen Wirkstoffe werden durch Behandlung mit Ethanol oder Methanol von der Harzphase eluiert. Der mit wirksamen Bestandteilen angereicherte alkoholische Extrakt wird bei vermindertem Druck und Temperaturen unter 30 °C vom Lösungsmittel befreit. Die anschließende Trocknung erfolgt mittels Lyophilisation. Durch diese Herstellungsmethode kann ein Droge-Extrakt-Verhältnis von 20:1 bei einem Harpagosidgehalt von 20 % erreicht werden.

Eine weitere Optimierung wird von Stumpf et al. (1997) beschrieben. Die gemahlene Droge wird mit 20%igem Ethanol versetzt und der resultierende Extrakt wird durch Abdampfen des Lösungsmittels aufkonzentriert. Das Konzentrat wird mit unverdünntem Ethanol oder anderen kurzkettigen (C₁-C₄) Alkoholen oder Ketonen bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fällt ein überwiegend aus Kohlenhydraten bestehender Niederschlag aus, der abgetrennt und verworfen wird. Die überstehende klare Lösung, die antiphlogistische Eigenschaft besitzt, wird getrocknet und enthält mindestens 5 % Harpagosid.

Eine Extraktion mit überkritischem CO₂ liefert Extrakte mit einem Harpagosidgehalt bis zu 10 % (Wheatley et al., 1998). Geschnittene Droge wird bei einem CO₂-Massenfluss von 2 ml/min mit einem Gemisch aus überkritischem CO₂ und 10 % (m/m) Ethanol als Schleppmittel extrahiert. Die Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Schleppmittelkonzentrationen zeigt, dass die höchste untersuchte Konzentration von 10 % die größte Harpagosidausbeute liefert. Der optimale Extraktionsdruck liegt bei 276 bar und einer Temperatur von 41 °C.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der mit unterschiedlichen Verfahren erzielte Harpagosidgehalt in Extrakten bisher bei maximal bei 5-10 % liegt.

5.1.1 Untersuchung des Einflusses verschiedener Extraktionsbedingungen

Ziel der Optimierung der Extraktionsparameter ist eine Anreicherung der wirksamkeitsbestimmenden Substanzen im Extrakt. Im Falle von *Harpagophytum procumbens* handelt es sich dabei um die Leitsubstanz Harpagosid. Des weiteren ist für eine gute pharmakologische Wirkung die chemische Gesamtzusammensetzung des Extraktes wichtig, die mittels fraktionierter CO₂-Extraktion erreicht wird. Das Extraktionsverfahren besteht aus einer Vorextraktion und einer Hauptextraktion. Die Vorextraktion dient dazu, unerwünschte Substanzen, die sich in der Droge befinden, zu entfernen. Der anschließende Extraktionsschritt liefert den Hauptextrakt, der mit pharmakologisch wirksamen Substanzen angereichert ist. Dabei wird der Extrakt im Hinblick auf den relativen und absoluten Harpagosidgehalt optimiert. Der relative Gehalt bezieht sich prozentual auf die Extraktausbeute. Der absolute Gehalt gibt die gesamte Menge Harpagosid an, die extrahiert wird.

Sowohl die Vor- als auch die Hauptextraktion unterliegen dem Einfluss mehrerer Extraktionsparameter, wie Druck, Temperatur, Schlepptmittelart sowie der Schlepptmittelkonzentration. Eine weitere wichtige Einflussgröße ist das Phasengebiet, in dem die Extraktion durchgeführt wird, das heißt, ob sich das CO₂/Schlepptmittelgemisch im überkritischen oder unterkritischen Zustand befindet. Weiterhin beeinflusst die Partikelgröße der Droge die Extraktion und die Extraktausbeute. Die genannten Einflussgrößen werden im Folgenden, wenn nichts anderes angegeben ist, mit 220 g pulverisierter, granulierter Teufelskrallenwurzel untersucht (Kap. 5.1.2).

5.1.1.1 Vorextraktion

Die Vorextraktion dient der Entfernung lipophiler Bestandteile. Da die lipophilen Substanzen als unwirksam gelten, sollen sie möglichst quantitativ im Vorextraktionsschritt eliminiert werden.

Die Extraktionen können sowohl im überkritischen als auch im unterkritischen Bereich durchgeführt werden. Der unterkritische Bereich besteht aus einer gasförmigen CO₂/Schlepptmittel-Phase, deren Hauptbestandteil CO₂ ist. Die flüssige Schlepptmittel/CO₂-Phase besteht größtenteils aus flüssigem Schlepptmittel (Kap. 2.2.2). In Summe betrachtet, ist das unterkritische Phasengebiet, selbst bei Einsatz lipophiler Schlepptmittel, durch die flüssige Komponente zu hydrophil, um die unerwünschten lipophilen Substanzen vollständig aus der

Teufelskrallenwurzel zu entfernen. Demzufolge werden alle weiteren Vorextraktionen im überkritischen Bereich durchgeführt.

Einfluss des Schleppmittels

Vorextraktionen mit reinem überkritischem CO₂ führen zur alleinigen Isolierung lipophiler Bestandteile. Polarere Substanzen, wie die Leitsubstanz Harpagosid, werden nicht mitextrahiert (Abb. 5-1, Bande 1). Reine CO₂-Extraktionen über zwei beziehungsweise fünf Stunden reichen nicht aus, um die lipophilen Substanzen vollständig herauszulösen. Aus diesem Grunde muss die Elutionskraft des Extraktionsmittels erhöht werden, damit die Menge extrahierter lipophiler Bestandteile ansteigt. Die höhere Elutionskraft erreicht man durch Zusatz von Schleppmitteln. Das Schleppmittel sollte lipophilen Charakter haben, so dass n-Butanol, n-Propanol und zum Vergleich auch das polare Ethanol verwendet werden. Alle drei Schleppmittel werden in unterschiedlichen Mengen und Konzentrationen dem überkritischen CO₂ zugesetzt. Um den während der Vorextraktion auftretenden „Verlust“ an wertbestimmenden Inhaltsstoffen zu erfassen, wird der Harpagosidgehalt der Vorextrakte bestimmt. Die Versuchsbedingungen und die Ergebnisse sind in Tab. 5-1 angegeben.

Tab. 5-1 Schleppmittelkonzentration unterschiedlicher Vorextraktionen im überkritischen Bereich (200 bar/40 °C) bei einem CO₂-Massenfluss von 8 kg·h⁻¹

Schleppmittel	Menge	Zudosierungs- geschwindigkeit	Konzentration im Extraktionsmittel	Harpagosidgehalt im Vorextrakt
Ethanol	0,2 l	0,5 l/h	6 %	1,8 %
	0,3 l	1,2 l/h	12 %	6,5 %
n-Propanol	0,2 l	0,5 l/h	6 %	1,7 %
	0,5 l	1,2 l/h	12 %	5,9 %
	0,3 l	1,4 l/h	14 %	4,1 %
n-Butanol	0,2 l	0,5 l/h	6 %	1,5 %
	0,5 l	1,2 l/h	12 %	4,6 %
	0,3 l	1,4 l/h	14 %	3,7 %

Im Vergleich zu reinem CO₂ steigt die Elutionskraft der CO₂/Schleppmittel-Gemische stark an, so dass Harpagosid bereits während der Vorextraktion zum Teil extrahiert wird (Tab. 5-1). Die Ausbeuten sind allerdings so gering, dass die absolut extrahierte Harpagosidmenge gegenüber dem Hauptextrakt verschwindend gering ist (Abb. 5-9).

Abb. 5-1 zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Vorextrakte. Die Hauptbestandteile der Extrakte sind lipophile Substanzen, die mit der Fließmittelfront wandern. Die geringe Lösungskraft von reinem CO₂ ist deutlich zu erkennen. Die extrahierte Menge der lipophilen Bestandteile ist mit den Schleppmitteln n-Propanol und n-Butanol wesentlich größer, wobei n-Propanol das Optimum darstellt.

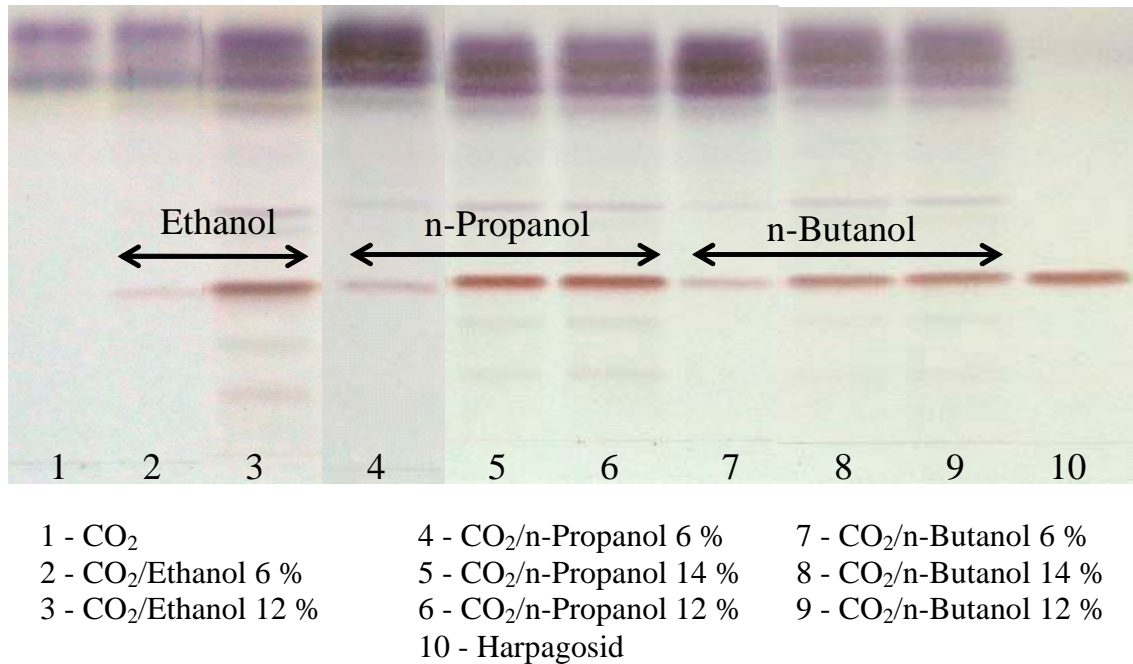


Abb. 5-1 Vorextraktion mit unterschiedlichen Schleppmitteln bei 200 bar/40 °C

Sowohl auf der DC-Platte als auch in Tab. 5-1 erkennt man eine vermehrte Extraktion von Harpagosid mit steigender Polarität des Schleppmittels. Dabei ist die absolute Menge an Schleppmittel ein wichtiger Faktor in Bezug auf den relativen Harpagosidgehalt im Extrakt. 0,5 l n-Propanol ergeben bei einer Zudosierungsrate von 1,2 l/h eine Konzentration von 12 % im überkritischen CO₂, während 0,3 l, die dem System schneller zugeführt werden (1,4 l/h), eine höhere Konzentration von 14 % ausmachen. Die größere n-Propanolmenge von 0,5 l ist trotz kleinerer Konzentration im CO₂ besser in der Lage Harpagosid und andere polare Substanzen zu lösen (Abb. 5-1, Bande 5, 6). Dies gilt für alle Schleppmittelextraktionen, wobei mit abnehmender Polarität eine geringere Extraktion hydrophiler Substanzen beobachtet wird. Alle weiteren Vorextraktionen werden bevorzugt mit 6 % (m/m) n-Propanol im überkritischen Bereich bei 200 bar und 40 °C durchgeführt.

5.1.1.2 Hauptextraktion

Der zweite Extraktionsschritt dient der Anreicherung pharmakologisch wichtiger Substanzen. Dazu soll der Harpagosidgehalt und die Extraktausbeute optimiert werden.

Da sich die polaren, pharmakologisch interessanten Substanzen nicht mit reinem CO₂ extrahieren lassen (Kap. 5.1.1.1), werden die folgenden Extraktionen mit Ethanol als Schlepplmittel in hoher Konzentration durchgeführt.

Einfluss des Extraktionsdruckes im überkritischen Bereich

Die Abhängigkeit des Harpagosidgehaltes und der Extraktausbeute vom Extraktionsdruck wird bei 200, 300 und 400 bar mit geschnittener Droge untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-2 dargestellt.

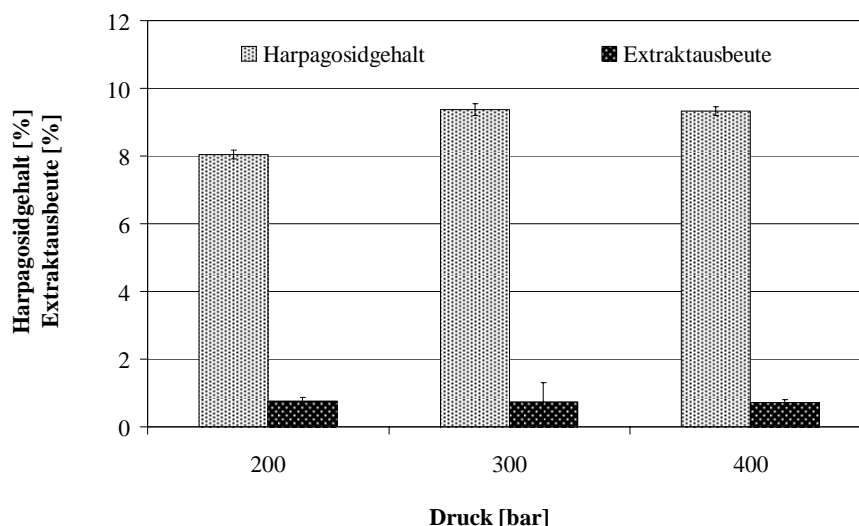


Abb. 5-2 *Abhängigkeit des Harpagosidgehaltes ($n = 6$) und der Extraktausbeute ($n = 2$) vom Extraktionsdruck. Die geschnittene Droge wird bei einem Massenfluss von $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ und einer Temperatur von $40 \text{ }^\circ\text{C}$ extrahiert.*

Steigender Extraktionsdruck im überkritischen Bereich hat keine Auswirkung auf die Extraktausbeute, führt aber zu leicht höheren Harpagosidgehalten. Mit 200 bar hergestellte Extrakte enthalten 8 % Harpagosid. Eine Erhöhung des Extraktionsdruckes auf 300 bar, lässt den Harpagosidgehalt im Extrakt um ca. 1 % ansteigen. Eine weitere Steigerung des Extraktionsdruckes führt zu keiner weiteren Erhöhung des Harpagosidgehaltes. Die Lösungskapazität überkritischer Gase hängt von deren Dichte ab, die eine Funktion von Druck und Temperatur ist. Der kritische Punkt eines CO₂/Ethanol-Gemisches bei 40 °C liegt ungefähr bei 80 bar. In diesem Bereich ist der Dichteinfluss am größten und es kommt zu einer sprunghaften Veränderung der Lösungskapazität. Bei Drücken größer 100 bar verändert sich die Dichte nur

geringfügig. Die Dichte bei 200 bar beträgt 874 kg/m^3 . Sie steigt bei einem Druck von 400 bar bis zu 945 kg/m^3 an. Dabei bleibt die Lösungskapazität nahezu konstant. Demzufolge hängt die Löslichkeit hydrophiler Substanzen nicht von der Dichte, sondern von zwischenmolekularen Kräften und der Polarität des Lösungsmittels ab. Da sich die Polarität von CO_2 /Schleppmittel-Gemischen im überkritischen Bereich mit steigendem Druck nicht verändert (Abb. 7-3), steigt auch der Harpagosidgehalt nicht weiter an.

Einfluss der Extraktionstemperatur im überkritischen Bereich

Der Einfluss der Extraktionstemperatur wird sowohl an geschnittener als auch pulverisierter, granulierter Droge bei 200 bar untersucht. Tab. 5-2 gibt die Ergebnisse wieder.

Tab. 5-2 Abhängigkeit der Ausbeute und des Harpagosidgehaltes von der Extraktionstemperatur; Extraktionsdruck 200 bar, CO_2 -Massenfluss $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$

Temperatur	geschnittene Droge		pulverisierte granulierte Droge	
	40 °C	60 °C	40 °C	60 °C
Extraktausbeute [%]	0,76	0,98	1,77	2,52
relativer Harpagosidgehalt im Extrakt [%]	7,33	8,4	29,16	25,16
absoluter Harpagosidgehalt im Extrakt [g]	0,38	0,50	1,14	1,42

Wie bei der Untersuchung des Extraktionsdruckes dargestellt, ändert sich die Dichte der CO_2 /Schleppmittel-Gemische bei Drücken größer 100 bar nur geringfügig. Die Dichte bei 200 bar/40 °C beträgt 857 kg/m^3 und verringert sich bei 200 bar/60 °C auf 815 kg/m^3 . Diese Abnahme ergibt sich aus der Erhöhung der Temperatur, die aber keinen Einfluss auf die Lösungskapazität hat. Dennoch bewirkt eine Temperaturerhöhung eine Steigerung der Ausbeute sowie des Harpagosidgehaltes. Der Harpagosidgehalt steigt sowohl bei der geschnittenen als auch bei der pulverisierten granulierten Droge um 25-30 % an. Die verbesserte Löslichkeit resultiert aus einer Erhöhung des Dampfdruckes von Harpagosid, das dadurch leichter flüchtig wird. Dies können Reverchon et al. (1993b) durch die Löslichkeit von C_{28} -n-Alkanen belegen. Die Extraktion der Alkane mit reinem CO_2 führt bei erhöhter Temperatur zu einer Verdreifachung der Löslichkeit und ist aufgrund der konstant gehaltenen Dichte des CO_2 auf eine Erhöhung der Flüchtigkeit der Alkane zurückzuführen. Des weiteren kann dieser Effekt auf intermolekulare Wechselwirkungen zurückzuführen sein, die aufgrund einer erhöhten Molekülbeweglichkeit schwächer werden, woraus eine erhöhte Löslichkeit resultiert. Die

erhöhte Extraktausbeute kann somit durch die Verbesserung der Löslichkeit aller Inhaltsstoffe erklärt werden.

Einfluss von Extraktionsdruck und -temperatur im unterkritischen Bereich

Alle unterkritischen Extraktionen liefern einen relativen Harpagosidgehalt von ca. 22 ± 3 % (Abb. 5-3). Sie unterscheiden sich allerdings in der Ausbeute. Extrakte bei 80 bar/60 °C und 100 bar/70 °C zeigen eine deutlich höhere Ausbeute im Vergleich zu anderen Extrakten (Abb. 5-3). Das unterkritische Extraktionsmittel besteht aus einer flüssigen und einer gasförmigen Phase, wobei die flüssige Phase für die Hydrophilie und die Lösungskapazität verantwortlich ist. Das Verhältnis flüssiger zu gasförmiger Phase kann dabei sehr unterschiedlich sein (Kap. 2.2.2). Abb. 5-4 zeigt die unterschiedlichen Mengenverhältnisse der Flüssigkomponente bei verschiedenen Extraktionsdrücken und -temperaturen. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei 100 bar/60 °C (I_2) die flüssige Komponente einen geringeren Anteil aufweist als bei 80 bar/60 °C (I_1), während sich die Anteile der flüssigen Phase bei 100 bar/60 °C (I_2) und 100 bar/70 °C (I_3) kaum unterscheiden. Die Extraktionsmittel mit großem Anteil flüssiger Komponente, liefern demzufolge Extrakte mit hoher Ausbeute. Die Elutionskraft für polare Substanzen ist größer und die Extraktausbeute steigt an. Die Extrakte mit geringerer Gesamtausbeute entstehen beim Einsatz von Extraktionsmitteln mit kleinerem Anteil der Flüssigkomponente. Da die absolute Extrakt- und Harpagosidausbeute bei 100 bar/70 °C am größten ist, wird im Folgenden mit diesem Extrakt gearbeitet.

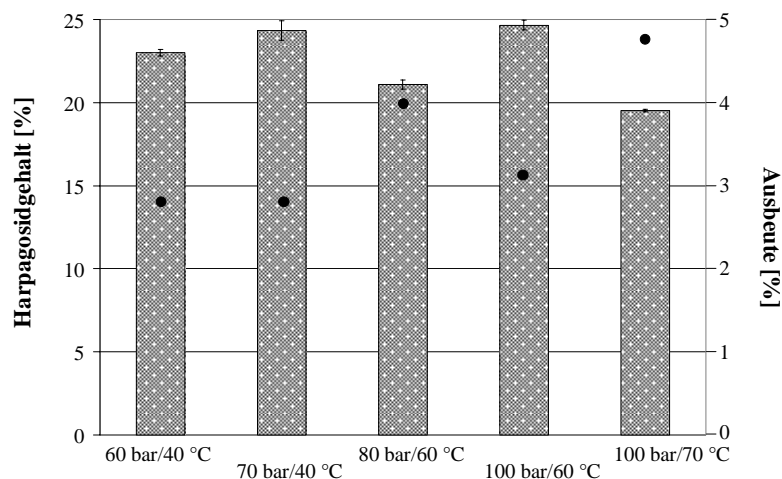


Abb. 5-3 Abhängigkeit des Harpagosidgehaltes \blacksquare ($n = 6$) und der Extraktausbeute \bullet ($n = 2$) von Extraktionsdruck und -temperatur. Die eingesetzte pulverisierte granuliert Droge wird bei einem Massenfluss von $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ extrahiert.

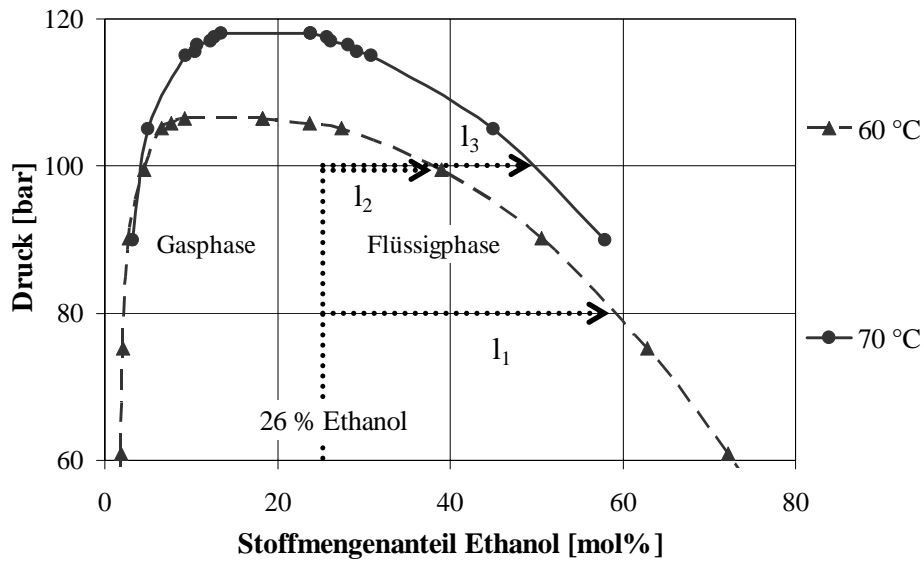


Abb. 5-4 Binäre Phasendiagramme $\text{CO}_2/\text{Ethanol}$ in Abhängigkeit der Temperatur (Daten aus Suzuki et al., 1990 und Lim et al., 1994) mit Darstellung der Anteile (l_1 - l_3) flüssiger Ethanol/ CO_2 -Phase bei unterschiedlichen Bedingungen.

Einfluss des Schleppmittels

Das verwendete Schleppmittel hat großen Einfluss auf den Harpagosidgehalt und die Extraktzusammensetzung. Die Schleppmittel n-Propanol und n-Butanol werden aufgrund ihrer Lipophilie zur Entfernung lipophiler Wurzelbestandteile während der Vorextraktion eingesetzt (Kap. 5.1.1.1.). Zur Hauptextraktion werden die hydrophilen Schleppmittel Ethanol und Methanol verwendet, mit dem Ziel hydrophile Inhaltsstoffe im Extrakt anzureichern. Die Abhängigkeit des Harpagosidgehaltes und der Ausbeute von der Art und Menge des Schleppmittels ist in Abb. 5-5 dargestellt. 2 l Schleppmittel Ethanol zeigen eine geringere Elutionskraft im Vergleich zur gleichen Menge Methanol. Das hydrophilere Schleppmittel Methanol übt größere zwischenmolekulare Kräfte aus als Ethanol. Aufgrund dessen ist die Harpagosidausbeute in methanolischen Schleppmittelextrakten größer. Wird die Schleppmittelmenge auf 4 l erhöht, weisen beide Schleppmittel die gleiche Elutionskraft für Harpagosid auf. Bei einer CO_2 -Extraktion mit einem Zusatz von 4 l Methanol als Schleppmittel ist der Harpagosidgehalt genauso groß wie bei einer $\text{CO}_2/\text{Ethanol}$ -Extraktion. Der Methanolzusatz führt zur Extraktion anderer hydrophiler Begleitstoffe zu Lasten des Harpagosids, was durch die höhere Ausbeute ersichtlich ist. Da der Harpagosidgehalt mit Methanol als Schleppmittel nicht wesentlich gesteigert werden kann, werden alle weiteren Extraktionen mit dem weniger toxischen Schleppmittel Ethanol durchgeführt.

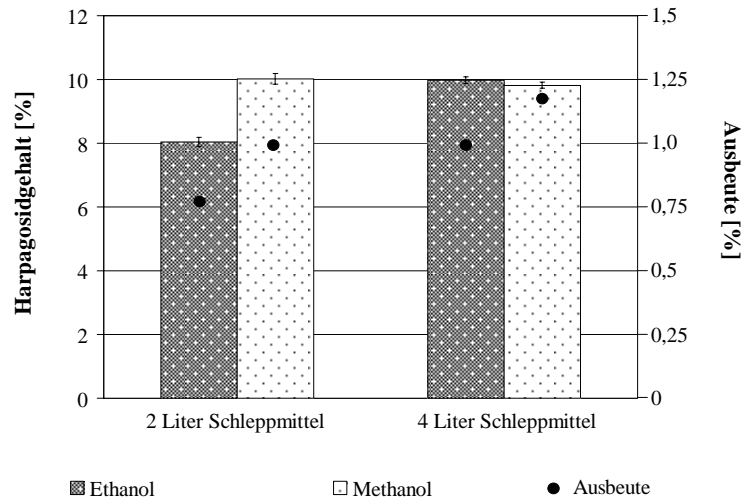


Abb. 5-5 Abhängigkeit des Harpagosidgehaltes ($n = 6$) und der Extraktausbeute ($n = 2$) vom Schleppmittel und der zugeführten Schleppmittelmenge. Die geschnittene Droge wird bei einem Massenfluss von $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$, einer Temperatur von $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Druck von 200 bar extrahiert.

Einfluss der Schleppmittelkonzentration

Die eingesetzte Schleppmittelmenge stellt einen wichtigen Faktor im Hinblick auf den resultierenden Harpagosidgehalt im Extrakt dar (Abb. 5-5). Bei Einsatz geschnittener Droge beträgt die absolut extrahierte Menge Harpagosid, mit 2 l Ethanol als Schleppmittel, 337 mg, was einem relativen Harpagosidgehalt von 8 % entspricht. Die Ausbeute kann unter Einsatz von 4 l Ethanol verdoppelt werden und beträgt 558 mg, entsprechend einem relativen Gehalt von 10 %. Das gleiche Verhalten zeigt granuliert Droge (Abb. 5-6). Innerhalb von 45 min wird überkritischem CO_2 das Schleppmittel Ethanol in unterschiedlichen Mengen zugeführt. Der Extrakt, hergestellt mit 0,35 l Ethanol, weist zwar einen hohen relativen Harpagosidgehalt von 15,6 % auf, die absolut extrahierte Menge Harpagosid beträgt allerdings nur 20,3 mg. Erhöht man die Ethanolmenge auf 0,8 l, steigt der relative Harpagosidgehalt um 10 % und die absolut extrahierte Menge steigt auf 189 mg an. Der mit 2 l Ethanol hergestellte Extrakt hat den gleichen relativen Harpagosidgehalt wie mit 0,8 l Schleppmittel. Die absolute Harpagosidausbeute beträgt allerdings 803,3 mg. Diese Unterschiede sind auf die steigende Hydrophilie des Extraktionsmittels zurückzuführen. Durch die Erhöhung der Schleppmittelmenge bei gleicher Zudosierungszeit strömt pro Zeiteinheit mehr Ethanol durch das Drogenbett. Diese Konzentrationsänderung des Schleppmittels im CO_2 führt zu einer verbesserten Elutionskraft für hydrophile Substanzen. Eine Konzentrationsänderung kann auch durch eine verlängerte Zudosierungszeit erfolgen. Da 2 l Ethanol als Schleppmittelzusatz die beste Harpagosidausbeute ergeben, werden diese durch Änderung der Zudosierungsrate mit unter-

schiedlicher Geschwindigkeit dem überkritischen CO₂ zugeführt (Abb. 5-6). Ein Extrakt, der mit 5 % Ethanol als Schleppmittel hergestellt wird, weist die geringste Ausbeute auf. Im Gegensatz zu 0,35 l Ethanolzusatz (5 %) sind bei einer zugesetzten Ethanolmenge von 2 l sowohl die Ausbeute als auch der Harpagosidgehalt deutlich höher. Pro Zeiteinheit wird die gleiche Menge Extraktionsmittel und somit auch die gleiche Menge Ethanol durch das Drogenbett geleitet. Bei 2 l Schleppmitteleinsatz ist die Summe des zugeführten hydrophilen Schleppmittels wesentlich höher und die Extraktion dauert länger. Die Gesamtpolarität wird dadurch größer und es können mehr hydrophile Substanzen extrahiert werden.

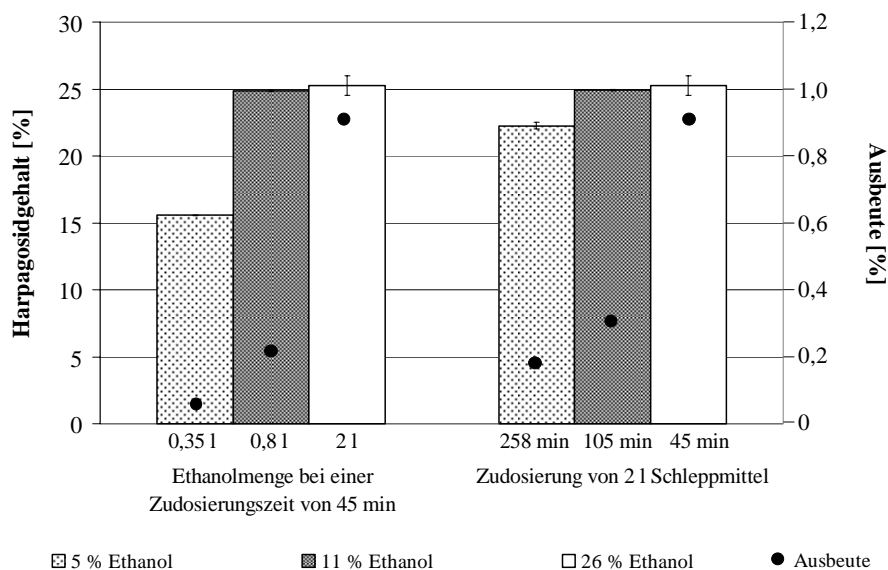


Abb. 5-6 Abhängigkeit des Harpagosidgehaltes ($n = 6$) und der Extraktausbeute ($n = 2$) von der eingesetzten Schleppmittelkonzentration. Die Schleppmittelkonzentration ist in Abhängigkeit der zugeführten Menge und der Zudosierungszeit dargestellt. Die granulierten Droge wird bei einem Massenfluss von $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$, einer Temperatur von $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem Druck von 200 bar extrahiert.

Bei einer Konzentrationsänderung über die Zudosierungszeit durchströmen jeweils 2 l Schleppmittel das Drogenbett (Abb. 5-6). Dagegen ist die Menge Ethanol, die pro Zeiteinheit zur Extraktion von Drogeninhaltsstoffen zur Verfügung steht, deutlich unterschiedlich. Bei 5 % Ethanolzusatz zum überkritischen CO₂ durchströmen pro Minute 7,75 ml Ethanol das Drogenbett verglichen mit 44,44 ml/min bei einem Ethanolzusatz von 26 %. Dieser Mengenvergleich verdeutlicht den großen Hydrophilieunterschied pro Minute. Dies ist der Grund für die größere Harpagosidausbeute bei hohen Schleppmittelkonzentrationen. Der Extrakt, der mit 2 l Ethanol als Schleppmittel, entsprechend 26 %, hergestellt wird, enthält im Vergleich zu anderen Extrakten als einziger alle pharmakologisch wichtigen Substanzen (Abb. 5-7). Da Acteosid/Isoacteosid in keinem anderen Extrakt vorhanden sind, werden alle weiteren Extraktionen mit CO₂/26 % (m/m) Ethanol durchgeführt.

Einfluss von überkritischem und unterkritischem Extraktionsmittel

Überkritisches Extraktionsmittel, bestehend aus CO₂/Schleppmittel, bildet eine einheitliche Phase (Kap. 2.2). Diese überkritische Phase hat trotz hoher Schleppmittelkonzentration lipophilen Charakter. Dadurch enthalten überkritische Extrakte einen relativen hohen Anteil unerwünschter lipophiler Bestandteile. Trotz einer Vorextraktion können die lipophilen Bestandteile im ersten Extraktionsschritt nicht quantitativ entfernt werden, so dass diese immer noch im Hauptextrakt vorkommen (Abb. 5-8). Der Vergleich eines Hauptextraktes ohne Vorextraktionsschritt weist allerdings einen wesentlich höheren lipophilen Anteil auf, als ein Extrakt mit Vorextraktion. Im Gegensatz zu überkritischen Extrakten enthalten unterkritische Extrakte vernachlässigbar kleine Mengen lipophiler Bestandteile (Abb. 5-8). Dieser Unterschied kommt aufgrund der größeren Hydrophilie des unterkritischen Extraktionsmittels zustande. Durch die flüssige Schleppmittel/CO₂-Phase (Kap. 2.2.2) ist unterkritisches Extraktionsmedium deutlich hydrophiler als überkritisches (Abb. 7-3). Die vermehrte Ausbildung hydrophiler zwischenmolekularer Kräfte sorgt für eine Reduktion der Lösungskapazität lipophiler Substanzen, die nicht mehr eluiert werden können. Durch den gleichzeitigen Anstieg der Wechselwirkungen zwischen hydrophilen Molekülen in der Droge und dem Extraktionsmittel, gehen alle hydrophilen Bestandteile aus den Wurzeln der Teufelskralle vermehrt in das Extraktionsmedium über. Saccharose kommt in unterkritischen Extrakten, im Vergleich zu überkritischen Extrakten, in höherer Konzentration vor. Das Tetrasaccharid Stachyose ist im unterkritischen Extrakt in geringen Konzentrationen vorhanden, während die Substanz mit dem deutlich lipophileren überkritischen Extraktionsmittel nicht gelöst werden kann (Abb. 5-8). Des weiteren unterscheiden sich über- und unterkritische Extrakte in ihren Ausbeuten und dem Harpagosidgehalt. Die Daten sind in Tab. 5-3 dargestellt.

Tab. 5-3 Abhängigkeit der Ausbeute und des Harpagosidgehaltes von über- und unterkritischem Extraktionsmittel (CO₂-Massenfluss 8 kg·h⁻¹).

	überkritischer Extrakt 200 bar/40 °C	unterkritischer Extrakt 100 bar/70 °C
Extraktausbeute [%]	1,77	4,84
relativer Harpagosidgehalt im Extrakt [%]	29,16	19,52
absoluter Harpagosidgehalt im Extrakt [g]	1,14	2,13

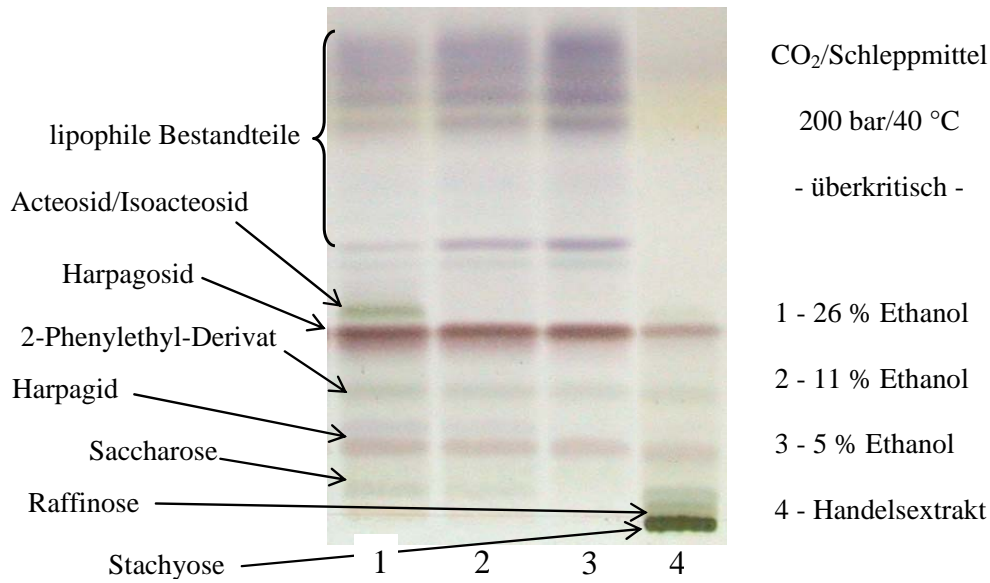


Abb. 5-7 *Abhängigkeit der CO₂-Extraktzusammensetzung von der Schleppmittelkonzentration mit Vergleich des Handelsextraktes. Jeweils 2 l Ethanol werden mittels der Zudosierungsrate dem überkritischen CO₂ (200 bar/40 °C) in unterschiedlicher Konzentration zugeführt.*

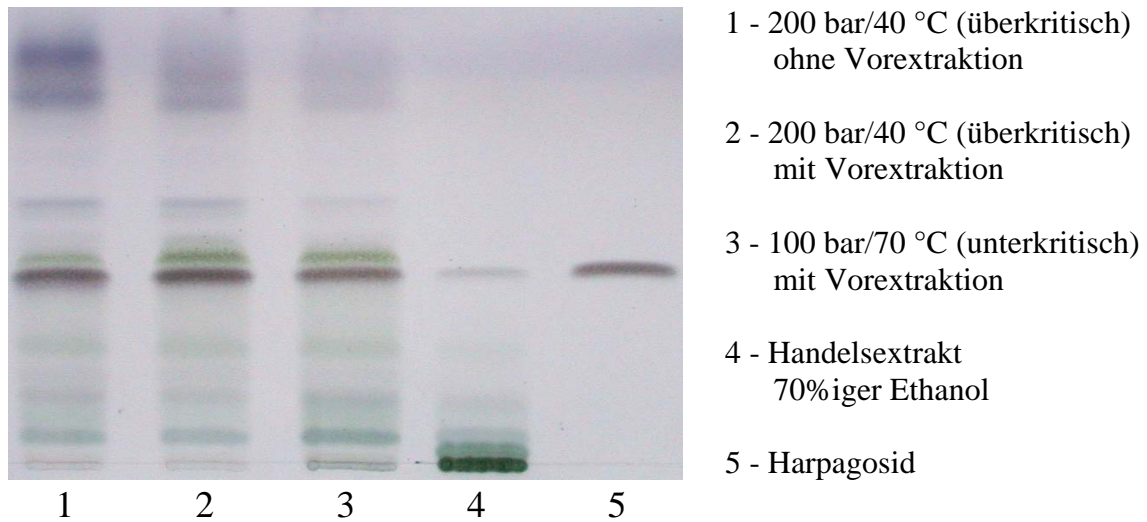


Abb. 5-8 *Vergleich eines Handelsextraktes mit über- und unterkritischen CO₂-Extrakten im Hinblick auf die Extraktzusammensetzung. Die Vorextraktionen werden mit 5 % n-Propanol bei 200 bar/40 °C durchgeführt, die Hauptextraktionen mit Schleppmittel Ethanol zu den angegebenen Bedingungen bei einem CO₂-Massenfluss von 8 kg·h⁻¹.*

Durch die vermehrte Extraktion hydrophiler Bestandteile im unterkritischen Bereich, ist die Extraktausbeute um das 2,5-fache größer als im überkritischen Bereich. Durch die Extraktion von Kohlenhydraten und anderer hydrophiler Begleitstoffe, ist der relative Harpagosidgehalt um ca. 10 % kleiner als in überkritischen Extrakten. Die absolute Harpagosidausbeute ist jedoch doppelt so groß.

Der überkritische Hauptextrakt enthält zwar geringe Mengen unerwünschter lipophiler Bestandteile, für die bisher keine pharmakologische Wirkung nachgewiesen wurde, hat aber einen hohen relativen Harpagosidgehalt von 30 %. Unterkritische Extrakte weisen hingegen einen geringeren relativen Harpagosidgehalt auf, doch aufgrund der hohen Ausbeute ist die absolute Harpagosidmenge doppelt so groß. Die Extrakte enthalten geringe Mengen unerwünschter Kohlenhydrate, denen entzündungsstimulierende Wirkung nachgesagt wird (Stumpf et al., 1997). Die Kohlenhydratmenge in CO₂-Extrakten ist im Vergleich zum Handelsextrakt zu vernachlässigen, denn im Handelsextrakt stellen die Kohlenhydrate den Hauptbestandteil dar (Abb. 5-8). Beide CO₂-Extrakte zeigen im Vergleich dazu mindestens eine zehnfache Erhöhung des Harpagosidgehaltes und eine Anreicherung anderer pharmakologisch wichtiger Substanzen. Im Handelsextrakt sind außer geringen Mengen Harpagosid nur Spuren anderer pharmakologisch wirksamer Substanzen enthalten.

5.1.2 Einfluss des Zerkleinerungsgrades der Droge

Der Einfluss des Zerkleinerungsgrades der Droge auf die Extraktausbeute und den Harpagosidgehalt wird an unterschiedlich zerkleinerten und aufbereiteten Drogenmaterialien untersucht. Eine Übersicht gibt Tab. 5-4.

Tab. 5-4 *Partikelgröße der unterschiedlichen Drogenmaterialien*

Drogenmaterial	Partikelgröße
pulverisiert	d ₅₀ 29,6 µm
pulverisiert kompaktiert 2 kN	d ₅₀ 47,6 µm
pulverisiert kompaktiert 4 kN	d ₅₀ 626,3 µm
pulverisiert kompaktiert 6 kN	d ₅₀ 966,6 µm
pulverisiert granuliert	d ₅₀ 443,4 µm
geschnitten	55 % zwischen 250-1400 µm

Da bei CO₂-Extraktionen die Droge während der Extraktion nicht quillt, kann das Extraktionsmittel nur schwer in das Partikelinnere gelangen. Die Hauptextraktionsprozesse finden somit an der Partikeloberfläche durch Abschwemme der Extraktivstoffe statt. Demzufolge muss eine große Drogenoberfläche zu hohen Ausbeuten und Extraktivstoffgehalten führen. Diese Oberflächenvergrößerung erfolgt durch Zerkleinerung des Drogenmaterials. Pulverisierte Droge hat die geringste Partikelgröße. Bei zu kleinen Partikeln führt das Anlegen des Extraktionsdruckes zu einer starken Verdichtung des Drogenbettes, so dass sich innerhalb der Extraktionshülse eine harte Säule ausbildet. Das Extraktionsmittel kann diese Säule nicht mehr gleichmäßig durchströmen und fließt an der Drogensäule vorbei. Diese Extraktionen sind nicht reproduzierbar. Gröberes, geschnittenes Drogenmaterial liefert zwar reproduzierbare Ergebnisse, doch die Extraktausbeute ist mit maximal 1 % unwirtschaftlich. Aus diesem Grund wird mittels Kompaktierung und Granulierung die Partikelgröße der pulverisierten Droge aufgebaut. Walzenkompaktierung mit 2, 4 und 6 kN liefert zwar deutlich größere mittlere Partikeldurchmesser, aber der Anteil an sehr feinen Partikeln bleibt bei allen drei Kompaktierkräften sehr hoch. Durch diesen hohen Anteil feiner Partikel verdichtet sich das Drogenbett weiterhin während der Extraktion. Die Säulen weisen zwar, im Vergleich zu pulverisierter Droge, eine deutlich geringere Härte auf, aber das Extraktionsmittel kann das verdichtete Drogenbett nicht durchströmen. Im Gegensatz dazu liefert die ethanolische Granulation (Kap. 8.5.2.1) der pulverisierten Droge ein extrahierbares Material, das sich durch gleichmäßige Partikel mit geringem Feinanteil auszeichnet. Unter Extraktionsbedingungen bleibt das Drogenmaterial fließfähig und das Extraktionsmittel kann die pulverisierte, granuliert Droge gleichmäßig durchströmen. Diese Extraktionen liefern Ausbeuten im überkritischen Bereich bis zu 1,9 % mit einem Harpagosidgehalt bis zu 30 %. Im Gegensatz dazu liefert geschnittene Droge eine um 50 % kleinere Ausbeute mit einem Harpagosidgehalt von 10 %.

5.1.3 Massenbilanz der Extraktionen

Die Massenbilanz stellt die Wiederfindung von Harpagosid im Vor- und Hauptextrakt, sowie in der extrahierten Droge dar. Dazu wird die Ausgangsdroge vollständig extrahiert (Kap. 8.4.3.1). Der Harpagosidgehalt dieses Extraktes wird als 100 %-Wert gesetzt. Nach den CO₂-Extraktionen, werden die Harpagosidgehalte der Vor- und Hauptextrakte bestimmt. Die zugehörige extrahierte Droge wird analog der Ausgangsdroge vollständig mit Methanol extrahiert. In Abb. 5-9 ist die Massenbilanz eines überkritischen und eines unterkritischen CO₂/Ethanol-Extraktes dargestellt.

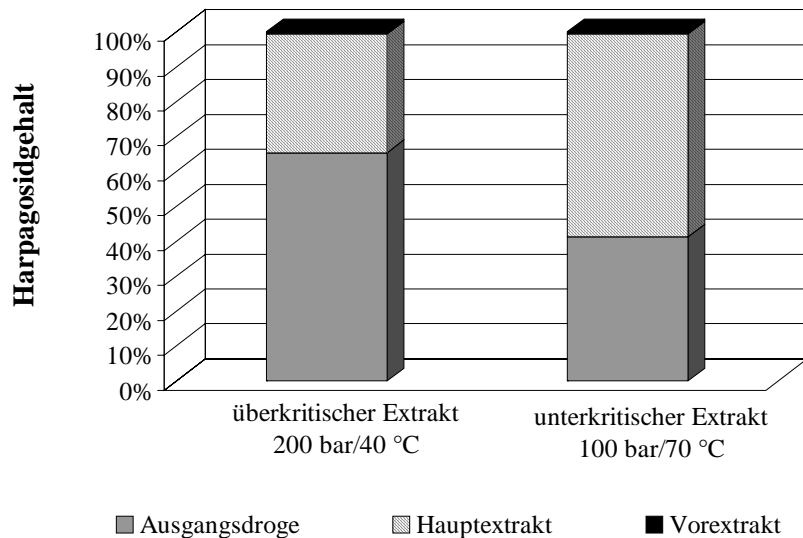


Abb. 5-9 Wiederfindung von Harpagosid in der extrahierten Droge, dem Vor- und Hauptextrakt im über- und unterkritischen Bereich.

Andere Extraktionsbedingungen liefern ebenfalls Massenbilanzen mit einer Harpagosid-Wiederfindung von $100 \pm 5 \%$. Die Massenbilanz zeigt deutlich den Unterschied zwischen über- und unterkritischen Extrakten. Bei überkritischen Extraktionsbedingungen verbleibt $2/3$ des Harpagosids in der Droge, während bei unterkritischen Bedingungen $2/3$ des Harpagosids im Hauptextrakt zu finden sind. Der extrahierte Harpagosidanteil im Vorextrakt ist vernachlässigbar klein. Diese beiden Extrakte sind repräsentativ für alle anderen extrahierten und untersuchten Extrakte, die das gleiche Resultat liefern.

5.1.4 Zusammenfassung

Um einen *Harpagophytum*-Extrakt zu erhalten, der überwiegend wirksamkeitsbestimmende Substanzen enthält, muss eine fraktionierte CO_2 -Extraktion der Droge durchgeführt werden. Im Vorextraktionsschritt werden unerwünschte lipophile Bestandteile der Droge entfernt. Die Vorextraktion wird mit CO_2 und 6 % (m/m) n-Propanol als Schleppmittel im überkritischen Bereich durchgeführt. Der geringe Schleppmittelzusatz erhöht die Effektivität des Extraktionsprozesses für lipophile Begleitstoffe. Höhere Zusätze an Schleppmittel bewirken eine vermehrte Extraktion von Harpagosid bei verminderter Extraktion lipophiler Bestandteile. Der anschließende Hauptextraktionsschritt findet mit CO_2 und Ethanol als Schleppmittel statt. Ethanol erhöht durch seine Hydrophilie die Gesamtpolarität des Extraktionsmittels und ermöglicht somit die Extrahierbarkeit polarer Wurzelbestandteile. 2 l Ethanol als Schleppmittel mit einer Konzentration von 26 % (m/m) eignen sich zur Anreicherung von Harpagosid und anderer polarer wirksamkeitsbestimmender Substanzen. Die weitere Prozessoptimierung er-

fordert eine Abwägung zwischen einem hohen relativen Harpagosidgehalt und der absoluten Extrakt- und Harpagosidausbeute. Sind hohe Harpagosidgehalte im Extrakt erwünscht, muss die Droge im überkritischen Bereich extrahiert werden. Das überkritische CO₂/Ethanol hat trotz des hydrophilen Schleppmittels einen leicht lipophilen Charakter, so dass selbst nach einer Vorextraktion lipophile Wurzelbestandteile im Hauptextrakt erscheinen. Dieser Extrakt enthält, außer geringen Mengen Saccharose, keine Kohlenhydrate, denen entzündungsstimulierende Wirkung nachgesagt werden, beinhaltet aber alle pharmakologisch wichtigen Substanzen, wie Harpagosid, Acteosid/Isoacteosid, Harpagid und 2-Phenylethylderivate. Diese Extrakte haben Harpagosidgehalte bis zu 30 % bei einem Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) von 55:1. Variationen von Extraktionstemperatur und -druck zeigen nur geringe Effekte, so dass sich 200 bar und 40 °C als geeignete Standardbedingung herausgestellt hat. Wenn hohe Extrakt- und Harpagosidausbeuten erwünscht sind, müssen die Extraktionen im unterkritischen Bereich ablaufen. Durch die hohe Hydrophilie des Extraktionsmittels werden keine lipophilen Bestandteile mitextrahiert. Dafür werden alle hydrophilen Wurzelbestandteile im Extrakt angereichert. Durch die vermehrte Extraktion von Kohlenhydraten wird der Harpagosidgehalt auf 20 % zurückgedrängt. Der Extrakt enthält, wie der überkritische Extrakt, alle pharmakologisch wichtigen Bestandteile. Die absolute Extraktausbeute ist jedoch um das 2,5-fache größer, das DEV verbessert sich auf 21:1 und die absolute Harpagosidausbeute verdoppelt sich. Im Bereich der unterkritischen Phase liefern alle untersuchten Bedingungen den gleichen Harpagosidgehalt. Die Ausbeute ist vom Verhältnis flüssiger zu gasförmiger Extraktionsphase abhängig. Unterkritische Extraktionsmedien, deren Anteil flüssiger Phase deutlich größer ist als der gasförmige Anteil, zeigen höhere Extraktausbeuten. Dabei hat sich ein Druck von 100 bar mit einer Temperatur von 70 °C als Optimum erwiesen.

Die eingesetzte Partikelgröße der Droge ist eine wichtige Einflussgröße im Hinblick auf die Extrakt- und Harpagosidausbeute. Geschnittene Droge liefert niedrige, unwirtschaftliche Ausbeuten, so dass eine Oberflächenvergrößerung und demzufolge eine Zerkleinerung der Droge nötig ist. Pulverisierte Droge ist nicht extrahierbar, da aufgrund der kleinen Partikel das Drogenbett unter hohem Extraktionsdruck eine harte Säule ausbildet. Die Granulation der pulverisierten Droge liefert ein Drogenmaterial, das sich durch gute Extrahierbarkeit auszeichnet. Im Vergleich zu geschnittener Droge verdoppelt sich die Ausbeute des Extraktes und der Harpagosidgehalt kann um 20 % gesteigert werden.

5.2 *Extraktion der Samen von Aesculus hippocastanum*

Die Monographie von Hippocastani semen ist bisher nur in das Deutsche Arzneibuch 2004 aufgenommen. Gleichzeitig ist dort die Monographie über einen eingestellten Rosskastaniensamentrockenextrakt (Hippocastani extractum siccum normatum) zu finden. Dieser Extrakt wird aus zerkleinerten Rosskastaniensamen mit Ethanol-Wasser-Gemischen oder Methanol-Wasser-Gemischen hergestellt. Dabei soll der Alkohol-Gehalt bei 40 bis 60 % (V/V) liegen. Die Droge wird, nach einem in der Monographie „Extrakte“ (Ph. Eur. 5) beschriebenen Verfahren, extrahiert. Dies können sowohl Mazeration als auch Perkolation sein. Der nach Eindüngung und Trocknung resultierende Trockenextrakt enthält 16-20 % Triterpenglykoside, berechnet als Aescin. Handelspräparate enthalten Extrakte, die überwiegend mit 50, 60 und 68 % (V/V) Ethanol oder 80 % (V/V) Methanol hergestellt werden (Rote Liste 2004).

Sämtliche Studien, die sich mit der Zusammensetzung und der pharmakologischen Wirkung von Rosskastaniensamenextrakten beschäftigen, verwenden methanolische Auszüge, die mittels Mazeration hergestellt werden. Zur Abtrennung der öligen Bestandteile wird der Samen zuerst mit n-Hexan und anschließend mit Methanol (Srijayanta et al., 1999) extrahiert.

Eine Methode zur Isolierung von β -Aescin in einer Reinheit von 95-99,5 % (m/m) beschreiben Alaqui-Ismaili et al. (2001). Dabei werden die Samen der Rosskastanie mit wässrigem Methanol extrahiert. Danach wird der Rückstand mit Ethanol extrahiert. Der methanolische und ethanolische Extrakt werden vereinigt und mit einem Kationenaustauscher behandelt. Der resultierende Extrakt wird vom Alkohol befreit und mit Aceton aufgenommen. Die acetonhaltige Lösung wird so lange abgekühlt, bis β -Aescin ausfällt, das im letzten Schritt von der umstehenden Lösung abgetrennt werden kann.

In der Literatur sind bisher keine CO₂-Extraktionen von *Aesculus hippocastanum* beschrieben worden. Im Folgenden wird der Einfluss unterschiedlicher CO₂-Extraktionsparameter auf den Aescingehalt und die Extraktzusammensetzung untersucht.

5.2.1 **Untersuchung des Einflusses verschiedener Extraktionsbedingungen**

Die Herstellung von Extrakten aus Rosskastaniensamen mittels CO₂-Hochdruckextraktionsverfahren wird im Hinblick auf die Extraktzusammensetzung und den β -Aescingehalt optimiert. Aufgrund vieler unerwünschter Begleitstoffe, kann eine optimale Extraktzusammensetzung nur durch fraktionierte CO₂-Extraktion erreicht werden. Jeder Extraktionsschritt unterliegt dabei dem Einfluss von Extraktionsdruck und -temperatur, sowie der Schleppmittelart und deren Konzentration. Des Weiteren wird die Elutionskraft über- und unter-

kritischer Extraktionsmittel untersucht. Dazu wird die Ausbeute hydrophiler Inhaltsstoffe herangezogen.

5.2.1.1 Vorextraktion

Wie in Kap. 5.1.1.1. für *Harpagophytum procumbens* beschrieben, dient die Vorextraktion auch im Falle von *Aesculus hippocastanum* zur Entfernung unerwünschter lipophiler Begleitstoffe.

Einfluss des Schleppmittels

Die Optimierung der Vorextraktion erfolgt durch Ethanol und n-Propanol in verschiedenen Konzentrationen. Einen Überblick gibt Tab. 5-5.

Tab. 5-5 Vorextraktion von *Hippocastani semen* unter Einsatz von Ethanol und n-Propanol als Schleppmittel im überkritischen Bereich (200 bar/40 °C) bei einem CO₂-Massenfluss von 8 kg·h⁻¹

Schleppmittel	Menge	Zudosierungsgeschwindigkeit	Schleppmittelkonzentration im Extraktionsmittel (m/m)
CO ₂	Dauer: 2 Stunden	-	-
Ethanol	0,2 l	0,6 l/h	6 %
	0,3 l	1,3 l/h	14 %
	0,5 l	1,4 l/h	12 %
n-Propanol	0,2 l	0,6 l/h	6 %
	0,3 l	1,2 l/h	14 %
	0,5 l	1,25 l/h	12 %
	2 l	2,7 l/h	28 %

Pharmakologisch wichtige Substanzen werden durch die eingesetzten Extraktionsmittel nicht mitextrahiert. Der Vorextrakt ist ein hellgelbes Öl, das nach DC-Auftrennung nur lipophile Substanzen ausweist, die sich alle an der Fließmittelfront befinden. Extraktionen mit dem polareren Ethanol als Schleppmittel ergeben im Vergleich zu propanolischen Extraktionen eine um ca. 1 % geringere Ausbeute. Die zweistündige Extraktion mit reinem CO₂ liefert die gleiche Ausbeute wie ein Propanolzusatz von 6 %. Da diese Ausbeute durch Erhöhung des Propanolzusatzes weiter gesteigert werden kann, werden die propanolischen Vorextraktionen bevorzugt angewendet. Für unterschiedliche Mengen zugesetzten n-Propanols ergibt sich ein Optimum. Die erzielte Ausbeute an öligem Vorextrakt von 12,1 g (4,0 %) ist bei einem

Zusatz von 2 l n-Propanol am größten. Mit einem halben Liter n-Propanol wird bereits eine Ausbeute von 11,3 g (3,8 %) erzielt, so dass die größere Ausbeute von 12,1 g den Einsatz der 4-fachen Schleppmittelmenge nicht rechtfertigt. Eine Temperaturerhöhung von 40 °C auf 60 °C hat keinen Einfluss auf die Extraktausbeute oder die Extraktzusammensetzung. Demzufolge werden alle weiteren Vorextraktionen mit 0,5 l n-Propanol (12 %, m/m) durchgeführt und mit einer Zudosierungsrate von 1,25 l/h dem überkritischen CO₂ (200 bar/40 °C) zugesetzt.

5.2.1.2 Hauptextraktion

Während des Hauptextraktionsschrittes sollen die polaren, wirksamkeitsbestimmenden Substanzen, vornehmlich β -Aescin, in möglichst hoher Konzentration im Extrakt angereichert werden. Zusätzlich soll ein Optimum an Extraktausbeute erreicht werden.

Wie bereits in Kap. 5.2.1.1 erwähnt, lassen sich keine polaren Substanzen mit reinem CO₂ oder geringen Schleppmittelmengen extrahieren. Die Hauptextraktionen werden wegen der im Vergleich zu *Harpagophytum* größeren Inhaltsstoffe mit sehr polaren Schleppmitteln, bevorzugt mit hohen Konzentrationen Methanol, durchgeführt.

Einfluss des Extraktionsdruckes im überkritischen Bereich

Eine Variation des Extraktionsdruckes im überkritischen Bereich hat einen geringen Einfluss auf den Aescingehalt im Extrakt (Abb. 5-10). Im Druckbereich von 100 bis 300 bar steigt der Aescingehalt um maximal 1 %. Zwischen 200 und 300 bar ist kein Unterschied mehr erkennbar. Dies ist, wie beim Schleppmittel Ethanol (Kap. 5.1.1.2), auf die gleich bleibende Polarität des CO₂/Methanol-Gemisches zurückzuführen. Die Ausbeute bewegt sich um $1,9 \pm 0,1$ %, was ebenfalls mit der konstanten Polarität des Extraktionsmittels erklärt werden kann. Da bei einem Extraktionsdruck von 200 bar, der Aescingehalt im Extrakt am größten ist, wird 200 bar als Referenzdruck gewählt.

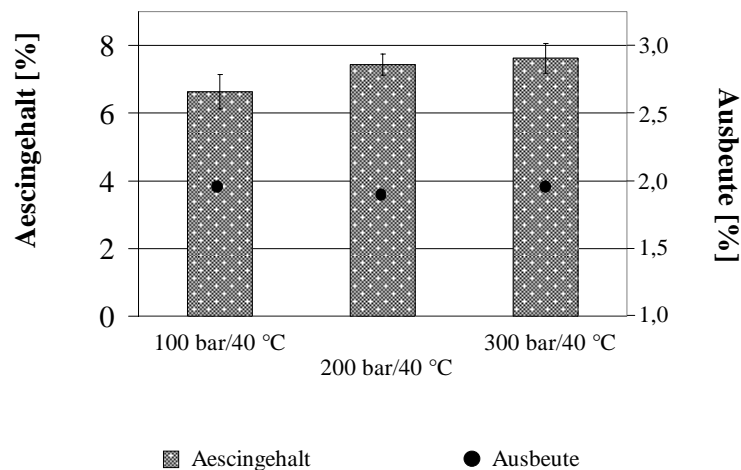


Abb. 5-10 Abhängigkeit des Aescingehaltes ($n = 6$) und der Extraktausbeute ($n = 2$) vom Extraktionsdruck bei einem Massenfluss von $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$.

Einfluss der Extraktionstemperatur im überkritischen Bereich

In Abb. 5-11 ist deutlich ein Temperatureinfluss auf den Aescingehalt im Extrakt zu sehen. Mit steigender Temperatur nimmt der Aescingehalt kontinuierlich ab, wobei die Extraktausbeute um einen Wert von $2 \pm 0,2 \%$ schwankt.

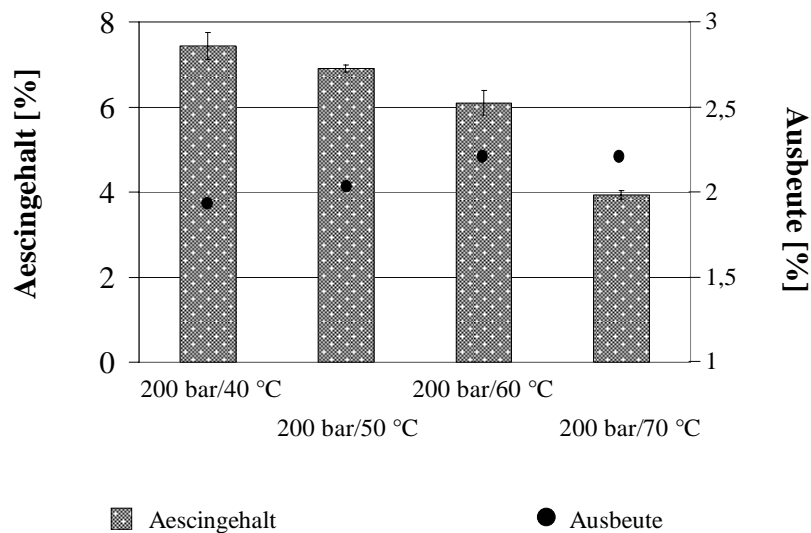


Abb. 5-11 Abhängigkeit des Aescingehaltes ($n = 6$) und der Extraktausbeute ($n = 2$) von der Extraktionstemperatur im überkritischen Bereich bei einem Massenfluss von $8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$.

Die Verringerung des Aescingehaltes ist auf eine Abnahme der Polarität des CO_2 /Methanol-Gemisches mit steigender Temperatur zurückzuführen. Die Simulationen der Extraktionsvorgänge mittels Molecular Modelling (Kap. 7) zeigen mit zunehmender Temperatur eine Abnahme des elektrostatischen Löslichkeitsparameters δ_{EL} , der aus Dipol-Kräften und H-

Brücken-Bindungen berechnet wird (Tab. 5-6). Wenn die polaren zwischenmolekularen Kräfte geringer werden, können zwischen Extraktionsmittel und dem polaren β -Aescin nur unzureichend Anziehungskräfte ausgebildet werden. Dadurch sinkt die Lösungskapazität und es wird weniger β -Aescin extrahiert. Die Ausbeute schwankt um 2 %, da zu Lasten des polaren β -Aescin lipophilere Begleitstoffe durch das unpolare Extraktionsmittel extrahiert werden.

Tab. 5-6 Elektrostatistischer Löslichkeitsparameter δ_{EL} des Lösungsmittelgemisches $\text{CO}_2/26\%$ Methanol (m/m) bei 200 bar in Abhängigkeit von der Temperatur (Kap. 7).

Temperatur	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
δ_{EL}	15,99	15,24	13,91	11,48

Einfluss von Extraktionsdruck und -temperatur im unterkritischen Bereich

Ein Einfluss der Extraktionstemperatur auf den Aescingehalt im unterkritischen Bereich ist im Gegensatz zum überkritischen Bereich kaum erkennbar (Abb. 5-12), da sich innerhalb der unterkritischen Extraktionsmittel die Polarität nicht verändert (Abb. 7-3). Sowohl bei 70 bar/40 °C als auch bei 90 bar/50 °C und 100 bar/60 °C beträgt der relative Aescingehalt $28 \pm 0,5\%$. Die Abnahme des relativen Aescingehaltes bei 100 bar/70 °C beruht auf der vermehrten Extraktion anderer hydrophiler Begleitstoffe, was durch die hohe Ausbeute deutlich wird.

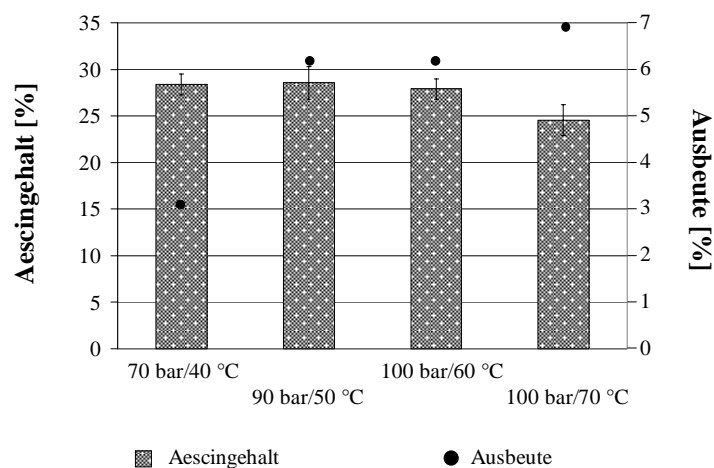


Abb. 5-12 Abhängigkeit des Harpagosidgehaltes ($n = 6$) und der Extraktausbeute ($n = 2$) von Extraktionsdruck und -temperatur im unterkritischen Bereich bei einem Massenfluss von $8 \text{ kg} \cdot \text{h}^{-1}$.

Die Extraktausbeute verdoppelt sich von 70 bar/40 °C zu 100 bar/70 °C. Abb. 5-13 verdeutlicht den Anstieg der flüssigen Komponente im Extraktionsmittel von 70 bar /40 °C (l_1) zu 100 bar/70 °C (l_2). Da dieser flüssige Anteil für die Extraktion der polaren Drogeninhaltsstoffe verantwortlich ist, steigt mit zunehmender Temperatur die Menge Extraktionsmittel, die pro Zeiteinheit das Drogenbett durchströmt. Bei größerem Durchsatz des Extraktionsmittels können wesentlich mehr Extraktivstoffe ausgeschwemmt werden. Demzufolge steigt die Gesamtausbeute aller Extraktivstoffe. Aufgrund dieser Ergebnisse wird 100 bar/70 °C als Referenz-Extraktionsbedingung gewählt.

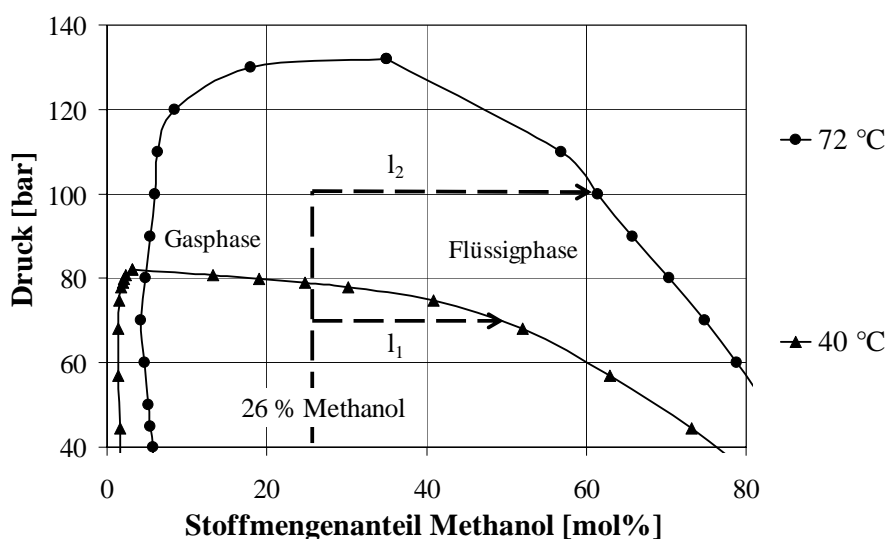


Abb. 5-13 Binäre Phasendiagramme CO_2 /Methanol in Abhängigkeit der Temperatur (Daten aus Semenova et al., 1990 und Yoon et al., 1994) mit Darstellung der Anteile (l_1 , l_2) flüssiger Methanol/ CO_2 -Phase bei unterschiedlichen Bedingungen.

Einfluss der Schleppmittelart

CO_2 -Extraktionen lassen sich problemlos mit kleinen Molekülen durchführen. Wenn das Molekulargewicht 500 g/mol übersteigt, muss die Polarität des Extraktionsmittels gesteigert werden, um diese Inhaltsstoffe extrahieren zu können (Stahl et al., 1987). β -Aescin hat mit 1131,3 g/mol ein hohes Molekulargewicht, das mit Hilfe der Schleppmittel Ethanol und Methanol extrahierbar wird (Tab. 5-7). Methanol, das polarere Schleppmittel, zeigt im Vergleich zu Ethanol bei gleichen Extraktionsbedingungen erwartungsgemäß höhere Aescingehalte. Die Ausbeute mit 26 % Ethanol im überkritischen Bereich bei 200 bar/40 °C ist größer als die Ausbeute bei einem 26%-igen Methanolzusatz. Durch die höhere Lipophilie des CO_2 /Ethanol-Gemisch werden neben polaren Inhaltsstoffen vermehrt lipophile Begleitstoffe mitextrahiert (Abb. 5-14). Geringere Schleppmittelkonzentrationen führen, wie an

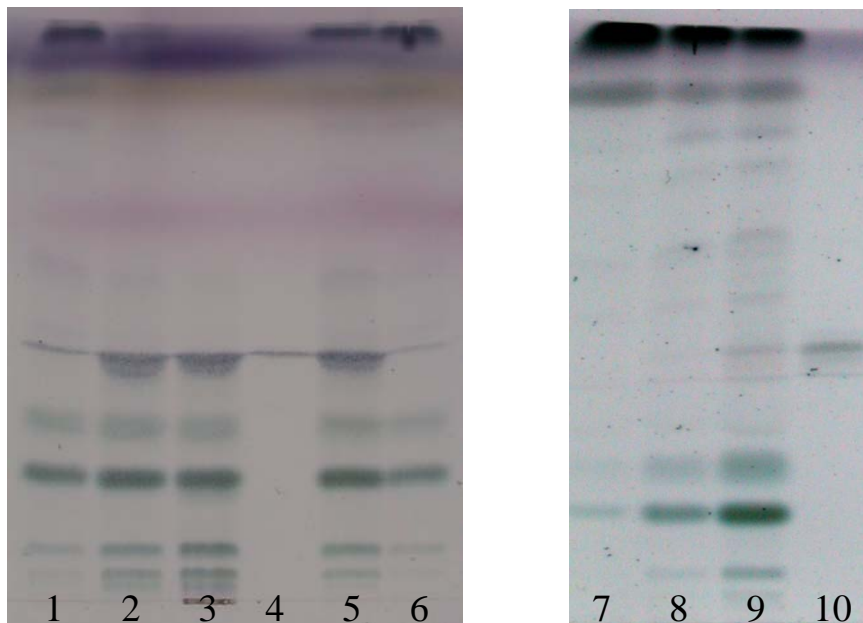
Methanol gezeigt, zum sofortigen Abfallen des Aescingehaltes und der Extraktausbeute. Da sich Methanol in der höchsten Konzentration von 26 % am besten eignet, wird es als Standard-Schleppmittel gewählt. Einen dünn-schichtchromatographischen Vergleich verschiedener Schleppmittel zeigt Abb. 5-14.

Tab. 5-7 Aescingehalt und Extraktausbeute in Abhängigkeit des zugesetzten Schleppmittels und dessen Konzentration bei verschiedenen Extraktionsbedingungen.

Schleppmittel	Schleppmittel-konzentration	Extraktionsbedingungen	Aescingehalt	Ausbeute [%]
Ethanol	26 %	200 bar/40 °C	0,9 %	2,2 %
	26 %	100 bar/70 °C	20,3 %	4,5 %
Methanol	11 %	200 bar/40 °C	0,2 %	0,9 %
	26 %	200 bar/40 °C	7,4 %	1,8 %
	26 %	100 bar/70 °C	24,6 %	6,9 %

Einfluss von überkritischem und unterkritischem Extraktionsmittel

Wie in Tab. 5-7 erkennbar, ergibt das polarere unterkritische Extraktionsmittel die höchsten Aescingehalte und Extraktausbeuten. Dies ist auf die erhöhte Polarität des Extraktionsmediums zurückzuführen, die durch den Anteil flüssiger Komponente des CO₂/Schleppmittelgemisches entsteht. Diese hohe Polarität sorgt neben einer erhöhten Aescin-Extrahierbarkeit auch für eine größere Lösungskapazität anderer polarer Begleitstoffe. Gleichzeitig wird die Extrahierbarkeit lipophiler Substanzen verringert (Abb. 5-14). Der Vergleich mit überkritischen Extrakten zeigt deutlich, dass diese mehr lipophile Inhaltsstoffe enthalten. Durch das lipophilere überkritische Extraktionsmittel werden polare Substanzen nur in geringen Mengen eluiert (Abb. 5-14). Im Gegensatz zum Handelsextrakt sind beide CO₂-Extrakte frei von sehr hydrophilen Substanzen, die an der Startlinie verbleiben (Abb. 5-14). Der Aescingehalt der unterkritischen CO₂/Schleppmittel-Extrakte liegt im Bereich des untersuchten Handelsextraktes (50 % Ethanol (V/V)), der 22,3 % β-Aescin im Extrakt enthält.



Spalte	26 % Schleppmittel	Bedingung	Phasengebiet
1 + 9	Methanol	200 bar/40 °C	überkritisch
2	Methanol	100 bar/70 °C	unterkritisch
3		Handelsextrakt (50 % (V/V) Ethanol)	
4 + 10		Aescin	
5	Ethanol	100 bar/70 °C	unterkritisch
6 + 8	Ethanol	200 bar/40 °C	überkritisch
7	n-Propanol	200 bar/40 °C	überkritisch

Abb. 5-14 DC-Auftrennung unterschiedlicher *Aesculus* Extrakte, die mit verschiedenen polaren Extraktionsmitteln hergestellt werden.

5.2.2 Massenbilanz der Extraktionen

Die Aufstellung der Massenbilanz erfolgt durch einen vollständigen methanolischen Auszug der Ausgangsdroge. Der resultierende Aescingehalt entspricht 100 %. Die β -Aescinmenge der Hauptextrakte sowie der zugehörigen extrahierten Drogen werden quantifiziert. Die Wiederfindung beträgt 100 %. Die in Abb. 5-15 dargestellte Aescinwiederfindung stimmt mit anderen untersuchten Extrakten überein.

Die Bilanzen zeigen, dass die überkritischen Extraktionen unwirtschaftlich sind, da nahezu 100 % des gesamten Aescins in der Droge verbleibt. Im Gegensatz dazu kann im unterkritischen Bereich über 20 % der Aescinmenge extrahiert werden, wobei Schleppmittel Methanol die doppelte Menge Aescin aus dem Samen löst wie Ethanol. Die harten *Aesculus*-

Samen sind für die generell niedrigen Ausbeuten verantwortlich, da das Extraktionsmittel den Samen nicht durchdringen kann und nur die Inhaltsstoffe aus der Oberfläche löst.

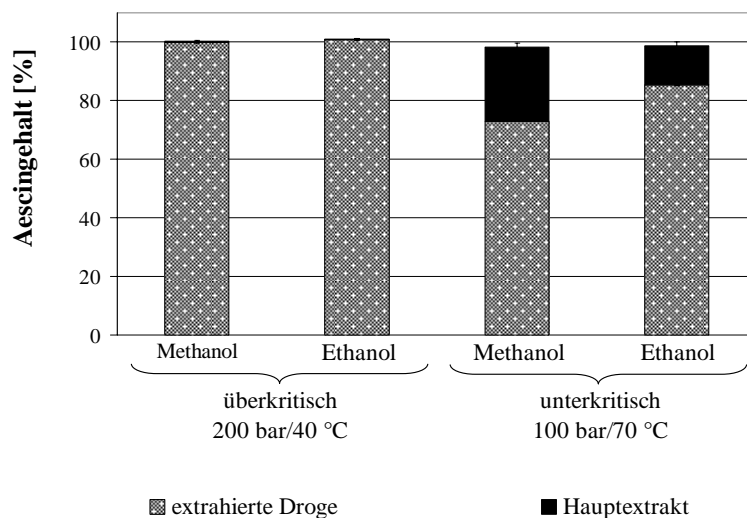


Abb. 5-15 Wiederfindung von Aescin in der extrahierten Droge und dem Hauptextrakt im über- und unterkritischen Bereich mit Zusatz von 26 % Schleppmittel.

5.2.3 Zusammenfassung

CO₂-Extraktionen mit hohen Schleppmittelkonzentrationen ermöglichen die Extraktion des großen β -Aescin-Moleküls. Um einen Extrakt zu erhalten, der mit β -Aescin angereichert ist, muss ein fraktioniertes Extraktionsverfahren angewendet werden. Im Vorextraktionsschritt werden mit Hilfe von CO₂/12 % (m/m) n-Propanol die lipophilen Bestandteile entfernt. Die Hauptextraktion findet bevorzugt mit Methanol als Schleppmittel in einer Konzentration von 26 % (m/m) statt, da Ethanol als Schleppmittel eine unzureichende Lösungskapazität für Aescin aufweist. Im überkritischen Bereich ist die Polarität beider Schleppmittel zu gering, um Aescin in nennenswerten Mengen zu eluieren. Im unterkritischen Bereich steigt der Aescingehalt im Extrakt bis zu 25 %, entsprechend einem DEV von 14:1. Durch die höhere Hydrophilie des unterkritischen Extraktionsmittels wird die Extraktion lipophiler Begleitstoffe vollständig zurückgedrängt. Dafür werden zwar polare Begleitstoffe in höherem Maße mitextrahiert, aber im Gegensatz zu den handelsüblichen Extrakten, ist deren Konzentration wesentlich geringer. Der unterkritische CO₂-Extrakt, der mit 26 % (m/m) Methanol bei 100 bar/70 °C hergestellt wird, enthält im Vergleich zum Handlextrakt (50 % Ethanol (V/V), DEV 5:1) die gleiche Menge Aescin, aber wesentlich weniger unerwünschte polare Begleitstoffe.

5.3 *Vergleich der Extraktionsbedingungen der Drogen*

Die wirksamkeitsbestimmende Substanz β -Aescin aus *Aesculus hippocastanum* und die Leitsubstanz Harpagosid aus *Harpagophytum procumbens* unterscheiden sich nicht in ihrer Polarität (Abb. 7-2). Harpagosid ist ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 508,5 g/mol. Im Vergleich dazu ist Aescin mit einem Molekulargewicht von 1131,3 g/mol ein großes Molekül. Um dieses Molekül mit CO₂ extrahieren zu können, muss die Polarität des CO₂-Extraktionsmittels deutlich erhöht werden (Stahl et al., 1987). Da beide Inhaltsstoffe polaren Charakter haben, sind sie nicht mit reinem überkritischem CO₂ extrahierbar. Um die Substanzen aus der Droge zu lösen ist ein Schlepptomittelzusatz nötig. Harpagosid erscheint bereits mit geringen Mengen des lipophilen Schlepptomittels n-Butanol im Extrakt. Die Harpagosidkonzentration im Extrakt kann entweder durch höhere Schlepptomittelkonzentrationen oder durch stärker polare Schlepptomittel gesteigert werden (Abb. 5-1). Im Gegensatz dazu erscheint Aescin erst mit 26 % (m/m) Ethanolzusatz in sehr geringen Mengen im Extrakt (Abb. 5-14). Bei dieser Ethanolkonzentration enthält der *Harpagophytum* Extrakt bereits 30 % Harpagosid. Um das große Aescinmolekül im Extrakt anzureichern, muss mit Methanol als Schlepptomittel gearbeitet werden. Hierbei sind geringe Methanolkonzentrationen von 11 % genauso unbefriedigend wie ein Zusatz von Ethanol. Aus diesem Grund muss Methanol in einer Konzentration von 26 % zugesetzt werden. Das Arbeiten im unterkritischen Bereich führt bei beiden Drogen zu einer erhöhten Ausbeute. Während der Harpagosidgehalt durch die Extraktion anderer polarer Stoffe zurückgedrängt wird, steigt der Aescingehalt im unterkritischen Bereich an. Die absoluten Ausbeuten der Substanzen sind im unterkritischen Bereich deutlich größer als im überkritischen. Für beide Drogen haben sich bei der Optimierung der Extraktionsbedingungen 200 bar/40 °C im überkritischen Bereich und 100 bar/70 °C im unterkritischen Bereich als günstige Standardbedingung erwiesen.

6. IN-VITRO UNTERSUCHUNGEN VON *HARPAGOPHYTUM* *PROCUMBENS* EXTRAKTEN

Teufelskrallenextrakte werden durch die Leitsubstanz Harpagosid spezifiziert. Für die pharmakologische Wirkung ist jedoch der Gesamtextrakt verantwortlich. Aufgrund unterschiedlicher Herkunft der Droge, wechselnder Zusammensetzung und verschiedener Extraktionsverfahren lassen sich die Daten aus pharmakologischen Untersuchungen nur schwer auf andere Teufelskrallen-Präparate übertragen (Erdös et al., 1978, Veit, 2002). Gängige Testmodelle stellen der Rattenpfotenödem-Test sowie der Writhing-Test (Prüfung auf analgetische Wirkung mit Hilfe eines chemischen Stimulus) dar. Erdös et al. (1978) stellen bei Teufelskrallenextrakten, im Vergleich zu chemischen Referenzsubstanzen, keine oder nur geringe analgetische und antiinflammatorische Wirkung fest. Die Extrakte weisen jedoch bei intraperitonealer Applikation, nicht aber bei peroraler Applikation, eine Wirkung auf (Lanhers et al., 1992). Da reines Harpagosid keinen Effekt zeigt, ist die Extraktzusammensetzung für die erreichte analgetische und antiphlogistische Wirkung verantwortlich. Baghdikian et al. (1997) können die analgetische und antiphlogistische Wirkung der *Harpagophytum*-Extrakte anhand des Rattenpfotenödem-Tests und des Writhing-Tests bestätigen.

Die Wirkung von Teufelskrallenextrakten wird durch klinische Studien bestätigt. Chrubasik et al. (1999) führen eine randomisierte Doppelblindstudie über vier Wochen durch. Die Probanden werden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: einer Placebo-Gruppe und zwei Verum-Gruppen, die jeweils unterschiedliche Mengen Extrakt bekommen. Die Verum-Gruppe, die den Extrakt hoch dosiert erhält, erreicht am meisten schmerzfreie Patienten. Eine weitere Studie mit identischem Studiendesign und einem anderen Extrakt wird von Göbel et al. (2001) durchgeführt. Eine Monotherapie mit *Harpagophytum*-Extrakten erzielt nach vier Wochen eine hochsignifikante klinische Wirksamkeit. Eine Dosierung von 480 mg pro Tag führt zur Linderung bei leichten bis mittelstarken Muskelschmerzen. Eine statistisch signifikante Besserung unter der Einnahme eines *Harpagophytum*-Extraktes kann auch für die Indikationen Coxarthrose und Gonarthrose gezeigt werden (Biller, 2002). Alle Probanden können innerhalb von fünf Monaten von nicht steroidalen Antirheumatika (NSAR) auf Teufelskrallenextrakte umgestellt werden. Dabei kommt es zu einer deutlichen Abnahme der NSAR-induzierten Nebenwirkungen, während die pharmakologische Wirkung gleich bleibt.

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Wirkungsmechanismus der *Harpagophytum*-Extrakte. Die in den Studien gefundene analgetische und antiphlogistische Wirkung

wird auf die Hemmung der Freisetzung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) oder Leukotrien B₄ (LTB₄) zurückgeführt (Kap. 6.1). Die Freisetzung von PGE₂ erfolgt durch das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2), dessen Hemmung mittels Mäusefibroblasten untersucht wird (Jang et al., 2003). Die Fibroblasten werden durch Lipopolysaccharide (LPS) zur COX-2 und demzufolge PGE₂ Synthese stimuliert. Die Kontrollfibroblasten ohne Zusatz von Teufelskrallenextrakt produzieren große Mengen PGE₂, da COX-2 nicht gehemmt wird. Fibroblasten, denen *Harpagophytum*-Extrakt zugesetzt wird, synthetisieren aufgrund einer COX-2 Hemmung nur geringfügig PGE₂. Das gleiche Verhalten zeigt das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase, welches eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen spielt. Eine Kombination aus Tocopherol und *Harpagophytum*-Extrakt zeigt bei transgenen Mäusen, die typischerweise innerhalb des ersten Lebensmonats Polyarthritits entwickeln, eine Inhibierung der Interleukin-1 β -Synthese (Arias et al., 2002). Des weiteren wird die Hemmung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) untersucht. Im Verlauf einer Entzündung werden Leukozyten, beispielsweise polymorphnucleare neutrophile Granulozyten (PMN), durch Peptide stimuliert, Botenstoffe auszusenden. Dabei werden unter anderem ROS, wie zum Beispiel Superoxide und Hypochloritanionen, freigesetzt. Diese Freisetzung der ROS wird mittels einer Zelllinie menschlicher Granulozyten, die durch Hefeextrakt stimuliert werden, untersucht. Die alleinige Zugabe von Tocopherol zeigt keine Hemmung der ROS Freisetzung, während die Kombination aus Tocopherol und *Harpagophytum*-Extrakt die ROS Bildung deutlich verringert. Loew et al. (2001) untersuchen an menschlichem Vollblut die Hemmwirkung von Teufelskrallenextrakten auf die Leukotrien-Biosynthese. Die Cysteinyl-Leukotrien- und Thromboxanbiosynthese kann jeweils unter Einfluss von *Harpagophytum*-Extrakt als Funktion der Harpagosidkonzentration gehemmt werden. Harpagosid allein zeigt jedoch keine Hemmwirkung, so dass entweder andere Extraktbestandteile oder Blutbestandteile nötig sind, um eine Aktivierung oder Biotransformation des Harpagosids zu bewirken.

6.1 Arachidonsäurekaskade

Verschiedene chemische, physikalische, physiologische und pathophysiologische Stimuli aktivieren Phospholipasen (Phospholipase A₂, Phospholipase C) zum Abbau von Membranphospholipiden. Dadurch wird Arachidonsäure freigesetzt, die als Substrat für den Cyclooxygenase- und Lipoxygenaseabbauweg zur Verfügung steht. Die Metaboliten dieser Stoffwechselfvorgänge sind an der Entstehung von Schmerz und Entzündung beteiligt.

Cyclooxygenaseabbauweg

Cyclooxygenase-1 (COX-1) ist ein Enzym, das konstitutiv in vielen Zellen des Organismus vorhanden ist. Es ist in der Plasmamembran oder dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird von Monozyten, Makrophagen und anderen Zellen nach Einwirkung proinflammatorischer Stimuli gebildet. Der Abbauweg der Arachidonsäure durch COX ist in Abb. 6-1 dargestellt.

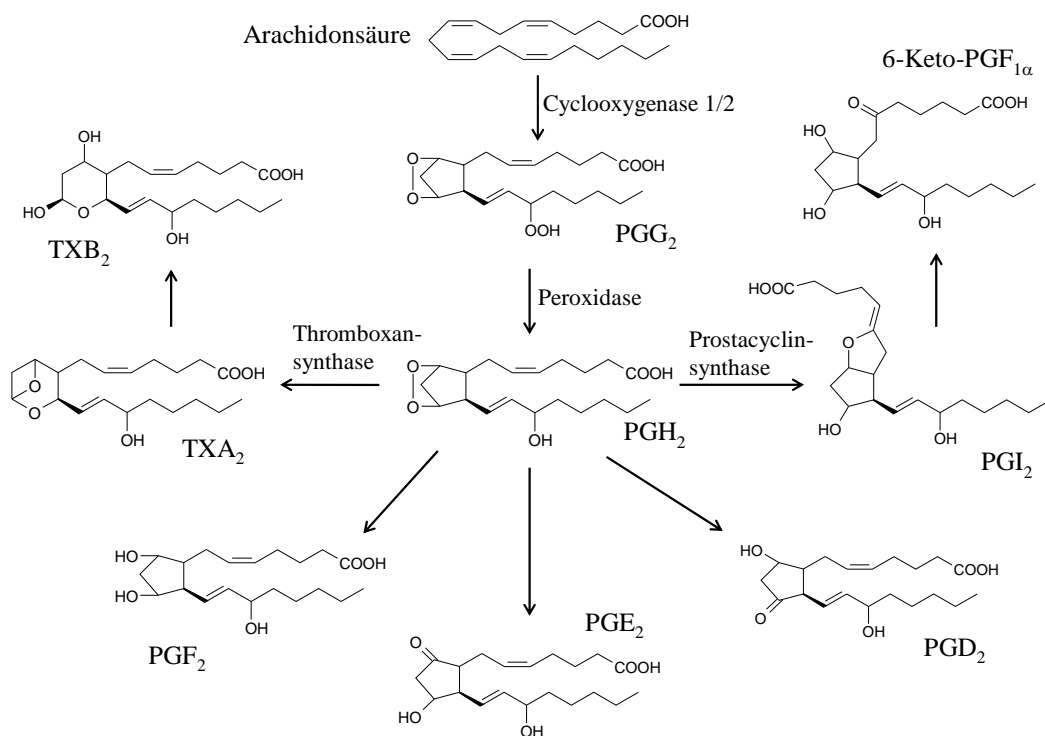


Abb. 6-1 Abbau der Arachidonsäure durch Cyclooxygenase

Beim Abbau der Arachidonsäure entstehen die Prostaglandine PGE₂, PGF₂ und PGD₂. Sie stellen pharmakologisch eine bedeutsame Gruppe der Eicosanoide dar. Durch die Prostaglandine hervorgerufene Wirkungen hängen von den jeweiligen Zielzellen ab und können teilweise konträre Effekte bei verschiedenen Zellen bewirken. Generell sensibilisieren die Prostaglandine beim entzündlichen Geschehen die Schmerzrezeptoren und beeinflussen die

Regulation der Körpertemperatur. Das periphere Gewebe reagiert mit Rötung, Schwellung, Schmerz und lokaler Erwärmung der entzündeten Stelle.

Die Thromboxane TXA_2 und TXB_2 werden überwiegend in Thrombozyten, der Lunge und der Milz gebildet. TXA_2 fördert die Thrombozytenaggregation und wirkt vasokonstriktorisch, während TXB_2 biologisch inaktiv ist.

Das Zwischenprodukt Prostacyclin PGI_2 stellt den physiologischen Antagonisten zu TXA_2 dar und verhindert somit die Thrombozytenaggregation und wirkt stark vasodilatatorisch.

5-Lipoxygenaseabbauweg

Die Stimulation des Enzyms 5-Lipoxygenase (5-LO) erfolgt durch zwei unterschiedliche Aktivierungsmechanismen. Die 5-LO Aktivität kann Ca^{2+} -Ionen abhängig gesteuert werden, indem Agenzien, wie beispielsweise Calciumionophor, die Aktivität stimulieren. Eine weitere Regulation der 5-LO Aktivität erfolgt durch zellulären Stress, wie zum Beispiel chemischen Stress, osmotischen Stress, Hitzeschock oder UV-Licht. Dabei wird das Enzym p38-MAP Kinase angeregt, das diese Stimulation an 5-LO vermittelt. Sowohl Ca^{2+} als auch p38-MAP Kinase bewirken eine Translokation und Bindung von 5-LO an die Kernmembran und darauf folgend die Aktivierung des Enzyms. Der Arachidonsäureabbau durch die stimulierte 5-LO ist in Abb. 6-2 dargestellt.

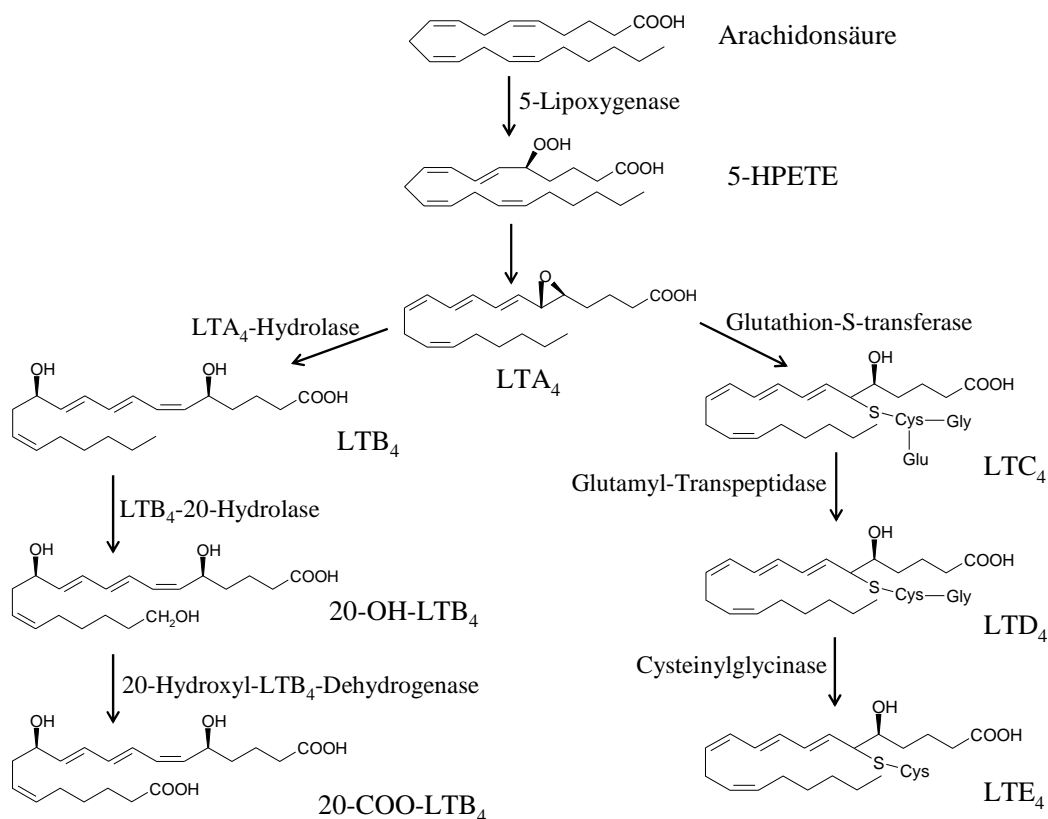


Abb. 6-2 Abbau der Arachidonsäure durch 5-Lipoxygenase

Abhängig vom 5-LO-Aktivierungsmechanismus werden unterschiedliche Leukotrienmengen gebildet. Die p38-MAP Kinase vermittelte Aktivierung bewirkt eine 50-70 % niedrigere Leukotrienausschüttung als die Ca^{2+} -abhängige Stimulierung. Die Zusammensetzung der gebildeten 5-LO Produkte bleibt hingegen gleich. Leukotriene wirken als Mediatoren bei allergischen und entzündlichen Reaktionen. LTB_4 besitzt eine chemotaktische Wirkung auf andere Zellen oder führt zur vermehrten Freisetzung von Zytokinen, während LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 überwiegend spasmogen auf die glatte Muskulatur oder die Bronchien wirken.

6.2 Cyclooxygenase-2 Hemmung durch Harpagophytum-Extrakte

Die in-vitro Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und demzufolge die Inhibition der Prostaglandin E_2 (PGE_2) Biosynthese wird mittels menschlichem Vollblut getestet, dessen Zellen durch die Zugabe von Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert wird. Drei unterschiedliche Teufelskrallenextrakte werden auf ihre PGE_2 -Hemmwirkung untersucht. Ein ethanolischer (60 %, V/V) Handelsextrakt wird mit einem überkritischen (200 bar/40 °C) und einem unterkritischen (100 bar/70 °C) CO_2 -Extrakt verglichen. Beide CO_2 -Extrakte werden mit einem Ethanolzusatz von 26 % hergestellt.

Die prozentuale PGE_2 -Hemmung dieser drei Extrakte ist in Abb. 6-3 dargestellt. Alle Extrakte weisen in den untersuchten Konzentrationen eine sehr schwache und stark schwankende Inhibition auf. Aufgrund der maximalen Hemmwirkung von 20 % kann eine Inhibition von COX-2 durch Teufelskrallenextrakte ausgeschlossen werden.

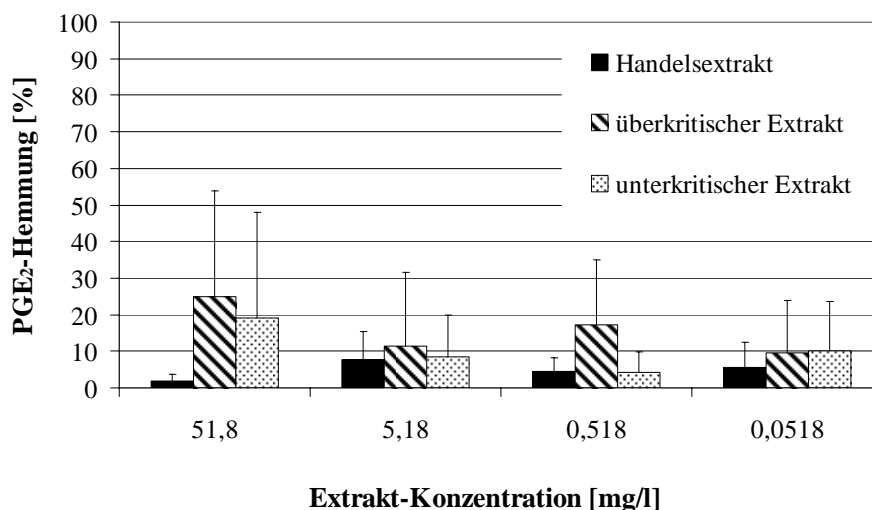


Abb. 6-3 Prostaglandin E_2 (PGE_2) Hemmung durch drei verschiedene Teufelskrallenextrakte. Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall.

6.3 5-Lipoxygenase Hemmung durch Harpagophytum-Extrakte

Die Hemmwirkung der Teufelskrallenextrakte auf die 5-Lipoxygenase (5-LO) wird mittels isolierter Granulozyten aus humanem Vollblut getestet. Das Arbeitsschema ist in Abb. 6-4 dargestellt. Nach der Stimulation von 5-LO durch Calciumionophor wird die gebildete Menge Leukotrien B₄ (LTB₄) mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die Hemmung von 5-LO und demzufolge der LTB₄-Biosynthese wird mit einem Handelsextrakt (60 % Ethanol, V/V), sowie mit einem überkritischen (200 bar/40 °C, 26 % Ethanol) und einem unterkritischen (100 bar /70 °C, 26 % Ethanol) CO₂-Extrakt bestimmt.

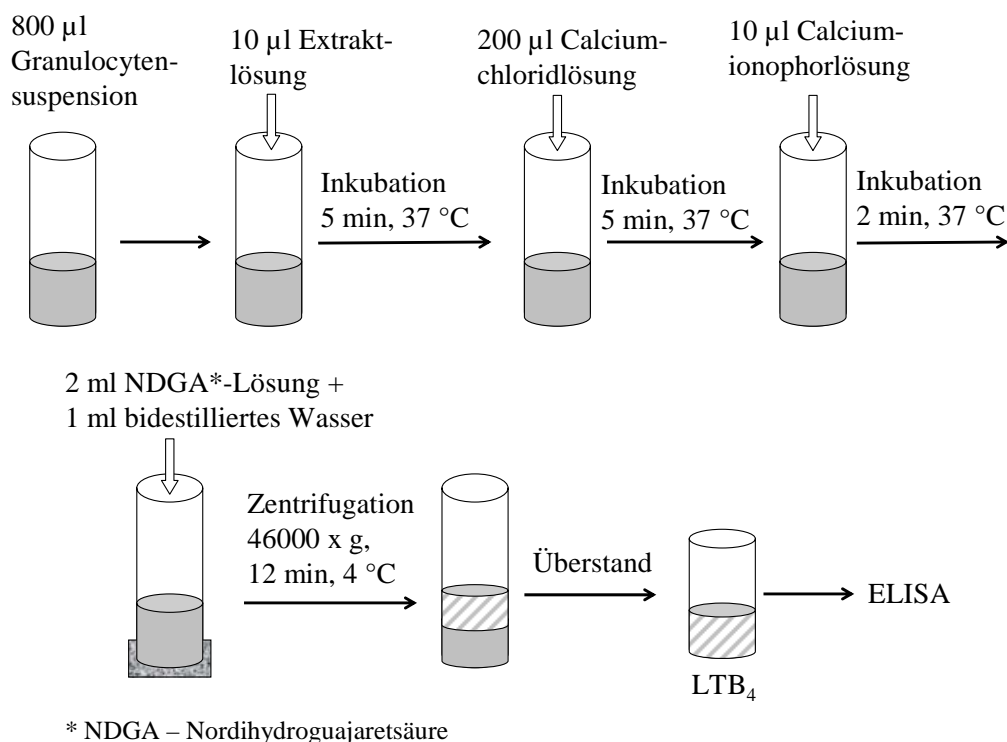


Abb. 6-4 Arbeitsschema der 5-Lipoxygenase (5-LO) Hemmung isolierter Granulozyten. Nach Stimulation von 5-LO durch Calciumionophor wird die gebildete LTB₄-Menge mittels eines ELISA bestimmt.

In allen untersuchten Konzentrationen weist der Handelsextrakt keine signifikante Inhibition der LTB₄-Biosynthese auf (Abb. 6-5). Im Gegensatz dazu zeigen beide CO₂-Extrakte eine Hemmwirkung auf die LTB₄-Produktion. Bei der höchsten untersuchten Extraktkonzentration von 51,8 mg/l wird die LTB₄-Synthese vollständig unterdrückt. Eine Extraktkonzentration von 5,18 mg/l erreicht noch eine Hemmwirkung von 30-40 %. Alle weiteren Verdünnungen der CO₂-Extraktlösung zeigen keine signifikante Hemmung von 5-LO.

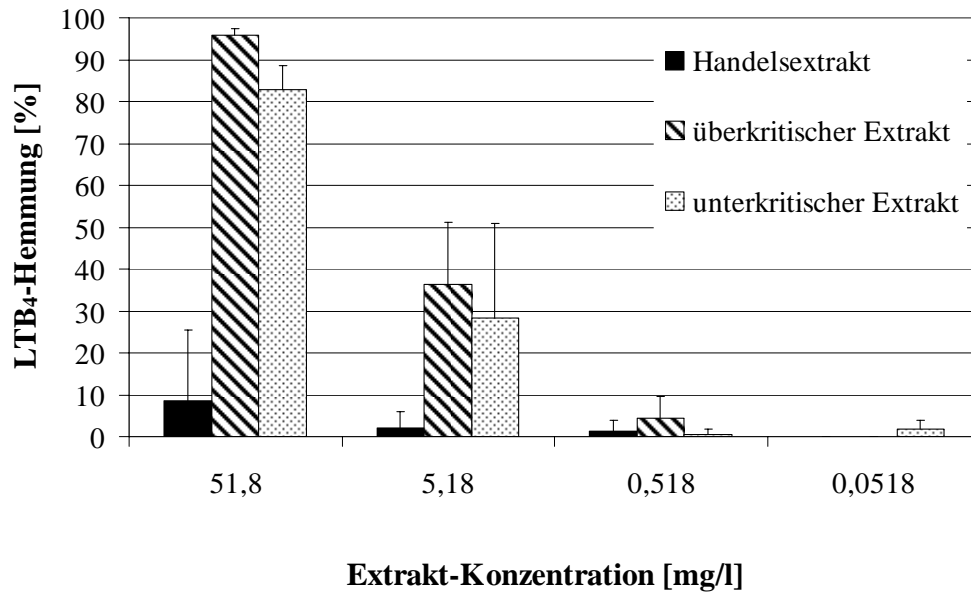


Abb. 6-5 Leukotrien B_4 (LTB_4) Hemmung durch drei verschiedene Teufelskrallenextrakte. Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall.

Beide CO_2 -Extrakte verhalten sich nahezu identisch, wobei der überkritische Extrakt im Hinblick auf den Mittelwert eine höhere Hemmung zeigt als der unterkritische Extrakt. Diese Ergebnisse können sowohl durch den Harpagosidgehalt, als auch durch die Extraktzusammensetzung erklärt werden. Der Handelsextrakt enthält 2,3 % Harpagosid und zeigt keine Hemmung der LTB_4 -Biosynthese. Im Vergleich dazu enthält der überkritische Extrakt, der vollständig 5-LO hemmt, 29,7 % Harpagosid, während der unterkritische Extrakt einen geringeren Harpagosidgehalt von 20,1 % aufweist, womit die geringfügigere Hemmwirkung erklärt werden kann.

Loew et al. (2001) entfernen aus einem wässrig-alkoholischen Extrakt die Ethanol unlöslichen Bestandteile. Sie können nachweisen, dass diese kohlenhydrathaltige Fraktion die Cysteinyl-Leukotrien-Biosynthese aktiviert. Diese gleichzeitige Leukotrienstimulation durch andere Extraktbestandteile ist ein weiterer Grund für die unterschiedliche Hemmung der LTB_4 -Biosynthese der drei Teufelskrallenextrakte. Alle untersuchten Extrakte sind sowohl im Vorkommen als auch in der Menge der Inhaltsstoffe unterschiedlich zusammengesetzt (Kap. 5.1.1.2, Abb. 5-8). Der Handelsextrakt besteht überwiegend aus den Kohlenhydraten Stachyose und Raffinose, die zur Leukotrienstimulation führen. Im Gegensatz dazu ist der überkritische CO_2 -Extrakt frei von diesen Zuckern. Der unterkritische CO_2 -Extrakt enthält nur geringe Mengen Stachyose. Dieser Unterschied des Kohlenhydratanteiles der CO_2 -Extrakte erklärt ebenfalls die tendenziell geringere LTB_4 -Hemmung durch den unterkritischen Extrakt.

6.4 Zusammenfassung

Drei unterschiedliche *Harpagophytum*-Extrakte, die sich in ihrem Harpagosidgehalt und der chemischen Extraktzusammensetzung unterscheiden, zeigen im in-vitro Test, der mittels humanem Vollblut auf COX-2 Hemmung prüft, in allen untersuchten Konzentrationen keine signifikante Hemmwirkung auf COX-2 und demzufolge auf die PGE₂-Biosynthese.

Mit isolierten Granulozyten aus menschlichem Vollblut wird die Inhibition der 5-LO Hemmung und der LTB₄-Biosynthese untersucht. Der Handelsextrakt weist keine signifikante LTB₄-Hemmung auf, während der überkritische und der unterkritische CO₂-Extrakt in einer Konzentration von 51,8 mg/l eine vollständige Inhibierung zeigen. Der Unterschied liegt sowohl in einem höheren Harpagosidgehalt der CO₂-Extrakte als auch in der Abwesenheit von Kohlenhydraten, die die Leukotrienbiosynthese stimulieren, begründet.

Die anti-inflammatorische Wirkung der *Harpagophytum*-Extrakte ist auf die Hemmung von 5-Lipoxygenase zurückzuführen. Bei Inhibition dieses Enzyms können aus der Arachidonsäure keine Leukotriene synthetisiert werden, die als Mediator für allergische und entzündliche Reaktionen fungieren.

7. SIMULATION DER EXTRAKTIONEN MITTELS MOLECULAR MODELLING

Molecular Modelling ist ein computergestütztes Verfahren, um Moleküleigenschaften oder Prozesse zu simulieren und zu charakterisieren. Das Simulieren von CO₂-Extraktionen ermöglicht es, energetische Vorgänge einer Extraktion zu begutachten. Das detaillierte Wissen erlaubt Vorhersagen zur Löslichkeit von Festsubstanzen in CO₂ oder CO₂/Schleppmittel-Gemischen.

Eine Methode CO₂-Löslichkeiten zu bestimmen ist die Verwendung von Zustandsgleichungen (equation of state, EOS). Es existieren ca. 40 verschiedene EOS, deren Parameter mittels einer Mischungsgleichung abgeschätzt werden. Da es 15 verschiedene Mischungsgleichungen gibt, ist es schwierig, die richtige Kombination aus EOS und einer Mischungsgleichung zu finden. Die gängigste Zustandsgleichung zur Simulation von Löslichkeiten in reinem CO₂ ist die Peng-Robinson EOS kombiniert mit der van der Waals-Mischungsgleichung (Cortesi et al., 1999; Vieira de Melo et al., 1999). Beim Einsatz von CO₂ und Co-solventien wird die „volumenabhängige Mischungsgleichung“ angewendet (Raghuram Rao et al, 1992). Eine andere Möglichkeit besteht darin die fehlenden Parameter experimentell zu bestimmen (Bartle et al., 1992; Mishra et al., 1993). Im Zusammenhang mit CO₂-Löslichkeiten von Feststoffen wird häufig auch die Redlich-Kwong EOS verwendet (Soave, 2000). Da EOS Berechnungen entweder nur für die verwendete Substanz gelten oder bei der Übertragung auf andere Moleküle unbefriedigende Resultate liefern, vergleichen Ashour et al. (2000) mehrere EOS sowie mehrere Mischungsgleichungen miteinander. Die Mischungsgleichung stellt im Vergleich zur EOS den wichtigeren Parameter dar, wobei komplizierte Mischungsgleichungen die Genauigkeit der Ergebnisse nicht erhöhen. Somit lässt sich keine allgemeingültige EOS für die Ermittlung der Löslichkeit in überkritischen Mischungen formulieren, sondern es wird jeweils nur das untersuchte System beschrieben. Jouyban et al. (2002) entwickeln eine Methode, bei der nur wenige Experimente nötig sind, um die Löslichkeit eines Feststoffes in CO₂ zu bestimmen. Diese Löslichkeitsdaten werden logarithmiert und gegen den Logarithmus der Dichte von reinem überkritischem CO₂ aufgetragen, woraus eine lineare Beziehung resultiert. Dieser Zusammenhang ermöglicht eine Vorhersage der Löslichkeit für Temperaturen von 35-37 °C und einen Druckbereich von 100-200 bar. Die Abweichung der berechneten von den gemessenen Daten beträgt maximal 15 %.

Eine empirische Gleichung zur Vorhersage von Feststofflöslichkeiten in CO₂ wird von Chrastil (1982) entwickelt. Die Gleichung basiert auf dem linearen Zusammenhang des Logarithmus der Feststofflöslichkeit und dem Logarithmus der Dichte von reinem überkritischem CO₂. Die Gleichung ist jedoch nur in einem Konzentrationsbereich von 100-200 g/l des zu lösenden Stoffes gültig, da oberhalb von 200 g/l die Dichte des Feststoffes zu sehr von der des Gases abweicht. Für das empirische Modell von Vetere (1998) benötigt man nur das Molekulargewicht sowie die Schmelztemperatur des Feststoffes. Diese Methode erfordert zur Erstellung eines mathematischen Zusammenhanges eine hohe Anzahl an Versuchen und ergibt Abweichungen von 5-120 %. Die Zuverlässigkeit der Vorhersage der Methode ist stark substanzabhängig und nicht auf andere Substanzklassen übertragbar.

Zahlreiche mathematische Modelle werden beispielhaft an einer Substanz entwickelt. Wu und Hou (2001) untersuchen die Extraktion von Öl aus Eigelb. Die Gleichgewichtskonstante respektive der Stoffaustauschkoeffizient werden mittels Simulation bestimmt und zur Berechnung der Löslichkeit herangezogen. Subra et al. (1998) untersuchen sowohl ein Diffusionsmodell als auch ein Gleichgewichtsmodell mittels der Isolierung von β -Caroten aus Karotten. Beide Modelle werden mit Hilfe der Partikelgröße, dem Temperatureinfluss und der Beschaffenheit des Lösungsmittels beurteilt. Reverchon und Marrone (2001) können bei pflanzlichen Ölen alle erforderlichen Modellparameter soweit eliminieren, dass zur Berechnung der Löslichkeit nur noch der interne Stoffaustauschkoeffizient benötigt wird.

Computergestützte Simulationen der Feststoffe und der CO₂-Moleküle führen zu molekularen elektrostatischen Potentialen (Politzer et al., 1992). Wenn die Moleküloberflächenpotentiale konstant sind, weist das Molekül eine gute CO₂-Löslichkeit auf. Die Gesamtvarianz der Potentiale, bestehend aus positiven und negativen Anteilen, wird logarithmiert und gegen den Logarithmus der Moleküllöslichkeit aufgetragen. Dieser lineare Zusammenhang dient zur Vorhersage der CO₂-Löslichkeit bei anderen Bedingungen. Da die Molekülgröße eine wichtige Rolle spielt, verliert dieses Modell seine Gültigkeit bei der Übertragung auf andere Moleküle (Politzer et al., 1993). Die Einführung einer zweiten Variablen, die die Molekülgröße beschreibt, ermöglicht die Übertragung des Modells auf andere Substanzen sowie eine Verbesserung der Korrelation des linearen Zusammenhanges. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Wechselwirkungen zwischen den Feststoffmolekülen eine größere Rolle spielen als die Wechselwirkungen zwischen Feststoff und Lösungsmittel, wobei diese trotz allem nicht vernachlässigt werden dürfen.

Engelhardt und Jurs (1997) verwenden ein QSPR (quantitative structure-property relationship) um die Löslichkeit von 58 organischen Verbindungen in überkritischem CO₂ vorher-

zusagen. Numerische Deskriptoren werden anhand der Moleküleigenschaften berechnet und beinhalten Informationen über topologische, geometrische und elektronische Eigenschaften. Sieben Deskriptoren, die den größten Einfluss auf die Löslichkeit haben, werden in das Modell aufgenommen. Daraus wird ein neuronales Netz erstellt, das signifikant bessere Ergebnisse liefert als lineare Modelle.

Bisherige Methoden stellen entweder komplizierte mathematische Modelle dar oder greifen auf geschätzte Parameter zurück. Diese liefern keine zufriedenstellenden Resultate oder sind nur für das untersuchte System gültig. Aus diesem Grunde werden über- und unterkritische Extraktionen sowohl mit CO₂ als auch mit CO₂/Schleppmittel mittels Molecular Modelling simuliert. Die Extrahierbarkeit von Pflanzeninhaltsstoffen soll unter Verwendung einfach erhältlicher Substanzparameter vorhersagbar sein. Dazu werden Inhaltsstoffe von *Harpagophytum procumbens* (Harpagosid, Stachyose), *Aesculus hippocastanum* (Aescin) und *Matricaria recutita* ((-)- α -Bisabolol), sowie unterschiedliche Extraktionsmittel bei verschiedenen Extraktionsbedingungen, simuliert und anschließend mit experimentellen Daten korreliert.

7.1 Löslichkeitsparameter

7.1.1 Theoretische Grundlagen

Der Löslichkeitsparameter δ nach Hildebrand (1916) stellt qualitativ die Lösungsmittelkraft dar und ist als die Wurzel der kohäsiven Energiedichte definiert (Gl. 7-1).

$$\delta = \left(\frac{\Delta H_v - R * T}{V} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Gl. 7-1})$$

V molares Volumen der Substanz

ΔH_v Verdampfungswärme

R allgemeine Gaskonstante

T Temperatur

Hansen (1999) teilt die kohäsive Energiedichte in die Einzelkomponenten des Löslichkeitsparameters δ und stellt die in Gl. 7-2 angegebene Beziehung auf.

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (\text{Gl. 7-2})$$

δ	Löslichkeitsparameter nach Hildebrand
δ_d	Löslichkeitsparameter, der aus den van der Waals-Kräften resultiert
δ_p	Löslichkeitsparameter, der aus den Dipolkräften resultiert
δ_h	Löslichkeitsparameter, der aus den H-Brückenbindungen resultiert

Theoretisch haben Substanzen mit gleichem Löslichkeitsparameter δ ähnliche Eigenschaften und zeigen optimale Löslichkeit untereinander. Diese Regel gilt für organische Lösungsmittel, bei denen das Lösungsverhalten gut vorhergesagt werden kann. In einigen Fällen, vor allem bei polaren Substanzen, wird diese Theorie ungültig (Burke, 1984). Die Vorhersagegenauigkeit der Löslichkeit steigt jedoch an, wenn alle zwischenmolekularen Kräfte, die van der Waals-Kräfte, die Dipol-Kräfte und die H-Brückenbindungen einzeln berücksichtigt werden (Burke, 1984).

7.1.2 Berechnung von Löslichkeitsparametern mittels Molecular Modelling

Da eine experimentelle Bestimmung der Löslichkeitsparameter von CO₂ und CO₂/Schleppmittel unter Extraktionsbedingungen nicht möglich ist, wird eine Charakterisierung mittels Molecular Modelling durchgeführt.

Die Simulationen ergeben drei verschiedene Löslichkeitsparameter: den Löslichkeitsparameter δ nach Hildebrand (1916), der die gesamte Lösungsmittelkraft repräsentiert, sowie einen Löslichkeitsparameter, der die Anteile van der Waals Kräfte δ_d beinhaltet und einen Löslichkeitsparameter, der nur den Anteil der elektrostatischen Kräfte δ_{EL} darstellt (Gl. 7-3). Dieser resultiert sowohl aus den Dipolkräften als auch aus den H-Brückenbindungen, wie in Gl. 7-4 dargestellt ist.

$$\delta = (\delta_{EL}^2 + \delta_d^2)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Gl. 7-3})$$

$$\delta_{EL} = (\delta_p^2 + \delta_h^2)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Gl. 7-4})$$

Tabelle 7-1 gibt einen Überblick über alle berechneten Löslichkeitsparameter der Extraktionsmedien bei unterschiedlichen Bedingungen, wobei δ_d die unpolaren und δ_{EL} die polaren zwischenmolekularen Interaktionen darstellt.

Tab. 7-1 Übersicht der simulierten Extraktionsbedingungen, der gemessenen Dichte, der berechneten Löslichkeitsparameter, sowie der ermittelte Extraktivstoffgehalt im zugehörigen Extrakt

<i>Aesculus hippocastanum</i>								
Extraktionsbedingungen	Druck [bar]	Temperatur [°C]	Schleppmittel	Dichte [kg/m ³]	Aescingehalt [mmol/100g Droge]	Löslichkeitsparameter des Extraktionsmediums		
						elektro ^a	VdW ^b	δ ^c
überkritisch	100	40	Methanol	834	0,107	15,89	9,77	18,73
	200	40	keines	846	0	8,46	9,69	12,9
	200	40	Ethanol	869	0,018	11,99	11,47	16,62
	200	40	Methanol	880	0,103	13	12,08	17,78
	200	50	Methanol	848	0,126	15,98	9,75	18,81
	200	60	Methanol	807	0,119	13,91	10,09	17,22
	200	70	Methanol	766	0,078	11,48	10,53	15,63
	300	40	Methanol	920	0,13	13,97	12,31	18,65
unterkritisch	90	50	Methanol	523	1,561	23,42	13,12	27,58
	100	60	Methanol	479	1,505	d	d	d
	100	70	Ethanol	399	0,807	20,49	13,03	24,51
	100	70	Methanol	406	1,5	25,32	11,32	28,42
<i>Harpagophytum procumbens</i>								
Harpagosidgehalt								
überkritisch	80	40	Ethanol	806	1,028 ^e	12,71	11,01	16,84
	200	40	keines	846	0 ^{e,f}	8,46	9,69	12,9
	200	40	Ethanol	869	0,958 ^e	11,99	11,47	16,62
	200	40	Ethanol	869	0,110 ^f	11,99	11,47	16,62
	200	40	Methanol	880	0,183 ^f	13	12,08	17,78
	200	60	Ethanol	795	1,247 ^e	11,88	10,45	15,84
	200	60	Ethanol	795	0,162 ^f	11,88	10,45	15,84
	200	60	Methanol	806	0,187 ^f	13,91	10,09	17,22
	300	40	Ethanol	909	0,138 ^f	12,26	11,77	17,03
	300	40	Methanol	920	0,202 ^f	13,97	12,31	18,65
	400	40	Ethanol	945	0,13 ^f	12,07	11,97	17,03
	400	40	Methanol	953	0,19 ^f	14,2	12,27	18,8
	unterkritisch	60	40	Ethanol	328	1,284 ^e	22,82	14,46
70		40	Ethanol	443	1,383 ^e	20,56	14,12	25,29
80		60	Ethanol	338	1,676 ^e	21,06	13,71	25,4
100		60	Ethanol	542	1,641 ^e	21,36	14,73	26,1
100		70	Ethanol	399	1,858 ^e	20,49	13,03	24,51

^a Löslichkeitsparameter aus elektrostatischen Kräften berechnet [(J/cm³)^{1/2}]

^b Löslichkeitsparameter aus Van der Waals Kräften berechnet [(J/cm³)^{1/2}]

^c Löslichkeitsparameter [(J/cm³)^{1/2}] nach Hildebrand

^d Berechnung war aufgrund fehlender Daten nicht möglich

^e granuliert Droge

^f geschnittene Droge

Hydrophile Substanzen können mit reinem überkritischem CO₂ nicht extrahiert werden, so dass die Polarität des Extraktionsmittels durch Zusatz von Schleppmitteln erhöht werden muss (Kap. 5.1.1.2). Für die Extrahierbarkeit polarer Pflanzeninhaltsstoffe sind hydrophile Wechselwirkungen zwischen CO₂/Schleppmittel und den Feststoffmolekülen verantwortlich. Löslichkeitsparameter, die nur Anteile zwischenmolekularer Kräfte beschreiben, sind gut geeignet, um Moleküllöslichkeiten vorherzusagen. Häufig ist eine Variation der Löslichkeit nur eine Folge sich ändernder Dipolkräfte und H-Brückenbindungen (Bustamante et al., 1998), während sich die van der Waals Kräfte kaum verändern. Der Gebrauch der Löslichkeitsparameter, die nur Anteile der herrschenden Interaktionen beschreiben, verbessert, im Vergleich zum Gesamtlöslichkeitsparameter δ , die Vorhersagegenauigkeit (Pena, et al., 2000). Demzufolge fungiert der, aus den Simulationen berechnete Löslichkeitsparameter δ_{EL} , der die elektrostatischen Kräfte beschreibt, als Parameter, mit dem die Extrahierbarkeit polarer Inhaltsstoffe aus Drogenmaterial vorhergesagt werden kann. Umso größer der Wert von δ_{EL} , desto polarer das Lösungsmittel oder die Substanz, und umso mehr polare zwischenmolekulare Kräfte existieren.

7.1.3 Vergleich der Polarität der Pflanzeninhaltsstoffe

Vier Inhaltstoffe (Abb. 7-1), die sich in ihrer Polarität unterscheiden, werden bei Raumtemperatur, bei 70 bar/40 °C und 100 bar/70 °C, was unterkritischen Bedingungen des Extraktionsmittels entspricht, sowie bei 200 bar/40 °C und 200 bar/60 °C, entsprechend überkritischen Extraktionsmittelbedingungen, simuliert.

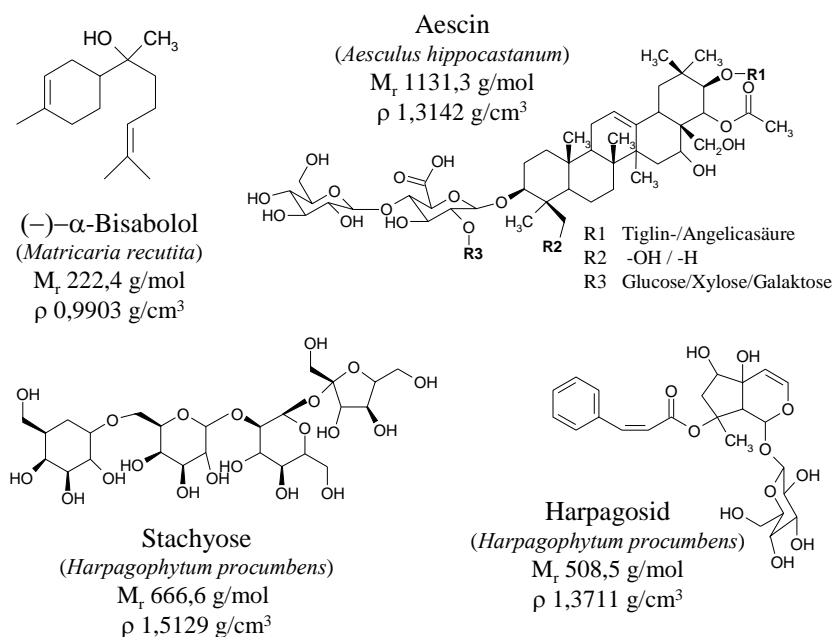


Abb. 7-1 Inhaltsstoffe unterschiedlicher Arzneipflanzen, die simuliert werden.

Keines der Moleküle zeigt zwischen Raumtemperatur, über- oder unterkritischem Zustand, signifikante Unterschiede in den Werten von δ_{EL} und demzufolge in der Polarität (Abb. 7-2).

(-)- α -Bisabolol ist mit nur einer polaren funktionellen Gruppe das lipophilste Molekül mit dem geringsten Wert für δ_{EL} (Abb. 7-2). Die polareren Moleküle Harpagosid und Aescin weisen einen höheren, aber gleichen elektrostatischen Löslichkeitsparameter δ_{EL} auf. Der Unterschied zwischen Harpagosid und Aescin besteht in einer anderen Verteilung der polaren funktionellen Gruppen. Während die funktionellen Gruppen bei Harpagosid gleichmäßig über das gesamte Molekül verteilt sind, weist Aescin einen polaren und einen lipophilen Teil auf. Des Weiteren ist Aescin ungefähr doppelt so groß wie Harpagosid. Das hydrophilste Molekül ist das Tetrasaccharid Stachyose mit einem δ_{EL} von 23.

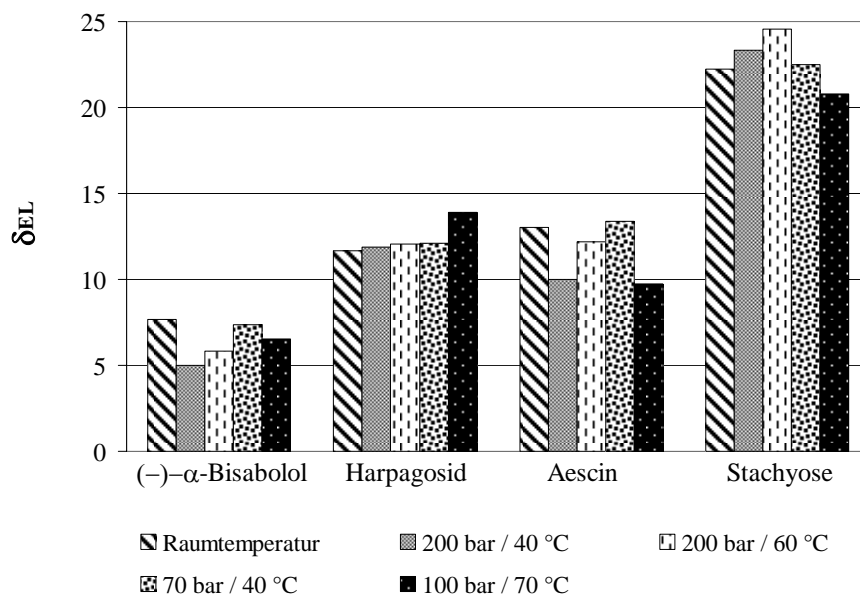


Abb. 7-2 Polaritätsvergleich verschiedener pflanzlicher Inhaltsstoffe

7.1.4 Vergleich der Polarität der Extraktionsmedien

Reines überkritisches CO_2 zeigt die geringste Polarität im Vergleich zu Extraktionsmedien, die Schleppmittel enthalten (Abb. 7-3). In reinem überkritischem CO_2 findet mit steigendem Druck eine Polaritätserhöhung statt, die durch einen Dichteanstieg erklärt werden kann. Demzufolge erhöht sich bei hohem Druck die Elutionskraft zugunsten der polaren Moleküle, so dass eine selektive Anreicherung lipophiler Substanzen vor allem im niedrigen Druckbereich stattfindet. Römpp (2003) kann zeigen, dass sich das lipophile Molekül Hyperforin, einer der Hauptinhaltsstoffe von *Hypericum perforatum*, selektiv bei 120 bar anreichern lässt, während die Selektivität im höheren Druckbereich nachlässt und der Hyperforingehalt aufgrund der Extraktion weiterer Bestandteile sinkt. (-)- α -Bisabolol zeigt ein ähnliches Verhalten (Kaiser,

2003), wobei die Selektivität für dieses Molekül bei 90 bar am größten ist. Dieser Unterschied liegt darin begründet, dass Hyperforin ($M_r = 536 \text{ g/mol}$) im Vergleich zu $(-)\text{-}\alpha\text{-Bisabolol}$ ($M_r = 222,4 \text{ g/mol}$) ein größeres Molekül darstellt und deshalb polarere Extraktionsmittel benötigt werden, um die Substanz in gleichem Maße extrahieren zu können.

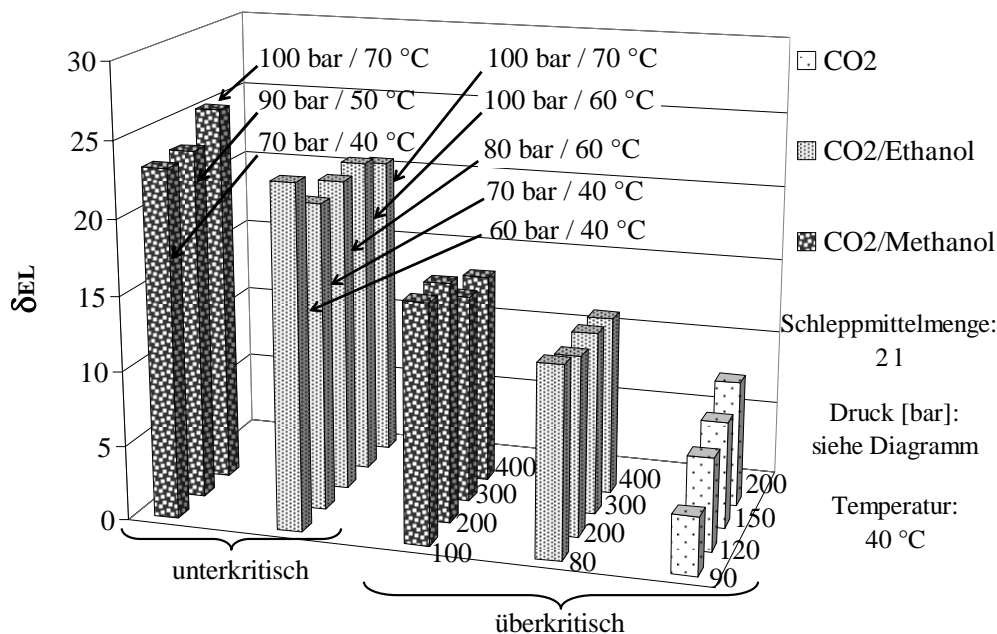


Abb. 7-3 Polaritätsvergleich verschiedener Extraktionsmedien

Um polare Moleküle, wie zum Beispiel Harpagosid extrahieren zu können, reicht eine Dichteerhöhung des Extraktionsmittels nicht aus, sondern es müssen Schlepptmittel zugesetzt werden, die die Polarität des Extraktionsmittels erheblich steigern (Walsh et al., 1987). Ethanol und Methanol werden überkritischem CO₂ in einer Konzentration von 25 % als Schlepptmittel zugesetzt. Diese CO₂/Schlepptmittel-Gemische weisen eine ähnliche Dichte wie reines überkritisches CO₂ auf (Tab. 7-1). Trotzdem zeigen diese Extraktionsmittel eine wesentlich höhere Elutionskraft für polare Substanzen, so dass die Dichte nicht mehr für eine Polaritätssteigerung verantwortlich gemacht werden kann. Die Erhöhung der Polarität beruht auf der Ausbildung polarer zwischenmolekularer Kräfte, die in δ_{EL} zum Ausdruck kommen. Tab. 7-2 verdeutlicht den Anstieg zwischenmolekularer Kräfte durch Zusatz steigender Schlepptmittelkonzentrationen. Während die Dichte gleich bleibt, steigt δ_{EL} kontinuierlich an. Abb. 7-3 zeigt die höhere Polarität der CO₂/Schlepptmittel-Extraktionsmedien im Vergleich zu reinem überkritischem CO₂. CO₂/Methanol-Gemische weisen höhere δ_{EL} im Vergleich zu CO₂/Ethanol-Gemischen auf. Die Polarität kann weiter erhöht werden, wenn man nicht im überkritischen, sondern im unterkritischen Bereich mit Schlepptmitteln extrahiert.

Tab. 7-2 *Polaritätsvergleich verschiedener Ethanolkonzentrationen in überkritischem CO₂ (200 bar/40 °C) im Hinblick auf die Dichte und δ_{EL}*

Schleppmittelkonzentration	Dichte des Extraktionsmediums [kg/m ³]	δ_{EL}
0 % (reines CO ₂)	846	11,06
5 %	850	11,52
10 %	856	12,56
25 %	859	17,37

7.2 *Vorhersage der Extrahierbarkeit pflanzlicher Inhaltsstoffe und Korrelation mit experimentellen Daten*

Ermittlung des minimalsten notwendigen elektrostatischen Löslichkeitsparameters δ_{EL} , um pflanzliche Inhaltsstoffe extrahieren zu können

Der Löslichkeitsparameter δ_{EL} , der den Anteil der elektrostatischen Kräfte beschreibt, kann als Parameter zur Vorhersage der Extrahierbarkeit von Pflanzeninhaltsstoffen aus Drogen verwendet werden. Wenn δ_{EL} des Extraktionsmittels den gleichen Wert annimmt, den der Extraktivstoff aufweist, wird sich dieser lösen und im Extrakt erscheinen (Abb. 7-4). Diese Angleichung von δ_{EL} ist notwendig, um die polaren zwischenmolekularen Kräfte auf die gleiche Stärke zu bekommen. Erst wenn diese Kräfte gleich groß sind, kann ein Molekül aus einer Pflanzenmatrix gelöst werden.

Da (-)- α -Bisabolol, eine sehr lipophile Substanz, bei überkritischen Extraktionsbedingungen einen δ_{EL} von 5,0-5,8 aufweist, der im Bereich von reinem überkritischem CO₂ (3,9-8,5) liegt, ist die Substanz löslich und erscheint im Extrakt. Hydrophilere Moleküle wie Harpagosid oder Aescin haben bei identischen Extraktionsbedingungen einen δ_{EL} -Wert von 10,0-14,6, der deutlich höher liegt als der des CO₂. Infolgedessen erfolgt noch keine Lösung aus der Pflanzenmatrix. Erst bei Steigerung des Extraktionsmittels auf den gleichen Wert von δ_{EL} lösen sich die Moleküle und erscheinen im Extrakt. Dies wird mit überkritischem CO₂, das mit Ethanol oder Methanol modifiziert ist (10,2-15,9), erreicht. Die stark hydrophile Stachyose mit einem δ_{EL} von 23 kann nur im unterkritischen Bereich unter Einsatz von Schleppmitteln extrahiert werden.

Wenn der Gehalt hydrophiler Inhaltsstoffe im Extrakt erhöht werden soll, muss die Polarität des Extraktionsmittels gesteigert werden (Abb. 7-5). Polarere Extraktionsmittel bilden

stärkere polare zwischenmolekulare Kräfte aus, so dass die resultierende höhere Elutionskraft die Extraktivstoffausbeute verbessert.

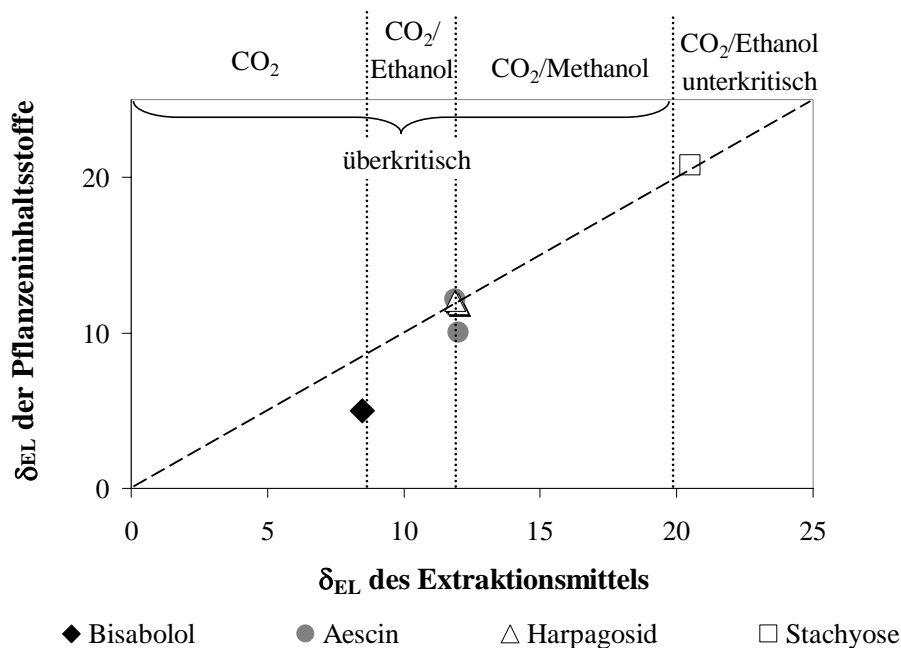


Abb. 7-4 Abschätzung der Löslichkeit von Pflanzeninhaltsstoffen in verdichtetem CO₂

Korrelation mit experimentellen Daten

Die sekundären Wurzeln der Teufelskralle werden mittels CO₂ und Ethanol als Schlepplmittel in einer Konzentration von 26 % extrahiert. Es wird mit unterschiedlichen Extraktionsdrücken und -temperaturen sowohl im überkritischen als auch im unterkritischen Bereich gearbeitet (Kap. 5.1.1.2). Die resultierenden Harpagosidgehalte der Extrakte werden mit δ_{EL} des Extraktionsmittels korreliert (Abb. 7-5). Reines überkritisches CO₂ weist eine zu geringe Polarität auf, um Harpagosid aus der Wurzelmatrix zu extrahieren. Demzufolge enthalten alle reinen CO₂-Extrakte kein Harpagosid. Überkritisches CO₂/Ethanol stellt das Extraktionsmittel mit der geringsten Elutionskraft für die Extrahierbarkeit von Harpagosid dar, da δ_{EL} von Extraktionsmittel und Molekül gleich sind. Der Harpagosidgehalt im Extrakt beträgt 1 bis 1,3 mmol/100 g eingesetzter Droge. Die Harpagosidausbeute kann gesteigert werden, in dem statt im überkritischen im unterkritischen Bereich mit Ethanol als Schlepplmittel extrahiert wird. Aufgrund der stärkeren zwischenmolekularen Kräfte erhöht sich die Ausbeute auf das Doppelte und erreicht einen Harpagosidgehalt von 1,9 mmol/100 g Droge.

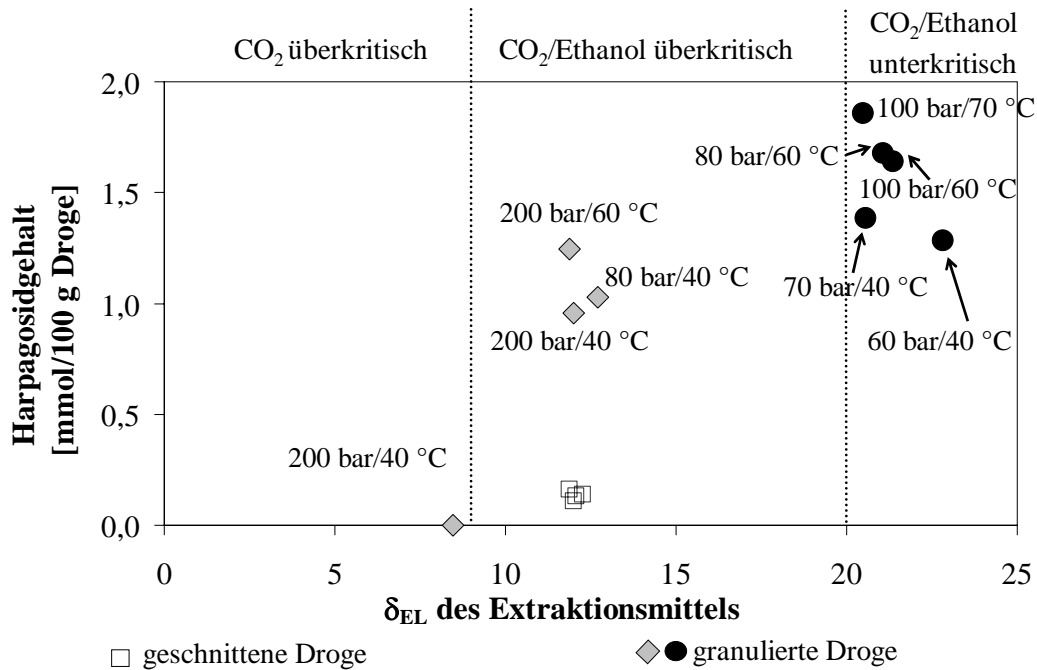


Abb. 7-5 Harpagosidgehalt im Extrakt in Abhängigkeit der elektrostatischen Kräfte des Extraktionsmittels

Es ist weder im überkritischen noch im unterkritischen Bereich möglich, durch Steigerung der Extraktionstemperatur oder des Extraktionsdruckes eine Erhöhung der Extraktausbeute und der Extraktivstoffgehalte zu erreichen.

Abb. 7-6 zeigt eine Übersicht verschiedener Extraktivstoff-Gehalte unterschiedlicher CO₂-Extrakte in Abhängigkeit der Polarität des Extraktionsmittels.

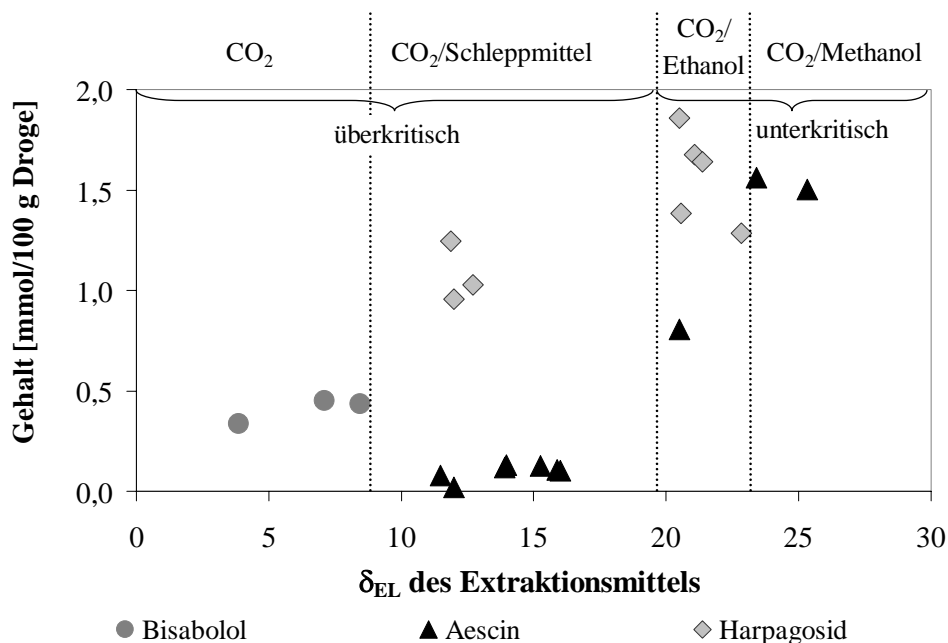


Abb. 7-6 Übersicht des Extraktivstoff-Gehaltes verschiedener Extrakte in Abhängigkeit von der Polarität des Extraktionsmittels

Die Extrahierbarkeit von Substanzen aus Drogen ist mittels Molecular Modelling unter Anwendung des elektrostatischen Löslichkeitsparameters δ_{EL} abschätzbar. Absolute Löslichkeiten und die daraus resultierenden Ausbeuten der jeweiligen Substanzen im Extrakt sind jedoch nicht vorhersagbar, da sie von weiteren Faktoren beeinflusst werden:

Moleküle mit einem Molekulargewicht über 700 g/mol zeigen eine schlechte CO₂-Extrahierbarkeit, da sie nur unzureichend von CO₂-Molekülen umgeben werden können (Vieira de Melo et al., 1999). Die Löslichkeit wird mit steigender Molekülgröße geringer, so dass ein Zusatz von Schleppmitteln zwingend erforderlich wird, um größere Moleküle zu extrahieren (Bartle et al., 1990). Aus diesem Grunde zeigt Aescin, trotz gleicher Polarität wie Harpagosid, sowohl in überkritischen als auch unterkritischen CO₂/Ethanol-Mischungen deutlich geringere Ausbeuten (Abb. 7-6). Des Weiteren weist das große Aescinmolekül im Vergleich zu Harpagosid einen kleineren Diffusionskoeffizienten auf. Die Wanderung aus der Pflanzenmatrix an die Oberfläche verläuft dadurch wesentlich langsamer. Die Diffusionsgeschwindigkeit stellt einen limitierenden Faktor dar (Reverchon et al., 1993a) und hat großen Einfluss auf die Extraktausbeute.

Ein weiterer Einflussfaktor ist die Partikelgröße der eingesetzten Droge. Bei CO₂-Extraktionen kann das Drogenmaterial nicht quellen, so dass überwiegend eine Abschwemme der Inhaltsstoffe aus der Partikeloberfläche erfolgt. Bei groben Partikeln wird das Innere der Droge vom Extraktionsmittel nicht erreicht (Reverchon und Marrone, 2001). Folglich führt die Extraktion kleiner Partikel mit größerer Oberfläche zu höheren Ausbeuten. Abb. 7-5 zeigt diesen Einfluss am Beispiel von Harpagosid. Geschnittene Droge (Teilchengröße: 40 % zwischen 250 µm und 800 µm) zeigt bei gleichen Extraktionsbedingungen und somit gleicher Polarität des Extraktionsmittels einen deutlich geringeren Harpagosidgehalt von 0,16 mmol/100 g eingesetzter Droge im Vergleich zu pulverisierter granulierter Droge ($d_{50} = 443,4 \mu\text{m}$), die eine Ausbeute von 1,25 mmol/100 g Droge aufweist.

Einen wichtigen Faktor stellen die Beschaffenheit der Pflanzenmatrix sowie die unmittelbare Umgebung des Extraktivstoffes in dieser Matrix dar. Der Feststoff kann von der Matrix adsorbiert werden (Subra et al., 1998). Die unmittelbare Umgebung der zu lösenden Substanz kann die Extraktion auf zwei verschiedene Arten beeinflussen. Einerseits können die Begleitstoffe die Extraktion der Substanz behindern, da diese bevorzugt extrahiert werden (Schaeffer et al., 1989). Erst nachdem diese entfernt sind, findet eine vermehrte Extraktion der interessierenden Substanz statt. Andererseits kann die Extrahierbarkeit des Feststoffes durch die Nachbarmoleküle auch erhöht werden (Cochran et al., 1990). Dies ist durch die zwischenmolekularen Kräfte der zu lösenden Substanz respektive der Begleitstoffe und der Matrix erklärbar.

Wenn die zwischenmolekularen Kräfte und somit die Affinität der Begleitmoleküle zur Matrix kleiner sind als die, der zu extrahierenden Substanz, werden bevorzugt die Begleitsubstanzen extrahiert. Sind allerdings deren Kräfte zur Matrix größer, dann hat die zu extrahierende Substanz eine höhere Affinität zum Extraktionsmittel und erscheint vermehrt im Extrakt. Jeong und Chesney (1999) postulieren den anziehenden Effekt zwischen Matrix und der zu lösenden Substanz als den einflussreichsten, der nicht ausschaltbar und vorhersagbar ist.

7.3 Zusammenfassung

Die Simulationen der CO₂-Extraktionen mittels Molecular Modelling erfordern als Eingabeparameter nur die Strukturformeln und die Dichten der zu simulierenden Substanzen. Die Extrahierbarkeit von Pflanzeninhaltsstoffen kann durch Berechnung des Löslichkeitsparameters δ_{EL} , der den Anteil der elektrostatischen Kräfte repräsentiert, vorhergesagt werden. Wenn δ_{EL} des Extraktionsmittels den gleichen Wert annimmt wie die zu extrahierende Substanz, erscheint das Molekül im Extrakt. Die Ausbeute dieses Extraktivstoffes kann weiter erhöht werden, wenn man ein Extraktionsmittel mit einem höheren Wert von δ_{EL} wählt. Eine Vorhersage von absoluten Extraktivstoffgehalten kann nicht getroffen werden, da die Molekülgröße der Substanzen, die Partikelgröße der eingesetzten Droge und die Beschaffenheit der Pflanzenmatrix die Löslichkeit beeinflussen und auch limitieren können. Die Beschaffenheit der Pflanzenmatrix sowie die Umgebung der Substanz innerhalb der Matrix ist ein unbekannter Faktor, der von Droge zu Droge variiert und nicht mit einem konstanten Parameter beschrieben werden kann.

Die Simulationen haben gezeigt, dass eine Polaritätssteigerung des Extraktionsmittels nicht allein durch eine Dichteerhöhung bewirkt wird. Im überkritischen Bereich mit reinem CO₂ kann der Polaritätsanstieg mit zunehmendem Druck auf die resultierende Dichtesteigerung zurückgeführt werden. Bei Zusatz von Schlepptmitteln hat jedoch die Dichte keinen Einfluss mehr auf Polaritätseffekte. Diese kommen ausschließlich durch zwischenmolekulare Kräfte zustande, die die entscheidende Größe in Bezug auf die CO₂-Löslichkeit darstellen.

8. EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 *Materialien*

8.1.1 **Drogen**

Sekundäre Wurzeln der Teufelskralle (*Harpagophyti radix*) werden als grob geschnittene Droge (Ch.-B. WE808295) von Fa. Schwabe und als pulverisierte Droge (Ch.-B. 4019, 5959) von Fa. Galke bezogen.

Die Samen der Rosskastanie (*Hippocastani semen*) werden als grob geschnittene Droge (Ch.-B. 994529) von Fa. Schwabe bereitgestellt.

Alle Drogen werden in verschlossenen Kunststoffkanistern bei Raumtemperatur gelagert.

8.1.2 **Handelsextrakte**

Handelsüblicher Teufelskrallenextrakt (Ch.-B. 02012090) wurde von Fa. Lichtwer, Rosskastaniensamen-Extrakt (Ch.-B. 46836) von Fa. Fujisawa Deutschland bezogen.

8.1.3 **Standardsubstanzen**

Tab. 8-1 Standardsubstanzen

<i>Substanz</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Aescin	2298806	Fa. Fluka
D (-)-Fructose	K20889221	Fa. Merck
D (+)-Galaktose	Art.-Nr. 104061	Fa. Merck
D (+)-Glucose (wasserfrei)	K25835437	Fa. Merck
Harpagosid	01112315	Fa. Extrasynthèse
Methylcinnamat	425363/123602	Fa. Fluka
Natriumtartrat-2-hydrat	33410	Fa. Riedel-de-Haën
D (+)-Raffinose	02040803	Fa. Extrasynthèse
Saccharose	Art.-Nr. 001010	Fa. Südzucker
Stachyose	02040802	Fa. Extrasynthèse

8.1.4 Lösungsmittel und Chemikalien

Tab. 8-2 Lösungsmittel und Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
<i>Substanzen für die Extraktionen</i>		
n-Butanol	Art.-Nr. 19430	Fa. Fluka
Elcema G 250	Ch.-B. 0780290825	Fa. Degussa Fa. Rettenmaier & Söhne
Ethanol > 99,8 %	Ch.-B. 3085-M	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein
Flüssig-CO ₂ (Typ 2.7)	Art.-Nr. 0458	Fa. Messer Griesheim
Methanol	Art.-Nr. M/4056/17	Fa. Fisher Scientific
n-Propanol	Art.-Nr. 100996	Fa. Merck
<i>Substanzen für die Analytik</i>		
Anisaldehyd	Art.-Nr. 159608	Fa. Merck
Aqua ad injectabilia	Umkehrosiose mit an- schließender Destillation	Pharm. Technologie Universität Tübingen
Chloroform	Art.-Nr. 25685	Fa. Fluka
1,2-Dichlorethan	Art.-Nr. 100955	Fa. Merck
Eisessig	Art.-Nr. 100062	Fa. Merck
Ethanol	Art.-Nr. 111727	Fa. Merck
Ethylacetat	Art.-Nr. 109623	Fa. Merck
Formamid	Art.-Nr. 33272	Fa. Riedel-de-Haën
Hydranal Composite 5	Art.-Nr. 34805	Fa. Riedel-de-Haën
Helium (Typ 4.6)	Art.-Nr. 0385	Fa. Messer Griesheim
Methanol	Art.-Nr. M/4056/17	Fa. Fisher Scientific
Schwefelsäure konz.	Art.-Nr. 100731	Fa. Merck
Thymol	Art.-Nr. 159681	Fa. Merck
Vanillin	Art.-Nr. 159466	Fa. Merck

Substanzen für pharmakologische in-vitro Untersuchungen

Acetylsalicylsäure	Art.-Nr. 0164221	Fa. Rhodia
Ammoniumchlorid	Art.-Nr. 100924	Fa. Merck
Calciumchlorid	Art.-Nr. 102378	Fa. Merck
Calciumionophor A23187	Art.-Nr. 21186	Fa. Fluka
Cremophor-EL	Art.-Nr. 9038005	Fa. BASF
Dimethylsulfoxid	Art.-Nr. D5879	Fa. Sigma-Aldrich
Dinatrium-EDTA	Art.-Nr. E4884	Fa. Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Art.-Nr. 106585	Fa. Merck
D-(+)-Glucose (wasserfrei)	Art.-Nr. 108337	Fa. Merck
Gentamicinsulfat	Art.-Nr. G1914	Fa. Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Art.-Nr. 104935	Fa. Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Art.-Nr. 104871	Fa. Merck
Kaliumhydrogencarbonat	Art.-Nr. 104852	Fa. Merck
Lipopolysaccharide, E. coli Serotyp O26:B26	Art.-Nr. 2762	Fa. Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Art.-Nr. 116224	Fa. Merck
Nordihydroguajaretsäure	Art.-Nr. 74540	Fa. Sigma-Aldrich
Percoll®	Art.-Nr. DMB10	Fa. Sigma-Aldrich
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Art.-Nr. T8154	Fa. Sigma-Aldrich

8.1.5 sonstige Verbrauchsmaterialien*Tab. 8-3 Sonstige Verbrauchsmaterialien*

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Eppendorf-Tubes, PP	Art.-Nr. 0030 125.150	Fa. Eppendorf
Membranfilter 0,2 µm Celluloseacetat Ø 25 mm	Art.-Nr. 11107-25-N	Fa. Sartorius
Membranfilter 0,2 µm regenerierte Cellulose Ø 47 mm	Art.-Nr. 18407-47-N	Fa. Sartorius
Glaskapillaren	Art.-Nr. 709107	Fa. Brand
Rundfilter Sorte 595 Ø 110 mm	Art.-Nr. 311610	Fa. Schleicher & Schüll

Fortsetzung Tab. 8-3

Vials für HPLC-Proben	Art.-Nr. 218A1103	Fa. Bender & Hobein
Septen (HPLC)	Art.-Nr. 275A1361	Fa. Bender & Hobein
Falconröhrchen, konisch	Art.-Nr. 5702 734.004	Fa. Eppendorf

8.2 Allgemein verwendete Geräte*Tab. 8-4 Geräte zur allgemeinen Verwendung*

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
Heizpilz G2 R/259	Fa. Heraeus
Kühlschrank Liebherr Premium (+5 °C)	Fa. Liebherr
Laborwaage Mettler AE200	Fa. Mettler-Toledo
Laborwaage Mettler PC1616 Delta Range	Fa. Mettler-Toledo
Laborwaage Mettler PM4600 Delta Range	Fa. Mettler-Toledo
Muldestor	Fa. Wagner & Munz
Schneidmühle Pulverisette	Fa. Fritsch
Trockenschrank SI 5042	Fa. Heraeus
Turbula –Mischer T2C	Fa. Bachofen
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H	Fa. Bandelin
Ultra-Turrax T25	Fa. IKA-Werke
Umkehrosiose-Anlage Hemo-RO	Fa. Millipore
Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor-R	Fa. Büchi
Vakuumtrockenschrank VDL 53	Fa. Binder

8.3 *Datenverarbeitung*

Rechner: Pentium-4 2,60 GHz, 256 MB RAM, 40 GB Festplatte

Tab. 8-5 *Allgemein verwendete Software*

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

8.4 *Analytische Verfahren*

8.4.1 **Qualitative Dünnschichtchromatographie**

8.4.1.1 **Nachweis der Zucker aus *Harpagophytum procumbens***

Die Bestimmung der Zucker erfolgt in Anlehnung an die Monographie für „Saccharose“, wie in der European Pharmacopoeia 4.0 (2002) beschrieben.

Probenaufbereitung

Sowohl die Referenzsubstanzen (2,5 mg, genau gewogen) als auch die Extrakte (50 mg, genau gewogen) werden in 5 ml einer Mischung aus Methanol/Wasser (3/2, V/V) gelöst.

Methodenbeschreibung

Stationäre Phase	Nucleosil 60 F ₂₅₄ HPTLC Platten (Art.-Nr. 1.05642), Fa. Merck
Mobile Phase	Wasser/Methanol/Eisessig/Dichlorethan (10/15/25/50, V/V/V/V)
Laufstrecke	15 cm
Sprühreagenz	0,5 g Thymol/5 ml Schwefelsäure/95 ml Ethanol

Die Auftragung der Proben erfolgt strichförmig von Hand mittels 5 µl Glaskapillaren (Fa. Brand). Die Platte wird in einer gesättigten Glaskammer, die 100 ml mobile Phase enthält, vertikal entwickelt und anschließend an der Luft getrocknet. Danach erfolgt eine zweite Entwicklung der Platte in frischem Fließmittel. Die getrocknete Platte wird mittels eines Glas-Sprühfingers und Pressluft mit Reagenz besprüht und danach für 10 min bei 120 °C im

Trockenschrank (Fa. Heraeus) erhitzt. Durch die Erwärmung färben sich die aufgetrennten Substanzen, die am Tageslicht betrachtet und ausgewertet werden.

8.4.1.2 Nachweis von Harpagosid

Probenaufbereitung

1 mg Harpagosid, genau gewogen, wird in 1 ml Methanol gelöst.

10 mg der Extrakte, genau gewogen, werden jeweils in 1 ml Methanol dispergiert und 1 min im Ultraschallbad behandelt.

Methodenbeschreibung

Stationäre Phase	Nucleosil 60 F ₂₅₄ HPTLC Platten (Art.-Nr. 1.05642), Fa. Merck
Mobile Phase	Wasser/Methanol/Ethylacetat (8/15/77, V/V/V)
Laufstrecke	8 cm
Sprühreagenz	0,5 ml Anisaldehyd/10 ml Eisessig/85 ml Methanol/5 ml konzentrierte Schwefelsäure

Nach der strichförmigen Handauftragung der Proben (5 µl Glaskapillaren) erfolgt die vertikale Entwicklung der Platte in einer gesättigten Glaskammer, die 100 ml mobile Phase enthält. Die an der Luft getrocknete Platte wird mittels eines Glas-Sprühfingers und Pressluft mit Sprühreagenz besprüht und anschließend für 15 min bei 120 °C im Trockenschrank (Fa. Heraeus) erhitzt. Die Auswertung der abgekühlten Platte erfolgt am Tageslicht.

8.4.1.3 Nachweis von Aescin

Probenaufbereitung

1 mg Aescin, genau gewogen, wird in 1 ml Methanol gelöst.

10 mg der Extrakte, genau gewogen, werden jeweils in 1 ml Methanol dispergiert und 1 min im Ultraschallbad behandelt.

Methodenbeschreibung

Stationäre Phase	Nucleosil 60 F ₂₅₄ HPTLC Platten (Art.-Nr. 1.05642), Fa. Merck
Mobile Phase	Chloroform/ Methanol/Wasser (51/40/8, V/V/V)
Laufstrecke	12 cm
Sprühreagenz	0,5 ml Anisaldehyd/10 ml Eisessig/85 ml Methanol/ 5 ml konzentrierte Schwefelsäure

Die Auftragung und Entwicklung erfolgt wie in 8.4.1.2. beschrieben.

8.4.2 LC-MS Identifizierung der Harpagophytum-Extrakte

Probenaufbereitung

Die Extrakte werden jeweils zu 10 mg in 1 ml Methanol gelöst.

HPLC-Bedingungen

Gerät	HP 1010 Flüssigkeitschromatograph mit Dioden-Array-Detektor, Fa. Hewlett Packard
Säule	Zorbax SB-C-18, 150-4,6 (Partikelgröße 3 µm) Fa. Agilent Technologies, Deutschland
Mobile Phase	A) 0,15 % Essigsäure B) Acetonitril
Gradientenprogramm	0-5 min von 95 % A zu 85 % A 5-7 min von 85 % A zu 82 % A 7-25 min von 82 % A zu 75 % A 25-32 min von 75 % A zu 70 % A 32-35 min von 70 % A zu 98 % A
Flussrate	1 ml/min
Säulentemperatur	25 °C
Einspritzvolumen	10 µl
Detektion	UV 295 nm, UV 280 nm, UV 325 nm

MS-Bedingungen

Gerät	Ionenfalle Esquire 3000+, Fa. Bruker Daltonik koaxialer Zerstäuber: sheath-liquid sprayer, Fa. Agilent Technologies, USA
Spannung	4 kV
Zerstäubergas	30 psi
Trockengas	10 l/min
Temperatur	350 °C

Die Peakzuordnung erfolgt durch die aufgenommenen UV-Spektren, den Vergleich der Retentionszeiten sowie der on-line Kopplung mit MS. Die Molekulargewichte werden durch Identifizierung der $[M-H]^-$ -Peaks bestimmt.

8.4.3 Quantitative Bestimmung der Extraktivstoffe

8.4.3.1 Quantitative Bestimmung von Harpagosid mittels HPLC

Methodenbeschreibung

Die Bestimmung von Harpagosid erfolgt in Anlehnung der Monographie von „Devil’s Claw“ (European Pharmacopoeia 5.0, 2005).

Geräte	HPLC-Pumpe Modell 616 mit 600S Controller und integrierter Entgasungseinheit, Fa. Waters Rheodyne 7125 Injektionsventil, 20 µl, Fa. Rheodyne LLC Dioden-Array-Detektor hp 1040A, Fa. Hewlett-Packard Software HPLC ChemStation HP 79994A, Fa. Hewlett-Packard
Analytische Säule	CC 125/4 Nucleosil 100-5 C18, 125 x 4 mm Art.-Nr. 721622.40, Fa. Macherey-Nagel
Vorsäule	CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18, 8 x 4 mm Art.-Nr. 721602.40, Fa. Macherey-Nagel
Mobile Phase	Methanol/Wasser (1/1, V/V)

Die Bestandteile der mobilen Phase werden mit Hilfe einer Filtrationseinheit aus Glas (Fa. Sartorius) durch einen Membranfilter (regenerierte Cellulose, Porenweite 0,2 µm, Fa. Sartorius) einzeln filtriert, abgewogen und gemischt. Anschließend wird das Fließmittel für 30 min im Ultraschallbad entgast. Vor Verwendung wird das Fließmittel erneut 30 min und während der Analysen kontinuierlich bei einem Druck von 4,5 bar mit Helium (Typ 4.6) begast.

Flussrate	1 ml/min
Einspritzvolumen	20 µl
Detektion	UV 200-600 nm Auswertung erfolgt bei UV 278 nm

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

Interne Standardlösung

Als interner Standard wird Methylcinnamat (Fa. Fluka) in einer Konzentration von 600 mg/100 ml Methanol verwendet. Diese Lösung wird den Proben in einer Konzentration von 4,0 ml interner Standard/100,0 ml Probe zugesetzt, um die Richtigkeit der Analysendurchgänge zu verifizieren.

Probenaufbereitung der CO₂-Extrakte

100-250 mg Extrakt, genau gewogen, werden in einem 25 ml Messkolben mit 1,0 ml interner Standardlösung versetzt und zu 25,0 ml mit mobiler Phase aufgefüllt. Die Probe wird 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend durch einen Membranfilter aus Celluloseacetat mit einer Porenweite von 0,2 µm (Fa. Sartorius) filtriert. Die erhaltene Lösung wird direkt als Probenlösung für die HPLC-Bestimmung eingesetzt.

Der Handelsextrakt (280 mg/25 ml) wird analog behandelt.

Probenaufbereitung für die Ausgangsdroge und die extrahierte Droge

1 g pulverisierte Droge, genau gewogen, wird mit 100 ml Methanol unter gelegentlichem Schütteln eine Stunde mazeriert und durch einen Papierfilter (Fa. Schleicher & Schüll) filtriert. Der Filter und der Drogenrückstand werden erneut mit 100 ml Methanol versetzt und eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Der erhaltene Extrakt wird filtriert und der Filter sowie der Drogenrückstand werden nochmals mit 100 ml Methanol eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Filtration werden alle Filtrate vereint und im Vakuumrotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird quantitativ in einen 25 ml Messkolben überführt, mit 1 ml interner Standardlösung versetzt und mit mobiler Phase aufgefüllt. Die so erhaltene Probelösung wird durch einen Membranfilter (Celluloseacetat, 0,2 µm) filtriert und direkt für die HPLC-Bestimmung eingesetzt.

Kalibrierung und Validierung

Linearität von Harpagosid

40,34 mg Harpagosid werden in 10,0 ml Methanol gelöst (Stammlösung). 0,25, 0,9, 1,85, 2,8 und 3,75 ml dieser Stammlösung werden mittels Eppendorf-Pipetten zu je 5,0 ml im Messkolben mit Methanol verdünnt. Die erhaltenen Lösungen werden durch einen Membranfilter (Celluloseacetat, 0,2 µm) filtriert und direkt zur HPLC-Bestimmung verwendet. Von jeder Verdünnung werden sechs Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt.

Richtigkeit (Wiederfindung)

194,1 mg eines CO₂-Extraktes werden in 50,0 ml mobiler Phase (Wasser/Methanol, 1/1, V/V) gelöst, woraus ein Harpagosidgehalt von 116,91 mg/100 ml resultiert (Stammlösung, 100,0 %). 9,0 ml dieses Extraktes werden zu 10,0 ml in mobiler Phase verdünnt, was einer Konzentration von 90,0 % entspricht. Weitere Untersuchungslösungen mit einem Harpagosidgehalt von 111,08 % bzw. 122,15 % werden hergestellt, indem zur obigen Extraktstamm-

lösung 1,0 ml bzw. 2,0 ml einer Harpagosid-Standardlösung (0,6475 mg/ml) zugegeben und anschließend mit Extraktlösung auf 5,0 ml aufgefüllt werden. Alle Lösungen werden durch einen Membranfilter (Celluloseacetat, 0,2 µm) filtriert und direkt als Probe zur HPLC-Bestimmung verwendet. Jede Lösung wird dreimal in willkürlicher Reihenfolge analysiert und daraus die Wiederfindungsrate bestimmt.

Systempräzision

Die filtrierte Lösung eines CO₂-Extraktes (194,1 mg/100 ml mobiler Phase) wird sechsmal injiziert. Der Mittelwert und die relative Standardabweichung werden berechnet.

Methodenpräzision

Aus jeweils 220 g granulierter Wurzel Droge wird sechsmal unabhängig voneinander unter den gleichen Extraktionsbedingungen (200 bar, 40 °C, Schleppmittel Ethanol 26 %) ein Extrakt hergestellt. Die Extrakte werden in jeweils drei Einzelbestimmungen analysiert. Aus den resultierenden Messwerten werden der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet.

Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze

Die Bestimmungs- und Nachweisgrenze wird nach Gottwald (2000) berechnet.

Reinheit

Nach Aufnahme des HPLC-Chromatogrammes mit Hilfe des Dioden-Array-Detektors wird die Reinheit der Harpagosidpeaks durch Überprüfung der Signalverhältnisse von Probe und Standard bei vier verschiedenen Wellenlängen nachgewiesen.

8.4.3.2 Quantitative Bestimmung von Harpagosid und Aescin mittels HPTLC

Methodenbeschreibung

Geräte	Auftragegerät Linomat IV, Fa. Camag
	automatische Entwicklungskammer ADC, Fa. Camag
	Tauchgerät DC-Tauchfix II, Fa. Lothar Baron Laborgeräte
	DC-Scanner PDA-Densitometer 2010 mit Dioden-Array-Detektor mit
	Halogenlampe, Fa. J&M
	Software Spectralys 1.82, Fa. J&M

Stationäre Phase	Nucleosil 60 F ₂₅₄ HPTLC Platten (Art.-Nr. 1.05642), Fa. Merck
Mobile Phase	<i>Harpagosid</i> : Wasser/Methanol/Ethylacetat (8/15/77, V/V/V) <i>Aescin</i> : Chloroform/ Methanol/Wasser (51/40/8, V/V/V)
Laufstrecke	7,5 cm
Tauchreagenz	<i>Harpagosid</i> : 0,5 ml Anisaldehyd/10 ml Eisessig/85 ml Methanol/ 5 ml konzentrierte Schwefelsäure <i>Aescin</i> : 1:1-Mischnug aus 1 % (m/V) Vanillin in Ethanol und 5 % (V/V) konz. Schwefelsäure in Ethanol
Detektion	VIS 400-1000 nm Quantifizierung: Harpagosid 509 nm und Aescin 607 nm

5 µl jeder Probe werden als 10 mm Bande mit einer Geschwindigkeit von 15 µl s⁻¹ automatisch aufgetragen. Der Abstand zwischen den Proben beträgt 5 mm und zur Plattenkante 10 mm, so dass insgesamt 12 Banden pro Platte aufgetragen werden. Das Auftrageschema wird bei jeder Platte wie folgt vorgenommen: zwei verschiedene Extrakte werden jeweils dreimal pro Platte appliziert. Die Standardlösungen in fünf verschiedenen Konzentrationen werden alternierend zu den Extraktproben aufgetragen, wobei die mittlere Standardkonzentration zweimal aufgetragen wird.

Nach der vertikalen Entwicklung unter Kammersättigung wird die Platte 1 min im Kaltluftstrom getrocknet und anschließend 2 s (*Harpagosid*) bzw. 3 s (*Aescin*) in das Reagenz getaucht. Die trockene Platte wird im Trockenschrank (Fa. Heraeus) bei 120 °C für 5 min erhitzt, um die Banden farbig und somit sichtbar zu machen. Die fertig entwickelte Platte wird bis zum Vermessen mit dem DC-Scanner für 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt, damit sich die Farben stabilisieren können. Der Auswertung der Extrakte wird jeweils die interne Kalibrierung der Platte zugrunde gelegt.

Probenaufbereitung der Extrakte

<i>Harpagosid</i> :	30-50 mg CO ₂ -Extrakt in 50,0 ml Methanol 190 mg Handelsextrakt in 50,0 ml Methanol
<i>Aescin</i> :	60-80 mg der unterkritischen CO ₂ -Extrakte in 25,0 ml Methanol 300-400 mg der überkritischen CO ₂ -Extrakte in 25,0 ml Methanol 70 mg Handelsextrakt in 25,0 ml Methanol

Die Extrakte werden in Methanol dispergiert und für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Diese Probenlösung wird ohne weitere Aufbereitung direkt auf die Platte aufgetragen.

Probenaufbereitung des Drogenmaterials von Aesculus hippocastanum

1 g pulverisierte Droge, genau gewogen, wird in 100 ml Methanol dispergiert und 30 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Filtration (Papierfilter, Fa. Schleicher & Schüll) werden der Filter und der Drogenrückstand erneut mit 100 ml Methanol aufgenommen und für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Dieser Vorgang wird nochmals wiederholt. Alle Filtrate werden vereinigt und im Vakuumrotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird quantitativ in einen 50 ml Messkolben überführt und mit Methanol aufgefüllt. Die resultierende Lösung wird direkt auf die DC-Platte aufgetragen.

*Kalibrierung und Validierung**Kalibrierung*

Harpagosid: Stammlösung: 10,74 mg Harpagosid in 25,0 ml Methanol
Verdünnungen: 4, 3, 2, 1 und 0,5 ml der Stammlösung werden im Messkolben zu je 5,0 ml verdünnt

Aescin: Stammlösung: 121,5 mg Aescin in 100,0 ml Methanol
Verdünnungen: 20, 15, 10, 5, und 2,5 ml der Stammlösung werden zu 25,0 ml im Messkolben verdünnt

Von jeder Verdünnung werden auf drei verschiedenen Platten insgesamt sechs Einzelbestimmungen durchgeführt.

Richtigkeit (Wiederfindung)

Tab. 8-6 Einwaagen und Herstellung der Lösungen zur Bestimmung der Richtigkeit

	Harpagosid	Aescin
Einwaage CO ₂ -Extrakt	58,4 mg/100 ml Methanol	355,1 mg/50 ml Methanol
resultierende Stammlösung	17,19 mg Harpagosid/100 ml	53,12 mg Aescin/100 ml
Standardlösung	42,96 mg/100 ml	121,5 mg/100 ml

9,0 ml Stammlösung werden mit Methanol zu 10,0 ml verdünnt, entsprechend 90,0 % Gehalt. Von der Standardlösung werden jeweils 2,0 ml entnommen und mit Extrakt-Stammlösung auf 50,0 ml bzw. 25,0 ml aufgefüllt. Daraus resultieren Lösungen mit 110,0 % bzw. 120,0 %

Harpagosid und 109,15 % bzw. 118,3 % Aescin. Die Lösungen werden insgesamt dreimal direkt auf die Platte aufgetragen und daraus die Wiederfindungsrate ermittelt.

Systempräzision

Ein CO₂-Extrakt wird sechsmal auf die gleiche Platte aufgetragen und daraus werden der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet.

Harpagosid: 57 mg Extrakt/100 ml Methanol

Aescin: 355,1 mg Extrakt/25 ml Methanol

Methodenpräzision

Von jeweils sechs gleich hergestellten Extrakten werden je drei Proben auf eine DC-Platte aufgetragen und vermessen. Aus den Messwerten werden der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet.

Harpagosid: Extrakt aus 220 g granulierter Droge, 200 bar, 40 °C,
26 % (m/m) Schleppmittel Ethanol

Aescin: Drogenauszug der Ausgangsdroge

Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze

Die Bestimmungs- und Nachweisgrenze wird nach Gottwald (2000) berechnet.

Reinheit

Die Reinheit wird über den Match-Faktor vergleichend zu den Referenzsubstanzen ermittelt. Die Überprüfung erfolgt bei drei verschiedenen Wellenlängen.

8.4.4 Wasserbestimmung nach Karl-Fischer

Geräte	Zentraleinheit SM-Titrino 702, Fa. Deutsche Metrohm
	Titrierstand Modell 703, Fa. Deutsche Metrohm
	Software MetroData, Fa. Deutsche Metrohm
Methode	Titriermedium Methanol/Formamid (2:1, V/V)
	Titrans Hydranal Composite 5
	Temperatur 42 °C
	Titrationseendpunkt 210 mV
	Stopkriterium Drift
	Stopdrift 12 µl/min

Titerbestimmung

Die Titerbestimmung von Hydranal Composite 5 erfolgt durch Titration des Standards Natriumtartrat-2-hydrat, das 15,66 % Kristallwasser enthält. Der Wassergehalt aus 150 mg, 60 mg sowie 30 mg, genau gewogen, wird durch dreifache Titration bestimmt. Aus den Ergebnissen wird der Titer, der die Wassermenge pro ml Hydranal angibt, bestimmt.

Titration der Droge

Zur Bestimmung des Wassergehaltes der Teufelskrallenwurzel werden ca. 150 mg Droge, genau gewogen, mit dem Titriermedium versetzt und 60 s mittels Ultra-Turrax dispergiert. Das gesamte System wird weitere 15 min bei 42 °C gerührt. Nach der Titration mit Hydranal Composite 5 werden aus jeweils drei Einzelbestimmungen der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet.

8.4.5 Partikelgrößenbestimmung der Drogen**8.4.5.1 Siebanalyse**

Gerät	Siebturm Retac 3D, Fa. Retsch
Siebe	Edelstahl, geflochten, Fa. Retsch
lichte Maschenweiten [μm]:	Teufelskralle: 250, 500, 710, 1400, 2000, 3150 Rosskastanie: 125, 250, 500, 710, 1400, 2800
Probenmenge	50 g, genau gewogen
Siebibtensität	60 % der maximalen Rüttelintensität
Siebzeit	3 min

Die Auswertung erfolgt gravimetrisch durch Wägung des jeweiligen Rückstandes. Die Masse pro Siebfraction wird prozentual auf die eingesetzte Probenmenge berechnet.

8.4.5.2 Laserbeugungsspektroskopie

Gerät	Mastersizer 2000S, Fa. Malvern Trockendispergiereinheit Scirocco 2000, Fa. Malvern Software Mastersizer 2000 Version 4.0, Fa. Malvern
Messbereich	0,02-2000 μm
Dispergierdruck	Atmosphärendruck
Messzeit	10 s

Die Laserbeugungsspektroskopie wird nur für pulverisierte, granuliert und kompaktierte Teufelskrallendroge angewendet. Die Auswertung erfolgt mittels Mie-Theorie, indem ein Brechungsindex von 1,52 und eine Absorption von 0,1 vorgegeben werden. Aus jeweils drei Einzelmessungen werden der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet.

8.5 *Technologische Verfahren*

8.5.1 Zerkleinerung der Droge

Die Zerkleinerung ist bei den Roskastaniensamen nötig.

Gerät	Schneidmühle Pulverisette, Fa. Fritsch
Umdrehungszahl	2860 min ⁻¹
Siebeinsatz	4 mm, Quadratlochung

8.5.2 Granulation der Droge

Die Granulation der Droge ist bei der pulverisierten Teufelskrallendroge nötig.

8.5.2.1 Feuchtgranulierung

Geräte	Planetenmischer RAPID 3 Z, Fa. F. Herbst & Co. Schlauchpumpe RZR2, Fa. Heidolph SKM Alexander Siebgranulator, Fa. Alexanderwerk Trockenschrank ULE 700, Fa. Memmert
--------	--

Zu je 1000 g pulverisierter Droge werden mittels einer Schlauchpumpe langsam 585 ml Ethanol unter gleichzeitigem Rühren im Planetenmischer zugefügt. Nach der Granulation der homogenen Mischung lässt man einen Teil der Granulationsflüssigkeit unter einem Abzug abdampfen (60 min). Danach erfolgt die vollständige Trocknung des Granulates im Umluft-trockenschrank bei 50 °C für 90 min. Nach Siebung des Granulates wird die Partikelgrößenfraktion, die kleiner als 1000 µm ist, zur Extraktion verwendet.

8.5.2.2 Walzenkompaktierung

Pulverisierter Teufelskrallendroge wird 1 % Magnesiumstearat (Ch.-B. 0266, Fa. Bärlocher) aufgesiebt (Sieb 300 µm) und anschließend 10 min im Rhönradmischer (Eigenbau) gemischt. Diese Mischung wird auf dem Mini-Pactor 250/25 (Fa. Gerteis) kompaktiert, dessen Funktionsweise von Eggelkraut-Gottanka (2001) beschrieben wird.

Kompaktierkraft	2, 4 und 6 kN
Spaltbreite	3 mm
Walzenbeschaffenheit	glatt, Kragenabdichtung
Granulator	Sternrotor, oszillierend, 270° im Uhrzeigersinn, 300° entgegen Uhrzeigersinn
Siebgröße	1,5 mm

8.5.3 Beschreibung der Hochdruckextraktionsanlage

Die verwendete Hochdruckanlage im Pilotmaßstab der Fa. Sitec ist eine Extraktionsanlage, die diskontinuierlich im Batchverfahren arbeitet und detailliert bei Römpp (2003) beschrieben wird. CO₂ als verdichtetes Gas durchströmt kontinuierlich die Anlage und wird im Kreislauf geführt, wobei ein separates Schleppmittelsystem die zusätzliche, kontinuierliche Zudosierung eines zweiten Lösungsmittels erlaubt.

Wichtige Komponenten der Extraktionsanlage

Kälteaggregat SC 21/21 GXT2, Fa. Danfoss

Kühlthermostat minichiller cc (Pumpenkopfkühlung), Fa. Peter Huber

Hochdruckpumpe EH-M-210V1, Fa. Lewa

Membrandosierpumpe EK-M-2101V (Schleppmittelsystem), Fa. Lewa

Heizthermostat E203 (Wärmetauscher, Extraktionsbehälter), Fa. Fa. Lauda

Kälte-/Wärmethermostat ministat cc (Zwischenabscheidung), Fa. Peter Huber

Heizthermostat E103 (Separator), Fa. Lauda

Massendurchflussmesser Massflo 2100 DI - 1,5, Fa. Danfoss

Pneumatische Regelventile 80037-IP, Fa. Kämmer

Messdatenerfassung Adam 4017, Fa. Advantech

Software Visidaq 3.11, Fa. Advantech

Technische Daten der Extraktionsanlage

Volumen Extraktionsbehälter	1,2 l oder 3,3 l
Extraktionsdruck	40-500 bar
Extraktionstemperatur	Raumtemperatur bis max. 80 °C
Volumenfluss Lösungsmittel	max. 20 l/h
Volumenfluss Schleppmittel	max. 2 l/h
Abscheidedruck	40-80 bar
Abscheidetemperatur	0-60 °C

Das Fließschema der Extraktionsanlage ist in Abb. 8-1 dargestellt.

Flüssiges CO₂ wird aus Steigrohrflaschen entnommen, an einem Kondensator (8) abkühlt und in einen gekühlten Vorratstank (1) geleitet. CO₂ für den Extraktionsvorgang gelangt über einen Unterkühler (2) in die Hochdruckpumpe (3). Im Unterkühler wird das CO₂ soweit abgekühlt, dass Kavitation im Pumpenraum vermieden wird. Durch die Pumpe wird das CO₂ auf Extraktionsdruck verdichtet und in einem Wärmetauscher (4) auf die Extraktionstemperatur erwärmt. Falls die Extraktion mit Schleppmitteln durchgeführt wird, wird nach der CO₂-Verdichtung das Schleppmittel aus einem separaten Vorratsbehälter (9) über eine gesonderte Pumpe (10) dem System zugeführt. CO₂ und Schleppmittel werden gemeinsam auf die gewünschte Extraktionstemperatur erwärmt. Der Massenfluss sowie die Dichte des Extraktionsmediums werden unmittelbar vor Eintritt in den Extraktionsbehälter (5) gemessen.

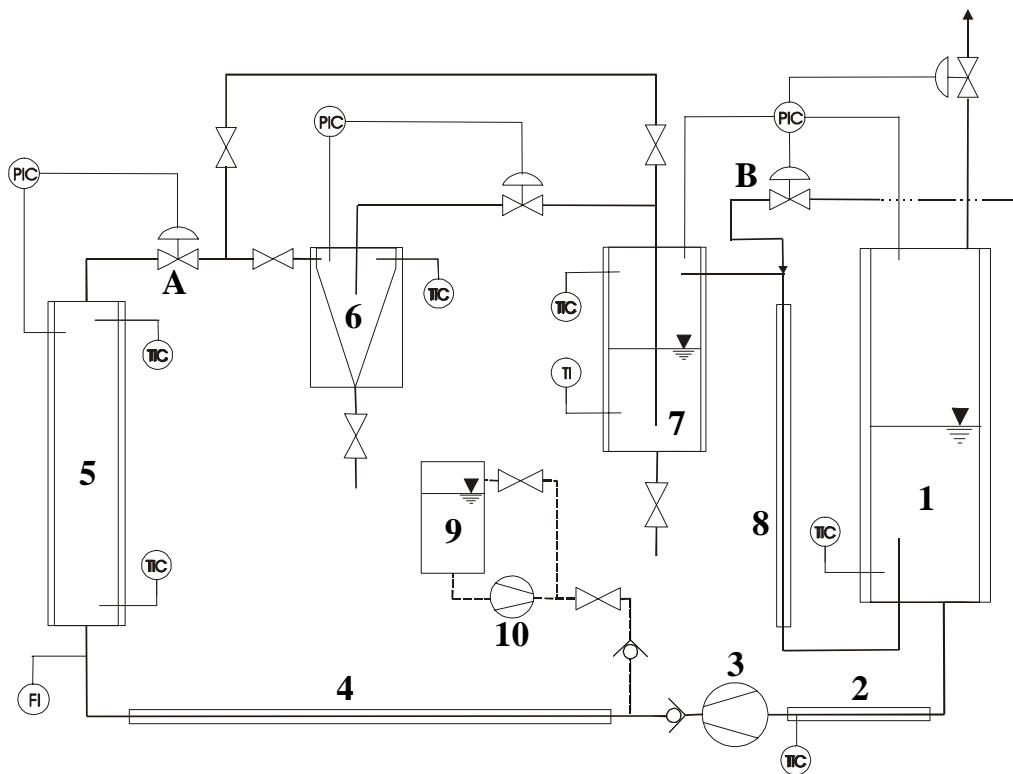


Abb. 8-1 Fließschema der verwendeten Extraktionsanlage; ∇ Ventil; ∇ pneumatisches Druckregelventil; \triangleright Rückschlagventil; FI = Flussmesser; PI(C) = Druckmesser (-regler); TI(C) = Temperaturmesser(-regler)

Im Extraktionsbehälter (5) befindet sich eine Extraktionshülse, die das zu extrahierende Gut enthält und sowohl nach oben als auch nach unten mit Metallsinterplatten verschlossen ist, um einen gleichmäßigen Durchfluss des Extraktionsmittels zu gewährleisten. Unmittelbar nach dem Extraktionsbehälter befindet sich ein pneumatisches Ventil (A), das den Extraktionsdruck konstant hält. Das mit Extraktivstoffen beladene Extraktionsmittel wird über einen

Zwischenabscheider (6) zum Endabscheider (7) geleitet. Im Zwischenabscheider (6) kann durch Änderung von Druck und/oder Temperatur die Abtrennung bestimmter Extraktivstoffe erfolgen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht genutzt wird. Unter Umgehung des Zwischenabscheiders gelangt das mit Extraktivstoffen beladene Extraktionsmedium in den Endabscheider (7), in dem durch Druckreduzierung die vollständige Trennung von CO₂, Schleppmittel und Extraktivstoffen erfolgt. CO₂ liegt im flüssigen Aggregatzustand vor und steht im Gleichgewicht mit der Gasphase. Während die Extraktivstoffe im flüssigen CO₂ noch eine gewisse Restlöslichkeit zeigen, sind diese im nun flüssig vorliegenden Schleppmittel noch vollständig löslich. Um eine endgültige Trennung der Extraktivstoffe vom CO₂ zu erreichen, wird der Separator (7) beheizt, so dass flüssiges CO₂ kontinuierlich verdampft und somit keine Lösungskapazität mehr aufweist. Die Extraktivstoffe liegen dann gelöst in reinem Schleppmittel vor, das kontinuierlich aus dem Separator abgelassen werden muss, um ein Vollaufen des Endabscheiders zu vermeiden. Im Falle einer Extraktion mit reinem CO₂ bleiben die Extraktivstoffe allein im Separator zurück. Verdampftes CO₂ wird über einen Kondensator (8) verflüssigt und dem Vorratstank (1) wieder zugeführt. Der Druck im Endabscheider wie auch im Vorratstank wird über ein pneumatisches Ventil (B) geregelt und konstant gehalten.

Die Absicherung der Anlage gegen Überdruck erfolgt durch zwei verschiedene Berstscheibentypen. Im Hochdruckbereich beträgt der Berstdruck 550 bar und sichert somit den Extraktionsbehälter, den Zwischenabscheider und die Pumpen, während im Niederdruckbereich der Berstdruck 100 bar beträgt und den Vorratstank sowie den Endabscheider schützt.

8.5.4 Optimierung der Extraktionsbedingungen

Für alle Versuche wird die 1,2 l Extraktionshülse verwendet. Die Solltemperatur am Kondensator beträgt jeweils -3 °C und die des Unterkühlers liegt bei -10 °C. Die Dauer der Extraktion wird ab dem Zeitpunkt gemessen, an dem CO₂ das Drogenbett durchströmt, bzw. sobald dem System Schleppmittel zudosiert wird. Der CO₂-Massenfluss wird konstant auf 8 kg·h⁻¹ gehalten. Der Abscheidedruck im Separator beträgt 40 bar, während die Abscheidetemperatur bei Schleppmittelextraktionen 22 °C und bei reinen CO₂-Extraktionen 8 °C beträgt.

Die Drogeneinwaage hängt vom verwendeten Drogenmaterial ab (Tab. 8-7).

Tab. 8-7 Drogeneinwaage für alle durchgeführten Extraktionen

pulverisierte Teufelskrallenwurzel	300 g
pulverisierte granuliert Teufelskrallenwurzel	220 g
pulverisierte kompaktierte Teufelskrallenwurzel	200 g
geschnittene Teufelskrallenwurzel	600 g
geschnittene Rosskastaniensamen	300 g

Die Droge wird im Verhältnis 1:1 mit Elcema G 250 (Fa. Degussa) für 15 min im Turbulenzmischer (Fa. Bachofen) gemischt. Diese Mischung wird direkt in die Extraktionshülse eingewogen.

8.5.4.1 Vorextraktion

Bei der Optimierung der Vorextraktionsbedingungen wird jeweils nur ein Extraktionsparameter variiert, während die anderen Parameter konstant gehalten werden. Eine Übersicht der untersuchten Extraktionsbedingungen ist in Tab. 8-8 dargestellt.

Tab. 8-8 Übersicht der untersuchten Vorextraktionsbedingungen

Extraktionszustände	überkritisch bei 200 bar / 40 °C	
	unterkritisch bei 100 bar / 70 °C	
Extraktionsmedien	CO ₂	CO ₂ /n-Butanol
	CO ₂ /Ethanol	CO ₂ /n-Propanol
Schleppmittelkonzentrationen	5, 6, 12 und 15 % (m/m)	

Reine CO₂-Extraktionen werden 2 bzw. 5 Stunden lang durchgeführt. Bei Schleppmittelextraktionen ist die Extraktionsdauer sehr unterschiedlich, da sich die Dauer der Schleppmittelzudosierung nach der Menge des Schleppmittels sowie der Zudosierungsrate richtet. Wenn das Schleppmittel vollständig dem CO₂-System zudosiert ist, wird jeweils 60 min weiterextrahiert, damit das Schleppmittel das Gesamtsystem komplett durchströmen kann, um sich vollständig im Separator abzuscheiden.

8.5.4.2 Hauptextraktion

Die Optimierung der Extraktionsbedingungen erfolgt in gleicher Weise wie bei den Vorextraktionen. Eine Übersicht der Hauptextraktionsbedingungen ist in Tab. 8-9 dargestellt.

Tab. 8-9 Übersicht der untersuchten Hauptextraktionsbedingungen

Extraktionszustände	überkritisch	unterkritisch	
	80 bar / 40 °C	60 bar / 40 °C	
	100 bar / 40 °C	70 bar / 40 °C	
	200 bar / 40 °C	80 bar / 60 °C	
	200 bar / 50 °C	90 bar / 50 °C	
	200 bar / 60 °C	100 bar / 60 °C	
	200 bar / 70 °C	100 bar / 70 °C	
	300 bar / 40 °C		
	400 bar / 40 °C		
Extraktionsmedien	CO ₂ /Methanol	CO ₂ /Ethanol	CO ₂ /n-Propanol
Schleppmittelkonzentrationen	5, 10 und 26 % (m/m)		

Als Referenzbedingung wird eine Schleppmittelkonzentration von 26 % angesetzt. Dies entspricht einer Schleppmittelmenge von 2 l, die bei maximalem Schleppmittelpumpenhub (2 l/h bei 500 bar) dem CO₂-System zudosiert wird. Die Zudosierungszeit beträgt 45 min. Nach Beendigung der Zudosierung wird 75 min weiterextrahiert, um zu gewährleisten dass sich die gesamte Schleppmittelmenge im Separator abgeschieden hat.

8.5.5 Trocknung der CO₂-Extrakte

Das Schleppmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C so weit als möglich abgedampft. Der eingedampfte Extrakt wird in flache Glasschalen ausgegossen und bei Raumtemperatur so lange unter dem Abzug belassen, bis eine Aufkonzentrierung zu einer sehr zähflüssigen Masse stattgefunden hat. Dieser zähfließende Extrakt wird für 24 Stunden im Vakuumtrockenschrank (Fa. Binder) bei 40 °C und 80 mbar getrocknet.

8.6 *In-vitro* Untersuchungen der Teufelskrallenextrakte

20 ml menschliches Vollblut werden am Versuchstag von drei gesunden, männlichen und weiblichen Spendern gesammelt (Blutspendezentrale, Abt. Transfusionsmedizin, Universität Tübingen) und mit Heparin behandelt, um eine Gerinnung zu vermeiden.

Für die in-vitro Untersuchungen wird DPBS-Puffer verwendet:

Kaliumdihydrogenphosphat	0,100 g
Dinatriumhydrogenphosphat	0,575 g
Kaliumchlorid	0,100 g
Natriumchlorid	4,000 g
D-(+)-Glucose (wasserfrei)	0,500 g
Wasser	ad 500 ml

Die Extrakte werden für beide Untersuchungen zu jeweils 51,8 mg in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Aus dieser Stammlösung werden durch 1:10-Verdünnungen die Untersuchungslösungen bis zu einer Konzentration von $5,18 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ hergestellt.

8.6.1 Cyclooxygenase-2 (COX-2) Hemmung

Geräte CO₂-Brutschrank, Fa. Heraeus Instruments
 Kendro Biofuge Stratus, kühlbar, Fa. Kendro Laborgeräte

Lösungen

Cremophor-EL/Ethanol-Lösung

Cremophor-EL	116,9 g
Ethanol 99 %	50,0 g

Gentamicin/DPBS-Lösung

Gentamicinsulfat	12,5 mg
DPBS-Puffer	ad 50,0 ml

Acetylsalicylsäure-Lösung ASS

ASS	2,0 mg
Gentamicin/DPBS	ad 10,0 ml

Lipopolysaccharid-Lösung LPS

LPS	1,0 mg
Gentamicin/DPBS	ad 5,0 ml

Thromboxansynthasehemmstoff-Lösung TSH

TSH: (E)-7-Phenyl-7-(3-pyridyl)-6-heptensäure	1,4 mg
Cremophor-EL/Ethanol	ad 5,0 ml

Methodenbeschreibung

800 µl Aliquote des heparinbehandelten menschlichen Vollblutes werden in Eppendorf-Tubes vorgelegt. Um die Thromboxanbiosynthese zu hemmen und gleichzeitig die Prostaglandinbiosynthese (PGE₂) zu fördern, werden dem Vollblut 10 µl der Thromboxansynthasehemmstoff-Lösung (Synthese nach Kato et al., 1985) zugegeben. Des Weiteren werden dem Ansatz 50 µl ASS-Lösung zugefügt, um Cyclooxygenase-1 (COX-1) irreversibel zu hemmen. Zu dieser Mischung werden 100 µl der Extrakt-Probenlösung in unterschiedlichen Konzentrationen pipettiert und für 15 min bei 37 °C im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂, 95 % Luft) vorinkubiert. Anschließend wird COX-2 und demzufolge die PGE₂-Biosynthese in den Proben durch Zugabe von 50 µl LPS-Lösung stimuliert und die Inkubation im CO₂-Brutschrank fortgesetzt. Die Prostaglandinbiosynthese wird nach 5 Stunden durch Zugabe von 1 ml eiskaltem DPBS-Puffer und gleichzeitiger Kühlung (10 min) im Eisbad abgebrochen. Die Lösung wird 15 min bei 4 °C (3500 x g) zentrifugiert, die PGE₂-enthaltenden Überstände werden abgenommen und bis zur Quantifizierung bei -20 °C gelagert.

Quantifizierung von PGE₂ mittels ELISA

Das Prinzip eines kompetitiven ELISA wird von Greim (2002) beschrieben. Zur Durchführung werden alle benötigten Reagenzien nach Vorschrift des Herstellers hergestellt. Die Probenlösungen werden mit dem mitgelieferten Assaypuffer 1:5 verdünnt. Das Auftragen des ELISAs erfolgt analog der Herstellervorschrift.

Es werden jeweils 100 µl Probe in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend 50 µl Enzymkonjugat sowie 50 µl Antibodylösung dazugegeben. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur werden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und zu allen Wells werden 200 µl Substratlösung pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation bei Raumtemperatur für 45 min erfolgt die photometrische Auswertung (ELISA reader EmaxTM, Fa. Molecular Devices) bei 405 nm. Die erhaltenen Daten werden mittels SOFTmax[®] PRO (Fa. Molecular Devices) ausgewertet.

8.6.2 5-Lipoxygenase (5-LO) Hemmung

Geräte Zentrifuge 5804R, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz
 Schüttelwasserbad 1083, Fa. GFL®
 Ultraschallbad Sonorex RK 514, Fa. Bandelin

Lösungen

0,9%ige Natriumchloridlösung NaCl

NaCl	4,5 g
Wasser	ad 500,0 ml

Percoll®-Stammlösung (Siliconpartikel (15-30 nm Durchmesser) beschichtet mit nichtdialysierbarem Polyvinylpyrrolidon)

Natriumchlorid	1,754 g
Percoll®	ad 200,0 ml

Percoll®-Lösungen 74 %, 54 %, 44 %

Percoll®-Stammlösung	74,0 g, 54,0 g, 44,0 g
0,9%ige NaCl-Lösung	26,0 g, 46,0 g, 56,0 g

Lysemedium

Ammoniumchlorid	4,150 g
Dinatrium-EDTA	0,019 g
Kaliumhydrogencarbonat	0,500 g
Wasser	ad 500,0 ml

Calciumchlorid-Lösung CaCl₂

CaCl ₂	0,111 g
NaCl	0,800 g
Wasser	ad 100,0 ml

Calciumionophor-Lösung

Calciumionophor	1,0 mg
Dimethylsulfoxid	ad 2,0 ml

Nordihydroguajaretsäure-Lösung NDGA

NDGA	1,5 mg
Wasser	ad 250,0 ml

Methodenbeschreibung

Die Untersuchung der 5-LO Hemmung wird mit isolierten Granulozyten aus heparinbehandeltem humanem Vollblut durchgeführt. Die Isolation erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation. In konische Zentrifugenröhrchen werden jeweils 3 ml 74%ige Percoll®-Lösung ($\rho = 1,1026$ g/ml) vorgelegt. Darüber werden 3 ml 54%ige Percoll®-Lösung ($\rho = 1,0776$ g/ml) und 2 ml 44%ige Percoll®-Lösung ($\rho = 1,0575$ g/ml) geschichtet. Auf diesen Dichtegradienten werden 5 ml Vollblut aufgetragen und durch Zentrifugation 20 min bei 350 x g und 20 °C aufgetrennt. Die Blutbestandteile werden entsprechend ihrer Dichte, wie in Abb. 8-2 dargestellt, aufgetrennt.

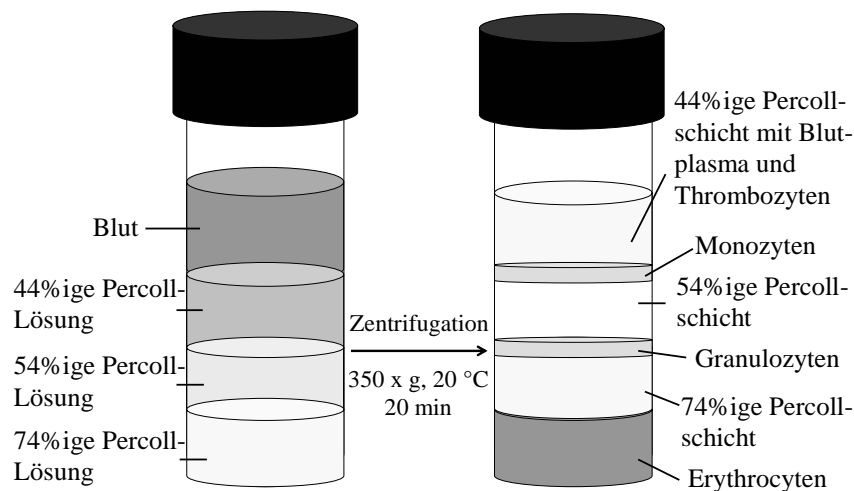


Abb. 8-2 Isolation der Blutbestandteile aus humanem Vollblut

Die Granulozytenfraktion wird mit einer Pipette in neue Zentrifugenröhrchen überführt und mit 12 ml Lysemedium versetzt. Nach Zentrifugation bei 350 x g und 20 °C für 10 min wird die überstehende Lösung abdekantiert und das Granulozytenpellet zweimal mit DPBS-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen werden die Zellen in 0,5 ml DPBS-Puffer redispergiert, in einem neuen Röhrchen vereinigt und auf eine Zellzahl von $1,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

800 µl Aliquote der Granulozytensuspension werden in Zentrifugenröhrchen vorgelegt. 10 µl der Extrakt-Probenlösung werden in unterschiedlichen Konzentrationen dazu pipettiert und im Schüttelwasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Nach 5 min werden jeweils 200 µl CaCl_2 -Lösung zu den Proben gegeben und für weitere 5 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Stimulation der Zellen durch Zugabe von 10 µl Calciumionophor-Lösung. Nach 2 min im Wasserbad bei 37 °C wird die Reaktion durch Stellen der Proben in ein Ultraschalleisbad (2 min) und die gleichzeitige Gabe von 2 ml NDGA-Lösung sowie 1 ml bidestilliertem Wasser abgebrochen. Die Proben werden bei 4 °C und 46000 x g für 12 min zentrifugiert. Die Überstände werden bis zur Leukotrien B_4 (LTB_4)-Quantifizierung bei -20 °C gelagert.

Quantifizierung von LTB_4 mittels ELISA

Die Quantifizierung und Auswertung erfolgt wie unter 8.6.1 beschrieben. Die Proben werden jedoch unverdünnt verwendet.

8.7 *Molecular Modelling*

8.7.1 Dichtebestimmung

Referenzsubstanzen

Die Referenzsubstanzen werden jeweils zu 30 mg, genau gewogen, mittels einer hydraulischen Presse (RIIC, Fa. Beckman) zu einem gesinterten 5 mm Pressling geformt. Die Dichte dieses Presslings wird bei 28 ± 1 °C in einem Pyknometer (AccuPyc 1330 V3.03, Fa. Micromeritics GmbH) mit einem Probenbehälter von $0,1 \text{ cm}^3$ vermessen. Pro Messung werden 25 Spül- und Messzyklen durchgeführt und der Mittelwert aus jeweils 4 Messungen pro Probe berechnet.

Überkritisches Extraktionsmedium

Die Dichte des überkritischen Extraktionsmediums, bestehend aus CO_2 oder CO_2 /Schleppmittel, wird vor Eintritt (FI in Abb. 8-1) in den Extraktionsbehälter gemessen. Die Dichtemessung erfolgt mit dem Messwertaufnehmer Massflo 2100 – DI 1,5 (Fa. Danfoss), der gleichzeitig den CO_2 -Massenfluss bestimmt.

Unterkritisches Extraktionsmedium

Für die Simulation der unterkritischen Extraktionsmedien benötigt man die Dichte von reinem CO_2 bei einem bestimmten Zustand, die mittels Bender-EOS (Bender, 1970) berechnet wird. Die Berechnungen der Schleppmittel gehen von bekannter Dichte bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck aus.

8.7.2 Simulationsverfahren

Die Simulationen werden mit Materials StudioTM Version 2.1 durchgeführt. Die verwendeten Software-Module sind MS Amorphous Cell (AC), MS Discover (D) sowie die Microsoft Windows Schnittstelle MS Visualizer (V). Für das angelegte Kraftfeld wird COMPASS Version 2.6 verwendet. Die Konstruktion der amorphen Zellen erfolgt durch Anlegen eines nonbond energy cutoffs von $8,5 \text{ \AA}$ mit einem Spielraum von $0,5 \text{ \AA}$. Für die Molecular Dynamic (MD) Simulationen, die die energetische Minimierung beinhalten, wird die nonbond energy Additionsmethode nach Ewald sowohl für die van der Waals Kräfte als auch für die Coulomb Kräfte angewendet. Dabei wird eine Genauigkeit von $0,01 \text{ kcal/mol}$ veranschlagt und alle Berechnungen werden mit einer Dielektrizitätskonstante von 1,0 durchgeführt.

8.7.2.1 Simulation der Pflanzeninhaltsstoffe

Der allgemeine Simulationsablauf ist in Abb. 8-3 dargestellt.

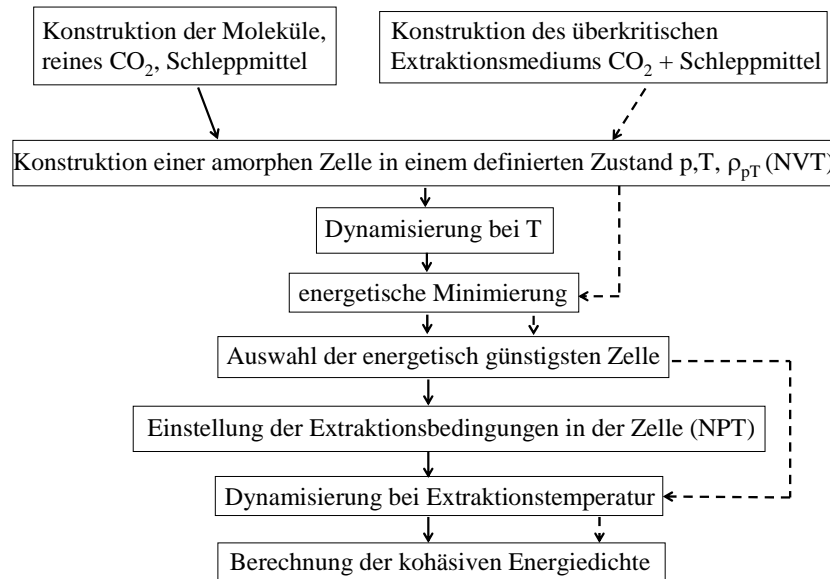


Abb. 8-3 allgemeiner Simulationsablauf

Zuerst werden die Pflanzenmoleküle mit dem V-Modul konstruiert, um anschließend zehn amorphe Zellen jeder Substanz mit dem AC-Modul zu konstruieren. Zur Erstellung der amorphen Zellen werden die Dichte und die zugehörige Temperatur der jeweiligen Substanz verwendet. Um zuverlässige Startbedingungen der Simulation zu erreichen, wird ein MD-Ablauf mit konstanter Anzahl an Molekülen, konstantem Zellvolumen und konstanter Temperatur (NVT) durchgeführt. Die Dynamisierung der amorphen Zelle dauert 1000 Femtosekunden (fs) bei einem Zeitintervall von 1 fs. Direkt im Anschluss an die Dynamisierung erfolgt die energetische Minimierung mit 1000 Iterationen und einem Konvergenzkriterium von 0,01. Die Dynamisierung und Minimierung wird mit allen konstruierten amorphen Zellen durchgeführt und die energetisch günstigste Zelle, mit der kleinsten Energie, wird für weitere Simulationen verwendet. Diese Zelle wird auf Extraktionsbedingungen eingestellt, indem Extraktionstemperatur und -druck angelegt werden. Die MD Simulation erfolgt mit konstanter Anzahl an Molekülen, konstantem Druck, konstanter Temperatur (NPT) und dauert 20 Picosekunden (ps) bei einem Zeitintervall von 1 fs. Die letzte resultierende Zellkonfiguration wird für die abschließende MD Simulation (20 ps, Zeitintervall 1 fs) zur energetischen Gleichgewichtseinstellung verwendet. Dabei wird alle 100 fs die aktuelle Zellkonformation in eine Zustandsmatrix abgespeichert. Die letzten 20 Konformationen, die die Pflanzenmoleküle bei Extraktionsbedingungen beschreiben, werden zur Berechnung des Löslichkeitsparameters δ nach

Hildebrand (1916), sowie zur Berechnung von Löslichkeitsparametern, die aus elektrostatischen Kräften (elektro) und aus van der Waals (VdW) Kräften resultieren, verwendet.

8.7.2.2 Simulation der überkritischen Extraktionsmedien

Durch Messen der Gemischdichte des einphasigen Extraktionsmediums CO₂/Schleppmittel vor Eintritt in den Extraktionsbehälter, erhält man bereits die Dichte bei der jeweiligen Extraktionstemperatur und dem Extraktionsdruck. Aus diesem Grund kann der gesamte Simulationsablauf, wie in Abb. 8-3 durch die gestrichelte Linie dargestellt, verkürzt werden. Da sich die konstruierte Zelle bereits auf dem entsprechenden Extraktionsdruck befindet, kann direkt nach der Auswahl der energetisch günstigsten Zelle die Dynamisierung bei Extraktionstemperatur durchgeführt werden, um anschließend die Löslichkeitsparameter zu berechnen.

8.7.2.3 Simulation der unterkritischen Extraktionsmedien

Unterkritische Extraktionsmedien bestehen aus einer flüssigen Schleppmittel/CO₂-Phase und einer gasförmigen CO₂/Schleppmittel-Phase (siehe Kap. 2.2.2). Den Simulationsberechnungen wird zugrunde gelegt, dass die Extraktionskraft von der flüssigen Phase ausgeht und die gasförmige Phase zu vernachlässigen ist. Dazu werden die Löslichkeitsparameter von CO₂ aus einem flüssigen Zustand bei 10 °C und 50 bar nach 8.7.2.1 konstruiert und berechnet. Die Berechnungen des Schleppmittels erfolgen nach demselben Schema mit bekannter Dichte bei Raumtemperatur. Die Berechnung der Gesamtlöslichkeitsparameter der modifizierten flüssigen Extraktionsphase wird nach der Mischungsregel binärer Mischungen (Barton, 1985) wie folgt berechnet:

$$\delta = \frac{\phi_{CO_2} \cdot \delta_{CO_2} + \phi_m \cdot \delta_m}{\phi_{CO_2} + \phi_m} \quad (\text{Gl. 8-1})$$

$$\phi_{CO_2} = \frac{V_{CO_2} \cdot x_{CO_2}}{V_m \cdot x_m + V_{CO_2} \cdot x_{CO_2}} \quad (\text{Gl. 8-2})$$

wobei δ der Löslichkeitsparameter, ϕ der Volumenanteil, V das molare Volumen und x der Molenbruch ist. Der Index steht für CO₂ und das Schleppmittel m . Den Molenbruch von CO₂ und dem Schleppmittel erhält man aus binären Phasendiagrammen, wie in Kap. 2.2.2 (Abb. 2-6) dargestellt. Das molare Volumen wird nach Gl. 8-3 berechnet, wobei die Dichte ρ nach der letzten MD Simulation resultiert und M_r das Molekulargewicht der Komponente darstellt.

$$V = \frac{M_r}{\rho} \quad (\text{Gl. 8-3})$$

9. ZUSAMMENFASSUNG

Die Extraktion von Naturstoffen mittels überkritisches Kohlendioxids (CO₂) wird seit ca. 1970 in der Nahrungsmittelindustrie erfolgreich eingesetzt. Reines überkritisches CO₂ besitzt lipophilen Charakter, so dass selektiv unpolare Substanzen angereichert werden können. Um dieses Verfahren im pharmazeutischen Sektor zu etablieren, ist es wünschenswert, auch polare Substanzen mit Hilfe von CO₂ zu extrahieren, da die meisten Arzneipflanzen hydrophile Inhaltsstoffe aufweisen. Die Extraktion gelingt nur durch Zusatz von Schleppmitteln, die die Polarität des Extraktionsmittels erhöhen. Je nach Polarität der zu extrahierenden Substanz werden unterschiedliche Schleppmittel benötigt, um selektive Extraktionen zu ermöglichen. Der Einfluss des Schleppmittels und dessen Konzentration wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit an den Modelldrogen Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens* DC.) und Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum* L.) im über- und unterkritischen Bereich untersucht. Ziel ist es, einen Parameter zu finden, der ein Maß für die Polarität der zu extrahierenden Substanzen und der Extraktionsmittel darstellt, um eine Vorhersage der Extrahierbarkeit zu ermöglichen. Dafür werden zusätzlich Extraktionsergebnisse von Kamillenblüten, die das lipophile (-)- α -Bisabolol enthalten, vergleichend herangezogen.

Harpagophytum procumbens DC. enthält in der sekundären Wurzel Kohlenhydrate (Stachyose, Raffinose, Saccharose), Iridoidglykoside (Harpagosid, Harpagid), 2-Phenylethyl-Derivate (Acteosid, Isoacteosid) und lipophile Substanzen. Da Harpagosid nachweislich an der pharmakologischen Wirkung beteiligt ist, fungiert es als Leitsubstanz. Zusammen mit anderen Iridoidglykosiden und 2-Phenylethyl-Derivaten soll es in hoher Konzentration im Extrakt vorkommen.

Die qualitative Extraktzusammensetzung der *Harpagophytum* Extrakte lässt sich mittels dünnschichtchromatographischer Trennverfahren gut beurteilen. Die Banden können mit Hilfe einer LC-MS Analyse eindeutig den Inhaltsstoffen zugewiesen werden. Zur Quantifizierung und Standardisierung der Extrakte wird Harpagosid herangezogen. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit zwei verschiedenen analytischen Verfahren. Sowohl die HPLC als auch die HPTLC liefern präzise Ergebnisse, wobei sich die Resultate der beiden Verfahren statistisch nicht signifikant unterscheiden.

Der Samen der Rosskastanie, *Aesculus hippocastanum* L., enthält β -Aescin, ein Triterpensaponingemisch, das für die pharmakologische Wirkung der *Aesculus*-Extrakte verantwortlich ist und im Extrakt angereichert werden soll.

Die Beurteilung der qualitativen Extraktzusammensetzung wird mittels dünnenschichtchromatographischer Trennung durchgeführt. Die Quantifizierung von β -Aescin erfolgt mit Hilfe der HPTLC-Densitometrie.

Beide Drogen werden auf einer **CO₂-Extraktionsanlage** im Pilotmaßstab extrahiert. Ziel ist die Anreicherung von Harpagosid respektive β -Aescin, sowie die Optimierung der Extraktausbeute und der Extraktzusammensetzung. Während einer CO₂-Extraktion quillt das Drogenmaterial nicht, so dass die Extraktionsprozesse hauptsächlich an der Partikeloberfläche durch Abschwemme stattfinden. Um eine hohe Extraktausbeute zu erzielen, muss die Oberfläche möglichst groß gewählt werden. Die Partikelgröße selbst stellt wiederum einen limitierenden Faktor dar, denn bei zu feinen Partikeln kommt es zur Verdichtung des Drogenbettes, welches das Extraktionsmittel nicht mehr gleichmäßig durchströmen kann.

Beide Drogen enthalten lipophile Bestandteile, die keine pharmakologische Wirkung aufweisen und somit im Extrakt unerwünscht sind. Aus diesem Grund wird eine **Vorextraktion** durchgeführt, die den Anteil lipophiler Begleitstoffe in der Droge verringert. Der lipophile Vorextrakt soll dabei möglichst keine wirksamkeitsbestimmenden Substanzen enthalten, da diese ausschließlich im Hauptextrakt angereichert werden sollen. Die Vorextraktion mit reinem überkritischem CO₂ führt bei beiden Drogen zur ausschließlichen Entfernung lipophiler Substanzen. Die Lösungskapazität von reinem CO₂ ist selbst bei 5-stündiger Extraktion zu gering, um die unerwünschten lipophilen Substanzen in ausreichender Menge aus der Droge zu entfernen. Durch Zusatz von relativ unpolaren Schleppmitteln, wie n-Butanol und n-Propanol zu überkritischem CO₂ wird dessen Lösungskapazität erhöht. Während ein Schleppmittelzusatz von 6 % n-Butanol bereits zur Extraktion geringer, aber vernachlässigbarer Mengen Harpagosid führt, wird β -Aescin aufgrund des hohen Molekulargewichtes weder mit CO₂/n-Butanol noch mit CO₂/n-Propanol aus der Droge herausgelöst. Die Optimierung der Vorextraktionen beider Drogen weist die höchste Extraktionsrate der lipophilen Substanzen bei Einsatz von n-Propanol als Schleppmittel auf.

Zur **Hauptextraktion** wird ein Zusatz polarer Schleppmittel, beispielsweise Ethanol oder Methanol, benötigt um die Gesamtpolarität des Extraktionsmittels so weit zu erhöhen, dass die Lösungskapazität für hydrophile Substanzen erreicht wird. Eine Anreicherung der Substanzen ist mit Hilfe hoher Schleppmittelkonzentrationen möglich. Eine Abnahme der Schleppmittelkonzentration hat eine Verringerung der Gesamtpolarität des Extraktionsmittels zur Folge, so dass der Gehalt hydrophiler Inhaltsstoffe im Extrakt gesenkt wird.

Im Falle von *Harpagophytum procumbens* DC. kann die Leitsubstanz Harpagosid mit CO₂ und 26 % (m/m) Ethanol als Schleppmittel im Extrakt angereichert werden. Eine Drucker-

höhung im überkritischen Bereich wirkt sich weder auf den Harpagosidgehalt, noch auf die Extraktausbeute aus. Die Dichte des Lösungsmittels ändert sich in Druckbereichen von 100 bis 400 bar kaum, wodurch die Polarität und die Lösungskapazität nahezu konstant bleiben. Eine Temperaturerhöhung von 40 auf 60 °C zeigt einen Anstieg der absoluten Harpagosid- ausbeute, die auf einen erhöhten Dampfdruck der Substanz zurückzuführen ist. Die Optimierung der Extraktionsparameter im überkritischen Bereich ergibt einen Extraktionsdruck von 200 bar und eine Temperatur von 40 °C. Dabei wird Harpagosid bis zu 30 % im Extrakt angereichert. Extraktionen im unterkritischen Bereich führen im Vergleich zu überkritischen, zu einem deutlichen Anstieg der Extraktausbeute. Dieser beruht auf einem Polaritätsanstieg der unterkritischen Phase, die sich in eine gasförmige und eine flüssige Komponente auf trennt. Der gasförmige Anteil besteht überwiegend aus CO₂, das keine Lösungskapazität für hydrophile Inhaltsstoffe aufweist. Der flüssige Anteil, der aus CO₂-gesättigtem Schleppmittel besteht, bewirkt die Extraktion hydrophiler Inhaltsstoffe und ist für den Polaritätsanstieg des Extraktionsmittels verantwortlich. Umso größer der Anteil der flüssigen Komponente ist, desto höher ist die Gesamtausbeute des Extraktes. Extraktionen bei 100 bar und 70 °C liefern Extrakte mit den höchsten Ausbeuten und einem Harpagosidgehalt von 20 %. Aufgrund der hohen Ausbeute ist die absolute Menge an extrahiertem Harpagosid doppelt so groß wie in überkritischen Extrakten. Der niedrigere Harpagosidgehalt im Extrakt resultiert aus der vermehrten Extraktion hydrophiler Begleitsubstanzen, wie Saccharose und Stachyose.

Das β -Aescin-Molekül weist bei doppeltem Molekulargewicht eine ähnliche Polarität wie Harpagosid auf. Um große Moleküle mittels CO₂ extrahieren zu können, muss die Polarität des Extraktionsmediums erhöht werden. Bei den für *Harpagophytum* optimierten Extraktionsbedingungen im überkritischen Bereich mit 26 % Ethanol als Schleppmittel verbleibt nahezu das gesamte β -Aescin im Samen. Der Einsatz von Methanol anstelle von Ethanol bringt eine Polaritätssteigerung mit sich, so dass β -Aescin aus der Droge herausgelöst wird. Eine Druckerhöhung im überkritischen Bereich führt zu keinem Anstieg des Aescingehaltes und der Ausbeute. Eine Temperaturänderung von 40 auf 70 °C in 10 °C-Schritten zeigt eine deutliche Abnahme des Aescingehaltes bei konstanter Ausbeute. Die Abnahme von β -Aescin im Extrakt ist durch einen Polaritätsverlust des Extraktionsmittels mit zunehmender Temperatur erklärbar. Dadurch werden lipophilere Inhaltsstoffe extrahiert und die Ausbeute bleibt somit konstant. Die absolut extrahierte β -Aescinmenge mit Methanol als Schleppmittel im überkritischen Bereich ist jedoch verschwindend gering. Erst eine weitere Steigerung der Polarität, durch Arbeiten im unterkritischen Bereich, sorgt für eine ausreichende Lösungskapazität. Mit 26 % Ethanol als Schleppmittel erreicht man einen Aescingehalt von 20 %. Der

methanolische Zusatz liefert erwartungsgemäß eine höhere Ausbeute und der Aescingehalt steigt auf 25 %. Im unterkritischen Bereich ist, wie beim Harpagosid, die Zunahme der Ausbeute mit steigendem Anteil flüssiger Extraktionsphase verknüpft.

Der Vergleich von CO₂-Extrakten mit **Handelsextrakten** zeigt im Fall der Rosskastanie den gleichen Aescingehalt von 20-25 %. Der Handelsextrakt enthält zusätzlich noch unerwünschte polare Inhaltsstoffe, die in CO₂-Extrakten nicht enthalten sind. Bei der Teufelskralle ergeben sich Vorteile bei Verwendung von CO₂-Extrakten. Während ein Handelsextrakt maximal 2,5 % Harpagosid enthält, weisen sowohl überkritische als auch unterkritische CO₂-Extrakte ein Vielfaches davon auf. Hauptbestandteile der herkömmlichen Handelsextrakte stellen Kohlenhydrate, vor allem Stachyose, dar. Der unterkritische Extrakt mit einem Harpagosidgehalt von 20 % enthält Kohlenhydrate in vernachlässigbaren Mengen. Im Vergleich dazu ist ein überkritischer Extrakt mit 30 % Harpagosid frei von Stachyose, enthält allerdings einige lipophile Begleitstoffe.

Der *Harpagophytum*-Handelsextrakt und die über- und unterkritischen CO₂-Extrakte werden pharmakologisch untersucht. Dazu werden zwei **in-vitro Tests** durchgeführt. Zum einen wird die Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase-2-(COX-2), mit humanem Vollblut, und zum anderen die 5-Lipoxygenase-(5-LO) Inhibition, mit isolierten Granulozyten aus Vollblut, getestet. Alle drei Proben zeigen schwache und stark schwankende COX-2 Hemmungen. Ein Inhibierungsmechanismus von *Harpagophytum*-Extrakten auf COX-2 kann daher ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu zeigen beide CO₂-Extrakte in einer Konzentration von 51,8 mg/l eine vollständige Inhibierung von 5-LO, während der Handelsextrakt keine Hemmung zeigt. Niedrigere Extraktkonzentrationen führen zu einer Abnahme der 5-LO hemmenden Wirkung. Der unterkritische Extrakt zeigt tendenziell eine geringere Inhibierung als der überkritische Extrakt. Dies kann sowohl mit dem geringeren Harpagosidgehalt als auch mit dem höheren Anteil an Kohlenhydraten, denen entzündungsstimulierende Wirkung nachgewiesen wurde, erklärt werden. Das gleiche gilt für den Handelsextrakt. Demzufolge sind die CO₂-Extrakte den herkömmlichen Extrakten nicht nur im Harpagosidgehalt und der Extraktzusammensetzung, sondern auch in ihrer pharmakologischen Wirkung überlegen.

Um die Optimierung von CO₂-Extraktionsverfahren zu vereinfachen, soll mittels **Molecular Modelling** Simulationen eine Vorhersage der Extrahierbarkeit hydrophiler Pflanzeninhaltsstoffe ermöglicht werden. Die Simulationen liefern drei verschiedene Löslichkeitsparameter: den Löslichkeitsparameter δ nach Hildebrand, den Löslichkeitsparameter δ_{EL} , berechnet aus elektrostatischen Kräften und den Löslichkeitsparameter δ_d , der aus van der Waals Kräften berechnet wird. Da es sich um die Extraktion hydrophiler Inhaltsstoffe handelt, sind haupt-

sächlich elektrostatische Kräfte für das Herauslösen dieser Substanzen aus der Pflanzenmatrix verantwortlich. Diese beinhalten sowohl Dipolkräfte als auch H-Brückenbindungen. Der Löslichkeitsparameter δ_{EL} ist demzufolge ein Maß für die Hydrophilie und Polarität der zu extrahierenden Substanzen, sowie der verschiedenen CO_2 /Schleppmittelgemische. Die Polarität des reinen lipophilen CO_2 kann durch zunehmenden Druck und steigender Dichte erhöht werden. Ein Schleppmittelzusatz zu reinem überkritischem CO_2 bewirkt eine weitere Erhöhung der Polarität, die nicht durch eine Dichteänderung, sondern durch Ausbildung polarer zwischenmolekularer Kräfte zustande kommt. Die Polarität unterkritischer Extraktionsmittel ist durch die Anwesenheit der flüssigen Schleppmittel/ CO_2 -Komponente am höchsten. Wenn der Wert von δ_{EL} des Extraktionsmittels nun den gleichen Wert annimmt, wie das zu extrahierende Molekül besitzt, wird es sich lösen und im Extrakt erscheinen. Hat das Extraktionsmittel einen geringeren δ_{EL} -Wert, wird das zu extrahierende Molekül in der Pflanzenmatrix verbleiben. Übersteigt der δ_{EL} -Wert des Extraktionsmittels den Wert des Moleküls, wird sich die Ausbeute im Extrakt erhöhen. Absolute Ausbeuten können mittels δ_{EL} nicht vorhergesagt werden, da Einflussparameter, wie beispielsweise die Partikelgröße der Droge oder die umgebende Pflanzenmatrix eine große Rolle im Hinblick auf die Extrahierbarkeit der Pflanzeninhaltsstoffe spielen.

Fraktionierte Extraktionen hydrophiler Pflanzeninhaltsstoffe mit CO_2 /Schleppmittelgemischen erlauben eine selektive Anreicherung dieser Substanzen im Hauptextrakt, wenn im Vorextraktionsschritt unerwünschte lipophile Begleitstoffe entfernt werden. Die Vorhersage der Extrahierbarkeit hydrophiler Substanzen mittels über- und unterkritischer CO_2 /Schleppmittelgemische ist durch den Löslichkeitsparameter δ_{EL} , der elektrostatische zwischenmolekulare Kräfte beschreibt, möglich. Dies erleichtert zukünftig CO_2 /Schleppmittel Extraktionen, da bereits im Vorfeld das CO_2 -haltige Extraktionsmittel bestimmt werden kann, das nötig ist, um die jeweilige Substanz aus der Matrix zu lösen.

10. LITERATURVERZEICHNIS

Alaqui-Ismaili, S.; Rull Prous, S. und Granolleras Castello, A.
Cognis Iberia, S. L., Barcelona
"Escinmischungen"
EP 1 314 432 A1, **23.11.2001**

Andrews, T.
"On the continuity of the gaseous and liquid states of matter"
Trans. Roy. Soc. **A159**, 575-590 (**1869**)

Apers, S.; Pieters, L.; Vlietinck, A.; Vercruyse, A. und Foriers, A.
"Single run HPLC separation of escins Ia and IIa by means of a waters symmetry shield C₈ column"
Proc. Phyto. Soc. Eur. **45**, 57-64 (**2000**)

Arias, C.; Rulli Prous, S. und Fabry, B.
Cognis Iberia, S. L., Barcelona
"Verwendung von Wirkstoffgemischen enthaltend Tocopherole und Extrakte des Harpagophytum procumbens zur Herstellung eines Medikamentes gegen rheumatische Arthritis"
EP 1 371 372 A1, **08.06.2002**

Ashour, I.; Almehaideb, R.; Fateen, S.-E. und Aly G.
"Representation of solid-supercritical fluid phase equilibria using cubic equations of state"
Fluid Phase Equilib. **167**, 41-61 (**2000**)

Baghdikian, B.; Lanhers, M. C.; Fleurentin, J.; Ollivier, E.; Maillard, C.; Balansard, G. und Mortier, F.
"An analytical study, anti-inflammatory and analgesic effects of *Harpagophytum procumbens* and *Harpagophytum zeyheri*"
Planta Med. **63**, 171-176 (**1997**)

Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; Hawthorne S. B.; Langenfeld, J. J.; Miller, D. J. und Robinson R.
"A model for dynamic extraction using a supercritical fluid"
J. Supercrit. Fluids **3**, 143-149 (**1990**)

Bartle, K. D.; Clifford, A. A. und Shilstone, G. F.
"Estimation of solubilities in supercritical carbon dioxide: a correlation for the Peng-Robinson interaction parameters"
J. Supercrit. Fluids **5**, 220-225 (**1992**)

Barton, A. F. M.
"CRC Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters"
CRC Press, Boca Raton, 27-35 (**1995**)

- Bender, E.
"Equations of the state exactly representing the phase behaviour of pure substances"
Proc. 5th Sym. Thermophys. Prop. **5**, 227-235 (1970)
- Biller, A.
"Ergebnisse zweier randomisierter kontrollierter Studien und einer Anwendungsbeobachtung mit Teufelskrallenextrakt"
in Schulz et al. (Hrsg.) „Phytopharmaka VII. Forschung und Entwicklung“
Steinkopff Verlag, Darmstadt, 82-92 (2002)
- Bombardelli, E.; Morazzoni, P. und Griffini, A.
"Aesculus hippocastanum L."
Fitoterapia **6**, 483-511 (1996)
- Brunner, G.
"Gas extraction"
Steinkopff-Verlag, Darmstadt, 6-21 (1994)
- Burke, J.
"Solubility Parameter: Theory and Application"
AIC Book and Paper Group Annual, Ed. Jensen C. **3**, 13-58 (1984)
- Burnouf-Radosevich, M. und Delfel, E. N.
"High performance liquid chromatography of triterpene saponins"
J. Chromatogr. **368**, 433-438 (1986)
- Buse Gase GmbH & Co.
"Eigenschaften der Kohlensäure"
4. Auflage (1992)
- Bustamante, P.; Pena, M. A. und Barra, J.
"Partial-solubility parameters of naproxen and sodium diclofenac"
J. Pharm. Pharmacol. **50**, 975-982 (1998)
- Chandra, A. und Nair, M. G.
"Supercritical carbon dioxide extraction of daidzein and genistein from soybean products"
Phytochem. Anal. **7**, 259-262 (1996)
- Chiu, K.-L.; Cheng, Y.-C.; Chen, J.-H.; Chang, C. J. und Yang, P.-W.
"Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids"
J. Supercrit. Fluids **24**, 77-87 (2002)
- Chrastil, J.
"Solubility of solids and liquids in supercritical gases"
J. Phys. Chem. **86**, 3016-3021 (1982)
- Chrubasik, S.
"Verfahren zur Herstellung von hochkonzentrierten Extrakten von Pflanzeninhaltsstoffen, insbesondere der Teufelskralle"
DE 196 03 788 A1, **02.02.1996**

- Chrubasik, S.; Junck, H.; Breitschwerdt, H.; Conradt, Ch. und Zappe, H.
“Effectiveness of *Harpagophytum* extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomized, placebo-controlled, double-blind study”
Eur. J. Anaesth. **16**, 118-129 (1999)
- Cochran, H. D.; Johnson, E. und Lee, L. L.
“Molecular theory of ternary supercritical solutions. I. Theory and methods of calculation”
J. Supercrit. Fluids **3**, 157-161 (1990)
- Costantini, A.
”Escin in pharmaceutical oral dosage forms: quantitative densitometric HPTLC determination”
Farmaco **54**, 728-732 (1999)
- Cortesi, A.; Kikic, I.; Alessi, P.; Turtoi, G. und Garnier, S.
“Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation”
J. Supercrit. Fluids **14**, 139-144 (1999)
- Czygan, F.-C.; Krüger, A.; Schier, W. und Volk, O. H.
“Pharmazeutisch-biologische Untersuchungen der Gattung *Harpagophytum* (Bruch.) DC ex Meissn.“
Dtsch. Apoth. Ztg. **36**, 1431-1434 (1977)
- de la Tour, C.
“Exposé de quelques résultats obtenus par l’action combinée de la chaleur et la compression sur certains liquides, tels que l’eau, l’alcool, l’éther sulfurique et l’essence de pétrole rectifiée”
Ann. chim. phys. **21**, 127-132 (1822)
- Deutsches Arzneibuch
”Eingestellter Roßkastaniensamentrockenextrakt”
Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart, Govi-Verlag, Pharmazeutischer Verlag Eschborn **2004**
- Deutsches Arzneibuch
”Roßkastaniensamen”
Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart, Govi-Verlag, Pharmazeutischer Verlag Eschborn **2004**
- Diaz, A.; Fernandez, L.; Ollivier E.; Martin, T.; Villaescusa, L. und Balansard G.
“Reverse-phase high pressure liquid chromatographic analysis of harpagoside, scorodioside and verbascoside from *Scrophularia scorodonia*: quantitative determination of harpagoside”
Planta Med. **64**, 94-95, (1998)
- Ekart, M. P.; Bennett, K. L.; Ekart, S. M.; Gurdial, G. S.; Liotta, C. L. und Eckert, C. A.
“Cosolvent interactions in supercritical fluid solutions”
AIChE J. **39**, 235-248 (1993)
- El-Gindy, A.; Ashour, A.; Abdel-Fattah, L. und Shabana, M. M.
”First derivative spectrophotometric, TLC-densitometric, and HPLC determination of acebutolol HCl in presence of its acid-induced degradation product”
J. Pharm. Biomed. Anal. **24**, 527-534 (2001)

- Ellington, E.; Bastida, J.; Viladomat, F. und Codina, C.
"Supercritical carbon dioxide extraction of colchicine and related alkaloids from the seeds of *Colchicum autumnale* L."
Phytochem. Anal. **14**, 164-169 (2003)
- Engelhardt, H. L. und Jurs, P. C.
"Prediction of supercritical carbon dioxide solubility of organic compounds from molecular structure"
J. Chem. Inf. Comput. Sci. **37**, 478-484 (1997)
- Erdös, A.; Fontaine, R.; Friehe, H.; Durand, R. und Pöppinghaus, Th.
"Beitrag zur Pharmakologie und Toxikologie verscheidener Extrakte, sowie des Harpagosids aus *Harpagophytum procumbens* DC."
Planta Med. **34**, 97-108 (1978)
- Farina, A.; Doldo, A.; Cotichini, V.; Rajevic, M.; Quaglia, M. G.; Mulinacci, N. und Vincieri, F. F.
"HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva Silvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC"
J. Pharm. Biomed. Anal. **14**, 203-211 (1995)
- Franck, H. P.
"Zur qualitativen und quantitativen Analytik der Saponine"
Dtsch. Apoth. Ztg. **33**, 1206-1208 (1975)
- Giannuzzo, A. N.; Boggetti, H. J.; Nazareno, M. A. und Mishima, H. T.
"Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*"
Phytochem. Anal. **14**, 221-223 (2003)
- Gilbert, M. L. und Paulaitis, M. E.
"Gas-liquid equilibrium for ethanol-water-carbon dioxide mixtures at elevated pressures"
J. Chem. Eng. Data **31**, 296-298 (1986)
- Glasl, H. und Ihrig, M.
"Quantitative Bestimmung von Triterpensaponinen in Drogen"
Pharm. Ztg. **43**, 2619-2622 (1984)
- Göbel, H.; Heinze, A.; Ingwersen, M.; Niederberger, U. und Gerber, D.
"Harpagophytum-Extrakt LI 174 (Teufelskralle) bei der Behandlung unspezifischer Rückenschmerzen"
Schmerz **15**, 10-18 (2001)
- Gottwald, W.
"Statistik für Anwender"
Wiley-VCH, Weinheim, 96-114, 126-146 (2000)
- Gouw, T. H. und Jentoft, R. E.
"Supercritical fluid chromatography"
J. Chromatogr. **68**, 303-323 (1972)

Greim, C.

“Entwicklung und Optimierung von in vitro Testverfahren zur Evaluierung von antiinflammatorisch wirkenden Arzneistoffen“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2002)

Greither, O.

Salus-Haus GmbH & Co. KG (Deutschland)

“Arzneimittelzubereitung mit antiarteriosklerotischer Wirkung“

EP 1 210 945 A1, **30.11.2001**

Guillerault, L.; Ollivier, E.; Elias, R. und Balansard, G.

”Determination of harpagide, 8-para-coumaroyl harpagide and harpagoside by high performance liquid chromatography in *Harpagophytum procumbens* drugs and in a commercial extract”

J. Liq. Chromatogr. **17**, 2951-2960 (1994)

Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis

Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H. und Schneider, G. (Hrsg.)

5. Auflage, Band 5, Springer-Verlag Berlin, 385-389 (1993)

Hannay, J. B. und Hogarth, J.

”On the solubility of solids in gases”

Proc. Roy. Soc. **29**, 324-326 (1879)

Hansen, C. M.

”Hansen solubility parameters. A user’s handbook”

CRC Press, London, 4-24 (1999)

Hildebrand, J. H.

“Solubility”

J. Am. Chem. Soc. **38**, 1452-1473 (1916)

Hübner, G.; Wray, V. und Nahrstedt, A.

”Flavonol oligosaccharides from the seeds of *Aesculus hippocastanum*”

Planta Med. **65**, 636-642 (1999)

ICH-Guideline Q2A

”Validation of analytical procedures”

International Conference on Harmonisation, 1-5 (1994)

ICH-Guideline Q2B

”Validation of analytical procedures”

International Conference on Harmonisation, 1-8 (1996)

Jang, M. H.; Lim, S.; Han, S. M.; Park, H. J.; Shin, I.; Kim, J. W.; Kim, N. J.; Lee, J. S.; Kim, K. A. und Kim, C. J.

”Harpagophytum procumbens suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in fibroblast cell line L929”

J. Pharmacol. Sci. **93**, 367-371 (2003)

- Jennings, D. W.; Lee, R.-J. und Teja, A. S.
"Vapor-liquid equilibria in the carbon dioxide + ethanol and carbon dioxide- 1-butanol systems"
J. Chem. Eng. Data **36**, 303-307 (1991)
- Jeong, M. L. und Chesney, D. J.
"Investigation of modifier effects in supercritical CO₂ extraction from various solid matrices"
J. Supercrit. Fluids **16**, 33-42 (1999)
- Jouyban, A.; Rehman, M.; Shekunov, B. Y.; Chan, H.; Clark, B. J. und York, P.
"Solubility prediction in supercritical CO₂ using minimum number of experiments"
J. Pharm. Sci. **91**, 1287-1295 (2002)
- Kämpf, R.
"*Harpagophytum procumbens* DC. Teufelskralle"
Schweiz. Apoth. Ztg. **114**, 337-342 (1976)
- Kaiser, C. S.
"Herstellung, in-line-Einschluß und Charakterisierung lipophiler und hydrophiler Kamillen-extrakte unter Einsatz von verdichtetem Kohlendioxid"
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2003)
- Kaiser, C. S.; Römpp, H. und Schmidt, P. C.
"Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide"
Pharmazie **56**, 907-926 (2001)
- Kato, K.; Ohkawa, S.; Terao, S.; Terashita, Z. und Nishikawa, K.
"Thromboxane synthase inhibitors (TXSI). Design, synthesis, and evaluation of a novel series of omega-pyridylalkenoic acids"
J. Med. Chem. **28**, 287-294 (1985)
- Kikuchi, T.; Matsuda, S.; Kubo, Y. und Namba, T.
"New iridoid glucosides from *Harpagophytum procumbens* DC."
Chem. Pharm. Bull. **31**, 2296-2301 (1983)
- Kim, M.-Y
Angiolab Inc.
"Composition containing horse chestnut extract for anti-angiogenic and matrix metalloproteinase inhibitory activity"
WO 03/035092 A1, **01.05.2003**
- Kockar, O. M.; Kara, M. und Kara, S.
"Quantitative determination of escin. A comparative study of HPLC and TLC-densitometry"
Fitoterapia **5**, 439-443 (1994)
- Lanhers, M. C.; Fleurentin, J.; Mortier, F., Vinche, A. und Younos, C.
"Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*"
Planta Med. **58**, 117-123 (1992)

- Le Floch, F.; Tena, M. T.; Rios, A. und Valcarcel, M.
"Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves"
Talanta **46**, 1123-1130 (1998)
- Li, S. und Hartland, S.
"Influence of co-solvents on solubility and selectivity in extraction of xanthines and cocoa butter from cocoa beans with supercritical CO₂"
J. Supercrit. Fluids **5**, 7-12 (1992)
- Lim, J. S.; Lee, Y. Y. und Chun, H. S.
"Phase equilibria for carbon dioxide-ethanol-water system at elevated pressures"
J. Supercrit. Fluids **7**, 219-230 (1994)
- Lin, M.-C.; Tsai, M.-J. und Wen, K.-C.
"Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae radix*"
J. Chromatogr. A **830**, 387-395 (1999)
- Loew, D.; Möllerfeld, J.; Schrödter, A.; Puttkammer, S. und Kaszkin, M.
"Investigation on the pharmacokinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis in vitro and ex vivo"
Clin. Pharmacol. Ther. **69**, 356-364 (2001)
- Lorenz, D. und Marek, M. L.
"Das therapeutisch wirksame Prinzip der Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum*)"
Arzneim. Forsch. **10**, 263-272 (1960)
- Luque de Castro, M. D. und Tena, M. T.
"Strategies for supercritical fluid extraction of polar and ionic compounds"
Trends Anal. Chem. **15**, 32-37 (1996)
- Mishra, V. K.; Temelli, F. und Ooraikul, B.
"Modeling binary phase behaviour of supercritical carbon dioxide and fatty acid esters"
J. Supercrit. Fluids **6**, 51-57 (1993)
- Modey, W. K.; Mulholland, D. A.; Raynor, M. W.
"Analytical supercritical fluid extraction of natural products"
Phytochem. Anal. **7**, 1-15 (1996)
- Moraes, M. L.; Vilegas, J. H. Y. und Lancas, F. M.
"Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves"
Phytochem. Anal. **8**, 257-260 (1997)
- Morimoto, S.; Nonaka, G.-I. und Nishioka, I.
"Tannins and related compounds. LIX. Aesculitannins, novel proanthocyanidins with doubly-bonded structures from *Aesculus hippocastanum* L."
Chem. Pharm. Bull. **35**, 4717-4729 (1987)
- 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)

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

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

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

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

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

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

Pena, M. A.; Daali, Y.; Barra, J. und Bustamante, J.

“Partial solubility parameters of lactose, mannitol and saccharose using the modified extended Hansen method and evaporation light scattering detection“

Chem. Pharm. Bull. **48**, 179-183 (2000)

Ph. Eur. 5

“Sucrose“

European Pharmacopoeia **4.0**

Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe Strasbourg, 1969 (2002)

Ph. Eur. 5

“Devil’s Claw Root“

European Pharmacopoeia **5.0**, Volume 2

Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe Strasbourg, 1401 (2005)

Ph. Eur. 5

“Extracts“

European Pharmacopoeia **5.0**, Volume 1

Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe Strasbourg, 570-572 (2005)

Pietta, P.; Mauri, P., Facino, R. M. und Carini, M.

”High performance liquid chromatographic analysis of β -escin”

J. Chromatogr. **478**, 259-263 (1989)

Politzer, P.; Lane, P.; Murray, J. S. und Brinck, T.

”Investigation of relationships between solute molecule surface electrostatic potentials and solubilities in supercritical fluids”

J. Phys. Chem. **96**, 7938-7943 (1992)

Politzer, P.; Murray, J. S.; Lane, P. und Brinck, T.

“Relationships between solute molecular properties and solubility in supercritical CO₂”

J. Phys. Chem. **97**, 729-732 (1993)

Poukens-Renwart, P.; Tits, M. und Angenot, L.

”Quantitative densitometric evaluation of harpagoside in the secondary roots of *Harpagophytum procumbens* D.C.”

J. Planar Chromatogr. **9**, 199-202 (1996)

Raghuram Rao, G. V.; Srinivas, P.; Sastry, S. V. G. K. und Mukhopadhyay, M.

“Modeling solute-co-solvent interactions for supercritical-fluid extraction of fragrances”

J. Supercrit. Fluids **5**, 19-23 (1992)

Renger, B.

”Quantitative densitometric HPTLC determination of triterpenic saponins (escin) in horse-chestnut extracts”

J. Planar Chromatogr. **3**, 160-162 (1990)

Reverchon, E.; Donsi, G. und Osseo, L. S.

”Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices”

Ind. Eng. Chem. Res. **32**, 2721-2726 (1993a)

Reverchon, E. und Marrone, C.

”Modeling and simulation of supercritical CO₂ extraction of vegetable oils”

J. Supercrit. Fluids **19**, 161-175 (2001)

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

”Solubilities of solid octacosane and triacontane in supercritical carbon dioxide“

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

Römpp, H.

”Anreicherung und in-line-Einschluss von *Hypericum perforatum* L. mittels überkritischer CO₂-Extraktion“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2003)

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

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

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

Rote Liste 2004

”Arzneimittelverzeichnis des BPI“

Editio Cantor Verlag, Aulendorf/Württemberg (2004)

Sachs, L.

”Angewandte Statistik“

11. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 561-568 (2000)

Schaeffer, S. T.; Zalkow, L. H. und Teja, A. S.

”Modelling of the supercritical fluid extraction of monocrotaline from *Crotalaria spectabilis*”

J. Supercrit. Fluids **2**, 15-21 (1989)

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

”Phase equilibria in the methanol-carbon dioxide system”

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

Sirtori, C. R.

”Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile”

Pharmacol. Res. **44**, 183-193 (2001)

Soave, G.

”A simple model for the supercritical extraction of solids“

J. Supercrit. Fluids **19**, 19-24 (2000)

- Spangenberg, B. und Klein, K. F.
"Fibre optical scanning with high resolution in thin-layer chromatography"
J. Chromatogr. A **898**, 265-269 (2000)
- Spangenberg, B.; Post, P. und Ebel, S.
"Fiber optical scanning in TLC by use of a diode-array detector – linearization models for absorption and fluorescence evaluation"
J. Planar Chromatogr. **15**, 88-93 (2002)
- Srijayanta, S.; Raman, A. und Goodwin, B. L.
"A comparative study of the constituents of *Aesculus hippocastanum* und *Aesculus indica*"
J. Med. Food **2**, 45-50, (1999)
- Stahl, E.; Quirin, K.-W. und Gerard, D.
"Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination"
Springer-Verlag, Berlin, 1-260 (1987)
- Sticher, O. und Meier, B.
"Quantitative Bestimmung von Harpagosid in Wurzeln von *Harpagophytum procumbens* mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)"
Dtsch. Apoth. Ztg. **34**, 1592-1594, (1980)
- Stumpf, K.H.; Jaggy, H.; Oschmann, R.; Koch, E. und Simmet, T.
Schwabe, Dr. Willmar GmbH & Co.
"Harpagoside-enriched extract from *Harpagophytum procumbens* and processes for producing same"
WO 97/34565, **21.03.1997**
- Subra, P.; Castellani, S.; Jestin, P. und Aoufi, A.
"Extraction of b-carotene with supercritical fluids: experiments and modelling"
J. Supercrit. Fluids **12**, 261-269 (1998)
- Suzuki, K.; Sue, H.; Itou, M.; Smith, R. L.; Inomata, H.; Arai, K. und Saito, S.
"Isothermal vapor-liquid equilibrium for binary systems at high pressures: carbon dioxide-methanol, carbon dioxide-ethanol, carbon-dioxide-1-propanol, methane-ethanol, methane-1-propanol, ethane-ethanol and ethane-1-propanol systems"
J. Chem. Eng. Data **35**, 63-66 (1990)
- Tomankova, H. und Sabartova, J.
"Determination of impurities in azidothymidine by HPTLC densitometry and HPLC Chromatographia **29**, 562-570 (1990a)
- Tomankova, H. und Sabartova, J.
"Determination of azidothymidine and its degradation product thymine in pharmaceutical dosage forms by HPLC and HPTLC densitometry"
Chromatographia **29**, 44-50 (1990b)
- Tyrer, D.
"Solubilities below and above the critical temperature"
J. Chem. Soc. **97**, 621-632 (1910)

Uberti, E.; Martinelli, E. M. und Pifferi, G.

“TLC-densitometric analysis of aescin in ointments“

Fitoterapia **1**, 57-60 (1990)

USP 28

”Validation of compendial methods”

in United States Pharmacopeia **28**

United States Pharmacopeial Convention Rockville (2004)

van Beek, T. A. und Taylor, L. T.

”Sample preparation of standardized extracts of *Ginkgo biloba* by supercritical fluid extraction”

Phytochem. Anal. **7**, 185-191 (1996)

Vanhaelen, M. und Vanhaelen-Fastre, R.

”Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plant crude extracts by thin-layer chromatography-densitometry”

J. Chromatogr. **281**, 263-271 (1983)

Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastre, R. und Elchami, A. A.

“Gas-liquid chromatographic determination of the iridoid content in *Harpagophytum procumbens* D.C.“

J. Chromatogr. **109**, 476-478 (1981)

Veit, M.

“Stellenwert pflanzlicher Antirheumatika”

Pharm. unserer Zeit **31**, 156-163 (2002)

Vetere, A.

“A short-cut method to predict the solubilities of solids in supercritical carbon dioxide”

Fluid Phase Equilibr. **148**, 83-93 (1998)

Vieira de Melo, S. A. B.; Costa, G. M. N.; Uller, A. M. C. und Pessoa, F. L. P.

“Modeling high-pressure vapour-liquid equilibrium of limonene, linalool and carbon dioxide systems”

J. Supercrit. Fluids **16**, 107-117 (1999)

Vitzthum, O. und Hubert, P.

HAG AG

“Verfahren zur Herstellung von Hopfenextrakten“

DT 2 127 618, **03.06.1971**

von Eggelkraut-Gottanka, S.

“Untersuchungen zur Zusammensetzung und Verarbeitung von Trockenextrakten aus *Hypericum perforatum* L.“

Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen (2001)

von Koenen, E.

“Heil-, Gift- und essbare Pflanzen in Namibia“

Kalus Hess Verlag, Namibia, 126 (1996)

- Wagner, H.; Reger, H. und Bauer, R.
"Saponinhaltige Drogen und Fertigarzneimittel"
Dtsch. Apoth. Ztg. **30**, 1513-1518, (1985)
- Wagner, J.; Schlemmer, W. und Hoffmann, H.
"Über die Inhaltsstoffe der Roßkastanie"
Arzeim.-Forsch. **2**, 205-209 (1970)
- Walsh, J. M.; Ikonomou, G. D. und Donohue, M. D.
"Supercritical phase behavior: the entrainer effect"
Fluid Phase Equilibr. **33**, 295-314 (1987)
- Wenzel, P. und Wegener, T.
"Teufelskralle. Ein pflanzliches Antirheumatikum"
Dtsch. Apoth. Ztg. **13**, 1131-1144 (1995)
- Wheatley, G. W.; Chapman, T. B.; Dring, S. und Gericke, N.
Essential Nutrition Limited (United Kingdom)
"A method of producing high anti-inflammatory activity extracts from *Harpagophytum procumbens*"
GB 2 335 919 A, **01.04.1998**
- Woldemariam, T. Z.; Betz, J. M. und Houghton, P. J.
"Analysis of aporphine and quinolizidine alkaloids from *Caulophyllum thalictroides* by densitometry and HPLC"
J. Pharm. Biomed. Anal. **15**, 839-843 (1997)
- Wu, W. und Hou, Y.
"Mathematical modeling of extraction of egg yolk oil with supercritical CO₂"
J. Supercrit. Fluids **19**, 149-159 (2001)
- Yoon, J.-H.; Chun, M.-K.; Hong, W.-H. und Lee, H.
"High pressure phase equilibria for carbon dioxide-methanol-water system: experimental data and critical evaluation of mixing rules"
Ind. Eng. Chem. Res. **32**, 2881-2887 (1993)
- Yoon, J.-H.; Lee, H.-S. und Lee, H.
"High pressure vapor-liquid equilibria for carbon dioxide + methanol, carbon dioxide + ethanol and carbon dioxide + methanol + ethanol"
J. Chem. Eng. Data **38**, 53-55 (1993)
- Yoshikawa, M.; Harada, E.; Murakami, T.; Matsuda, H.; Wariishi, N.; Yamahara, J.; Murakami, N. und Kitagawa, I.
"Escins-Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, bioactive Triterpene oligoglycosides from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L.: their inhibitory effects on ethanol absorption and hypoglycemic activity on glucose tolerance test"
Chem. Pharm. Bull. **42**, 1357-1359 (1994)
- Ziller, K. H. und Franz, G.
"Analysis of water soluble fraction from the roots of *Harpagophytum procumbens*"
Planta Med. **37**, 340-348 (1979)

Zosel, K.
Studiengesellschaft Kohle mbH
"Verfahren zur Entcoffeinierung von Kaffee"
DT 2 005 293, **05. 02. 1970**

Zosel, K.
"Praktische Anwendungen der Stofftrennung mit überkritischen Gasen"
Angew. Chem. **90**, 748-755 (**1978**)

11. ANHANG

11.1 Messdaten der LC-MS Analyse eines CO₂-Teufelskrallenextraktes

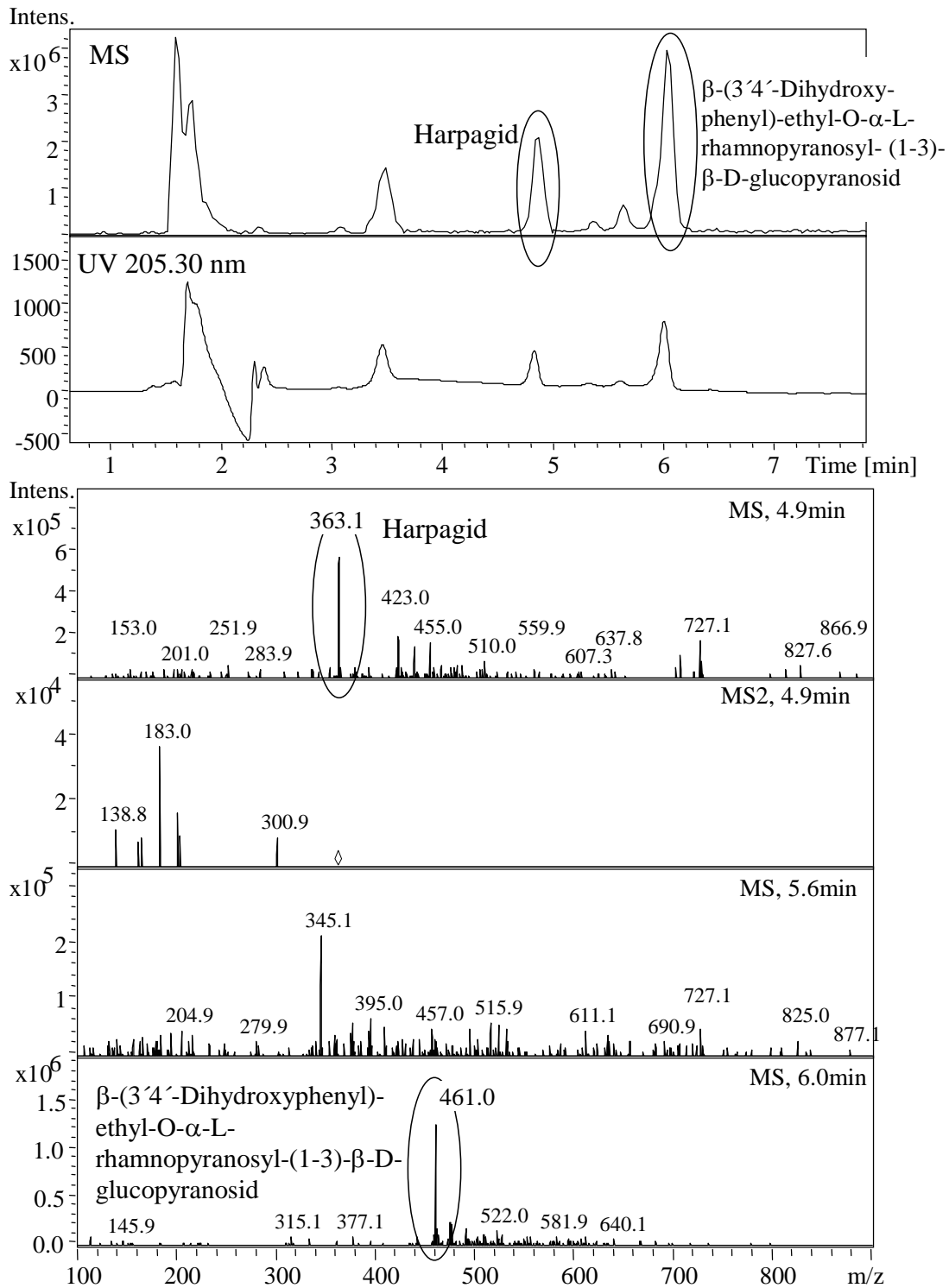


Abb. 11-1 HPLC- und MS-Chromatogramm (Zeitraum 0-8 min) eines CO₂-Extraktes unter Zuordnung der Peaks zu den Extraktivstoffen

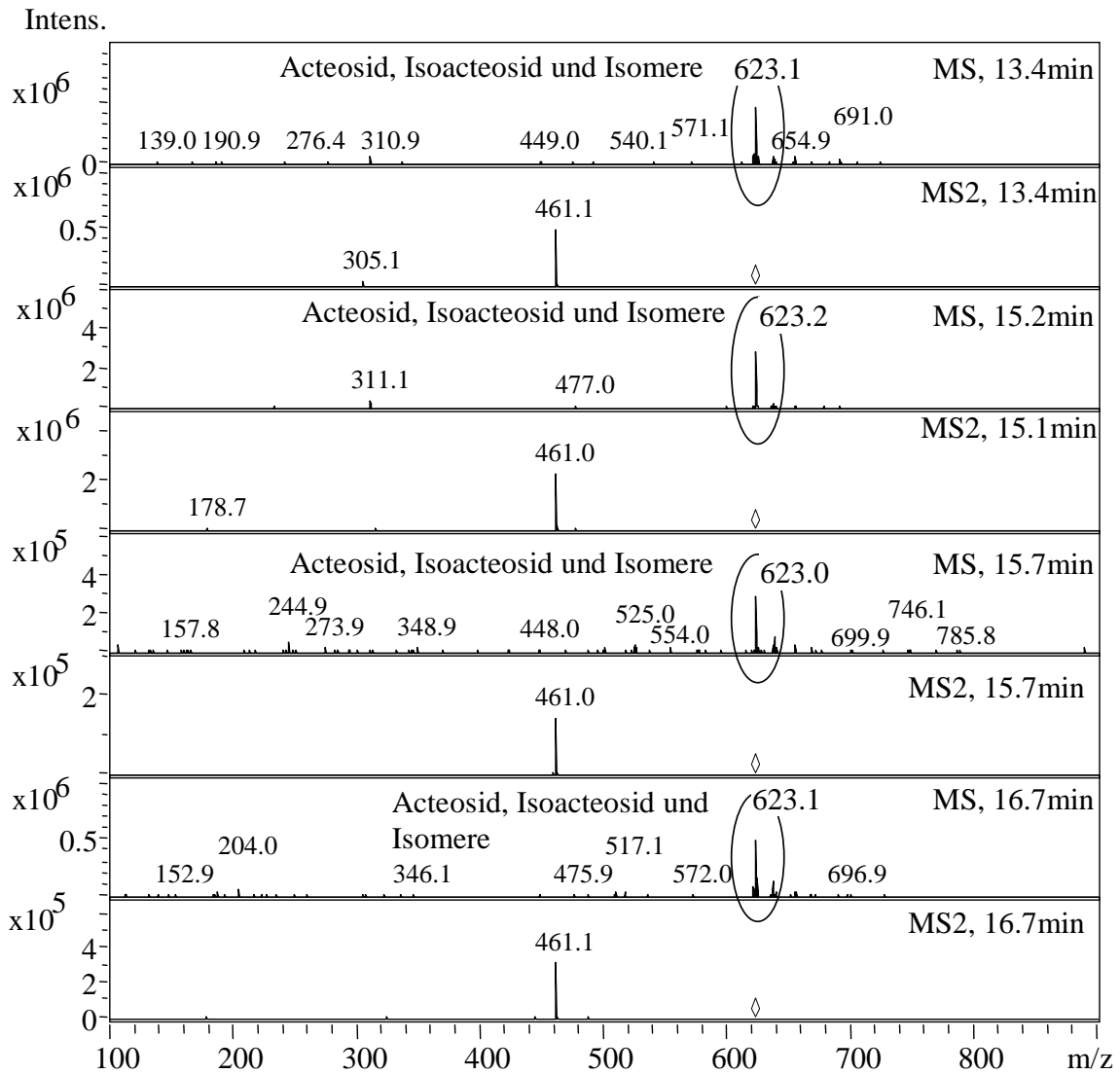
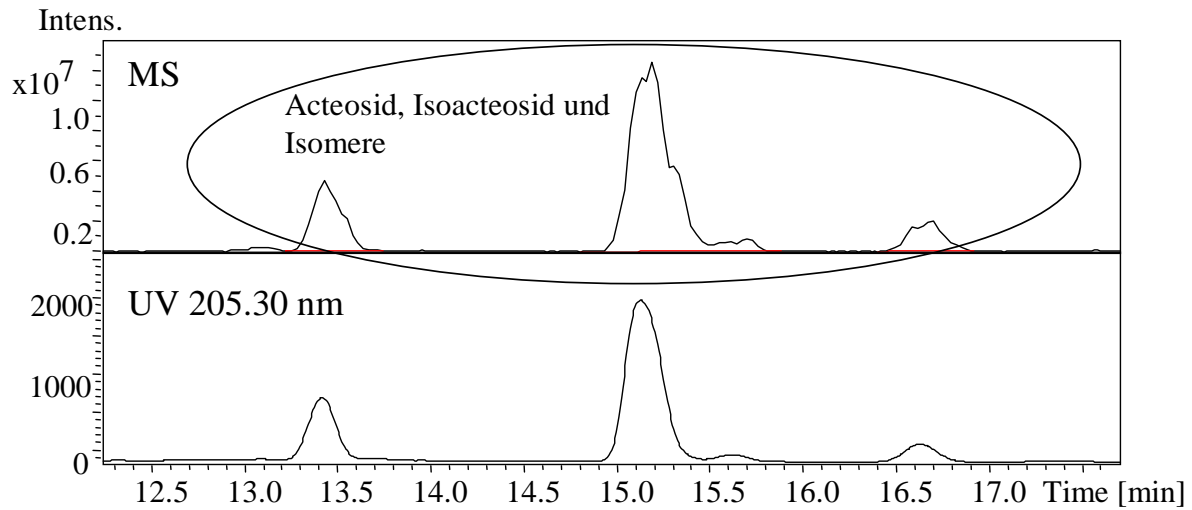


Abb. 11-2 HPLC- und MS-Chromatogramm (Zeitraum 12-18 min) eines CO_2 -Extraktes unter Zuordnung der Peaks zu den Extraktivstoffen

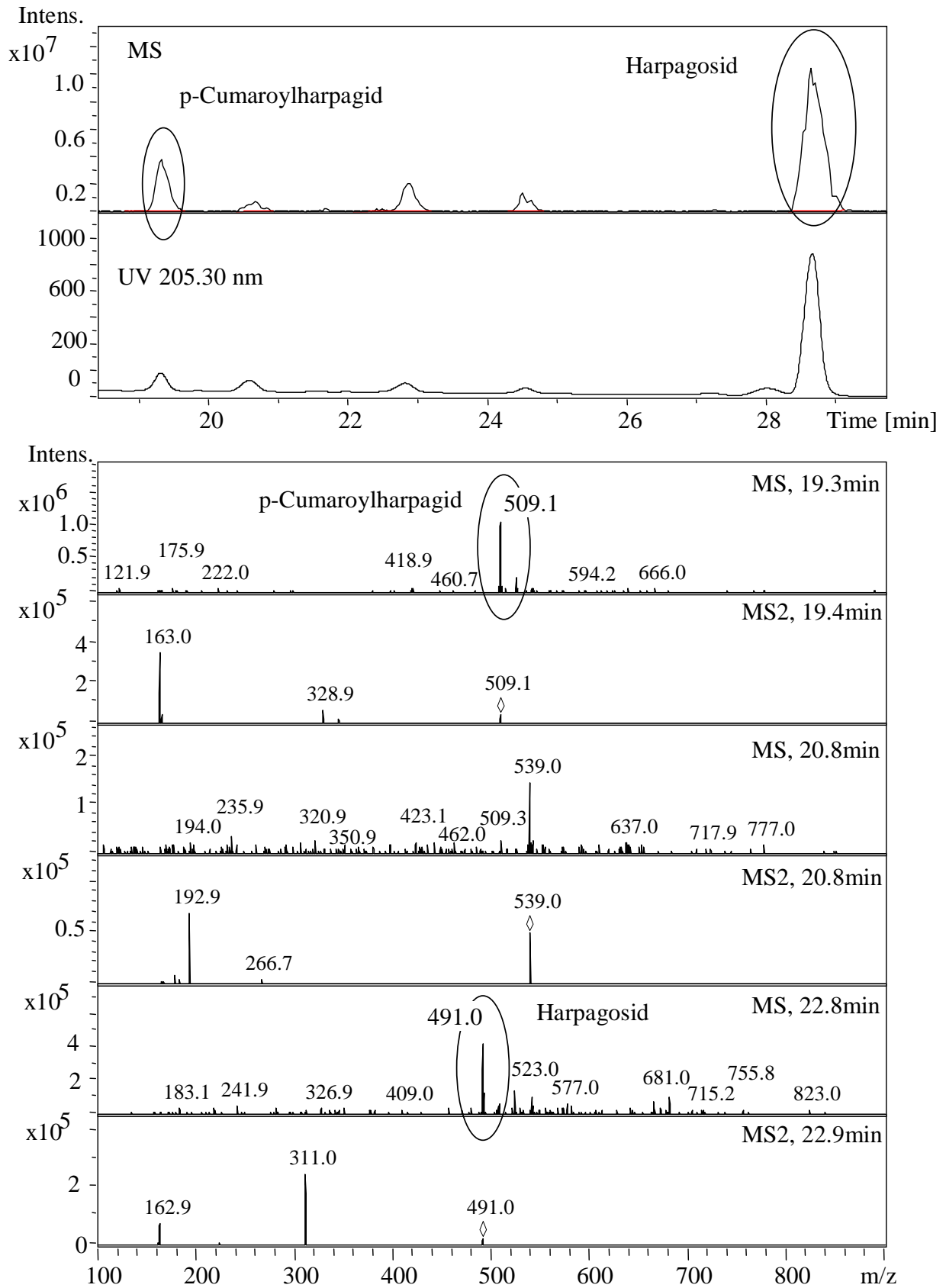


Abb. 11-3 HPLC- und MS-Chromatogramm (Zeitraum 18-30 min) eines CO_2 -Extraktes unter Zuordnung der Peaks zu den Extraktivstoffen

11.2 Messdaten der Kalibrierung und Validierung der HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Harpagosid

Tab. 11-1 Messdaten der HPLC-Kalibrierung für Harpagosid

Konzentration [mg/100 ml]	Flächeneinheiten			Mittelwert
20,170	6543	6719	6512	6648,67
	6752	6698	6668	
72,612	27478	27398	27509	27417,00
	27437	27408	27272	
149,258	55754	55531	55635	55657,00
	55936	55505	55581	
225,904	83453	83785	83614	83645,00
	84059	83572	83387	
302,550	112187	112109	112128	112254,5
	112517	112421	112165	
403,400	148864	149102	148794	148936,67
	148769	149094	148997	
Steigung	371,14			
Achsenabschnitt	-406,56			
Korrelationskoeffizient	0,999983			

Tab. 11-2 Bestimmung der HPLC-Systempräzision für Harpagosid

	Konzentration [mg/100 ml]		
Messwerte	227,38	227,69	225,32
	228,42	229,07	231,56
Mittelwert [mg/100 ml]	228,24		
relative Standardabweichung [%]	0,91		

Tab. 11-3 Bestimmung der HPLC-Methodenpräzision für Harpagosid bei sechsmaliger Herstellung eines überkritischen CO₂-Extraktes

Extrakt	Konzentration [mg/100 ml]			Mittelwert	rel. Stabw. [%]
1	296,23	293,05	295,80	295,03	0,58
2	299,05	290,40	289,42	292,96	1,81
3	294,07	291,86	294,11	293,35	0,44
4	289,01	283,83	286,02	286,29	0,91
5	286,39	284,57	284,60	285,19	0,37
6	298,28	297,44	299,11	298,28	0,28
Mittelwert (n = 18)				291,85	
rel. Standardabweichung [%]				1,81	

Tab. 11-4 Bestimmung der HPLC-Wiederfindungsrate für Harpagosid

Soll-Konz. [mg/100 ml]	116,91	105,22	129,86	142,81
Soll-Gehalt [%]	100,00	90,00	111,08	122,15
Ist-Konz. [mg/100 ml]	118,23	101,59	128,84	145,31
	115,48	106,49	130,43	146,23
	117,03	103,05	129,19	145,58
Mittelwert	116,91	103,71	129,49	145,71
rel. Stab. [%]	1,18	2,42	0,65	0,33
Ist-Gehalt [%]		88,71	110,76	124,63
Wiederfindung [%]		98,56	99,71	102,03

11.3 Messdaten der Kalibrierung und Validierung der HPTLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Harpagosid

Tab. 11-5 Messdaten der HPTLC-Kalibrierung für Harpagosid

Konzentration [mg/100 ml]	Flächeneinheiten			Mittelwert
4,296	217,5	222,0	202,7	226,37
	254,8	246,0	215,2	
8,592	426,2	409,6	401,9	434,38
	465,0	462,1	441,5	
17,184	733,3	710,9	718,9	750,58
	789,6	788,1	762,7	
25,776	965,3	962,7	1005,9	1002,17
	1031,7	1036,6	1010,8	
34,368	1215,1	1230,9	1168,9	1202,98
	1219,9	1208,6	1174,5	
42,960	1372,9	1385,4	1317,6	1342,08
	1312,8	1321,9	1341,9	
quadratische Steigung (x^2)			-0,43	
Parameter m (x)			48,93	
Parameter b			33,82	
Korrelationskoeffizient			0,99773	

Tab. 11-6 Bestimmung der HPTLC-Systempräzision für Harpagosid

	Konzentration [mg/100 ml]		
Messwerte	14,59	14,89	15,2
	15,16	15,32	14,75
Mittelwert [mg/100 ml]		14,98	
relative Standardabweichung [%]		1,91	

Tab. 11-7 Bestimmung der HPTLC-Methodenpräzision für Harpagosid bei sechsmaliger Herstellung eines überkritischen CO₂-Extraktes

Extrakt	Konzentration [mg/100 ml]			Mittelwert	rel. Stabw. [%]
1	16,58	16,77	15,93	16,43	2,69
2	17,48	18,21	17,64	17,77	2,16
3	16,98	17,61	17,45	17,35	1,87
4	17,70	17,81	17,13	17,55	2,08
5	17,78	18,08	18,23	18,03	1,27
6	17,32	17,86	17,41	17,53	1,65
Mittelwert (n = 18)				17,44	
rel. Standardabweichung [%]				3,40	

Tab. 11-8 Bestimmung der HPTLC-Wiederfindungsrate für Harpagosid

Soll-Konz. [mg/100 ml]	17,19	15,47	18,91	20,63
Soll-Gehalt [%]	100,00	90,00	110,00	120,00
Ist-Konz. [mg/100 ml]	16,86	16,02	18,74	19,91
	17,44	15,78	18,43	20,19
	17,28	15,41	18,91	20,61
Mittelwert	17,19	15,73	18,70	20,24
rel. Stab. [%]	1,75	1,94	1,30	1,72
Ist-Gehalt [%]		91,52	108,76	117,72
Wiederfindung [%]		101,48	98,89	98,12

11.4 Messdaten der Kalibrierung und Validierung der HPTLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Aescin

Tab. 11-9 Messdaten der HPTLC-Kalibrierung für Aescin

Konzentration [mg/100 ml]	Flächeneinheiten			Mittelwert
12,150	112,3	106,4	114,1	114,30
	113,3	119,9	119,8	
24,300	175,2	177,2	177,1	181,03
	181,2	187,4	188,1	
48,600	308,1	310,6	311,5	323,37
	326,8	344,3	338,9	
72,900	459,9	454,3	453,1	462,23
	457,3	478,3	470,5	
97,200	591,2	589,9	590,5	590,65
	588,9	589,8	593,6	
121,500	729,4	738,9	722,0	735,03
	745,5	746,2	728,2	
Steigung	5,66			
Achsenabschnitt	45,70			
Korrelationskoeffizient	0,9992			

Tab. 11-10 Bestimmung der HPTLC-Systempräzision für Aescin

	Konzentration [mg/100 ml]		
Messwerte	111,89	111,45	112,00
	111,97	111,31	111,26
Mittelwert [mg/100 ml]	111,65		
relative Standardabweichung [%]	0,31		

Tab. 11-11 Bestimmung der HPTLC-Methodenpräzision für Aescin bei sechsmaliger Herstellung eines methanolischen Drogenauszuges

Extrakt	Konzentration [mg/100 ml]			Mittelwert	rel. Stabw. [%]
1	129,52	127,93	138,52	131,99	4,33
2	127,75	130,55	133,58	130,62	2,23
3	134,60	133,21	140,99	136,27	3,04
4	131,64	135,57	131,78	132,99	1,68
5	144,20	140,93	142,32	142,48	1,15
6	129,98	128,6	138,33	132,30	3,98
Mittelwert (n = 18)				134,44	
rel. Standardabweichung [%]				3,92	

Tab. 11-12 Bestimmung der HPTLC-Wiederfindungsrate für Aescin

Soll-Konz. [mg/100 ml]	53,13	47,82	57,98	62,84
Soll-Gehalt [%]	100,00	90,00	109,15	118,30
Ist-Konz. [mg/100 ml]	52,33	47,52	57,82	63,05
	52,44	48,57	55,97	61,67
	54,63	47,49	58,92	65,69
Mittelwert	53,13	47,86	57,57	63,47
rel. Stab. [%]	2,44	1,29	2,59	3,22
Ist-Gehalt [%]		90,08	108,38	119,49
Wiederfindung [%]		100,08	99,29	101,00

11.5 Firmenverzeichnis

Accelrys Ltd., 334 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0WN, UK
Advantech Europe GmbH, Kolberger Straße 7, D-40599 Düsseldorf
Agilent Technologies GmbH, Hewlett-Packard-Straße 8, D-76337 Waldbronn
Agilent Technologies, 1601 California Ave., Palo Alto, California 94304, USA
Alexanderwerk AG, Kippdorfstraße 6-24, D-42857 Remscheid
Alfred Galke GmbH, Am Bahnhof 1-5, D-37534 Gittelde
Assay Designs, 800 Technology Drive, Ann Arbor, Michigan 48108, USA
W.A. Bachofen Maschinenfabrik, Utengasse 15/17, CH-4002 Basel, Schweiz
Bärlocher GmbH, Riesstraße 16, D-80992 München
Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Heinrichstraße 3-4, D-12207 Berlin
BASF AG, Carl-Bosch-Straße 38, D-68056 Ludwigshafen
Beckman, Kingsmead Business Park, Glenrothes-Fife, Scotland, UK
Bender & Hobein GmbH, Buchbrunnenweg 26, D-89081 Ulm
Binder GmbH, Bergstraße 14, D-78532 Tuttlingen
Brand GmbH & Co. KG, Otto-Schott-Straße 25, D-97877 Wertheim
Bruker Daltonik GmbH, Fahrenheitstraße 4, D-28359 Bremen
Büchi Labortechnik GmbH, Am Porscheplatz 5, D-45127 Essen
Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Verwaltungsstelle für Agraralkohol,
Friedrichsring 35, D-63069 Offenbach am Main
Camag AG & Co. GmbH, Bismarckstraße 27-29, D-12169 Berlin
Danfoss GmbH, Carl-Legien-Straße 8, D-63073 Offenbach
Degussa AG, Weißfrauenstraße 9, D-60311 Frankfurt/Main
Deutsche Metrohm GmbH & Co., In den Birken 3, D-70794 Filderstadt
Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., Willmar-Schwabe-Straße 4, D-76227 Karlsruhe
Eppendorf GmbH, Peter-Henlein-Straße 2, D-50389 Wesseling-Berzdorf
Extrasynthèse, B.P. 62, F-69730 Genay, Frankreich
Fisher Scientific GmbH, Liebigstraße 16, D-61130 Niederau
Fluka Chemie AG, Industriestraße 25, CH-9470 Buchs, Schweiz
Fritsch GmbH, Industriestraße 8, D-55743 Idar-Oberstein
Fujisawa Deutschland GmbH, Weihenstephaner Straße 28, D-81673 München
Gerteis Maschinen + Processengineering AG, Stampfstraße 74, CH-8645 Jona, Schweiz
GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Schulze-Delitzsch-Straße 4, D-30938 Burgwedel
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Straße 12, D-91126 Schwabach
Heraeus Instruments GmbH, Postfach 1561, D-63450 Hanau

F. Herbst & Co., Dyckhofstraße 7, D-41460 Neuss
Hewlett-Packard GmbH, Herrenberger Straße 140, D-71034 Böblingen
IKA-Werke GmbH & Co., Janke & Kunkel Straße 10, D-79219 Staufen
J&M Analytische Mess- und Regeltechnik GmbH, Robert-Bosch-Straße 83, D-73431 Aalen
Kämmer Ventile GmbH, Manderscheidtstraße 19, D-45141 Essen
Kendro Laboratory Products GmbH, Robert-Bosch-Straße 1, D-63505 Langenselbold
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
Lichtwer Pharma AG, Wallenroder Straße 8-10, D-13435 Berlin
Liebherr Hausgeräte GmbH, Memminger Straße 77-79, D-88416 Ochsenhausen
Lothar Baron Laborgeräte, Im Weiler 10, D-78479 Insel Reichenau
Macherey-Nagel GmbH, Valenciener Straße 11, D-52355 Düren
Malvern Instruments GmbH, Rigipsstraße 19, D-71083 Herrenberg
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, Füttingsweg 34, D-47805 Krefeld
Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-35353 Gießen
Micromeritics GmbH, Erftstraße 54, D-41238 Mönchengladbach
Microsoft Deutschland GmbH, Konrad-Zuse-Straße 1, D-85716 Unterschleißheim
Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5, D-65824 Schwalbach
Molecular Devices GmbH, Gutenbergstraße 10, D-85737 Ismaning
Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Werner-von-Siemens-Straße 1, D-77656 Offenburg
Retsch GmbH & Co. KG, Rheinische Straße 36, D-42781 Haan
Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Holzmühle 1, D-73494 Rosenberg
Rheodyne LLC, 600 Park Court Rohnert Park, CA 94928 USA
Rhodia Chimie, 25 Quai Paul Doumer, F-92408 Courbevoie, Frankreich
Riedel-de-Haën, Wunstorfer Straße 40, D-30926 Seelze
Sartorius AG, Weender Landstraße 94-108, D-37075 Göttingen
Schleicher & Schüll GmbH, Hahnestrasse 3, D-37586 Dassel/Relliehausen
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstraße 5, D-82024 Taufkirchen
Sitec Sieber Engineering AG, Aschbach 621, CH-8124 Maur, Schweiz
Südzucker AG, Maximilianstraße 10, D-68165 Mannheim
Wagner & Munz GmbH, In der Rosenau 4, D-81829 München
Waters GmbH, Hauptstraße 87, D-65760 Eschborn
Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstraße 12, D-69469 Weinheim

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Ammon, Bechthold, Beyer, Döring, Drews, Gauglitz, Gündisch, Häfelinger, Heide, Kovar,
Lindner, Mechler, Nagel, Pommer, Safayhi, Schmidt, Schultz, Strähle, Wahl, Wankmüller,
Zimmermann

LEBENS LAUF

21. März 1976	geboren in Böblingen als zweites Kind von Anton und Ingrid Günther (geb. Fahrenkrog)
1982-1986	Peter-Rosegger Grundschule Gärtringen
1986-1992	Otto-Hahn Gymnasium Böblingen
1992-1995	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Böblingen
1995	Erlangung der „Allgemeinen Hochschulreife“
Oktober 1995-Oktober 1999	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
August 1997	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1999	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1999-April 2000	Praktikum in der Schönbuch-Apotheke in Holzgerlingen
Mai 2000-Oktober 2000	Praktikum bei Solvay Pharmaceuticals GmbH in Hannover
Dezember 2000	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 2000	Approbation als Apothekerin
Januar 2001-März 2001	angestellte Apothekerin in der Schönbuch-Apotheke in Holzgerlingen
April 2001-September 2001	Sprach- und Auslandsaufenthalt in Irland
seit Oktober 2001	wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Beginn der Dissertation „Schleppmitteleinsatz in der Kohlendioxidextraktion hydrophiler Pflanzeninhaltsstoffe und Vorhersage der Extrahierbarkeit“ unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt.