

**Extraktion, Umwandlung und Fraktionierung
von Ginsenosiden in flüssigem Ammoniak
und in wässrigen Lösungen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von
M.Sc. Chem. In-Ho Cho
aus Gyeongbug, Korea

eingereicht beim Fachbereich 8
der Universität-Gesamthochschule Siegen
Siegen 2001

Referent : Professor Dr. H. Lentz

Koreferent : Hochschuldozent Dr. H. C. Uzar

Tag der mündlichen Prüfung : 05. 04. 2001

Herrn Professor Dr. H. Lentz danke ich für die Stellung des interessanten Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. E. Hohaus danke ich für die zahlreiche Diskussionen sowie die Korrektur dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Hochschuldozent Dr. H. C. Uzar, der mir wissenschaftliche Anleitungen auf dem Gebiet der Naturstoffchemie gegeben hat.

Herrn Dr. J. Nolte und Herrn Dipl.-Ing. W. Nigge, Institut für die Spektrochemie und angewandte Spektroskopie (ISAS) in Dortmund danke ich für die massenspektrometrischen Untersuchungen und wissenschaftliche Beratung.

Herrn Dipl.-Laborchem. A. Lehnen danke ich für die freundliche Hilfe bei den Arbeiten mit der Hochdruckapparatur und zahlreichen Diskussionen.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Laboratoriums- und Verfahrenstechnik, insbesondere bei Herrn Dr. W. Zimmermann und Herrn A. Mele möchte ich mich für die geleistete Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Den Mitarbeitern der mechanischen und elektronischen Werkstätten und der Glasbläserei danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung und der Instandhaltung der Apparaturen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Frau und meinem Sohn, die mir das Studium ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1	Beschreibung der Ginsengpflanze	1
1.1.1	Historisches	1
1.1.2	Ginsenosid-Strukturen	2
1.1.3	Ginsenosidgehalte in der Ginsengwurzel	5
1.1.4	Weitere Inhaltsstoffe der Ginsengpflanze	6
1.1.5	Die medizinische Wirkung der Ginsenoside	6
1.2	Extraktion mit komprimierten Gasen	9
1.3	Problemstellung	11
2	Analytische Grundlagen und Analysenverfahren	12
2.1	Chromatographie	12
2.2	Grundlagen der HPLC	15
2.3	Massenspektrometrie	16
2.4	Kalibrierung und statistische Kenndaten von Analysenverfahren	18
2.4.1	Kalibrierung	18
2.4.2	Wiederfindung	18
2.5	Quantitative HPLC-Bestimmung der Hauptginsenoside in den Extrakten	20
2.5.1	Beschreibung der HPLC- Apparatur	20
2.5.2	Probenaufbereitung	21
2.5.3	Durchführung der Chromatographie	22
2.6	Beschreibung der HPLC/MS-Apparatur	23
3	Materialien, Extraktionsapparaturen und Extraktionsverfahren	25
3.1	Materialien	25
3.2	Extraktionsapparatur für Ammoniak	26
3.3	Benutzte Extraktionsverfahren	28
3.3.1	Extraktion mit flüssigem Ammoniak bei 60 °C in einer Hochdruckapparatur	28
3.3.2	Extraktion mit Lösungsmitteln in der Soxhletapparatur bei Normaldruck	28
3.3.3	Alkalische Methanol/Wasser-Extraktion in der Soxhletapparatur bei Normaldruck	29
3.3.4	Umsetzung der Methanol/Wasser-Extrakte mit Natriumhydroxid- und Ammoniak-Lösung	29

3.4	Fraktionierung	30
3.4.1	Fraktionierung der Hauptginsenoside des 60%-Methanolextraktes mit Hilfe einer Reversed-phase-Material-Säule	30
3.4.2	Fraktionierung durch kurzzeitige Extraktion mit einem ersten und folgender erschöpfender Extraktion mit einem zweiten Extraktionsmittel	30
4	Ergebnisse und Diskussion	32
4.1	Extraktausbeuten der verschiedenen Extraktionsverfahren	32
4.2	Chromatographische Analyse der Hauptginsenoside	34
4.3	Hauptginsenosid-Gehalte der Extrakte	42
4.4	Malonyl-Ginsenoside und ihre Reaktionen mit Basen	43
4.5	Fraktionierung der Ginsenoside	50
4.5.1	Untersuchung zur Abhängigkeit der Extraktzusammensetzung von der Extraktionszeit und vom Extraktionsmittel	50
4.5.2	Versuche zur Fraktionierung der Ginsenoside durch zweifache Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln und unterschiedlichen Extraktionszeiten	53
4.5.3	Fraktionierung der Hauptginsenoside des 60% Methanolextraktes mit Hilfe einer Reversed-phase-Material-Säule	55
4.6	HPLC/MS-Untersuchungen der Ginseng-Extrakte	60
4.6.1	MS-Spektren der Ginsengextrakte	60
4.6.2	Charakterisierung einer Mischung der reinen Hauptginsenoside (Standards)	63
4.6.3	Charakterisierung der Extrakte	66
5	Zusammenfassung	72
6	Literaturverzeichnis	75
7	Anhang	79

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Beschreibung der Ginsengpflanze

1.1.1 Historisches

Die Ginseng-Pflanze, die zur Gattung der Araliaceae gehört, wird in Asien seit Jahrtausenden mythisch verehrt. Sie ist mit Legenden, Märchen und Magie umwoben. Die „Menschenwurzel“ (Gin = Mensch; Seng = Wurzel) gilt dort als die königliche aller Heilpflanzen. Von ihrer Wirksamkeit ist man im Fernen Osten aus Erfahrung und Überlieferung so überzeugt, daß lange Zeit darauf verzichtet wurde, sich um einen wissenschaftlichen Nachweis der als positiv empfundenen Effekte zu bemühen. Gemäß ihrem lateinischen Namen Panax Ginseng (Panacea-Allheilmittel) soll die Wunderdroge nicht nur regelnd in den Gesamtorganismus des Menschen eingreifen, sondern auch Hilfe leisten bei Erschöpfungszuständen, bei Abgeschlagenheit und mangelnder Konzentrationsfähigkeit. Als natürliches Allheilmittel genießt die Ginsengwurzel in der ganzen Welt einen sagenhaften Ruf. Schon vor zwei Jahrtausenden wog man sie gegen das dreifache Gewicht an Gold auf, und bis heute hat die Arzneipflanze ihren hohen Wert nicht verloren. Im Preis schlägt sich auch nieder, daß die gegen Witterung und Schädlinge sehr anfällige Pflanze mit viel Mühe und Zeitaufwand kultiviert wird.

Die hier untersuchte Ginsengart, *Panax ginseng* C. A. Meyer, wird auch als koreanischer oder asiatischer Ginseng bezeichnet. Sie wird in China (*Panax notoginseng*), Korea (*Panax ginseng* C.A. Meyer), Japan (*Panax japonicus* C.A.Meyer) und Nordamerika (*Panax quinquefolium* L) angebaut. Man erntet die gelblichbraune Wurzel der Pflanze nach 4 bis 6 Jahren, wenn sie eine Länge von 8 bis 20 cm und einen Durchmesser von etwa 2 cm erreicht hat. Um die Wurzel als „weißen Ginseng“ in den Handel zu bringen, wird sie gewaschen, geschält und in der Sonne oder im Wärmeluftstrom getrocknet. Sie erhält Färbung und glasigen Zustand durch eine Wärmebehandlung im Dampfstrom.

Für medizinische Zwecke kann das Wurzelmehl direkt verwendet werden. Wäßrige oder alkoholische Extrakte werden in Form von Tee, Tonikum oder als Kapsel angeboten, denen oft noch Vitamine zugesetzt sind. Selbst durch Kosmetika, Konfekt und Zigaretten kann man Ginseng zu sich nehmen.

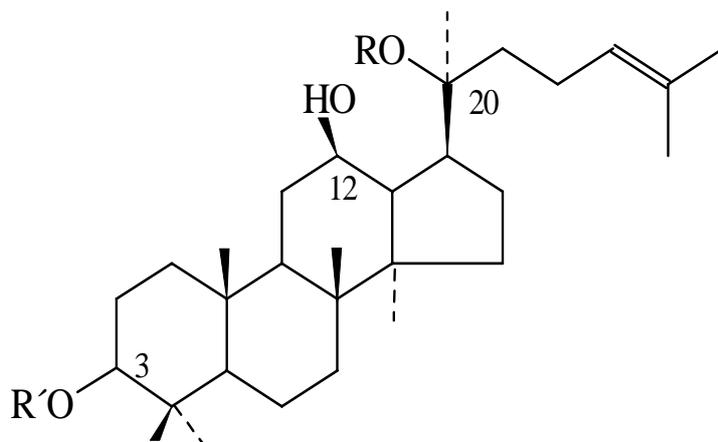
1.1.2 Ginsenosid-Strukturen

Die erste Veröffentlichung über Strukturaufklärung und Identifizierung stammt aus dem Jahre 1915 von Kondo und Tanaka [1], als die Möglichkeiten für die Trennung und die Spektroskopie noch nicht weit entwickelt waren. Man bediente sich deshalb chemischer Umsetzungen, um Stoffklasse, Grundgerüst und schließlich Art und Gehalt der eingebauten Monosaccharide zu bestimmen. In neuen Veröffentlichungen werden die Ginsenoside durch die Massenspektrometrie analysiert oder auch derivatisiert und anschließend mit der IR- und NMR-Spektroskopie untersucht [2-14]. Wegen der extrem geringen Konzentrationen einiger Komponenten und der daraus folgenden schwierigen Isolierung genügender Probenmengen wurden bisher nicht alle Strukturen restlos aufgeklärt.

Zu den wichtigen Veröffentlichungen gehören Klassifizierung und Strukturaufklärungen von Shibata et al. [15-17]. Er untersuchte methanolische Extrakte mit der Dünnschichtchromatographie (DC) und ordnete die Flecken Ginsenosiden zu, die er nach ihrer Laufgeschwindigkeit mit Rx ($x = a, b, c, d, e, f, g, h, o$) bezeichnete. Bei diesen Fraktionen handelte es sich nicht um Reinsubstanzen, wie weitere Auftrennungen mit besseren analytischen Methoden zeigten. Danach wurden die Indizes x der Fraktionen mit Ziffern versehen, z. B. gelang die Trennung von Ra in Ra₁ und Ra₂ sowie die von Rg in Rg₁, Rg₂ und Rg₃.

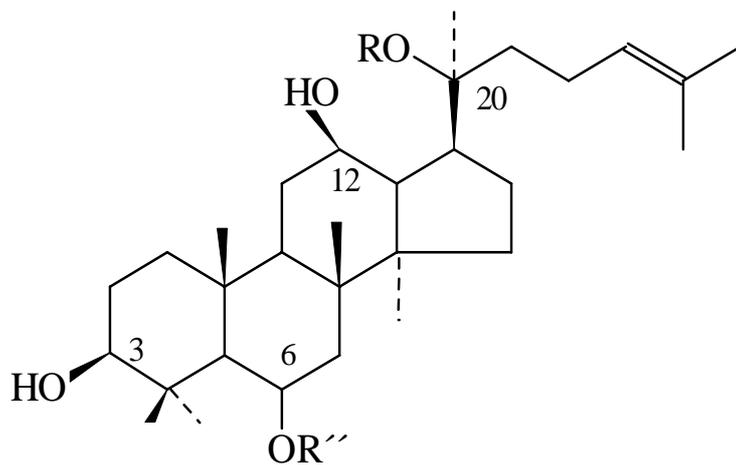
Die Ginsenoside gehören zur Klasse der Saponine, pflanzliche Glykoside, die in Wasser kolloidal löslich sind und als Schaumbildner gelten. Den meisten Ginsenosiden liegt das Dammarolgerüst zugrunde. Nur Ro basiert auf dem Oleanolsäuregerüst. Das Grundgerüst ist als Hydrolyseprodukt der Ginsenoside bestimmbar. An diesen Grundstrukturen sind in bestimmten Stellungen (3-, 6- und 20-OH) Zuckerbausteine über Glykosidbrücken gebunden. Im Jahre 1983 isolierten Kitagawa et al. [18] aus Ginsengwurzel vier Malonyl-Ginsenoside m-Rb₁, m-Rb₂, m-Rc und m-Rd.

Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Ginsenoside gelten in ihrer Struktur als gesichert. Die Strukturformeln seien hier aufgeführt:



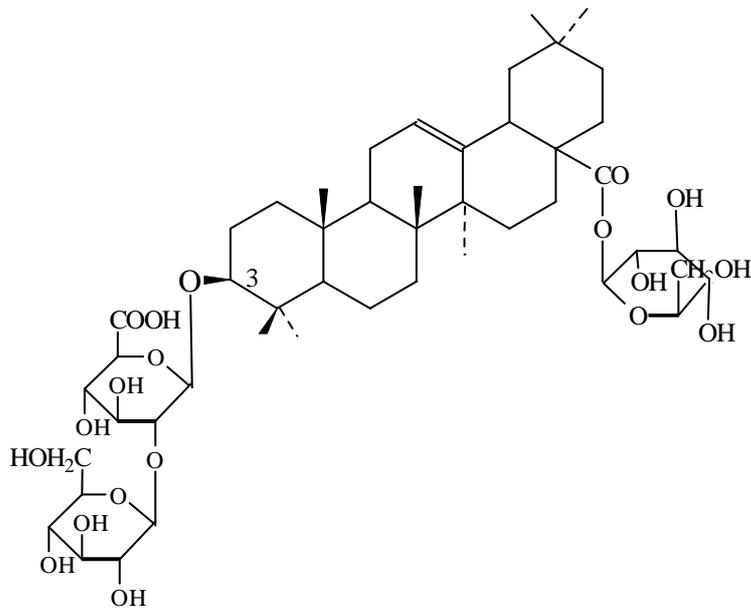
20(s)-Protopanaxadiol

	R'	R
20(s)-Protopanaxadiol	H	H
Rc	glc ²⁻¹ glc	glc ⁶⁻¹ ara(fu)
Rd	glc ²⁻¹ glc	glc
Rb ₁	glc ²⁻¹ glc	glc ⁶⁻¹ glc
Rb ₂	glc ²⁻¹ glc	glc ⁶⁻¹ ara(py)

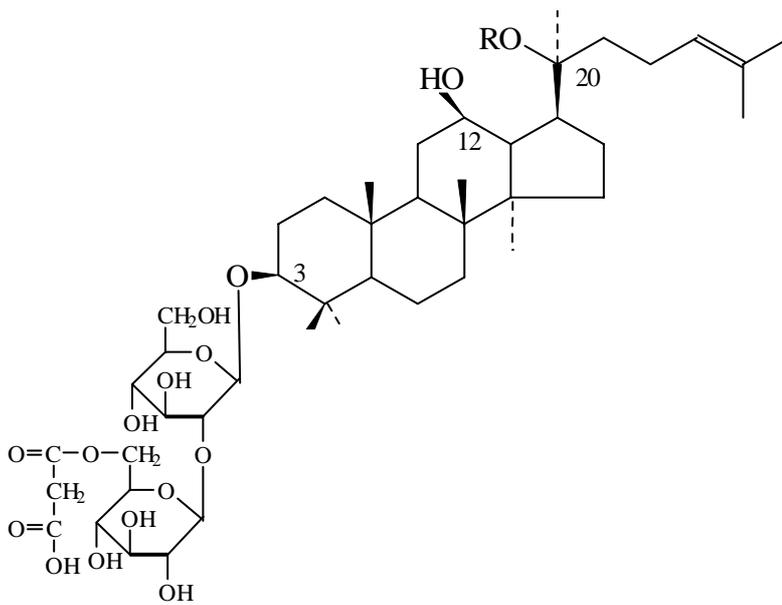


20(s)-Protopanaxatriol

	R''	R
20(s)-Protopanaxatriol	H	H
Rg ₁	glc	glc
Rf	glc ²⁻¹ glc	H
Re	glc ²⁻¹ rham	glc
Rh ₂	glc	H



Ginsenosid Ro



Malonyl-Ginsenoside

<i>Malonyl-Ginsenosid</i>	R
m-Rc	glc ⁶⁻¹ ara(fu)
m-Rd	glc
m-Rb ₁	glc ⁶⁻¹ glc
m-Rb ₂	glc ⁶⁻¹ ara(py)

Abb. 1.1 Struktur der Ginsenoside

20 (s)-Protopanaxadiole, 20 (s)-Protopanaxatriole, Ginsenosid Ro, Malonyl-Ginsenoside
 (glc=β-D-glucopyranosyl; rham=α-L-rhamnopyranosyl; ara(py)= α-L-arabino-pyranosyl;
 ara(fu)= α-L- arabinofuranosyl)

1.1.3 Ginsenosidgehalte in der Ginsengwurzel

Zur Bestimmung der Ginsenosidgehalte müssen zunächst die Komponenten chromatographisch getrennt und isoliert werden. Da die Ginsenoside in ihrem Löslichkeitsverhalten ähnlich sind, ist die Reinheit der erhaltenen Präparate unsicher. Zusätzlich tragen die Variation der Pflanzenszusammensetzung und Fehler bei der Eichung zu Abweichungen unter den Gehaltsangaben bei. Die folgenden Tabellen zeigen nach den Ergebnissen verschiedener Autoren die Unterschiede der Ginsenosidzusammensetzung der Wurzeln aus weißem Ginseng bzw. die Differenzen der Gehalte je nach Bestimmungsmethode.

Tab. 1.1 Ginsenosidgehalte nach Extraktion von Ginsengwurzeln

HPLC [19]

Extrakt.-mittel	Zeit [min]	Temp. [K]	Ginsengart	Re	Rg ₁	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	ΣRx
Wasser	240	373	white ginseng	-	-	-	0,11	0,03	0,02	0,004	0,20
60%-Methanol	240	341	white ginseng	-	-	-	0,43	0,08	0,11	0,02	0,64
Ammoniak(26bar)	240	334	white ginseng	-	-	-	0,66	0,26	0,18	0,03	1,13

HPTLC [20]

Extrakt.-mittel	Zeit[min]	Temp. [K]	Ginsengart	Re	Rg ₁	Rb ₁ /Rb ₂	Rc	Rd	ΣRx	
Wasser	240	373	white ginseng	1,06	0,09	0,26	0,04	-	0,003	1,45
60%-Methanol	240	341	white ginseng	1,10	0,21	1,40	-	-	0,15	2,68
Ammoniak(26bar)	240	334	white ginseng	1,46	0,20	1,99	0,35	-	0,07	4,07

HPLC [21]

Extrakt.-mittel	Zeit [min]	Ginsengart	Re	Rg ₁	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	ΣRx
50%-Ethanol	15	white ginseng	0,22	0,40	0,08	0,33	0,17	0,19	0,04	1,44
50%-Ethanol	15	Gins.hair-root	0,68	0,42	0,25	1,13	0,95	0,81	0,75	5,00

GC [22]

Extrakt.-mittel	Zeit [min]	Ginsengart	Re	Rg ₁ /Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	ΣRx
Methanol	240	white ginseng	0,32	0,39	0,70	0,28	0,32	0,07	2,09
Methanol	240	Amer.ginseng	1,13	0,20	3,88	0,41	-	0,38	6,01

Trotz differierender Gehaltsangaben entfallen die Hauptanteile beim weißen Ginseng auf die Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Re und Rg₁. Der Gehalt an Ginsenosiden, bezogen auf die Gesamttrockenmasse der Wurzel, ist zwar beim amerikanischen Ginseng wesentlich höher als bei den asiatischen Arten, aber die Zusammensetzung unterscheidet sich stark von dem koreanischen Ginseng. Einige Ginsenoside konnten im amerikanischen Ginseng nicht nachgewiesen werden, der Anteil an Rg₁ ist geringer und der an Rb₁ und Re dafür höher.

1.1.4 Weitere Inhaltsstoffe der Ginsengpflanze

In Extrakten der Ginsengwurzel können sich neben den Ginsenosiden zahlreiche weitere Inhaltsstoffe befinden. Einigen Substanzen kann ein medizinischer Effekt zugeordnet werden. Bisher wurden außer den Ginsenosiden noch folgende Bestandteile in der Wurzel bestimmt [23,24]:

- Pancen: Das hellgelbe etherische Öl mit dem für Ginseng typischen Geruch macht etwa 0,05% der trockenen Gesamtmasse aus.
- Sterine und Fettsäure: Bisher wurden β -Sitosterin und Daucosterin nachgewiesen sowie Panax-, Öl-, Palmitin-, Stearin-, Salicyl- und Vanillinsäure.
- Aminosäuren und Peptide: Bekannt sind u. a. Prolin, Glycin, Alanin, Lysin, Arginin, Cystein, Tyrosin, Asparaginsäure, Serin, Leucin, Valin und aus ihnen zusammengesetzte Peptide.
- Zucker: Etwa 5% des Trockengewichts fallen auf Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose und drei aus ihnen bestehenden Trisaccharide ebenso wie Mannit, Arabinose, Rhamnose und Gluconsäure.
- Vitamine: Neben den Vitaminen B₁, B₂, B₁₂ und C wurden Folsäure, Nicotinsäureamid und Panthothensäure identifiziert.
- Enzyme und Phospatide: Amylase, Phenolase und Cholin.
- Anorganische Elemente: Gefunden wurden Magnesium, Aluminium, Phosphor, Kalium, Calcium, Vanadium, Mangan, Eisen, Kobalt, Kupfer, Germanium und Arsen.

1.1.5 Die medizinische Wirkung der Ginsenoside

Im asiatischen wie auch im europäischen und amerikanischen Raum spricht man der Ginsengwurzel und ihren Extrakten eine tonisierende, d.h. regulierende und harmonisierende Wirkung auf das Gleichgewicht der Körperfunktionen, die Homöostase, zu. Nach Kübler wird dies durch die Reaktivitätsregulierung der Zellmembran bewirkt [25]. Dadurch tritt eine Erhöhung der Leistungsfähigkeit und der Widerstandskraft sowohl gegen physikalische Einflüsse (Überhitzung, UV- und Röntgenstrahlung als auch gegen biologische Schädlinge wie Bakterien und Tumore) ein [23].

Da die medizinisch eingesetzten Präparate nicht nach einem einheitlich standardisierten Verfahren hergestellt werden und die Zusammensetzung der Wirkstoffe variiert, ist es schwierig,

allgemeingültige exakte Aussagen über die Wirkung zu machen. In vielen Literaturstellen fehlen auch nähere Angaben über das verwendete Ginsengprodukt, z.B. Zusammensetzung oder Ginsengart.

Die Beurteilung der medizinischen Wirkung ergab, daß sich bezüglich Auffassungstempo, Reizschwelle, Schlafstörungen, Spannungskopfschmerz und Nervosität der Zustand von Patienten, die mit Ginseng behandelt wurden, gegenüber Placebo-Patienten stark verbessert hatte. Andere Symptome, wie z.B. Leistungsfähigkeit, Konzentrationsfähigkeit, Stimmungslage, konnten bei beiden Patientengruppen nicht gesteigert werden.

Außer diesen mehr subjektiven Symptomen wurden an Tieren und Menschen Stoffwechsel- und Gewebeveränderungen beobachtet (Tab 1.2). Beim Einsatz von einzelnen isolierten Ginsenosiden stellte man spezifische, zum Teil sogar entgegengesetzte Effekte fest. Während das Ginsenosid Rb₂ eine dämpfende Wirkung auf das zentrale Nervensystem ausübt, stimuliert Rg₁ dasselbe. Rb₁ und Rg₁ haben unterschiedliche Wirkungen auf den Blutdruck; Rb₁ regt die Cholesterin-Synthese an, der Extrakt mit der Ginsenosidmischung senkt aber den Cholesterinspiegel. Eine Senkung des Lactatspiegels im Blut, erhöhter Fettsäureabbau und gehemmte Glycogenolyse treten nur bei körperlicher Anstrengung auf. Nach Absetzen des Ginsengpräparates klingt die Wirkung wieder ab.

Diese Vielfalt der medizinischen Einsatzmöglichkeiten legt es nahe, sowohl die Extraktion als auch die Herstellung von Reinsaponinen zu optimieren und standardisiert gezielt einzusetzen.

Tab. 1.2 Einige medizinische Wirkungen der Ginseng-Extrakte und einzelner Ginsenoside [26]

Wirkung	Ginseng-Extrakte	Reines Ginsenosid
Adaptogen		
Steigerung der physischen Leistung	+	
Revitalisierende Kraft	+	
Zentrales Nervensystem		
Regelvorgänge im Nervensystem	+	
Stimulierung		Rg ₁
Dämpfung		Rb ₂
Leber und Verdauung		
RNA- und Proteinsynthese	+	
Stimulierung der Cholesterin-Synthese	+	
Senkung des Serum- und Lebercholesterinspiegels	+	
Steigerung der Pepsinproduktion		Rb ₁
Steigerung der Darmmotorik	+	
Kohlenhydratstoffwechsel		
Regulierung bei hyperglykämischem Zustand	+	
Hypoglykämische Wirkung	+	
Blutbild		
Steigerung der DNA, Protein- und Lipidsynthese		Rb ₂ , Rc, Rg ₁
Steigerung der RNA-Synthese		Rb ₁ , Rc
Blutdruck		
Gefäßerweiterung, hypertone Wirkung		Rg ₁
Hypotone Wirkung		Rb ₁
Nieren und Nebennieren		
Antiexsudative Wirkung	+	
Antiinflammatorische Wirkung		Rg ₂
Steigerung der Nebennierenfunktion	+	
Hormone		
Stimulierung von ACTH	+	
Genadotrope Wirkung	+	
Tumorwirkung	+	

1.2 Extraktion mit komprimierten Gasen

Grundlage jeder Extraktion ist der Übergang des zu lösenden Stoffes in die aufnehmende Phase und die Bildung einer Lösung. Bei der normalen Extraktion ist die aufnehmende Phase flüssig. Aber im überkritischen Zustand kann ein komprimiertes Gas als Lösungsmittel fungieren. Dies wurde bereits 1879 von Hannay und Hogarth beobachtet [27]. Sie fanden, daß Kaliumjodid sowohl in flüssigem als auch überkritischem absoluten Alkohol löslich ist. Im überkritischen Zustand kann das Kaliumjodid leicht durch Drucksenkung gefällt und durch Druckerhöhung wieder aufgelöst werden. Durch Auflösung in einem überkritischen Medium kann die Löslichkeit technisch einfach beeinflusst werden, denn Trennung von überkritischem Lösungsmittel und gelöster Substanz ist durch Drucksenkung leicht zu erreichen.

Die Löslichkeit in überkritischen Medien blieb lange nur von wissenschaftlichem Interesse. Erst in den siebziger Jahren wurden die Anwendungen der Löslichkeit in überkritischen Medien in größerem Umfang untersucht. Es wurden Substanzen auf ihre Eignung als überkritische Lösungsmittel geprüft, deren kritische Punkte im Temperaturbereich zwischen ca. 30-330 °C und im Druck zwischen 30 und 120 bar lagen.

Kohlendioxid ($T_c = 31,05 \text{ °C}$, $P_c = 73,8 \text{ bar}$) ist für viele Anwendungen geeignet. Insbesondere hat die Extraktion mit Kohlendioxid im Bereich der Lebensmittelchemie viele Vorteile: Kohlendioxid ist weitgehend inert und toxikologisch unbedenklich, die kritischen Werte liegen so günstig, daß überkritische Bedingungen sehr schonend bei der Extraktion von biologischem Material sind, und es ist ein ausreichend gutes Lösungsmittel für unpolare und mäßig polare Substanzen. Es wurden Verfahren z.B. zur Extraktion von Coffein aus Kaffee oder Tee, von Nikotin aus Tabak, der Bitterstoffe des Hopfens, von Gewürzinhaltstoffen, pflanzlichen Ölen, Farbstoffen, Zitrusölen und pharmazeutischen Wirkstoffen entwickelt [28]. Bei der Extraktion von Coffein, der Bitterstoffe des Hopfens und von Pyrethrin erwies sich die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid wirtschaftlich als konkurrenzfähig, so daß industrielle Anlagen in Betrieb genommen wurden.

Eine zweite wichtige Gruppe von überkritischen Lösungsmitteln sind Kohlenwasserstoffe. Sie werden für eine Gewinnung von Kraftstoffen aus Kohle und Schwerölen diskutiert. Im NCB-Prozeß, entwickelt vom National Coal Board, Großbritannien, wird Kohle mit überkritischen Kohlenwasserstoffen, insbesondere Toluol extrahiert. Die Extrakte enthalten einen größeren Wasserstoffanteil als die Ausgangssubstanz [29,30]. Aufbauend auf dem NCB-Prozeß, wurden auch Verfahren für Teersände, Braunkohlen und Ölschiefer entwickelt.

Kohlendioxid und die Kohlenwasserstoffe sind unpolare Substanzen. Für die Extraktion von polaren Substanzen sind aber polare Lösungsmittel notwendig. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von reinen polaren Substanzen wie z.B. Wasser, Alkohole oder von Ammoniak. Die kritischen Temperaturen von Wasser und den Alkohole liegen so hoch, daß bei vielen Substanzen eine Extraktion bei überkritischen Bedingungen nicht mehr ohne Zersetzungen möglich ist (Wasser: 374,35 °C, Methanol: 240,45 °C, Ethanol: 243,35 °C, Isopropanol: 235,25 °C). Ein Ausweg ist die Verwendung dieser Substanzen in Mischung mit Kohlendioxid, wo sie dann als Entrainer bezeichnet werden [29,31].

Die kritische Temperatur von Ammoniak liegt deutlich niedriger als die von Wasser oder von Alkoholen ($T_c = 132,45$ °C, $P_c = 112,8$ bar) [32]. Untersuchungen von Giddings et al. zeigen, daß bei einer Temperatur von 140 °C und einem Druck von 200 bar schon viele, insbesondere polare Substanzen durch Ammoniak transportierbar sind [33].

Ginsenoside sind in polaren Lösungsmitteln löslich, so daß Ginsengextrakte üblicherweise durch Extraktion mit Alkohol oder Wasser gewonnen werden können. Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, daß sie unspezifisch sind, also auch viele andere Stoffe mitlösen, und daß dem Extrakt oft ein Teil des Lösungsmittels in einem zusätzlichen Verfahrensschritt entzogen werden muß.

Nach Versuchen von Kim und Lentz [34] kann das unpolare Kohlendioxid die Ginsenoside von trockenen und auch von feuchten Ginsengpflanzenteilen praktisch nicht lösen. Jedoch kann Ammoniak eingesetzt werden, da die Ginsenoside durch Ammoniak nicht angegriffen werden, wie die Analyse der gewonnenen Extrakte zeigt. Die Stabilität gegen Ammoniak war nicht selbstverständlich, da Ammoniak die Inhaltsstoffe des Hopfens durch Reaktion zerstört oder des Kaffees durch Amidbildung verändert. Ammoniak liefert Extrakte, die einen höheren Ginsenosidanteil haben als Präparate, die mit Wasser oder Alkohol gewonnen wurden.

1.3 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten Extraktionen, Fraktionierung und Reaktion von Ginsenosiden in verschiedenen Lösungsmitteln, besonders in flüssigem Ammoniak, untersucht werden. Insbesondere sollte geprüft werden, ob bei den Ginsenosid-Extraktionen die Reaktivität des Ammoniaks nicht schädlich, sondern sogar von Nutzen sein könnte. Die Ginsengwurzel enthält nämlich neben den bekannten neutralen Ginsenosiden auch einige saure Ginsenoside, die während der Extraktion mit Ammoniak neutralisiert werden könnten.

Hierzu würden einige Ginsenoside nicht nur extrahiert, sondern gleichzeitig auch zu den entsprechenden neutralen Ginsenosiden umgesetzt werden, wodurch die Ausbeute dieser neutralen Ginsenoside erhöht würde. Dieses Verfahren setzt jedoch die Stabilität der neutralen Ginsenoside gegenüber alkalischen Lösungen voraus, wozu ebenfalls Untersuchungen notwendig sind.

Die Ginsenoside sollten durch die HPLC identifiziert und quantitativ bestimmt werden. Das HPLC-Analysenverfahren sollte hierfür optimiert werden. Zur sicheren Identifizierung der Ginsenoside in den Extrakten sollte außer der HPLC-Trennung mit UV-Detektion auch die HPLC in Verbindung mit der Massenspektrometrie (MS) eingesetzt bzw. die Extrakte massenspektrometrisch untersucht werden.

Die Selektivität der Extraktionsmittel bezüglich der Ginsenoside und auch deren verschiedene Lösungsgeschwindigkeit sollten untersucht und für eine mögliche Fraktionierung ausgenutzt werden. Im Zusammenhang mit einer effektiven Extraktion der Ginsenoside aus den Ginsengwurzeln ist zu prüfen, ob durch eine gezielte Extraktion oder nacheinander geschaltete Extraktionen eine teilweise Vortrennung bzw. Fraktionierung einzelner Ginsenoside oder Ginsenosidgruppen (z.B. Panaxadiole, Panaxatriole) erreicht werden kann.

Hierzu sollten Untersuchungen zur Abhängigkeit der Extraktzusammensetzung von der Extraktionszeit und vom Extraktionsmittel vorgenommen werden. Weitere Versuche zur Fraktionierung der Ginsenoside sollten durch zweifache Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln und unterschiedlichen Extraktionszeiten durchgeführt werden.

In Anlehnung an die Reversed-phase-Trennung der Ginsenoside zu deren Bestimmung mit Hilfe des Analysenverfahrens wäre eine solche Trennung durch Reversed-phase-Material mit einer einfachen Glassäule und einem geeigneten Eluenten zu versuchen.

2 Analytische Grundlagen und Analysenverfahren

2.1 Chromatographie

Unter dem Begriff Chromatographie werden physikalisch-chemische Trennmethode zusammengefaßt, bei denen Stofftrennungen auf unterschiedlichen Verteilungen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase beruhen, wobei ein Stoffaustausch zwischen beiden Phasen stattfindet. Nach dem Aggregatzustand der mobilen Phase unterscheidet man die Gas-Chromatographie von der Flüssigkeits-Chromatographie. Als wichtigste Trennmechanismen sind Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch und Molekülausschluß zu nennen. Flüssigkeitschromatographische Trennungen lassen sich sowohl in Säulen als auch auf Schichten durchführen.

In einem chromatographischen System aus stationärer und mobiler Phase sowie aus den Molekülen der zu trennenden Stoffe wird in der kinetischen Betrachtungsweise das Verhalten einzelner Moleküle, d.h. die Wanderung in Richtung der mobilen Phase und des Überganges zwischen mobiler und stationärer Phase betrachtet. Diese Theorie führt zu folgenden grundsätzlichen Aussagen und Definitionen: Verschiedene Stoffe durchwandern eine vorgegebene Trennstrecke mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Der eigentliche Stofftransport erfolgt jedoch mit einer konstanten Geschwindigkeit, nämlich jener der mobilen Phase. Die einzelnen Stoffe haben unterschiedliche Retentionszeiten in der stationären Phase (aufgrund von Adsorptions- und Verteilungsschritten).

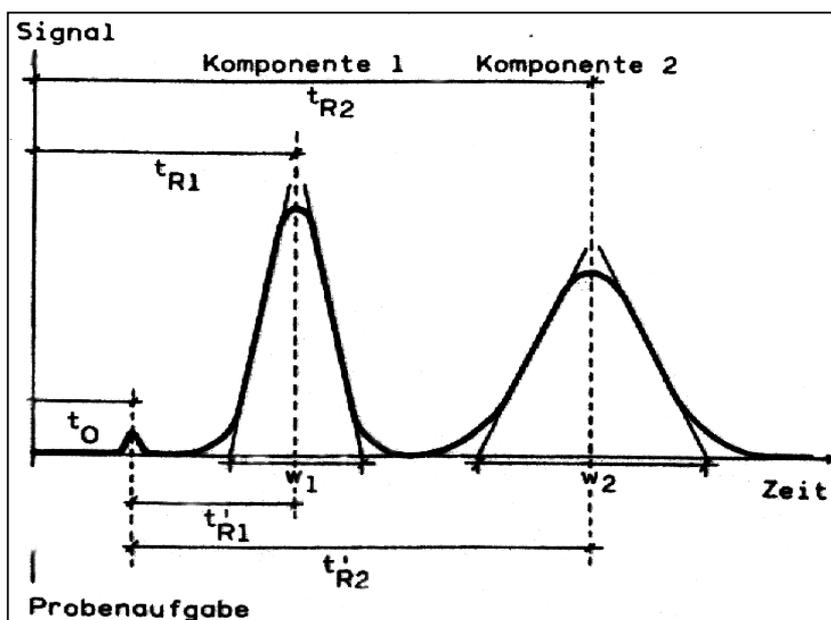


Abb. 2.1 Das Chromatogramm und seine Kenngrößen

Die beobachtete Gesamtretentionszeit t_R setzt sich daher additiv aus der Retentionszeit in der stationären Phase t'_R und der Durchflußzeit t_0 zusammen. Bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit der mobilen Phase lassen sich die Angaben auch in Form von Retentionsvolumina machen.

Die eluierten Substanzen werden von der mobilen Phase in den Detektor transportiert und vom Schreiber im Idealfall als Gaußkurve registriert. Die Signale nennt man Peaks, ihre Gesamtheit Chromatogramm. Abb. 2.1 gibt einen Überblick über die Kenngrößen eines Chromatogrammes.

w: Basisbreite eines Peaks

t_0 : Totzeit der Trennsäule; die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern. Die lineare Geschwindigkeit u des Lösungsmittels berechnet sich demnach zu

$$u = L / t_0$$

mit L : Länge der Trennsäule.

Eine nicht retardierte Substanz, d.h. ein Stoff, der von der stationären Phase nicht festgehalten wird, erscheint nach t_0 am Säulenende.

t_R : Retentionszeit; die Zeit, welche vom Einspritzen eines Stoffes bis zur Registrierung seines Peakmaximums verstreicht. Zwei verschiedene Stoffe werden dann getrennt, wenn ihre Retentionszeiten verschieden sind.

t'_R : Netto-Retentionszeit.

Wie man aus der Zeichnung sieht, ist $t_R = t_0 + t'_R$

Die Retentionszeit ist natürlich von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und der Länge der Trennsäule abhängig. Strömt die mobile Phase langsam oder ist die Säule lang, so ist t_0 groß und damit auch t_R . Deshalb ist t_R für die Charakterisierung einer Substanz nicht gut geeignet. Günstiger ist der Kapazitätsfaktor, auch k' -Wert genannt:

$$k' = t'_R / t_0 = (t_R - t_0) / t_0$$

Die Leistungsfähigkeit eines chromatographischen Systems wird von der Bandenverbreiterung, als Differenz zwischen dem Probenaufgabevolumen und dem Elutionsvolumen, überwiegend durch Diffusionseffekte bestimmt. Über diese Effekte macht die kinetische Theorie keine näheren, d.h. keine quantitativen Aussagen. Die Verteilung der Moleküle am Ende einer

Trennstrecke entspricht im Idealfall einer Gauß-Kurve, der Kapazitätsfaktor k' wird durch das Maximum festgelegt. Je schmaler die Elutionsbanden, d.h. je geringer die Standardabweichung vom Mittelwert ausfällt, desto mehr Stoffe können im gleichen Zeitraum voneinander getrennt werden. Ein quantitatives Maß für die Leistungsfähigkeit einer chromatographischen Säule stellt die Zahl der theoretischen Trennstufen N dar bzw. die Höhe einer theoretischen Trennstufe H , die sich hier auf die Gesamtretentionszeit t_R beziehen. Ist jedoch die Gesamtretentionszeit eines Stoffes gleich der Durchflußzeit t_0 , so wird aufgrund der sehr schmalen Elutionsbande, die keine Nettoretention aufweist, eine sehr hohe Trennstufenzahl berechnet. Die Trennstufenzahl ist damit von der Retentionszeit abhängig und kein Maß für die Trennleistung der Säule. Daher wird mit Nettoretentionszeiten gerechnet, wodurch effektive Trennstufenzahlen erhalten werden. Eine höhere Trennstufenzahl kann durch die Verlängerung der Trennstrecke erreicht werden.

Trennstufenzahl (N)

$$N = 16 (t_R / w)^2 = 5,54 (t_R / w_{1/2})^2$$

Mit der Länge der Trennsäule L läßt sich die Trennstufen- oder Bodenhöhe H berechnen:

Trennstufenhöhe (H)

$$H = L / N$$

Zur Beurteilung und quantitativen Beschreibung einer Trennung von zwei aufeinanderfolgenden Banden wird als Maß für die Selektivität eines Trennsystems die relative Retention α angegeben. Liegt im chromatographischen System ein Gleichgewicht vor, so stellt die relative Retention eine thermodynamische Größe dar. Sie ist bei konstanter Temperatur nur von den Eigenschaften der Stoffe und denen der stationären Phase abhängig. Die Vollständigkeit einer Trennung hängt jedoch außer von der relativen Retention auch von der Bandenbreite ab, weshalb die Auflösung R als Quotient aus dem Abstand der beiden Bandenmaxima und dem arithmetischen Mittel der Bandenbreiten definiert ist.

Auflösung (R)

$$R = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \right) = 1.198 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}} \right)$$

$w_{1/2}$: Peakbreite auf halber Höhe des Peaks, $t_{R2, R1}$: Retentionszeiten von zwei Komponenten

Bei einer Auflösung von 1 sind die Peaks nicht vollständig voneinander getrennt, doch erkennt man in jedem Fall zwei Komponenten. Die Wendetangenten berühren einander gerade und die Peakflächen überlappen sich nur 2 %. Eine Auflösung von 1,25 ist auch für die quantitative Analyse mit Integrator ausreichend. Größere Auflösungen als 1,5 sind gar nicht erwünscht, weil die Analysenzeit verlängert wird, ohne irgend einen Gewinn an Information zu bringen.

2.2 Grundlagen der HPLC

Der Vorteil der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) liegt in ihrer Leistungsfähigkeit, das heißt, sie liefert gute Trennungen in kurzer Zeit. Für eine wirksame Chromatographie in flüssiger Phase sind sehr kleine Teilchen für die stationäre Phase und dementsprechend hoher Druck zum Durchpressen der mobilen Phase notwendig. Als stationäre Phase dient ein relativ polares Material mit hoher spezifischer Oberfläche, meistens Silicagel, aber auch Aluminiumoxid oder Magnesiumoxid. Die mobile Phase ist relativ apolar. Die Trennung erfolgt durch unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Molekülsorten im Gemisch an der stationären Phase. Ein apolares Lösungsmittel eluiert langsamer als ein stärker polares.

Für die Reversed-phase-HPLC-Methode gilt das Umgekehrte des oben Beschriebenen: Das Trägermaterial ist sehr apolar, die mobile Phase ist relativ polar. Hierbei eluiert also ein polares Lösungsmittel (z.B. Wasser) langsamer als ein weniger polares (z.B. Acetonitril). Um eine zusätzliche Zonenverbreiterung außerhalb der Trennsäule durch Diffusionseffekte zu vermeiden, müssen die sogenannten Totvolumina im Einspritzsystem und in der Verbindung zwischen Säule und Detektor gering gehalten werden. Man verwendet daher Kapillarverbindungen und Durchflußzellen mit 8-16 µl Volumen. Vor allem bei geringen Retentionsvolumina machen sich diese Effekte durch Totvolumina relativ stark bemerkbar.

Pumpen für die HPLC müssen für eine konstante und pulsationsfreie Strömung sorgen, da das Lösungsmittelvolumen gemessen wird und bei Pulsation Drift und Rauschen des Detektors und Veränderungen in der stationären Phase auftreten können.

Zur Probenaufgabe lassen sich zwei verschiedene System einsetzen. Wie in der Gaschromatographie kann einmal die Probe mit einer Spritze direkt in den Strom der mobilen Phase gegeben werden, oder man verwendet eine Probenschleife, von der aus in einem zweiten Schritt die Probe in die Säule gespült wird. Bei diesem System wird die Probe drucklos in eine Speicherschleife gegeben, die Volumina zwischen 1- 200 µl besitzen kann, und dann durch Umschalten des Lösungsmittelstromes nach dem Prinzip eines Mehrweghahnes in die Trennsäule gespült.

Die Trägermaterialien für die HPLC müssen druckstabil sein. Diese Forderung erfüllen poröse Materialien wie Kieselgel oder Aluminiumoxid. Diese können vollkommen poröse Teilchen und solche mit einer porösen Schicht und einem Kern aus Glas sein.

Zur Detektion wird in den meisten Fällen die mobile Phase direkt nach dem Verlassen der Säule durch den Detektor geführt, wo die eluierten Substanzen mit Hilfe unterschiedlicher Meßprinzipien erfaßt werden können.

2.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Trennung und Messung von Massen, die für allgemeine analytische Zwecke eingesetzt wird. Da die massenabhängigen Eigenschaften neutraler Moleküle nicht rasch und selektiv genug wirksam sind, um eine analytische Methode darauf aufzubauen, werden Massentrennung und Massenmessung an Ionen durchgeführt. Das massebedingte Verhalten von Ionen ist leicht durch elektrische und magnetische Felder beeinflussbar und kann in einer Weise gelenkt werden, daß eine auch für analytische Zwecke ausreichend rasche und präzise Massentrennung resultiert. Was zur Aufnahme eines Massenspektrums nötig ist, sind technisch adäquate Einrichtungen, die folgende Aufgaben erfüllen sollen:

- Zuführung der Proben in geeigneter Form und Menge,
- Erzeugung von Ionen,
- Auftrennung der Ionen nach ihrer Masse,
- Registrierung und Präsentation der Daten in einer Form, die zur Bestimmung der Masse und Häufigkeit der Ionen geeignet ist.

Die Probenzuführung ist für die Methode insofern ein entscheidender Faktor, als sie einen der wichtigsten limitierenden Faktoren für die Anwendbarkeit darstellt und als die Art der Zuführung charakteristische Eigenheiten zur Folge hat. Beim heutigen Stand der Technik müssen die Proben für organisch-analytische Zwecke in Dampfform überführt werden, um analysierbar zu sein. Verbindungen, die nicht einen minimalen Dampfdruck von etwa 10^{-6} Torr liefern, sind einer direkten massenspektrometrischen Analyse nicht zugänglich. Von Verbindungen, die einen solchen minimalen Dampfdruck nur unter Zersetzung liefern, erhält man die Spektren der Thermolyseprodukte. Solche Produkte können zwar auch wichtige Strukturinformationen enthalten, aber sind natürlich nur sekundärer Natur.

Zur Erzeugung der für die Massentrennung notwendigen Ionen stehen eine ganze Reihe von Verfahren zur Verfügung, die alle auch technisch realisiert worden sind. Zu den wichtigen Methoden zählen:

Ionisation durch energiereiche Strahlen oder Partikel (Elektronen, Photonen), starke elektrische Felder (Feldemissionsquellen), elektrische Entladungen (Funkenquellen, Glimmentladungen), Hitze (Thermoquellen, LASER), Wechselwirkung mit Ionen (Chemische Ionisation).

Praktisch hat sich herausgestellt, daß für analytische Zwecke in der organischen Chemie eine gängige Methode zur Ionenerzeugung die Elektronenstoßionisation ist.

Für die Trennung der gebildeten Ionen nach ihrer Masse und Ladung gibt es eine Reihe verschiedener Möglichkeiten. Allen ist gemeinsam, daß sie die massenabhängigen Eigenschaften von Ionen als bewegte Ladungsträger zur Grundlage haben. Die erste Stufe der Massentrennung ist demzufolge immer eine Beschleunigung der Ionen durch elektrische Felder, wobei die elektrostatische Energie in kinetische Energie der Ionen umgewandelt wird.

$$e \cdot U = \frac{1}{2} m v^2$$

e = Ladung, U = Beschleunigungsspannung, m = Masse, v = Geschwindigkeit

2.4 Kalibrierung und statistische Kenndaten von Analysenverfahren

2.4.1 Kalibrierung

Die Kalibrierkurve liefert den mathematischen Zusammenhang zwischen dem Meßsignal und der untersuchten Konzentration bzw. Substanzmenge und wird mit Hilfe von Standards bekannter Konzentration ermittelt. Der Konzentrationsbereich der Standards muß dem Untersuchungsproblem angepaßt sein, ist aber bei geringen Konzentrationen durch die Bestimmungsgrenze und bei hohen Konzentrationen durch verfahrenstechnische, apparative und chemische Gegebenheiten begrenzt. Eine solche Kalibrierung wird mit im Labor angesetzten Lösungen durchgeführt. Diese Eichung wird σ - Eichung genannt.

Die Kalibriergerade, festgelegt durch die einzelnen Meßwerte, wird nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet. Dabei benötigen ungewichtete lineare Kalibrierkurven den analytisch und mathematisch geringsten Aufwand. Die Geradengleichung $y = m \cdot x + b$ liefert den Zusammenhang zwischen dem Meßwert y und der Probenkonzentration x .

2.4.2 Wiederfindung

Die Auswirkungen einer unbekanntem Matrix auf das gesamte Analysenverfahren kann durch die Bestimmung der Wiederfindung charakterisiert werden. Dabei wird der Urprobe vor dem ersten Probenaufbereitungsschritt eine bekannte Menge der zu bestimmenden Substanz zugesetzt.

Bei der klassischen Wiederfindung WFR wird betrachtet, ob eine zugesetzte Substanzmenge x_{zug} wiedergefunden wird. Der Zusatz soll nicht größer sein als die Konzentration in der Urprobe. Die Verdünnungen müssen so vorgenommen werden, daß die Produkte möglichst vollständig gelöst werden und die Konzentration der zu analysierenden Lösungen im Arbeitsbereich liegen.

Der wahrscheinlichste Gehalt x' der Urprobe wird aus der σ - Kalibrierfunktion bestimmt. Der Meßwert y' der Wiederfindungsprobe wird mittels der σ -Kalibrierfunktion in die insgesamt gefundene Konzentration x_{insg} umgerechnet. Von dem Gesamtgehalt x_{insg} subtrahiert man den wahrscheinlichsten Gehalt der Urprobe x' und erhält somit die wiedergefundene Konzentration des Zusatzes x_{gef} .

$$x_{\text{gef.}} = x_{\text{insg.}} - x'$$

x' : wahrscheinlichster Konzentrationsgehalt der Urprobe

$x_{\text{insg.}}$: Konzentration der Urprobe $x' + \text{Zusatz } x_{\text{gef.}}$.

Für die Wiederfindung WFR gilt:

$$\text{WFR} = x_{\text{gef.}} / x_{\text{zug.}} * 100\%$$

$x_{\text{zug.}}$: vorgegebene Konzentration des Zusatzes

Im Idealfall ist die wiedergefundene Konzentration $x_{\text{gef.}}$ gleich der Konzentration des zugeetzten Standards $x_{\text{zug.}}$ und die Wiederfindung beträgt 100%.

Die durch die σ -Kalibrierung gefundene Kalibrierfunktion darf weiterhin für die jeweilige Probenmatrix verwendet werden, wenn die Wiederfindung gemäß Gleichung annähernd 100 % beträgt. Die Toleranzgrenze für abweichende Wiederfindungen bleibt dem Analytiker überlassen [35], wenn sichergestellt werden kann, daß das Ergebnis der Wiederfindung reproduzierbar ist.

2.5 Quantitative HPLC-Bestimmung der Hauptginsenoside in den Extrakten

2.5.1 Beschreibung der HPLC-Apparatur

Die schematische Darstellung der HPLC- Anlage ist in Abb.2.2 dargestellt.

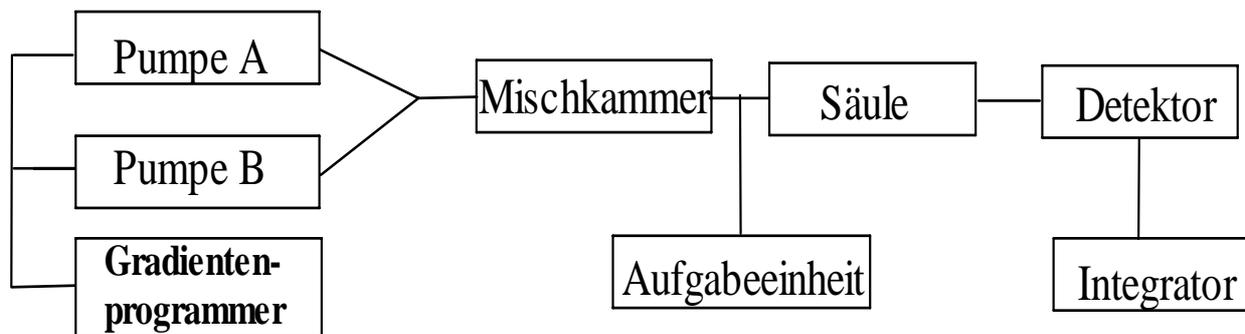


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der HPLC- Anlage

Das HPLC-Analysesystem bestand aus zwei Hochdruckpumpen (Knauer, Typ 64), einem Aufgabeeventil (Rheodyne, Typ 7010) mit 20µl Probenschleife, einer Steuereinheit (Knauer, HPLC Programmer 50), einer HPLC-Säule (Knauer, Eurospher-100 C₁₈, 5 µm, Länge 250 mm, innerer Durchmesser 4,6 mm), einem UV-Detektor (Knauer, K2500) und einem Integrator (Schimadzu, C-R1B). Eluentenzusammensetzung: Acetonitril-50 mM KH₂PO₄ (40:60;v/v). Geschwindigkeit des Eluentstroms: 1ml/min. Wellenlänge der UV-Detektion: 200 nm und 203 nm. Die HPLC-Analysen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Säule war gefüllt mit 5 µm großen Partikeln aus Silikagel, deren Oberfläche mit C₁₈-Ketten belegt war, so daß eine unpolare stationäre Phase („reversed phase“) vorlag. Auf dem Weg der zu analysierenden Substanzen durch die Säule findet ständig eine Verteilung dieser Substanzen zwischen mobiler und stationäre Phase statt. Die Trennwirkung beruht auf den unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der verschiedenen Substanzen zwischen der stationären und der mobilen Phase und den daraus resultierenden unterschiedlichen Retentionszeiten.

2.5.2 Probenaufbereitung

Die Produkte der Ammoniak-, Methanol/Wasser- und Wasser-Extraktion wurden 1 Tag lang im Exsikkator über Silicagel im Vakuum getrocknet und gewogen. Die getrockneten Extrakte der Ammoniak- (Extraktionszeit 35 min bzw. 4h), Methanol/Wasser- (15 min bzw. 4 h) und Wasser-Extraktion (45 min bzw. 4h) wurden mit bidestilliertem Wasser zu 50, 100, 25, 100, 5 bzw. 50 ml gelöst.

Da zur Bewertung der Extraktionen die Ginsenoside in den Extrakten qualitativ untersucht und quantifiziert werden mußten, bot sich die Trennung der Verbindungen mit Hilfe der HPLC und UV-Detektion an. Zur Erzielung einer effektiven chromatographischen Trennung der Ginsenoside war eine Vorreinigung der Extrakte notwendig, bei der störende Begleitstoffe von den Ginsenosiden abgetrennt werden mußten. Diese Vorreinigung der Extrakte erfolgte durch Festphasenextraktion (Solid Phase Extraktion, SPE) mit kleinen Adsorptionssäulen, die modifiziertes Kieselgel (unpolare C₁₈-Phase) enthielten [36]. Soll eine C₁₈-Phase mit einer wässrigen Probenlösung behandelt werden, so muß dieses Sorbens zunächst mit geeigneten Lösungsmitteln benetzt werden. Die C₁₈-Säulen wurden deshalb mit 5 ml Methanol und danach mit 3 ml bidestilliertem Wasser aktiviert. Anschließend erfolgte die Aufgabe von 1ml der wässrigen Extraktlösung auf die vorbereitete Säule. Gewaschen wurde mit 10 ml bidestilliertem Wasser und 15 ml 30%igem Methanol. Die Elution der Ginsenoside wurde jeweils mit 5 ml Methanol vorgenommen. Diese Lösungen wurden im Rotationsverdampfer bei ca. 50°C / 30 mbar zur Trockene eingedampft. Das Produkt wurde mit 10 ml 40%igem Acetonitril gelöst und in die HPLC-Apparatur aufgegeben.

2.5.3 Durchführung der Chromatographie

Die Extrakte wurden mit soviel Wasser versetzt, bis sie sich vollständig lösten. Die Zusammensetzungen der Lösungen sind Tab.2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1 Übersicht der für die HPLC-Analyse benötigten Extraktlösungen

<i>Extraktionsmittel</i>	<i>Extraktionszeit[min]</i>	<i>Extrakt-Trockenmasse[g]aus 10g Wurzelpulver</i>	<i>Extrakt mit Wasser gelöst zu dem angegebenen Volumen [ml]</i>	<i>Extraktanteil[%] der wäßrigen Lösung</i>
Ammoniak(bei 60°C)	35	0,78	50	1,56
Ammoniak(bei 60°C)	240	1,62	100	1,62
60% Methanol	15	0,31	25	1,24
60% Methanol	240	1,32	100	1,32
Wasser	45	0,08	5	1,60
Wasser	240	0,51	50	1,02

Zur Injektion in das HPLC-System wurden Proben der aufbereiteten getrockneten Extrakte in 5- 10 ml Laufmittel gelöst. Das Volumen ist bei jedem Chromatogramm angegeben. Das Laufmittel wurde jeden Tag frisch angesetzt. Acetonitril wurde im Ultraschallbad 20 Minuten entgast, während die Entgasung von Wasser 10 Minuten lang im Vakuum stattgefunden hat. Das injizierte Probenvolumen war durch eine 20 µl-Probenschleife vorgegeben. Zwischen den Injektionen mußte die Probenschleife mit Laufmittel gespült werden. Der Laufmittelfluß war 1ml/min. Der minimale Betriebsdruck betrug 2 Mpa, der maximale Betriebsdruck 40 Mpa. Bei frisch eingesetztem Filter am Eingang der Trennsäule betrug der Druck etwa 14-16 Mpa. Nach ca. 30 Chromatogrammen stieg er bis zu 20 MPa, worauf dieser Filter erneuert werden mußte.

Am Spektralphotometer wurden die Wellenlänge von 203 nm oder 200 nm und die Empfindlichkeit eingestellt, die jeweils im Chromatogramm angegeben ist. Das maximale Eingangssignal am Integrator betrug 16 mV und der Papiervorschub war 4 mm/min.

2.6 Beschreibung der HPLC/MS-Apparatur

Das mit einem Massenspektrometer gekoppelte HPLC-System besteht aus zwei Hochdruckpumpen (Knauer, Maxi-Star K 1000) , einem dynamischen Mischer (Knauer), einem Splitter Accurate (LC Packings, Niederlande), einem Injektionsventil (Valco C4, 50 nl), einer HPLC-Säule (Grom-Sil 120 ODS-3 CP, 5 μ m, 150 * 0,1 mm, der Fa.Grom Analytik+HPLC GmbH, Herrenberg).

Eluentenzusammensetzung ; A: H₂O/Acetonitril (80:20;v/v) B: Acetonitril/H₂O (80:20;v/v)

Zeitlicher Verlauf der Laufmittelzusammensetzung (Gradient):

0 min, 100 % A; 20 min, 80% A; 50 min, 0 % A

Alle Messungen zur Identifizierung der Ginsenoside wurden am MAT 90 Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen), einem doppelt fokussierenden Sektorfeldgerät mit umgekehrter Nier-Johnson-Geometrie durchführt, welches mit einer Elektrospray-Quelle ESI II (Finnigan MAT, Bremen) ausgestattet war (Abbildung 2.3).

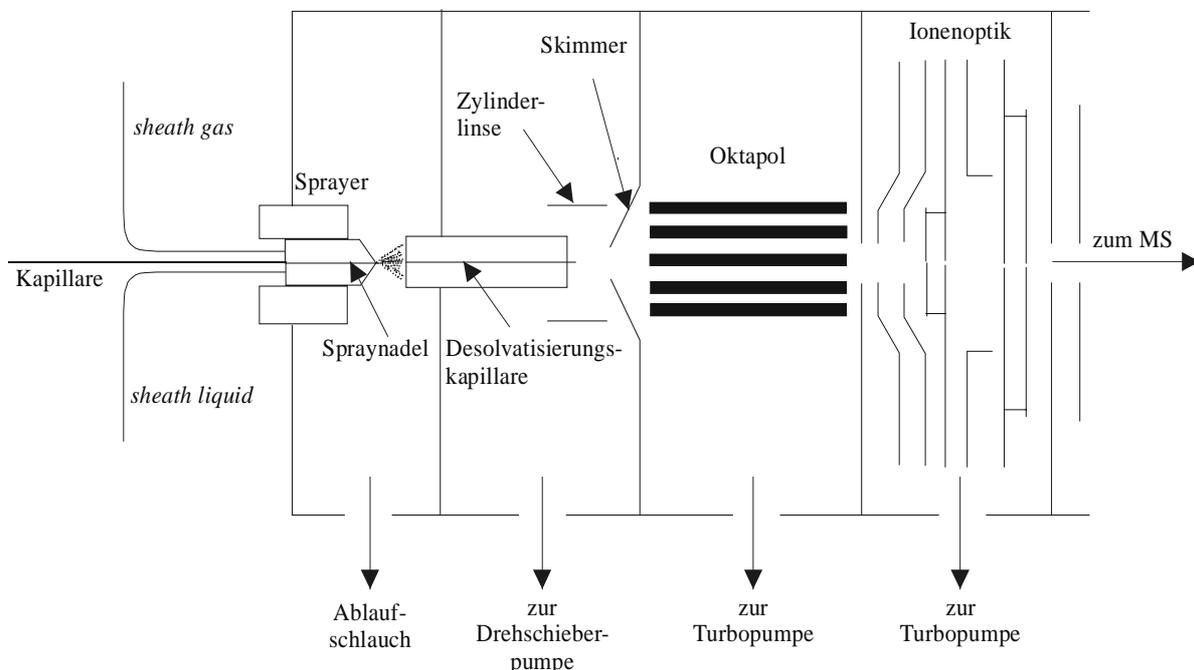


Abb. 2.3 Schema des verwendeten Elektrospray-Interfaces am MAT 90

Probenherstellung: Es wurden die Ammoniak-, 60% Methanol- und Wasser-Extrakte (jeweils 240 min) jeweils zu 100 ml in bidestilliertem Wasser gelöst. Danach wurde je 1ml Lösung mit Hilfe der Festphasenextraktion (vgl. Kapitel 2.5.2) gereinigt. Die gereinigten Produkte lagen jeweils in 5 ml reinem Methanol vor.

Die Probe gelangte über eine 50 μm i.d. Kapillare in den Sprayer, in dem das Sheath gas und der sheath liquid koaxial zu dieser geführt wurde. Ein Teil der unter Atmosphärendruck gebildeten kleinen geladenen Tröpfchen drang in die Desolvatisierungskapillare ein, die eine Temperatur von 250 °C besaß. Beim Austritt aus der Kapillare kam es aufgrund der Ablenkung durch die Zylinderlinse zu Kollisionen zwischen den Restgasmolekülen und den noch vorhandenen Lösungsmittelclustern, wodurch bis zum Eintritt in die Ionenoptik die freien Ionen gebildet wurden. Der Oktapol diente hier nur zur Verbesserung der Ionen­transmission und nicht als Massenfilter.

Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte an einer DEC 3000 Alpha-Workstation mit der Betriebssoftware DEC OSF/1 Version 2.0 (DEC: Digital Equipment Corporation, USA) und ICIS Version 9.321 (Finnigan MAT) als massenspektrometrische Software.

Die gesamten massenspektrometrischen Analysen wurden im profile Modus aufgenommen. Die massenspektrometrischen Untersuchungen der mit einer Flußrate von 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ infundierten Proben erfolgten im scan Modus (Aufnahme eines großen Massenbereichs), wobei das magnetische Sektorfeld exponentiell mit der Zeit geändert wurde. Zur Verbesserung der Sprayeigenschaften wurde ein sheath flow von 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ Isopropanol- H₂O (5:1;v/v) eingesetzt. Die Elektrosprayspannung betrug 3.8 kV.

3 Materialien, Extraktionsapparaturen und Extraktionsverfahren

3.1 Materialien

Die extrahierten Ginsengwurzeln (Araliaceae, *Panax ginseng* C. A. Meyer) waren 5 Jahre alt, lufttrocken und stammten aus Korea, wo sie in Taegu 1998 gekauft worden waren. Die Wurzeln wurden mit ihrer natürlichen Restfeuchtigkeit gemahlen. Die Restfeuchtigkeit des Wurzelpulvers wurde nach zweitägigem Trocknen im Exsikkator über Silicagel im Vakuum zu 3,0 Gew.% bestimmt. Der Korndurchmesser des Wurzelpulvers lag zwischen 0,063 und 0,63 mm (Siebanalyse mit „Analysette“, Typ 03.502 der Fa. Fritsch; Prüfsiebe Fa. Retsch, DIN 4188, Weiten: 0,03–1,25 mm). Das benutzte Wasser war bidestilliert und hatte eine Leitfähigkeit von 1,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Der Reinheitsgrad des Methanols (Fa. J.T. Baker) war zur Analyse. Das Ammoniak (Fa. Messer-Griesheim) hatte eine Reinheit >99,8 %. Der Reinheitsgrad des Kaliumhydroxid und des Natriumhydroxid (jeweils Fa. Riedel- deHaën) war zur Analyse. Ammoniaklösung 26% (Fa. Riedel- deHaën) war zur Analyse. Die Extraktionshülsen für die Ammoniak- und Soxhlet-Extraktionen (Fa. Schleicher & Schuell Nr.603) hatten einen Durchmesser von 22 mm und waren 80 mm hoch. Zur Filtration der Extraktlösungen dienten Papierfilter der Fa. Schleicher & Schuell Nr.595, Durchmesser 185 mm. Zur Probenvorbereitung wurden Säulen „3ml Solid Phase Extraktion Columns Bakerbond spe C₁₈“ der Fa. J.T. Baker verwendet. Die Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rg₁ und Rf sind käuflich (Fa. Roth). Der Reinheitsgrad des Kaliumdihydrogenphosphats (Fa. Merck) war zur Analyse. Die Reinheit des Acetonitrils (Fa. Promochem) war angegeben mit „Gradient Grade“.

3.2 Extraktionsapparatur für Ammoniak

Für die Extraktion mit flüssigem Ammoniak bei 334 K wurde eine Apparatur benutzt, mit der analog dem Soxhlet-Verfahren extrahiert werden kann. Im Gegensatz zum Soxhletaufsatz wurde keine Dampfleitung benötigt, da der Glaseinsatz in einem Autoklaven stand. Die Anlage ist in Abb.3.1 dargestellt. Der Autoklav bestand aus nichtrostendem Stahl mit einer besonderen Beständigkeit gegenüber chemisch angreifenden Stoffen (DIN 17440, deutsche Werkstoff-Nr. 1.4571) und besaß einen Außendurchmesser von 80 mm, eine Wandstärke von 8,5 mm und eine Länge von 430 mm. Am oberen Schraubverschluß des Autoklaven war eine Zuleitung mit Ventil zur Be- und Entladung mit Extraktionsmittel, ein Anschluß zum Manometer und ein Kühlfinger eingeschweißt. Die 25 mm dicken Schraubverschlüsse am oberen und unteren Ende des Autoklaven waren mit O-Ringen (63x2 mm) abgedichtet. Die maximale Betriebstemperatur des Autoklaven hängt von der Beständigkeit dieses Dichtungsmaterials ab. Die O-Ringe aus Perbunan können bis zu etwa 373 K erhitzt werden.

Im oberen Schraubverschluß des Autoklaven ist ein Fenster eingebaut. Es besteht aus synthetischem Saphir (Dicke 15 mm, Durchmesser 30 mm), gedichtet mit einem O-Ring (28 x 2 mm). Durch das Fenster können die vom Kühlfinger fallenden Tropfen kondensierten Lösungsmittels und der Siphon des Glasaufsatzes mit einer Lampe beobachtet werden.

Im Autoklaven steht der Einsatz, bestehend aus einem Glaszylinder als Vorlage (Höhe 90 mm, Durchmesser 54 mm) und einem Aufsatz (Höhe bis zum Siphon 100 mm, Durchmesser 45 mm) mit Siphon und eingesetzter Extraktionshülse.

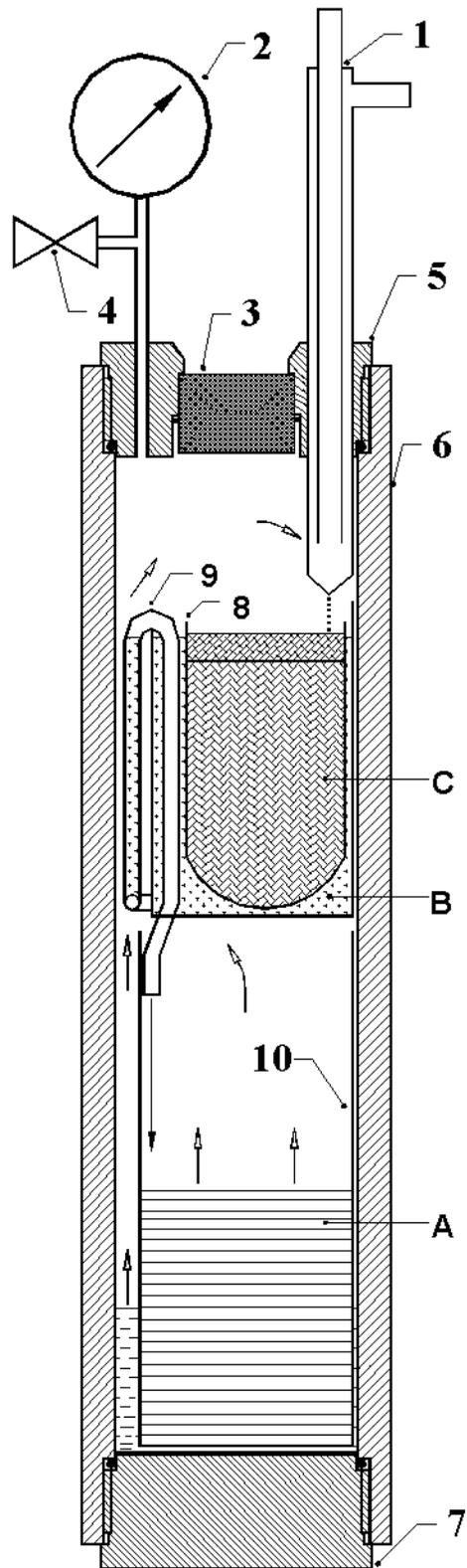


Abb. 3.1 Schematische Abbildung der Extraktions-Hochdruckapparatur

1: Kühler, 2: Manometer, 3: Fenster, 4: Ventil, 5: Deckelflansch,
 6: Zylinder, 7: Bodenflansch, 8: Extraktionshülse, 9: Siphon, 10: Auffanggefäß
 A: Produkt, B: Extraktlösung, C: Extraktionsgut

3.3 Benutzte Extraktionsverfahren

3.3.1 Extraktion mit flüssigem Ammoniak bei 60 °C in einer Hochdruckapparatur

Zur Extraktion der Ginsenoside wurden 10 g Ginsengwurzelpulver als Vorlage in den 160 ml-Glaseinsatz mit Siphon des Autoklaven eingewogen. 120 g Ammoniak wurden über die Zuleitung mit Ventil in den Autoklaven eingefüllt. Nach dem Einwiegen wurde das Ventil verschlossen, das System von der Druckflasche abgeschraubt und durch ein Heizbad auf 334 K erwärmt. Es stellte sich dabei ein Druck von 20 bar ein. Durch das Beobachtungsfenster war ermittelt worden, daß nach 4 Stunden Extraktion der Glasaufsatz über den Siphon 8 mal entleert worden war. Nach der Extraktion wurde der Überdruck im Autoklaven durch Öffnen des Ventils abgelassen und der Extrakt entnommen.

3.3.2 Extraktion mit Lösungsmitteln in der Soxhletapparatur bei Normaldruck

Bei der Extraktion mit Methanol/Wasser (60:40; v/v) wird eine Soxhletapparatur verwendet mit 250 ml Rundkolben als Vorlage, einem 30 ml Soxhletaufsatz mit passender Filterhülse und einem Rückflußkühler. Zur Durchführung der Extraktion werden 10 g Ginsengpulver in die Filterhülse eingewogen und 150 ml Lösungsmittel in den Rundkolben gegeben. Bei der Extraktion mit 60%igem Methanol wird der Aufsatz innerhalb von 4 Stunden 24 mal periodisch entleert. Das etherische Öl Panacen gibt der Extraktlösung eine Gelbfärbung. Diese Verbindung ist unpolarer und damit schlechter löslich in der Methanollösung als die Ginsenoside. Man kann davon ausgehen, daß eine erschöpfende Extraktion erreicht ist, sobald die Lösung im Aufsatz klar bleibt.

Analog wird mit Wasser extrahiert. Dabei entleert sich der Aufsatz bis zur fehlenden Gelbfärbung 12 mal. Nach dem Abfiltrieren des Rückstandes wird das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft, der getrocknete Extrakt gewogen und bis zur Weiterverarbeitung verschlossen aufbewahrt.

3.3.3 Alkalische Methanol/Wasser-Extraktion in der Soxhletapparatur bei Normaldruck

Die Laugen werden dem Ginsengmaterial vor der Extraktion mit 60%igem Methanol zugesetzt. Bei der Extraktion mit Methanol wird eine Soxhletapparatur verwendet mit einem 250 ml Rundkolben als Vorlage, einem 30 ml Soxhletaufsatz mit passender Filterhülse und einem Rückflußkühler. Zur Durchführung werden 10 g Ginsengpulver in die Filterhülse eingewogen und mit jeweils 150 ml alkalischem 60%igem Methanol extrahiert. Das 60% ige Methanol enthielt folgende Konzentrationen an Alkalien: 0,01 M NaOH, 0,01 M KOH bzw. 2,6 % NH₃. Bei der Extraktion wird der Aufsatz innerhalb von 4 Stunden 24 mal periodisch entleert.

3.3.4 Umsetzung der Methanol/Wasser-Extrakte mit Natriumhydroxid- und Ammoniak-Lösung

Die 60% Methanol-Extrakte (240 min, 75° C) wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und mit wässriger 0,1 M NaOH-Lösung bis zur Endkonzentration 0,01 M versetzt. Diese Lösungen wurden 10 min, 2 h, 4 h bzw. 24 h auf 60 °C erhitzt.

In entsprechenden Versuchen wurden die gleichen Extrakte mit 1 M NaOH- bzw. 26%iger NH₃-Lösung bis zur Endkonzentration 0,1 M bzw. 6,5% versetzt und 10 min bzw. 4 h auf 60 °C erhitzt.

Bei allen Versuchen wurden die Anfangs- und End-pH-Werte gemessen.

3.4 Fraktionierung

3.4.1 Fraktionierung der Hauptginsenoside des 60 %-Methanolextraktes mit Hilfe einer Reversed-phase-Material-Säule

Eine Trennung der Hauptginsenoside am Beispiel einer Lösung des 60%- Methanol-Extraktes wurde mit einer Umkehrphasen-Säule unter Normaldruck versucht.

Die Säule aus Glas (Innendurchmesser 14 mm, Länge 300 mm) war mit einem Absperrhahn am unteren Ende versehen. Die Füllhöhe des reversed-phase-Materials in der Glassäule (C₁₈-Material gewonnen aus den Säulen „3 ml Solid Phase Extraktion Columns Bakerbond spe C₁₈“ der Fa. J.T. Baker, 40 µm Korndurchmesser) betrug 90 mm, entsprechend einer Füllmasse von 5,00 g.

Der getrocknete 60% Methanol-Extrakt aus 10 g Ginsengpulver wurde mit destilliertem Wasser zu 100 ml gelöst. Hiervon wurden 2 ml auf die Säule gegeben und danach langsam und ohne die Schicht zu verwirbeln 20 ml Methanol-Wasser(80:20;v/v). Die mobile Phase floß mit einer Geschwindigkeit von 19,0 mm/min durch die Säule. Es wurden nacheinander Fraktionen von jeweils 2 ml abgenommen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe der HPLC analysiert.

3.4.2 Fraktionierung durch kurzzeitige Extraktion mit einem ersten und folgender erschöpfender Extraktion mit einem zweiten Extraktionsmittel

10 g getrocknetes Ginsengpulver wurde mit 150 ml 60%igem Methanol 10 min lang bei Raumtemperatur behandelt und abfiltriert (Extraktion Nr.1). Nach dem Abfiltrieren des Rückstandes wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft, der trockene Extrakt gewogen und bis zur Weiterverarbeitung verschlossen aufbewahrt. Der feste Rückstand (extrahiertes Ginsengpulver) des 60% Methanol-Extraktes wurde mit NH₃ (120 min, 103 g) bei 30 °C extrahiert (Extraktion Nr.2). Nach der Extraktion wurde der Überdruck im Autoklaven durch Öffnen des Ventils abgelassen und der Extrakt entnommen.

Im Gegensatz zu der obigen Reihenfolge der Extraktionen wurden 10 g Ginsengpulver zuerst mit Ammoniak (10 min, 103 g) bei 30 °C extrahiert (Extraktion Nr.3). Danach wurde der feste Rückstand (extrahiertes Ginsengpulver) der Ammoniak-Extraktion mit 60 %igem Methanol (120 min, 150 ml) bei Raumtemperatur behandelt und abfiltriert (Extraktion Nr.4). Nach dem Abfiltrieren des Rückstandes wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft, der trockene Extrakt gewogen und bis zur Weiterverarbeitung verschlossen aufbewahrt.

Tab. 3.1 gibt einen Überblick über die Bedingungen der vier Extraktionen..

Tab. 3.1 Bedingungen der Extraktionen

Nr.	Zu extrahieren- des Material	Extraktions- mittel	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Druck [bar]
1	Ginsengpulver	60% Methanol	10	25	1
2	Rest von Nr.1	Ammoniak	120	30	10
3	Ginsengpulver	Ammoniak	10	30	10
4	Rest von Nr. 3	60 %Methanol	120	25	1

Die vier Extrakte wurden jeweils in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst und je 1 ml Lösung mit Hilfe der Festphasen-Extraktion gereinigt. Nach der Reinigung (vgl. Probenaufbereitung, Kapitel 2.5.2) wurden die Produkte in 40%igem Acetonitril gelöst und mit Hilfe der HPLC analysiert.

4. Ergebnisse und Diskussionen

4.1 Extraktausbeuten der verschiedenen Extraktionsverfahren

Es wurden getrocknete, gemahlene, koreanische Ginsengwurzeln (Araliaceae, *Panax ginseng* C.A. Meyer) mit flüssigem Ammoniak (20 bar, 334 K) extrahiert und die Extrakte mittels HPLC charakterisiert. Die Ammoniak-Extrakte wurden mit den Produkten einer 60 Vol-% Methanol-Extraktion (Siedepunkt 348 K) und einer Wasser-Extraktion (373 K) verglichen. Die getrockneten Extrakte aus den verschiedenen Verfahren waren Feststoffe. (Die experimentellen Bedingungen und Ausbeuten der Extraktionen sind in Tab. 4.3, s. 42, aufgeführt.)

Die Extraktausbeuten zeigen, daß die Ammoniak-Extraktion bei 334 K, 20 bar und 240 min mit 16,2 % die größte Ausbeute liefert. Die zweitgrößte Ausbeute von 13,2% wurde bei der 60% Methanol-Extraktion bei 348 K und 240 min festgestellt, gefolgt von der Ausbeute von 7,80 % der Ammoniak-Extraktion (35 min). Die geringste Ausbeute von 0,80 % liefert die Extraktion mit Wasser (45 min).

Die getrockneten Ammoniak-Extrakte sind gelbbraun gefärbt. Die trockenen Extrakte der 60% Methanol- und der Wasser-Extraktionen zeigen dagegen eine gelbe Farbe. Werden die trockenen Extrakte in bidestilliertem Wasser gelöst, so bilden sich aus den Ammoniak-Extrakten leicht getrübe Lösungen, während die 60% Methanol- und Wasser-Extrakte klare Lösungen ergeben. Offensichtlich enthalten die Ammoniak-Extrakte auch weniger polare Substanzen, die in Wasser nicht so gut löslich sind.

Eine weitere Charakterisierung der Extrakte wurde durch Geschmacks- und Geruchsproben vorgenommen. Die wässrigen Lösungen der Ammoniak-Extrakte waren weniger bitter und hatten einen stärkeren typischen Geruch nach Ginsengwurzel als die der 60% Methanol-Extrakte.

Die Extraktion von Wurzelpulver des weißen Ginsengs mit Wasser (240 min, 373 K) ergab eine Ausbeute von 5,10%. Schilke [37] ermittelte unter diesen Bedingungen nur 2,0% Ausbeute. Da keine Angaben zur Korngröße des extrahierten Materials gemacht wurden, muß angenommen werden, daß eine größere Körnung zur Extraktion verwendet wurde, die eine geringere Ausbeute zur Folge hatte. Der von Griesing [19] angegebenen Extraktionsausbeute der Wasser-Extraktion unter den genannten Bedingungen von 0,2% dürfte eine fehlerhafte

Berechnung zugrundeliegen, da die Ausbeuteangaben der Extraktionen mit 60% Methanol und Ammoniak (26 bar) mit den Angaben von Schilke [37] übereinstimmen. Offensichtlich wurden von Griesing und Schilke jeweils Extrakte, die unter gleichen Bedingungen gewonnen wurden, untersucht.

Wie hoch die Ausbeuten an Ginsenosiden in den Extrakten tatsächlich waren, konnte erst mit Hilfe der HPLC-Analyse bestimmt werden, da die Extrakte noch überwiegend andere Pflanzeninhaltsstoffe und im Fall der Ammoniak-Extraktionen auch Reaktionsprodukte enthielten. Die prozentualen Anteile der anderen Pflanzeninhaltsstoffe in den trockenen Extrakten sind im Anhang in Tab.7.2 aufgeführt.

4.2 Chromatographische Analyse der Hauptginsenoside

Je 1 mg der reinen gekauften Hauptginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁ (Vergleichssubstanzen oder Standards) wurde jeweils in 10 ml des chromatographischen Laufmittels (40 Vol.-% Acetonitril) gelöst. Auch die in bidestilliertem Wasser gelösten Extrakte wurden nach der Reinigung durch Festphasenextraktion (s. Kapitel 2.5.2) in 10 ml mobiler Phase gelöst. Diese Lösungen wurden chromatographiert und die Retentionszeiten t_R gemessen (Tab.4.1, Abb.4.1-4.7).

Tab. 4.1 Retentionszeiten t_R [min] der Hauptginsenoside aus Extrakten und Vergleichssubstanzen (Standards)

Extraktionsmittel Extraktionszeit Ginsenosid	Wasser 45 min	Wasser 240 min	Methanol 15 min	Methanol 240 min	NH ₃ 35 min	NH ₃ 240 min	Standard	Max. Δt _R [min]
Re	3,41	3,42	3,48	3,50	3,49	3,54	3,46	0,13
Rg ₁	3,80	3,80	3,81	3,81	3,86	3,90	3,88	0,10
Rf	10,52	10,51	10,55	10,53	10,58	10,61	10,59	0,10
Rb ₁	13,58	13,60	13,67	13,66	13,89	13,92	13,73	0,34
Rc	17,66	17,57	17,61	17,96	17,56	17,91	17,51	0,45
Rb ₂	21,63	21,03	21,12	21,06	21,36	21,24	21,27	0,60
Rd	33,21	33,91	34,13	34,00	33,98	34,24	33,96	1,13

Die Hauptginsenoside erscheinen im Chromatogramm bei t_R = 3,41- 34,24 min. Die Retentionszeiten der einzelnen Ginsenoside hängen in unterschiedlichem Maße von der Zusammensetzung des Laufmittels ab. Die Retentionszeiten von Re, Rg₁ und Rf differieren maximal von 0,10 min bis 0,13 min, die von Rb₁, Rc und Rb₂ von 0,34 min bis 0,60 min und Rd um 1,13 min. Der starke Einfluss der Laufmittelzusammensetzung auf die Retentionszeiten dürfte größer sein als eventuelle Matrixeffekte der verschiedenen Extrakte oder statistische Schwankungen.

Die Retentionszeiten der Ginsenoside hängen außer vom Grundgerüst auch von der Zahl der Zuckereinheiten und OH-Gruppen einer Glucosidkette ab. Sie ist um so kürzer, je polarer die Einzelmoleküle sind. Die Ginsenoside Re und Rg₁ enthalten ein Triolgrundgerüst und zwei Glucosidketten. Das Ginsenosid Rf besitzt ein Triolgrundgerüst und ein Glucosidkette. Alle drei Triol-Ginsenoside zeigen ein relativ polares Verhalten und deshalb kurze Retentionszeiten.

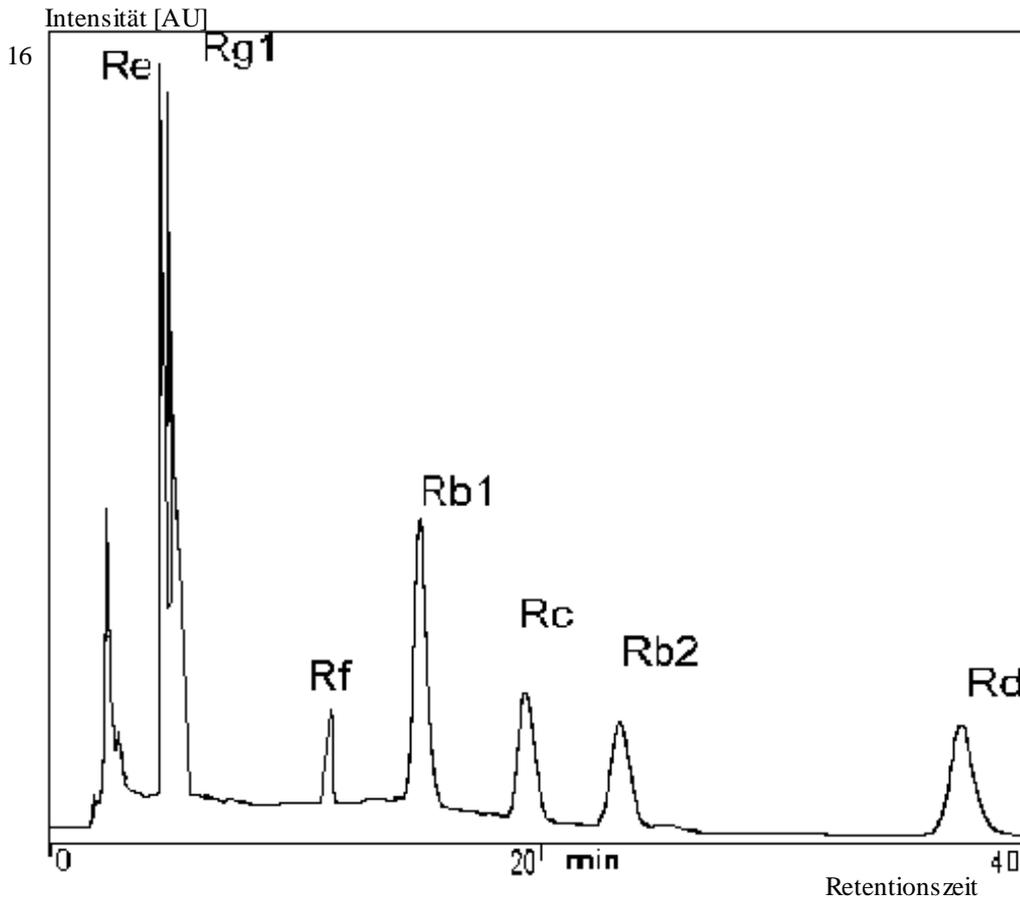


Abb. 4.1 Chromatogramm der reinen Ginsenoside (gekaufte Vergleichssubstanzen) in 10 ml 40%igem Acetonitril, Chromatographische Bedingungen s. Kap 2.5

Eine stärkere Retention an der unpolaren stationären Phase weisen die Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc und Rd auf, die ein Diolgrundgerüst enthalten, welches weniger polar ist.

In diesem Reversed-Phase-System mit wässrigem Laufmittel erscheinen die Ginsenoside nicht genau in umgekehrter Reihenfolge wie im Normalphasen-System der DC [37]. Sie wurden in der Reihenfolge Re, Rg₁, Rf, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd registriert (s. Tab.4.1).

Der unterschiedliche Ringschluß zur Arabinofuranose bei Rc und –pyranose bei Rb₂ führt zu einer deutliche Trennung der beiden Ginsenoside mit der gleichen Molekülmasse (Abb.4.1). Das Ginsenosid Re besitzt gegenüber Rg₁ einen zusätzlichen Rhamnose-Rest am Glucosid-Substituenten in 6-OH-Stellung. Jedoch war die Trennung nicht vollständig zu erreichen (s. Abb.4.1).

Im folgenden sind die Chromatogramme der verschiedenen Extrakte wiedergegeben (Abbn. 4.2 bis 4.7).

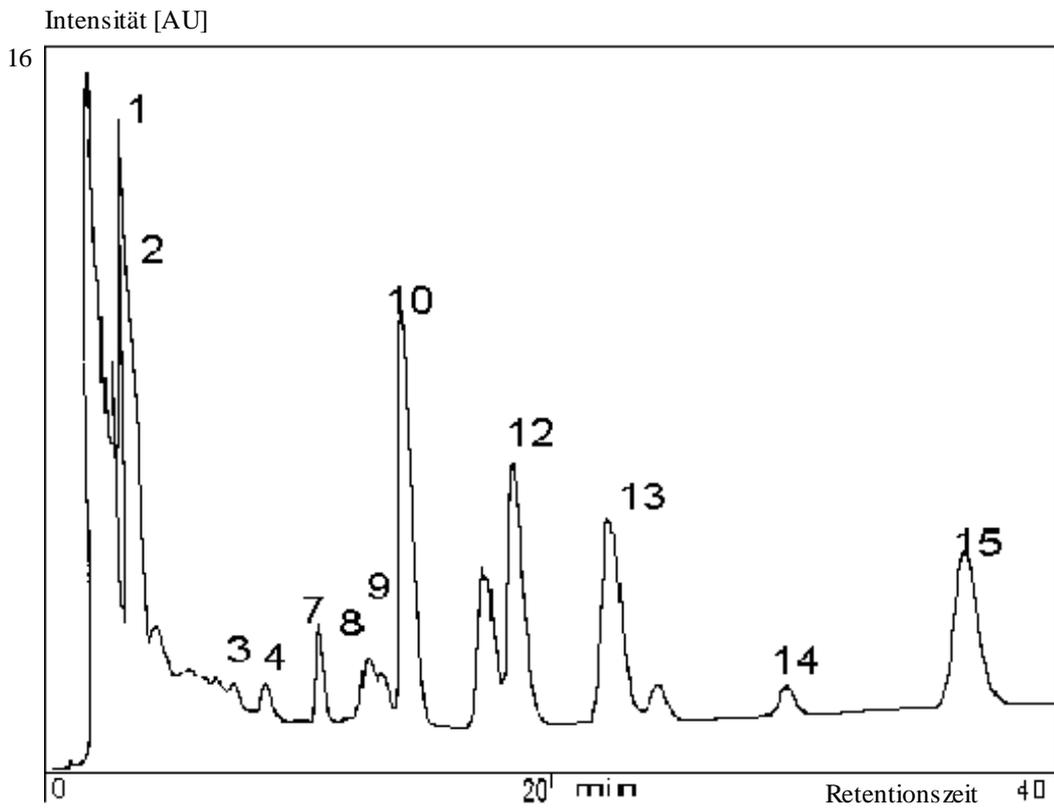


Abb.4.2 Chromatogramm des Ammoniak-Extraktes bei 334 K (Extraktionszeit 240 min) in 10 ml 40%igem Acetonitril, Chromatographische Bedingungen s. Kap 2.5

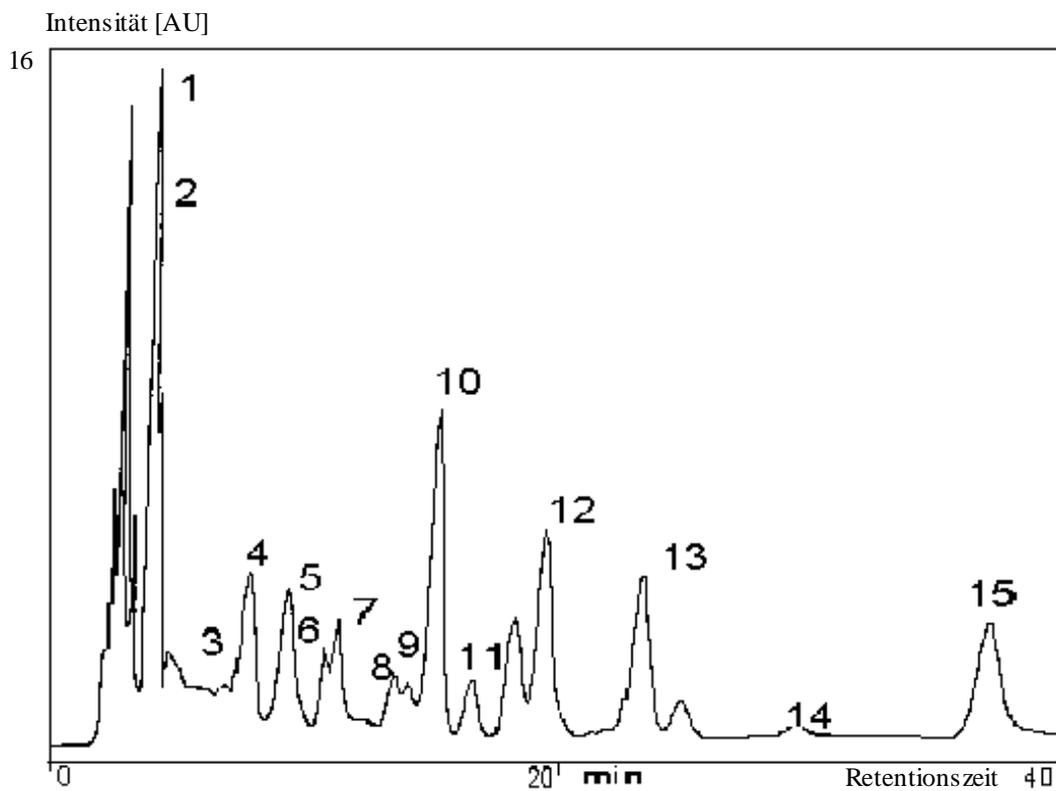


Abb.4.3 Chromatogramm des Methanol-Extraktes bei 348 K (Extraktionszeit 240 min) in 10 ml 40%igem Acetonitril, Chromatographische Bedingungen s. Kap 2.5

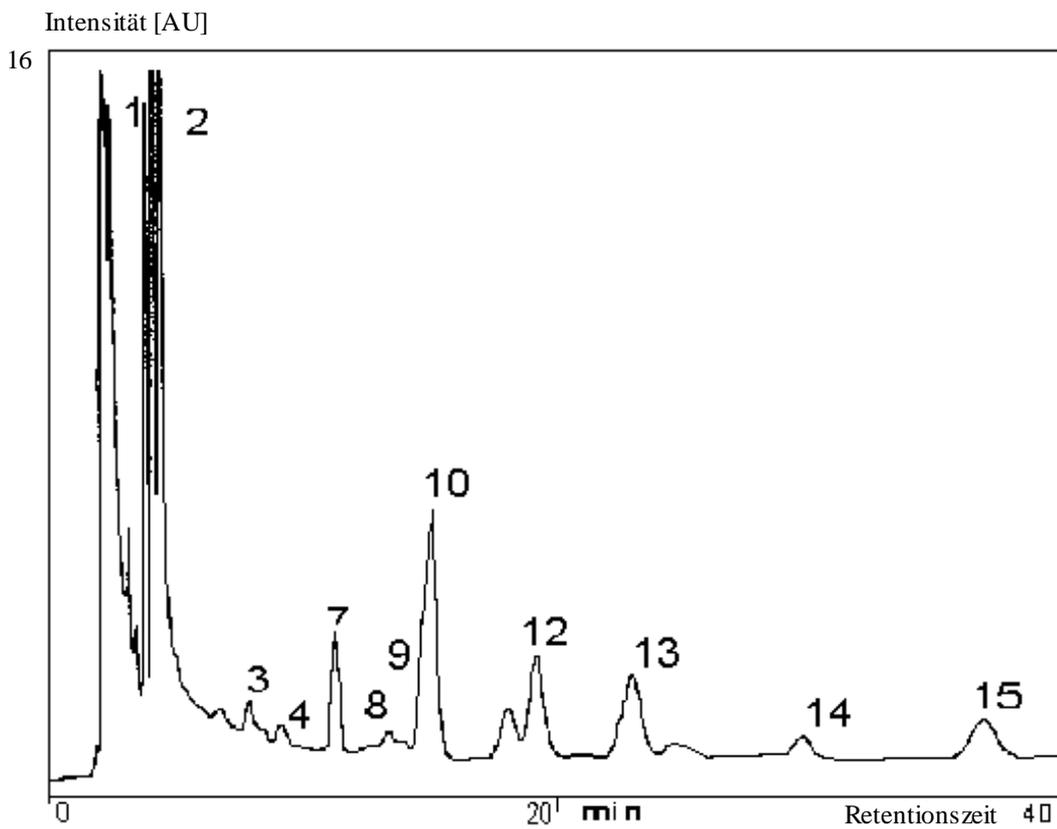


Abb.4.4 Chromatogramm des Ammoniak-Extraktes bei 334 K (Extraktionszeit 35 min) in 10 ml 40%igem Acetonitril, Chromatographische Bedingungen s. Kap 2.5

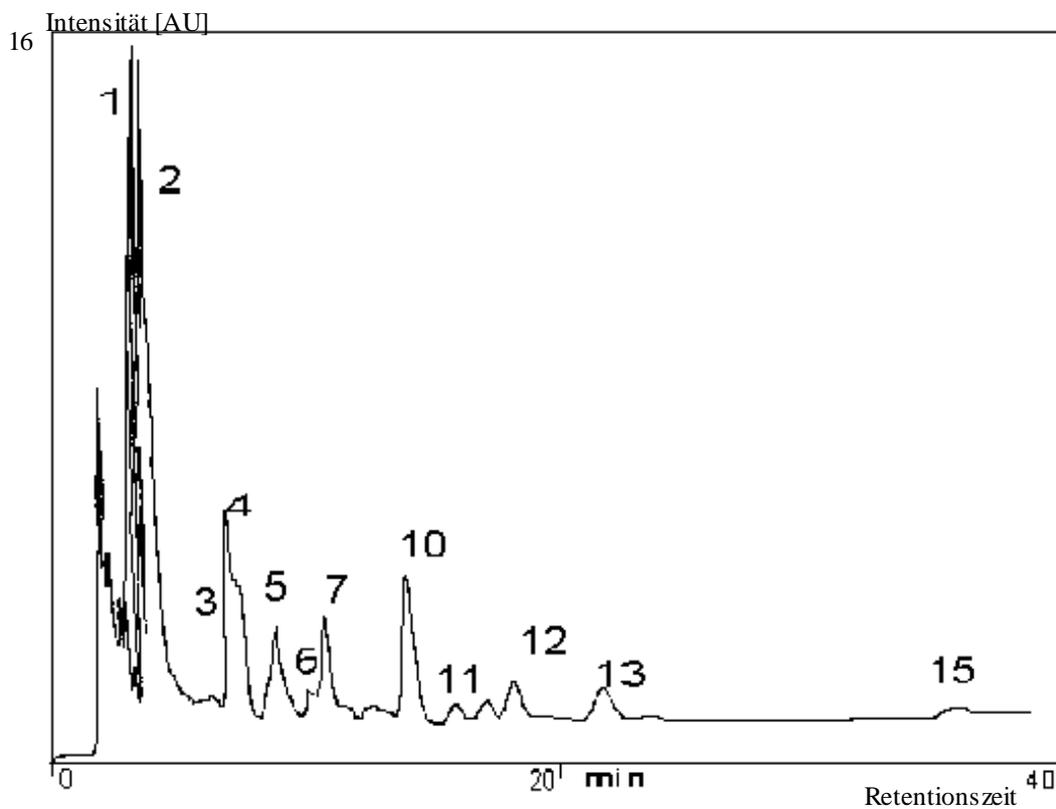


Abb.4.5 Chromatogramm des Methanol-Extraktes bei 348 K (Extraktionszeit 15 min) in 10 ml 40%igem Acetonitril, Chromatographische Bedingungen s. Kap 2.5

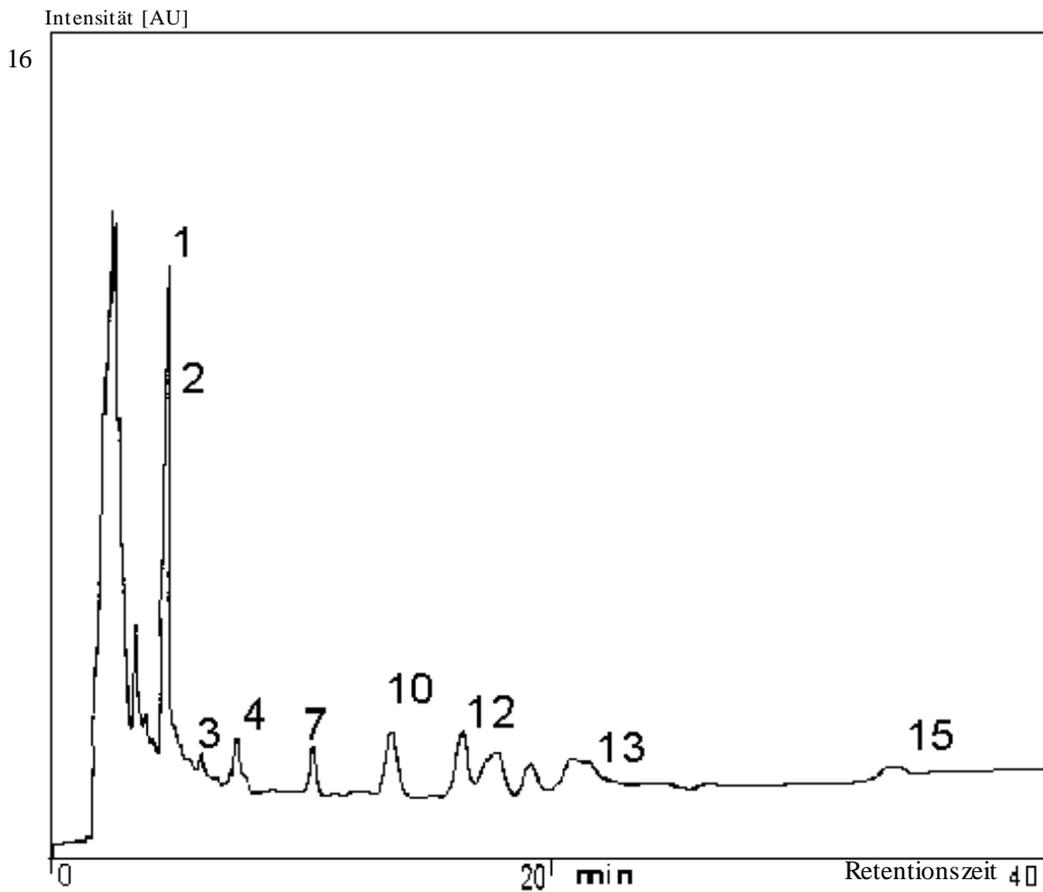


Abb.4.6 Chromatogramm des Wasser-Extraktes bei 373 K (Extraktionszeit 240 min) in 10 ml 40%igem Acetonitril, Chromatographische Bedingungen s. Kap 2.5

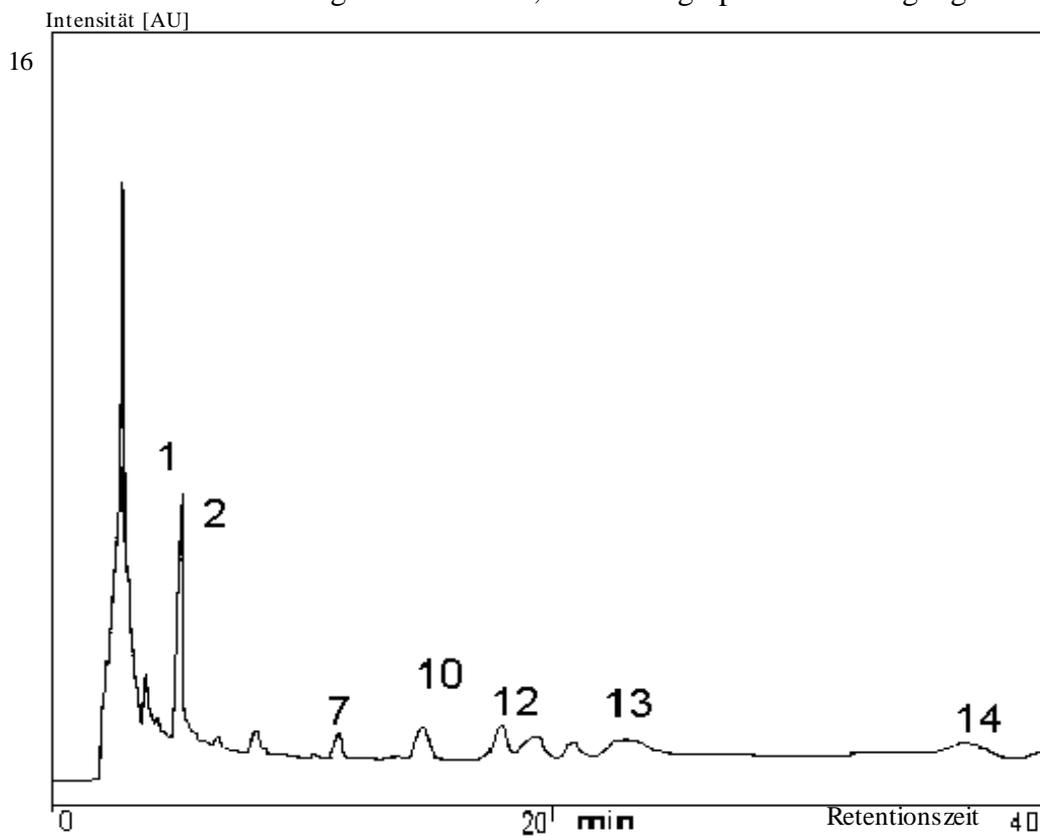


Abb.4.7 Chromatogramm des Wasser-Extraktes bei 373 K (Extraktionszeit 45 min) in 10 ml 40%igem Acetonitril, Chromatographische Bedingungen s. Kap 2.5

Im Chromatogramm des 60% Methanol-Extraktes (Abb. 4.3) wurden 15 Peaks bestimmten Ginsenosiden zugeordnet. Die Identifizierung der Peaks 1, 2, 7, 10, 12, 13 und 15 erfolgte mit Hilfe von Vergleichssubstanzen (Standards).

Die anderen bezeichneten chromatographischen Signale wurden nach der Literatur [38,39] bestimmten Verbindungen zugeordnet. Das Signal zwischen den Peaks 11 und 12 konnte nicht identifiziert werden. Der Peak nach dem Signal 13 gehört offenbar zu dem Ginsenosid Rb_2 , den auch die Vergleichssubstanz Rb_2 zeigt. Die Schar von Peaks im Retentionszeitbereich $t_R = 0 - 3$ min deutet auf polare Produkte hin.

Die bezifferten Signale der Chromatogramme konnten einzelnen Ginsenosiden wie folgt zugeordnet werden:

1:Re, 2:Rg₁, 3:Rg₂, 4:m-Rb₁, 5:m-Rc, 6:m-Rb₂, 7:Rf, 8: 20(R)-Rg₂, 9: 20(R)-Rh₁, 10:Rb₁, 11:m-Rd, 12:Rc, 13:Rb₂, 14:Rs₁, 15:Rd

Der Ammoniak- und der Methanol-Extrakt (je 240 min) waren in 10 ml 40%igem Acetonitril gelöst. Bedingungen für die Chromatogramme Abb. 4.2 und 4.3: s. Kap. 2.5, UV-Detektion $\lambda=200$ nm.

Alle Extraktionen wurden fünfmal durchgeführt. Vom jedem Extrakt wurden drei Chromatogramme angefertigt. Zur Bewertung der Abweichungen der Gehalte der fünf Extrakte wurde am Beispiel der Ammoniak-Extrakte (Extraktionszeit: 4 h) die relative Standardabweichung der Chromatogramm-Peakflächen für Rg_1 und Rb_1 berechnet. Für jeden Extrakt kamen die Peakflächenmittelwerte der jeweils drei Chromatogramme zur Auswertung. Die relativen Standardabweichungen (RSD) der Peakflächenmittelwerte der Chromatogramme der fünf Ammoniak-Extrakte (4 h) betragen für Re: RSD = 1.34 %, Rg_1 : 0,48 %, Rf: 0,45 %, Rb_1 : 1,33 %, Rc: 1,78 %, Rb_2 : 2.06 % und für Rd: 1,54 %.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Qualitätsunterschiede gleichartiger Extrakte offenbar gering sind. Die angegebenen Gehalte ergaben sich jeweils aus dem Mittelwert der 15 Peakflächen.

Die Wiederfindung für das gesamte analytische Verfahren wurde am Beispiel des Ginsenosids Rb_1 für den 60% Methanol-Extrakt (4 h) zu 97,5 % ermittelt. Sowohl die Lösungen des Methanol-Extraktes als auch die Extraktlösungen mit dem Rb_1 -Zusatz wurden mit Hilfe der Festphasenextraktion (vgl. Kap. 2.5.2) aufbereitet.

Zusätzlich wurde die Wiederfindung nur für die Festphasenextraktion mit der C₁₈-Kartusche bestimmt. Am Beispiel des Ginsenosids Rg₁ wurde für diesen Probenvorbereitungsschritt (auch Solid Phase Extraction, SPE genannt) eine Wiederfindung von 99,1 % ermittelt. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Festphasenextraktion unter den hier angewendeten Bedingungen wohl keinen Verlust an Ginsenosiden verursacht.

Mit Hilfe der Vergleichssubstanzen Rb₁ und Rg₁ konnte beispielhaft gezeigt werden, daß die aus jeweils drei Chromatogrammen gemittelten Peakflächen proportional den Ginsenosid-Konzentrationen sind. Die beiden Kalibriergeraden sind in Abb. 4.8 wiedergegeben.

Die Berechnungen der Kalibrierfunktionen $y = m \cdot x + b$ ergaben für

Rb₁ : $y = 88555 \cdot x - 1797$ ($r = 0,9978$); für Rg₁: $y = 240477 \cdot x - 3953$ ($r = 0,9999$)

(y = Peakfläche, m = Steigung der Kalibriergeraden, x = Konzentration, b = Ordinatenabschnitt, r = Korrelationskoeffizient).

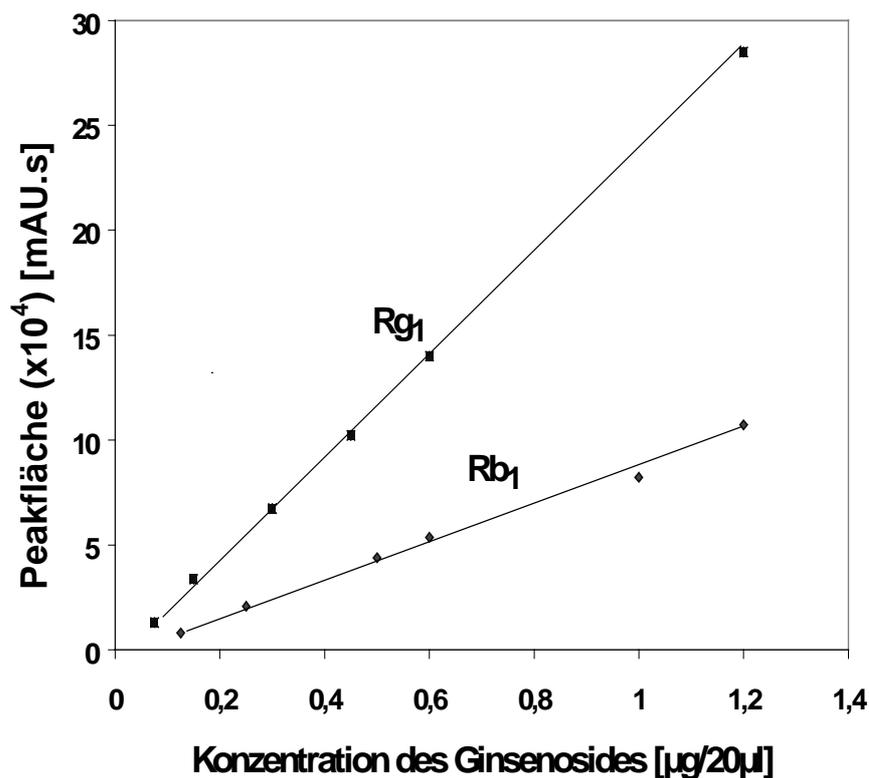


Abb.4.8 Kalibriergeraden der Ginsenoside Rb₁ und Rg₁.

Chromatographische Bedingungen s. Kap. 2.5

Als Beispiel seien zur näheren Charakterisierung des Chromatogrammes des 60 % Methanol-Extraktes (4 h), Abb. 4.3 einige chromatographische Daten wiedergegeben: Die Auflösungen R benachbarter Signale betragen beispielhaft $R(m-Rb_1/m-Rc) = 1,89$; $R(m-Rc/m-Rb_2) = 1,67$; $R(Rb_1/m-Rd) = 1,64$. Die Auflösungen wurden nach $R = 1,198 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{1/2,1} + w_{1/2,2})$ berechnet ($w_{1/2}$ = Peakbreite auf halber Höhe des Peaks). Die Trennstufen- oder Bodenzahl der HPLC-Säule ergibt sich nach $N = 5,54 (t_R / w_{1/2})^2$ aus dem Signal für z.B. m-Rb₁ zu $N = 1049$. Entsprechend beträgt die Trennstufen- oder Bodenhöhe $H = L / N = 0,24$ mm (L = Länge der Trennsäule).

Einige wichtige chromatographische Daten des Ammoniak-Extraktes (4 h) und des Methanol-Extraktes (4 h) sind in den Tabellen 4.2 wiedergegeben.

Tab. 4.2 Retentionszeiten t_R , Peakbreiten auf halber Höhe der Peaks $w_{1/2}$, Auflösungen R, Bodenzahlen N, Bodenhöhen H und Kapazitätsfaktoren k' des Chromatogrammes des Ammoniak-Extraktes (A) und 60% Methanol-Extraktes (M) von Ginsengwurzelpulver (Extraktionsdauer jeweils 4 h, die Totzeit t_0 beträgt für beide Chromatogramme 2,7 min, Papiergeschwindigkeit 4 mm/min)

Gin-senosid	t_R [min]		t_R [mm]		$w_{1/2}$ [mm]		Auflösung R		Bodenzahl N		Bodenhöhe H [mm]		Kapazitätsfaktor k'	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
Re	3,54	3,50	14,16	14,00	0,5	0,5	1,73	1,49	4443	4343	0,06	0,06	0,31	0,30
Rg ₁	3,90	3,81	15,60	15,24	0,5	0,5	1,73	1,49	5393	5147	0,05	0,05	0,44	0,40
Rf	10,61	10,53	42,44	42,12	1,0	1,0	2,27	1,61	9978	9828	0,03	0,03	2,93	2,90
Rb ₁	13,92	13,66	55,68	54,64	2,0	2,0	3,52	1,64	4294	4135	0,06	0,06	4,16	4,06
Rc	17,59	17,56	70,36	70,24	3,0	3,0	2,92	2,80	3047	3037	0,09	0,09	5,51	5,50
Rb ₂	21,24	21,06	84,96	84,24	3,0	3,0	2,92	2,80	4443	4368	0,06	0,06	6,87	6,80
Rd	34,24	34,00	136,96	136,00	4,0	4,0	6,94	6,77	6495	6427	0,04	0,04	11,68	11,60

4.3 Hauptginsenosid-Gehalte der Extrakte

Tab.4.3 gibt für die verschiedenen Extraktionen Ausbeuten (getrocknete Extrakte in Gewichtsprozent des trockenen Ausgangsmaterials), Ginsenosid-Gehalte und die Summehalte der sieben Hauptginsenoside des Wurzelpulvers aus weißem Ginseng an.

Tab. 4.3 Ginsenosid-Extraktionen aus Wurzelpulver des weißen Ginsengs: Extraktausbeuten, Gehalte und Summehalte der Hauptginsenoside.

Extrakt				Ginsenosid(wRx)%								
Extrakt.-mittel	Zeit	Temp.(K)	Ausbeute(w%)	Re	Rg ₁	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	ΣRx	
Ammoniak (Druck: 20 bar)	35 min	334	7,80	0,14	0,11	0,03	0,27	0,06	0,05	0,03	0,69	
	4 h	334	16,2	0,48	0,41	0,11	1,15	0,23	0,22	0,14	2,74	
60%-Methanol	15 min	348	3,10	0,20	0,07	0,02	0,10	0,03	0,02	0,01	0,45	
	4 h	348	13,2	0,51	0,35	0,07	0,40	0,10	0,09	0,07	1,59	
Wasser	45 min	373	0,80	0,01	0,01	0,001	0,003	0,002	0,002	0,002	0,03	
	4 h	373	5,10	0,13	0,11	0,02	0,05	0,03	0,04	0,07	0,45	

Vergleicht man die Ammoniak-, die Methanol-Wasser- und die Wasser-Extrakte miteinander, so ist die Ausbeute der Wasser-Extraktion mit 45 min Extraktionszeit am geringsten (<1%). Die Ammoniak-Extraktion mit 4 h Extraktionszeit erbrachte dagegen die größte Ausbeute mit ca. 16%. Die in Tab.4.3 aufgeführten Summehalte der Hauptginsenoside des Wurzelpulvers sind den Extraktausbeuten im wesentlichen proportional. In den Extrakten sind die Ginsenoside Re, Rg₁ und Rb₁ am häufigsten. Der extrahierte Anteil des Ginsenosids Rb₁ ist beim Ammoniak-Extrakt (Extraktionszeit 4 h) mit 1,15% am höchsten. Die Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc und Rd lassen sich bei Anwendung von flüssigem NH₃ im Vergleich zu 60%igem Methanol anscheinend besser extrahieren. Beispielsweise enthält der Ammoniak-Extrakt mit 4 h Extraktionszeit die Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc und Rd in etwa der doppelten Konzentration des vergleichbaren 60% Methanol-Extraktes. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, beruhen die hohen Extraktionsausbeuten der genannten Ginsenoside mit Ammoniak aber vor allem auf der Umwandlung der zusätzlich vorhandenen sauren Ginsenoside oder Malonyl-Ginsenoside m-Rb₁, m-Rb₂, m-Rc und m-Rd in die entsprechenden neutralen Ginsenoside und deren Extraktion.

4.4 Malonyl-Ginsenoside und ihre Reaktionen mit Basen

Kitagawa et al. isolierten aus Ginsengwurzeln erstmals die Malonyl-Ginsenoside [18]. Yamaguchi et al. [40] wiesen nach, daß die sauren Ginsenoside in 70% igem Methanol bei erhöhten Temperaturen teilweise in die neutralen Ginsenoside umgewandelt werden. Wesentlich schneller verläuft die Umwandlung durch Hydrolyse mit einer Base [41]. Court et al. [42] hydrolysierten die sauren Ginsenoside mit wässriger KOH-Lösung und bestimmten diese mittels HPLC indirekt über die Gehaltszunahmen der entsprechenden neutralen Ginsenoside. Da angenommen werden könnte, daß die Malonyl-Ginsenoside m-Rb₁, m-Rb₂, m-Rc und m-Rd nicht oder nur in minderm Maße pharmazeutisch wirksam sind, ist es eine interessante Aufgabe, die sauren in neutrale Ginsenoside umzuwandeln und zwar simultan mit einer effektiven Extraktion.

Die Reaktion der Malonyl- zu den neutralen Ginsenosiden war mit Hilfe der Chromatogramme der Extrakte zu erklären. Der Vergleich dieses 60% Methanol-Extrakt-Chromatogrammes (Abb.4.3) mit dem Chromatogramm des Ammoniak-Extraktes (Abb.4.2) zeigt bei gleicher Extraktionszeit deutliche Unterschiede.

Im Chromatogramm des Ammoniak-Extraktes sind die Signale 4, 6 und 11 des 60% Methanol-Extraktes nicht mehr vorhanden, Signal 5 ist verkleinert. Dagegen sind die Peaks 10, 12, 13 und 15 im Chromatogramm des Ammoniak-Extraktes ca. doppelt so groß wie die im Chromatogramm des 60% Methanol-Extraktes.

Durch die Ammoniak-Extraktion wurden die Malonyl-Ginsenoside m-Rb₁, m-Rb₂, m-Rc und m-Rd praktisch vollständig in die entsprechenden neutralen Ginsenoside überführt. Da angenommen wird, daß auch m-Rc vollständig zu Rc umgesetzt wurde, rührt offenbar das restliche Signal 5 nicht von m-Rc, sondern von mindestens einer anderen Begleitsubstanz her.

Die Zuordnung der Signale der Malonyl-Ginsenoside in den Chromatogrammen konnte weiter gesichert werden. Da die Moleküle der neutralen Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc und Rd durch den Malonylrest gleichartig zu den sauren Ginsenosiden verändert sind, sollten die Differenzen der Retentionszeiten $t_{R\text{Ginsenosid}} - t_{R\text{Malonyl-Ginsenosid}}$ den Retentionszeiten der Malonyl-Ginsenoside bzw. Ginsenoside proportional sein. Diese Abhängigkeiten sind in Abb.4.9 dargestellt und zeigen lineares Verhalten.

Beide Geraden schneiden die Abszisse bei $t_R = 2,9$ min. Diese Retentionszeit ist mit der Totzeit t_0 des isokratischen HPLC-Systems identisch. Die auf diese Weise ermittelte Totzeit wurde auch experimentell bestimmt, indem reines Acetonitril aufgegeben wurde. Diese Bestimmung ergab $t_0 = 2,7$ min, was eine gute Übereinstimmung mit dem vorher ermittelten Wert zeigt.

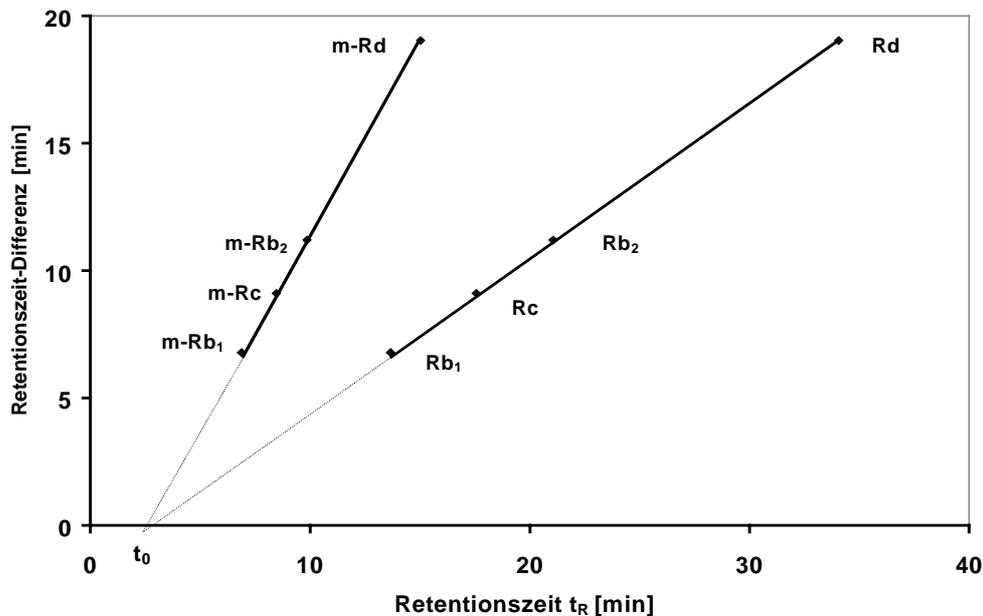


Abb. 4.9 Abhängigkeit der Retentionszeiten-Differenzen t_R Ginsenosid – t_R Malonyl-Ginsenosid von den Retentionszeiten der Malonyl-Ginsenoside bzw. Ginsenoside.

Malonyl-Ginsenoside werden durch Ammoniak, Ammoniak-Wasser-Mischungen, wäßrige NaOH- oder KOH-Lösungen im Ausgangsmaterial oder in den Extrakten zu den neutralen Ginsenosiden umgesetzt. Durch diesen einfachen Prozeß wird der Anteil der pharmazeutisch wertvollen neutralen Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc und Rd deutlich erhöht.

Wird das Wurzelpulver mit alkalischer 60%iger Methanollösung extrahiert, so lassen sich Ergebnisse, wie sie in Tab.4.4 dokumentiert sind, erzielen. Hier sind die Verhältnisse der Peakflächen der Chromatogramme der alkalischen 60% Methanol-Extrakte des Wurzelpulvers zu den Peakflächen des Chromatogrammes des 60% Methanol-Extraktes wiedergegeben. Die Extraktionsdauer betrug jeweils 4 h. Während der Extraktionen verringerte sich jeweils der pH-Wert. Die Malonyl-Ginsenoside m-Rb₁, m-Rb₂ und m-Rd wurden durch die drei Verfahren vollständig zu den neutralen Ginsenosiden Rb₁, Rb₂ und Rd umgesetzt. Die Umsetzungen zu den neutralen Ginsenosiden konnten durch die entsprechenden Peakflächenvergrößerungen in den Chromatogrammen bewiesen werden.

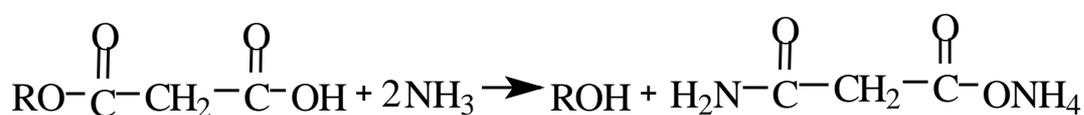
Tab. 4.4 Peakflächenverhältnis der Chromatogramme der alkalischen 60% Methanol-Extrakte und des 60% Methanol-Extraktes. Extraktionsdauer 4 h.

Ginsenosid	0,01 M NaOH Anfangs-pH=11,98 End-pH=10,01	0,01 M KOH Anfangs-pH=12,02 End-pH=10,21	2,6% wässr. NH ₃ -Lösung Anfangs-pH=11,89 End-pH=9,83
m-Rb ₁	0	0	0
m-Rc	0,21	0,23	0,16
m-Rb ₂	0	0	0
Rb ₁	1,76	1,84	1,67
m-Rd	0	0	0
Rc	1,71	1,81	1,77
Rb ₂	2,03	2,11	1,91
Rd	2,02	2,04	1,94

Bei der Behandlung des Wurzelpulvers mit alkalischen Lösungen und Extraktion mit 60% igem Methanol verblieben Restsignale mit ca. 20% der Signalfläche für m-Rc des 60% Methanol-Extraktes. Dies zeigt, daß die betreffende Begleitsubstanz im Gegensatz zu den Malonyl-Ginsenosiden gegenüber Basen stabil ist.

Wurde die Behandlung der Ginsenoside mit Alkali erst im Anschluß an die 60% Methanol-Extraktion im Extrakt vorgenommen, so ergaben sich ähnliche Peakflächenverhältnisse der Chromatogramme (vgl.Tab. 4.5) wie bei der Reaktion des Wurzelpulvers mit Laugen vor der 60% Methanol-Extraktion (Tab. 4.4).

Bei der Ammoniak-Extraktion reagieren die Malonyl-Ginsenoside m-Rb₁, m-Rb₂, m-Rc und m-Rd zu den entsprechenden neutralen Ginsenosiden, die in der folgenden Reaktionsgleichung als ROH bezeichnet werden.



Malonyl-Ginsenoside

Ammoniumsalz des Malonsäuremonoamids

ROH = Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc oder Rd

Infolge der Ammonolyse der sauren Ginsenoside entsteht neben den neutralen Ginsenosiden jedoch eine Malonsäureverbindung. Für den Fall der Abwesenheit von Wasser wurde die

Umsetzung zum Ammoniumsalz des Malonsäuremonoamids angenommen. Malonsäure und deren Salze zählen nicht zu den starken Giften. Beispielsweise wird Malonsäure der Schweizer Giftklasse 4 („nicht unbedenkliche Stoffe und Erzeugnisse“) zugeordnet. In den Extrakten und anderen pharmazeutischen Produkten könnten Malonsäureverbindungen enthalten sein, die dann nach bekannten Verfahren, beispielsweise mit Hilfe von reversed-phase-Material, abtrennbar wären.

Zur Untersuchung der Stabilität der Malonyl-Ginsenoside gegenüber Alkalien wurden 60% Methanol-Extrakte (4 h, 348 K, vgl. Kapitel 3.3.2) mit 0,1 M NaOH und Wasser zu 100 ml mit der Konzentration 0,01 M NaOH versetzt. Diese Lösung wurde in vier Lösungen zu je 25 ml aufgeteilt und diese jeweils 10 min, 2 h, 4 h bzw. 24 h auf 333 K erhitzt. In allen Fällen verringerte sich der Anfangs-pH von 11,30 in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Tab. 4.5 Verhältnis der Peakflächen der Chromatogramme der nach der Extraktion mit 0,01 M NaOH-Lösungen behandelten 60 % Methanol-Extrakte und des unbehandelten 60 % Methanol-Extraktes. Extraktionsdauer 4 h; die anschließende Dauer der Umsetzung mit 0,01 M NaOH ist angegeben. Anfangs-pH=11,30.

Reaktionszeit	10 min (End-pH=10,93)	2 h (End-pH=10,34)	4 h (End-pH=10,20)	24 h (End-pH=9,96)
Ginsenosid				
m-Rb ₁	0,51	0,21	0,05	0
m-Rc	0,62	0,25	0,21	0,19
m-Rb ₂	0,38	0,29	0,04	0
Rb ₁	1,19	1,51	1,69	1,78
m-Rd	0,38	0,19	0,05	0
Rc	1,23	1,54	1,68	1,74
Rb ₂	1,25	1,67	1,99	2,04
Rd	1,45	1,72	1,89	1,98

Im Mittel nahmen die Peakflächen von m-Rb₁, m-Rb₂ und m-Rd nach 10 min Umsetzungszeit auf 40-50% der anfänglichen Peakflächen ab. Nach 2 h waren noch 20-30% der ursprünglichen Peakflächen meßbar, nach 4 h noch ca. 5%. Bei einer Umsetzungszeit von 24 h konnten diese Malonyl-Ginsenoside nicht mehr nachgewiesen werden. Das Peakflächenverhältnis der Peaks mit der Retentionszeit des m-Rc beträgt dagegen nach 4 h und 24 h Umsetzungsdauer noch ca. 0,2.

Das Verhalten des Malonyl-Ginsenosids m-Rc stimmt mit dem der anderen Versuche weitgehend überein. Bei der Behandlung des 60% Methanol-Extraktes mit 0,1 M KOH- bzw. 20%iger wässriger NH₃-Lösung verblieben für den Peak mit der Retentionszeit des m-Rc noch 23 bzw. 17% der ursprünglichen Peakfläche. Die Versuche zeigen, daß sowohl die neutralen Ginsenoside als auch die Begleitsubstanz mit der Retentionszeit des m-Rc stabil gegenüber Basen sind.

Die Peakflächenverhältnisse der Chromatogramme der Tab. 4.4 (4 h Umsetzungsdauer mit 0,01 M NaOH bzw. KOH oder 2,6% wässriger NH₃-Lösung während der Extraktion) und der Tab.4.5 (24 h Umsetzungsdauer mit 0,01 M NaOH nach der Extraktion) liegen für das Ginsenosid Rb₁ zwischen 1,67 und 1,84, für Rc zwischen 1,71 und 1,81. Daraus geht hervor, daß im Wurzelpulver die Gehalte von m-Rb₁ und m-Rc nur ca. 70-80% der molaren Anteile von Rb₁ und Rc betragen.

Im Gegensatz hierzu liegen die Peakflächenverhältnisse für Rb₂ zwischen 1,91 und 2,11 sowie für Rd zwischen 1,94 und 2,04. Demnach betragen die molaren Verhältnisse m-Rb₂ : Rb₂ und m-Rd : Rd ca.1, d.h. hier liegen vergleichbare molare Mengen von sauren und neutralen Ginsenosiden vor.

Die vier Chromatogramme des 60% Methanolextraktes (4 h) umgesetzt mit 0,01M NaOH bei den Reaktionszeiten 10 min, 2 h, 4 h bzw. 24 h wurden in Abb.4.10 wiedergegeben. Sie zeigt eine stetige Abnahme der Peakflächen der Peaks 4 (m-Rb₁), 5 (m-Rc), 6 (m-Rb₂) und 11 (m-Rd) mit zunehmender Umsetzungsdauer des 60 % Methanol-Extraktes mit 0.01 M NaOH. Nach 24 h Umsetzungsdauer waren die Malonyl-Ginsenoside nicht mehr nachweisbar. Nur Peak 5 war noch mit ca. 20% der ursprünglichen Fläche vertreten. Es handelt sich offenbar um eine andere basenstabile Begleitsubstanz.

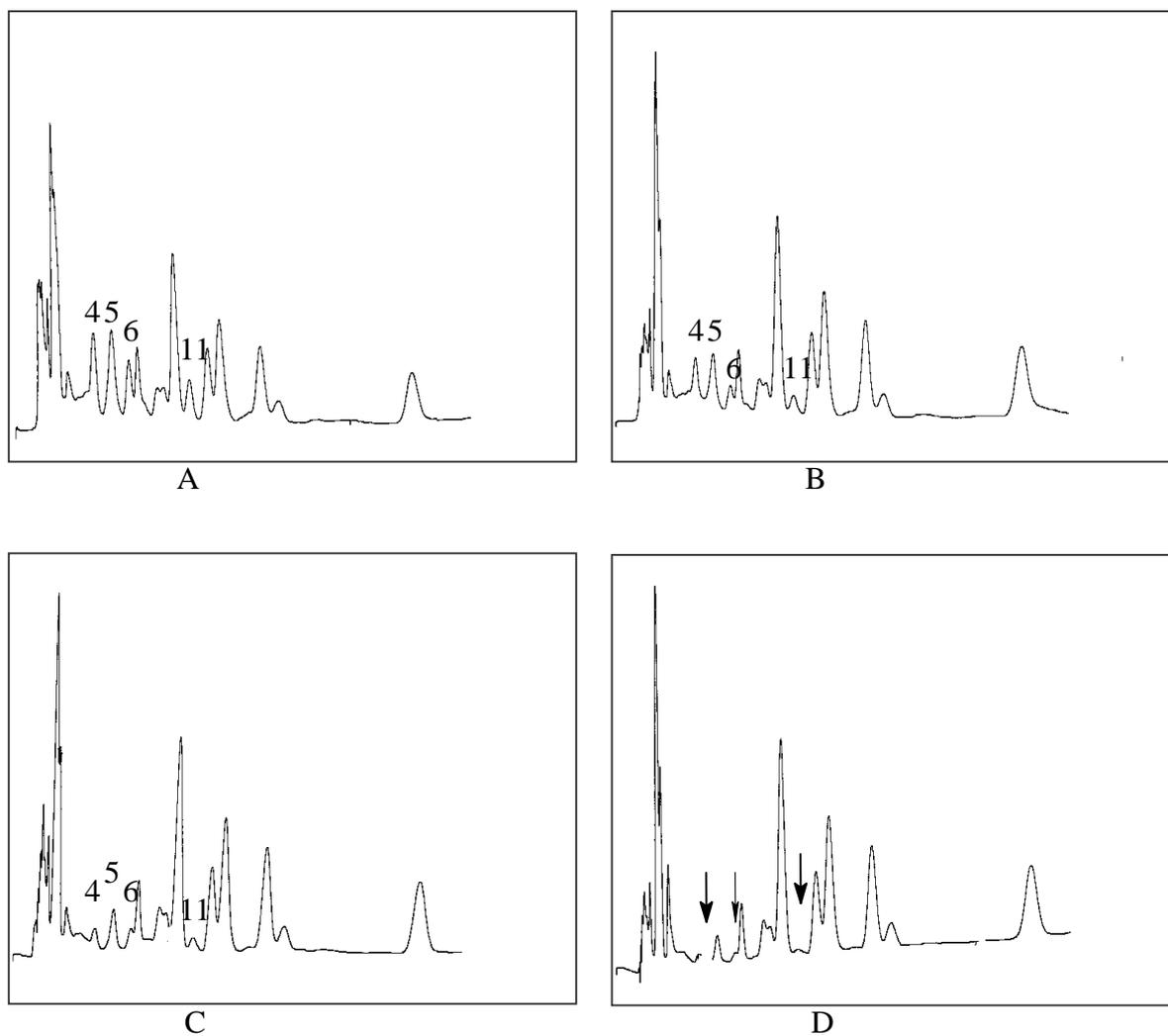


Abb. 4.10 Chromatogramme der 60 % Methanolextrakte (240 min), die anschließend mit 0.01M NaOH und unterschiedlicher Dauer umgesetzt wurden (vgl. Tab. 4.5a)

Chromatogramm A: Umsetzungsdauer 10 min (End-pH = 10,93)

Chromatogramm B: Umsetzungsdauer 2 h (End-pH = 10,34)

Chromatogramm C: Umsetzungsdauer 4 h (End-pH = 10,20)

Chromatogramm D: Umsetzungsdauer 24 h (End-pH = 9,96)

Zur Untersuchung der Stabilität der neutralen Ginsenoside gegenüber deutlich alkalischen Lösungen wurden 60% Methanol-Extrakte (4 h, 348 K) in Wasser gelöst und mit 1 M NaOH bzw. 26 % wässr. NH₃-Lösung bis zur Endkonzentration 0,1 M bzw. 6,5% versetzt. Diese Lösungen wurden 10 min bzw. 4 h auf 333 K erhitzt.

In Tab.4.6 wird das Verhältnis der Peakflächen der Chromatogramme der nach der Extraktion mit 0,1M NaOH-Lösungen bzw. 6,5% wässr. NH₃-Lösungen behandelten 60 % Methanol-Extrakte (4 h) und des unbehandelten 60 % Methanol-Extraktes (4 h) wiedergegeben.

Tab. 4.6 Verhältnis der Peakflächen der Chromatogramme der nach der Extraktion mit alkalischen Lösungen behandelten 60 % Methanol-Extrakte (4 h) und des unbehandelten 60 % Methanol-Extraktes (4 h). Der pH-Wert nach der jeweiligen Umsetzung ist angegeben.

	60%MeOH-Extrakt mit 0,1 M NaOH 10 min (pH=12,89)	60%MeOH-Extrakt mit 0,1 M NaOH 240 min (pH=12.84)	60%MeOH-Extrakt mit 6,5%wässr. NH ₃ 10 min (pH=12,81)	60%MeOH-Extrakt mit 6,5 % wässr. NH ₃ 240 min (pH=12.69)
m-Rb ₁	0	0	0	0
m-Rc	0,20	0,19	0,18	0,18
m-Rb ₂	0	0	0	0
Rb ₁	1,78	1,78	1,72	1,71
m-Rd	0	0	0	0
Rc	1,77	1,76	1,67	1,71
Rb ₂	2,06	2,08	1,98	2,01
Rd	2,01	2,01	1,99	2,09

Aus der Tabelle 4.6 geht hervor, daß die vollständige Umwandlung der Malonyl-Ginsenoside in die neutralen Ginsenoside mit den hier verwendeten stärker alkalischen Lösungen schon nach 10 min stattgefunden hat. Nach 4 h sind die Peakflächenverhältnisse kaum verändert. Dieser Sachverhalt beweist auch die Stabilität der neutralen Ginsenoside gegenüber stark alkalischen Lösungen (pH nahezu 13). Im Gegensatz zu diesen Umsetzungen mit 0,1 M NaOH-Lösungen ist die Umsetzung der Malonyl-Ginsenoside mit 0,01 M NaOH –Lösungen erst nach einer Zeit länger als 4h beendet.

4.5 Fraktionierung der Ginsenoside

4.5.1 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Extraktzusammensetzung von der Extraktionszeit und vom Extraktionsmittel

Die verschiedenen Extraktionen zeigen, daß die Ausbeuten an Ginsenosiden von der Extraktionszeit bei gleichem Extraktionsmittel bzw. vom Extraktionsmittel bei vergleichbarer Extraktionszeit abhängen. Eine Trennung bzw. Fraktionierung einzelner Ginsenoside wäre über nacheinander stattfindende Extraktionen des Wurzelpulvers denkbar, wobei die Extraktionszeiten und die Extraktionsmittel entsprechend ausgewählt würden.

Zur übersichtlicheren Darstellung des Einflusses der Extraktionszeit auf die Ausbeuten einzelner Ginsenoside wurden aus Tabelle 4.3 die Ginsenosid-Gehalte der Extrakte des jeweiligen Extraktionsmittels verwendet. Für die verschiedenen langen Extraktionen mit dem gleichen Extraktionsmittel wurde jeweils der Gehaltsquotient aus den Gehalten von 4 h Extraktion zu den Gehalten der Extraktion mit kürzeren Zeiten gebildet. Tabelle 4.7 gibt die Quotienten des Gehaltes der Ginsenoside aus den Extraktionen mit kürzerer Extraktionszeit zu den Extraktionen mit 4 h Dauer an.

Tab.4.7 Quotienten des Ginsenosidgehaltes aus den kürzeren Extraktionen zu den gleichen Extraktionen mit 4 h Dauer

		Re	Rg ₁	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	ΣR _x
Ammoniak	(35 min / 4 h)	0,29	0,27	0,27	0,23	0,26	0,23	0,21	0,25
60% Methanol	(15 min / 4 h)	0,39	0,20	0,29	0,25	0,30	0,22	0,14	0,28
Wasser	(45 min / 4 h)	0,08	0,09	0,05	0,06	0,07	0,05	0,03	0,07

Wird beispielweise die Ammoniak-Extraktion (Gehaltsverhältnisse 35 min- zu 4 h -Extraktion) betrachtet, so ist der Gehaltsquotient von Rd am niedrigsten (0,21). Dies bedeutet, daß eine kürzere NH₃-Extraktion verhältnismaßig weniger Rd abtrennt als bei den anderen Hauptginsenosiden. Bei Re ist der Gehaltsquotient dagegen 0,29. Für das Ginsenosid Re erbringt die kürzere Extraktion im Vergleich zu Rd schon eine bessere Ausbeute.

Die Quotienten aus den Ginsenosid-Gehalten der Extraktionen mit kürzerer Zeit (Soxhlet wurde einmal entleert) zu den Extraktionen mit 4 h liegen bei allen Extraktionsmitteln (Ammoniak, 60 %iges Methanol, Wasser) für die Panaxatriole Re, Rg₁ und Rf im allgemeinen höher als für die Panaxadiole Rb₁, Rc, Rb₂ und Rd. Besonders zeitabhängig sind die Extrak-

tionen mit Wasser. Hier wird in 45 min gegenüber 4 h Extraktionszeit nur ca. ein Zehntel und weniger extrahiert. Die Panaxadiole werden bevorzugt bei längerer Extraktionszeit extrahiert. Die polareren Triole Re, Rg₁ und Rf werden durch die polaren Extraktionsmittel zwar nach längerer Zeit auch besser extrahiert als nach kürzerer, aber nicht in dem Maße wie die Panaxadiole.

Die extrahierten Ginsenosid-Mengen sind in starkem Maße von dem Extraktionsmittel abhängig. Bei einer Extraktionszeit von jeweils 4 h sind die Gehaltsquotienten der Ginsenoside für jeweils zwei Extraktionsmittel gebildet worden. Die Quotienten für die drei Extraktionsmittelpaare sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Tab. 4.8 Quotienten der Ginsenosid-Gehalte zweier Extraktionsmittel (Extraktionszeit 4 h)

	Re	Rg ₁	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	ΣR _x
Ammoniak /60% Methanol	0,94	1,17	1,57	2,88	2,30	2,44	2,00	1,72
Ammoniak / Wasser	3,69	3,73	5,50	23,00	7,67	5,50	2,00	6,09
60% Methanol / Wasser	3,92	3,18	3,50	8,00	3,33	2,25	1,00	3,53

Der Vergleich der Extraktionen mit Ammoniak / 60% Methanol zeigt: 60%iges Methanol extrahiert die Triolverbindungen (Re, Rg₁, Rf) etwa gleich gut wie Ammoniak. Dagegen werden die Diolverbindungen (Rb₁, Rc, Rb₂, Rd) von Ammoniak besser extrahiert (Faktor 2-2,9) als von 60%igem Methanol. Aus dem Vergleich der Extraktionen mit NH₃ und H₂O läßt sich folgern, daß die Panaxadiole durch NH₃ wesentlich besser extrahiert werden als mit H₂O. Aber auch die Panaxatriole werden mit Hilfe von NH₃ ca. 4-6 mal mehr extrahiert werden als mit Wasser. Vergleicht man die 60% Methanol- mit der Wasser-Extraktion, so ist der Unterschied zwischen den extrahierten Panaxadiol- u. Panaxatriol-Mengen nicht so deutlich.

Im Gegensatz zu den anderen Ginsenosiden ist für Rd die Wasser-Extraktion so effektiv wie die 60% Methanol-Extraktion. Für die übrigen Ginsenoside ist die 60% Methanol-Extraktion um den Faktor 2,3 bis 8 günstiger als die Extraktion mit Wasser. Rd kann am besten mit Ammoniak (Faktor 2 gegenüber der 60% Methanol- und der Wasser-Extraktion) abgetrennt werden.

Die bisherige Betrachtung der Extraktzusammensetzung in Abhängigkeit vom Extraktionsmittel erfolgte für Extraktionszeiten von jeweils 4h.

Die gleichen Extraktionen wurden auch bei kürzeren Extraktionszeiten durchgeführt. Die Ammoniak-Extraktion bei einmaligem Austausch des flüssigen Ammoniaks in der Soxhlet-Hochdruckapparatur dauerte 35 min. Die Extraktionen mit 60%igem Methanol bzw. mit Wasser in der Soxhlet-Apparatur nahmen bei einmaligem Abfluß des Extraktionsmittels 15 min bzw. 45 min in Anspruch.

Für den entsprechenden Vergleich der Gehaltsquotienten der drei Extraktionsmittelpaare wurden die Quotienten in Tabelle 4.9 zusammengestellt.

Tab. 4.9 Quotienten der Ginsenosid-Gehalte zweier Extraktionsmittel bei kürzeren Extraktionszeiten

	Re	Rg ₁	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	ΣR _x
Ammoniak (35min) / 60% Methanol (15 min)	0,70	1,57	1,50	2,70	2,00	2,50	3,00	1,50
Ammoniak (35min) / Wasser (45min)	14,00	11,00	30,00	90,00	30,00	25,00	15,00	23,00
60% Methanol(15min) / Wasser (45min)	20,00	7,00	20,00	33,30	15,00	10,00	5,00	15,00

Auch bei diesen „Einmal“-Extraktionen (einmaliges Füllen des Extraktors) zeigt Ammoniak das beste, Wasser das geringste Extraktionsvermögen. Die Panaxadiole werden durch Ammoniak im allgemeinen besser extrahiert als die Triolverbindungen.

4.5.2 Versuche zur Fraktionierung der Ginsenoside durch zweifache Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln und unterschiedlichen Extraktionszeiten

Bei den Extraktionen unter Kapitel 4.5.1 wurden zwar verschiedene Extraktionsmittel und unterschiedliche Extraktionszeiten angewendet, jedoch wurde das Ginsengpulver stets nur einmal extrahiert. Jetzt sollen Versuche zur Fraktionierung der Ginsenoside durch zweifache Extraktion des Ginsengpulvers beschrieben werden.

Ginsengpulver wurde zuerst 10 min lang mit 60% Methanol extrahiert und der Extrakt analysiert. Der aus dieser Extraktion verbliebene, im Exsikkator getrocknete Rückstand wurde anschließend mit Ammoniak 120 min lang extrahiert. Der Extrakt wurde ebenfalls analysiert, um die Ginsenosid-Ausbeuten bestimmen zu können.

Das Prinzip dieser zweifachen Extraktion des Ginsengpulvers ist einmal der Wechsel des Extraktionsmittels und zum anderen die gleichzeitige Änderung der Extraktionszeit (oben angeführtes Beispiel: 60% Methanol-Extraktion mit kurzer Extraktionszeit, anschließend Extraktion mit Ammoniak bei längerer Extraktionszeit).

In der anderen Zweifach-Extraktion wurden die zum obigen Beispiel gegensätzlichen Bedingungen angewendet: Extraktion des Ginsengpulvers zuerst mit Ammoniak, jedoch nur 10 min lang, danach wird der im Exsikkator getrocknete Rückstand mit 60%igem Methanol, jedoch 120 min lang extrahiert. Beide Extrakte wurden analysiert.

Die Größe der Peakflächen aus den Chromatogrammen der Extrakte sind in Tabelle 4.10 aufgeführt.

Tab. 4.10 Chromatogramm-Peakflächen der Extrakte aus den Zweifach-Extraktionen

Extraktion	Re	Rg ₁	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd
10 min 60% CH ₃ OH	56531	36859	19791	33559	39293	23468	13839
Anschl. 120 min NH ₃	226836	109214	39375	145827	155392	109386	65174
10 min NH ₃	36053	32735	12736	26106	27036	12003	14059
Anschl. 120 min 60% CH ₃ OH	218822	119219	54642	117027	159843	109778	66106

In Tabelle 4.11 sind die Quotienten aus den Peakflächen der Chromatogramme aus den Extrakten der beiden Zweifach-Extraktionen angegeben.

Tab. 4.11 Quotienten aus den Chromatogramm-Peakflächen aus den Extrakten der beiden Zweifach-Extraktionen

Extraktion	Re	Rg ₁	Rf	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd
10 min 60% CH ₃ OH / Anchl. 120 min NH ₃	0,25	0,34	0,50	0,23	0,25	0,21	0,21
10 min NH ₃ / Anchl. 120 min 60% CH ₃ OH	0,16	0,27	0,23	0,22	0,17	0,11	0,21

Insgesamt belegen die kleinen Peakflächen-Quotienten, daß die NH₃ –Extraktion wegen der längeren Extraktionszeit von 120 min gegenüber der 60% Methanol-Extraktion (10 min) die Hauptginsenoside besser abtrennt. Besonders die Panaxadiole Rb₁, Rc, Rb₂ und Rd haben Werte zwischen 0,21 und 0,25. Diese Ginsenoside werden durch die länger dauernde NH₃ –Extraktion zum Teil aus den Malonyl-Ginsenosiden umgewandelt und bevorzugt abgetrennt.

Die Quotienten der Ginsenoside Rg₁, Rf , Rb₁ und Rd betragen bei den Extraktionen Ammoniak 10min / 60% Methanol 120 min 0,21 bis 0,27. Natürlich liefert die länger dauernde 60% Methanol-Extraktion höhere Ausbeuten als die kurze Ammoniak-Extraktion (alle Quotienten der Chromatogramm-Peakflächen sind kleiner als 1).

Von beiden Zweifach-Extraktionen wurden auch die Chromatogramm-Peakflächen (vgl. Tab. 4.10) summiert. Unterschiede von 10- 20 % sind nur bei Re, Rf und Rb₁ festzustellen.

4.5.3 Fraktionierung der Hauptginsenoside des 60%- Methanolextraktes mit Hilfe einer Reversed-phase-Material-Säule

Bei den bisher beschriebenen Extraktionen, die durch Anwendung verschiedener Extraktionsmittel und unterschiedlicher Extraktionszeiten bei einmaliger Extraktion (Kapitel 4.5.1) und bei zweifacher Extraktion (Kapitel 4.5.2) des Ginsengpulvers gekennzeichnet sind, wurden die einzelnen Hauptginsenoside zwar teilweise angereichert, jedoch nicht voneinander getrennt. Ein vollständige Trennung scheint ziemlich aufwendig zu sein. Deshalb wurde die Fraktionierung der Ginsenoside mit Hilfe einer Säule, die mit reversed-phase-Material (C₁₈-Phase) gefüllt war, untersucht.

Der Trennversuch wurde mit dem 60% Methanol-Extrakt ohne dessen vorherige Reinigung durch Festphasenextraktion durchgeführt. Einzelheiten über die RP-Säule und die Versuchsdurchführung wurden in Kapitel 3.4.1 beschreiben. Es wurden 2 ml 60% Methanol-Extrakt auf die Säule gegeben und mit 20 ml Methanol-Wasser (80:20;v/v) eluiert. Das Eluat wurde in sechs 2ml-Fractionen gesammelt, die jeweils mit Hilfe der HPLC und UV-Detektion (Kapitel 2.5) analysiert wurden.

Die Chromatogramme der sechs Fraktionen sind in der Abbildung 4.12 wiedergegeben. Die Kennzeichnung der Signale in diesen Chromatogrammen entspricht derjenigen der Abbildung 4.3 in Kapitel 4.2.

Die Retentionszeiten, Peakflächen und die Zuordnung der Signale zu den einzelnen Ginsenosiden sind für alle säulenchromatographischen Fraktionen des 60% Methanol-Extraktes in Tabelle 4.12 zusammengefaßt.

In der Fraktion 0 bis 2 ml trat nur das auch bei den anderen Untersuchungen vorhandene Gemisch stärker polarer Stoffe auf ($t_R < 3\text{min}$), während die Ginsenoside noch am C₁₈-Material adsorbiert waren.

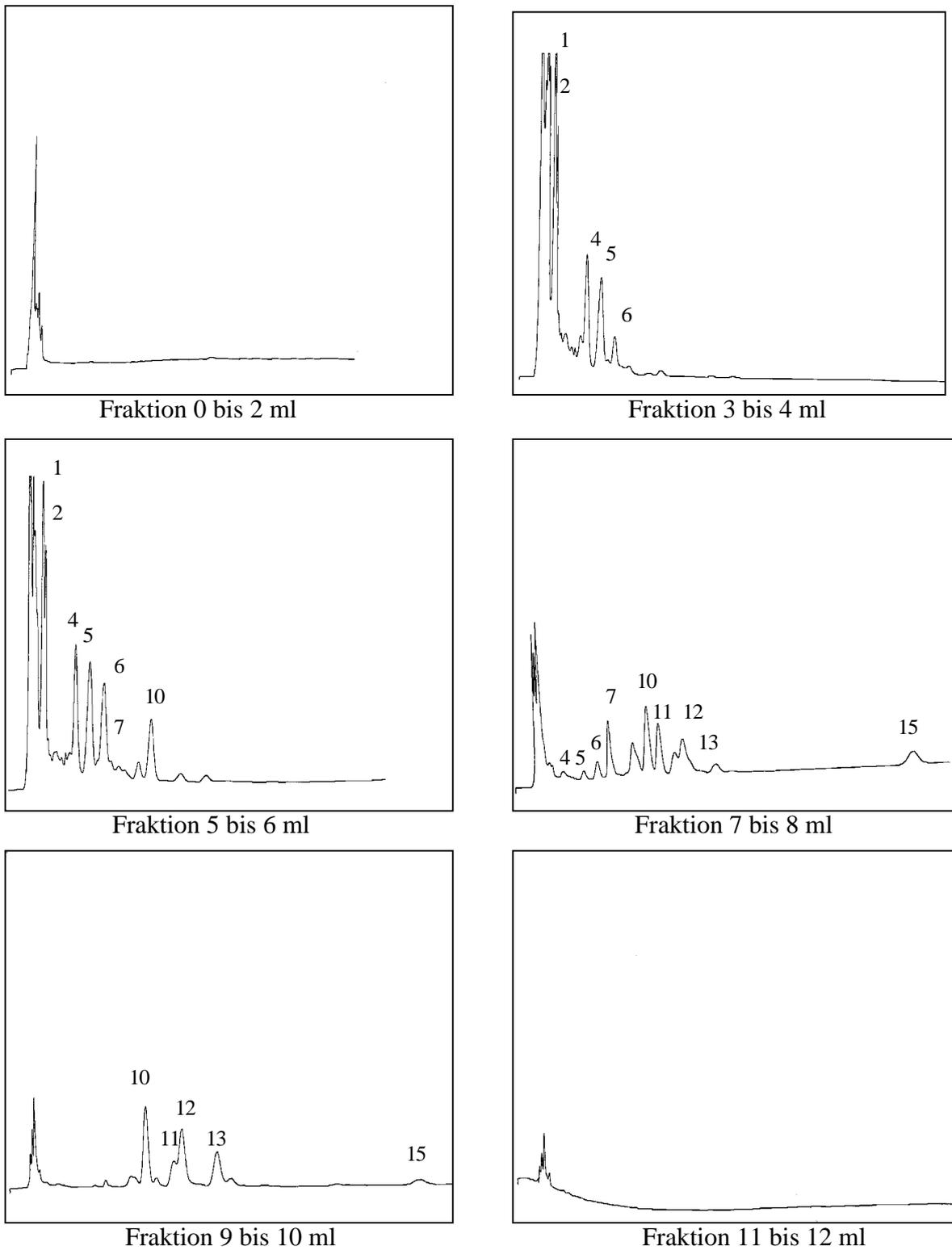


Abb. 4.11 Chromatogramme der 2ml-Fractionen 0 bis 12 ml des 60% Methanol-Extraktes getrennt mit Hilfe einer C_{18} -Säule und Methanol-Wasser (80:20; v/v)
 1:Re, 2:Rg₁, 4:m-Rb₁, 5:m-Rc, 6:m-Rb₂, 7:Rf, 10:Rb₁, 11:m-Rd, 12:Rc, 13:Rb₂, 15:Rd

Tab. 4.12 Charakterisierung der säulenchromatographischen Fraktionen des 60% Methanol-Extraktes mit Hilfe der HPLC

Fraktion [ml]	Retentionszeit t_R [min]	Peakfläche [m Au.s]	Ginsenosid
0 bis 2	2,2	352506	
	2,8	87982	
3 bis 4	2,2	1259695	
	2,9	590189	
	3,69	670116	Re
	3,97	375186	Rg ₁
	7,30	377593	m-Rb ₁
	8,89	406387	m-Rc
	10,39	175830	m-Rb ₂
5 bis 6	2,2	1022170	
	2,6	948228	
	3,64	579350	Re
	3,94	329392	Rg ₁
	7,17	455731	m-Rb ₁
	8,70	519889	m-Rc
	10,17	471278	m-Rb ₂
	11,70	74760	Rf
	15,14	252491	Rb ₁
7 bis 8	2,2	149388	
	2,8	392843	
	7,24	27764	m-Rb ₁
	8,70	56258	m-Rc
	10,00	176196	m-Rb ₂
	12,00	188336	Rf
	15,27	196336	Rb ₁
	16,87	100815	m-Rd
	17,74	241492	Rc
	21,20	59145	Rb ₂
	32,00	101711	Rd
9 bis 10	2,2	30012	
	2,7	125033	
	15,00	300204	Rb ₁
	16,25	27607	m-Rd
	18,21	268546	Rc
	21,88	84830	Rb ₂
	33,25	49074	Rd
11 bis 12	2,3	12520	
	2,8	69379	

Die Fraktion 3 bis 4 ml enthielt die Ginsenoside Re, Rg₁, m-Rb₁, m-Rc und m-Rb₂. Diese Ginsenoside haben Retentionszeiten unter 10,4 min. Re und Rg₁ gehören zu den relativ polaren Panaxatriolen. Hiernach schließen sich in der Elutionsreihenfolge die wegen des polaren Malonsäurerestes auch noch relativ polaren Malonylginsenoside m-Rb₁, m-Rc und m-Rb₂ an. Die Ginsenoside Rf, m-Rd und die weniger polaren Panaxadiole Rb₁, Rb₂, Rc und Rd waren noch in der RP-Säule verblieben.

Die danach folgende Fraktion 5 bis 6 ml beinhaltet außer den Verbindungen der Fraktion 3 bis 4 ml zusätzlich das Panaxatriol Rf und das Panaxadiol Rb₁ (t_R ca. 15,1 min). Das Chromatogramm dieser Fraktion beweist, daß die Konzentrationen der Panaxatriole Re und Rg₁ gegenüber denen der Fraktion 3 bis 4 ml bereits geringer wurden, während die Konzentrationen an m-Rb₁, m-Rc und m-Rb₂ zunahmen. m-Rd, Rc, Rb₂ und Rd waren noch nicht eluiert.

Die Fraktion 7 bis 8 ml enthielt dann auch diese vier Ginsenoside, jedoch nicht mehr die relativ stärker polaren Ginsenoside Re und Rg₁ mit den kurzen Retentionszeiten zwischen ca. 3,6 und 4,0 min. Die Konzentration der Ginsenoside m-Rb₁, m-Rc, m-Rb₂ und Rb₁ hat gegenüber der Fraktion 5 bis 6 ml abgenommen, während für Rf eine Konzentrationszunahme zu verzeichnen war.

Die Fraktion 9 bis 10 ml enthält nur noch die Ginsenoside mit den längeren Retentionszeiten (ca. 15 bis 33 min). Dies sind Rb₁, m-Rd, Rc, Rb₂ und Rd. Bemerkenswert ist der Sachverhalt, daß in dieser Fraktion kein einziges Ginsenosid der Fraktion 3 bis 4 ml mehr enthalten ist.

In der Fraktion 11 bis 12 ml sind keine Ginsenoside mehr nachzuweisen.

Der Trennversuch der Ginsenoside des 60% Methanol-Extraktes mit Hilfe der RP-Säule hat gezeigt, daß eine vollständige Trennung der Panaxatriole Re, Rg₁ sowie der relativ polaren Malonyl-Ginsenoside m-Rb₁, m-Rc und m-Rb₂ von den weniger polaren Verbindungen Rb₁, m-Rd, Rc, Rb₂ und Rd ohne Schwierigkeiten ermöglicht werden kann. Das Ginsenosid Rf, das offenbar eine mittlere Polarität aufweist, findet sich entsprechend in den mittleren Fraktionen wieder.

Eine Feintrennung in einzelne Ginsenoside oder zwei in der Retentionsabfolge benachbarter Ginsenoside wäre durch einige experimentelle Maßnahmen, wie Einsatz einer längeren Säule mit feinkörnigerem RP-Material, Optimierung der mobilen Phase (evtl. Anwendung eines Gradienten), der Säulentemperatur und der Geschwindigkeit der mobilen Phase, durchaus zu erreichen. Auf diese Weise dürften sich die relativ reinen und sehr teuren Ginsenoside (Standards), mit denen in dieser Arbeit kalibriert wurde, gewinnen lassen.

4.6 HPLC/MS-Untersuchungen der Ginseng-Extrakte

4.6.1 MS-Spektren der Ginsengextrakte

Zur weiteren Absicherung der Ginsenosid-Analytik und zum Nachweis sehr geringer Konzentrationen einzelner Ginsenosid-Spezies wurde ein Gradienten-HPLC-Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion angewendet. Die unmittelbare massenspektrometrische Identifizierung von Ginsengextrakten und chromatographischen Fraktionen ist durch die Registrierung typischer Massen wie die der quasi-Molekül- und/oder einiger Fragment-Ionen der einzelnen Ginsenoside möglich [7,8].

Um für die massenspektrometrische Detektion der Ginsenoside die wichtigsten und häufigsten Ionen zu ermitteln, werden vorerst Massenspektren der Extrakte der Ginsengwurzeln und einer Mischung der Hauptginsenosid-Standards registriert.

Die Abbildungen 4.12 bis 4.14 zeigen die Massenspektren des Ammoniak-, 60% Methanol- und Wasser-Extraktes (jeweils 240 min Extraktionsdauer). Das Massenspektrum des Ammoniak-Extraktes besteht aus einer Vielzahl von Ionensignalen, wovon einige bestimmten Ginsenosiden zugeordnet werden konnten, wie m/z 407,1; 441,2; 789,4; 805,4; 969,5; 1101,6 und 1131,5. Die Zuordnung dieser Signale zu Molekül+Natrium-Ionen bzw. Fragment-Ionen und zu einzelnen oder mehreren Ginsenosiden geht aus den Tabellen 4.13 und 4.14 hervor. Aus dem Massenspektrum des 60%Methanol-Extraktes sind die Ionen mit m/z 423,1, 805,4, 969,5 und 1101,6 ebenfalls in den genannten Tabellen zugeordnet. Der Wasser-Extrakt weist im Massenspektrum eine Reihe von Ionen auf, wovon die mit m/z 407,1, 443,1 und 1101,5 in den Tabellen 4.13 und 4.14 zugeordnet wurden.

Rel. Intensität [%]

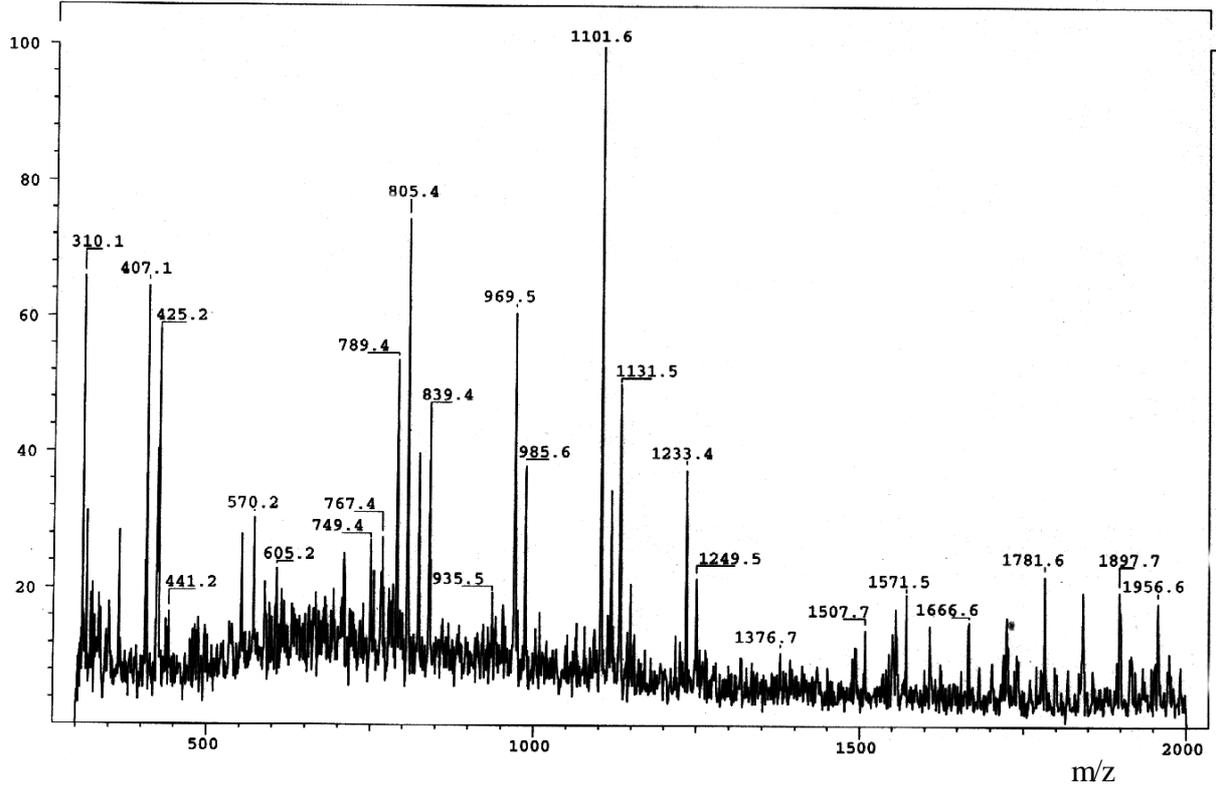


Abb. 4.12 Massenspektrum des Ammoniak-Extraktes (240 min, 20 bar, 334 K) nach Direktinfusion

Rel. Intensität [%]

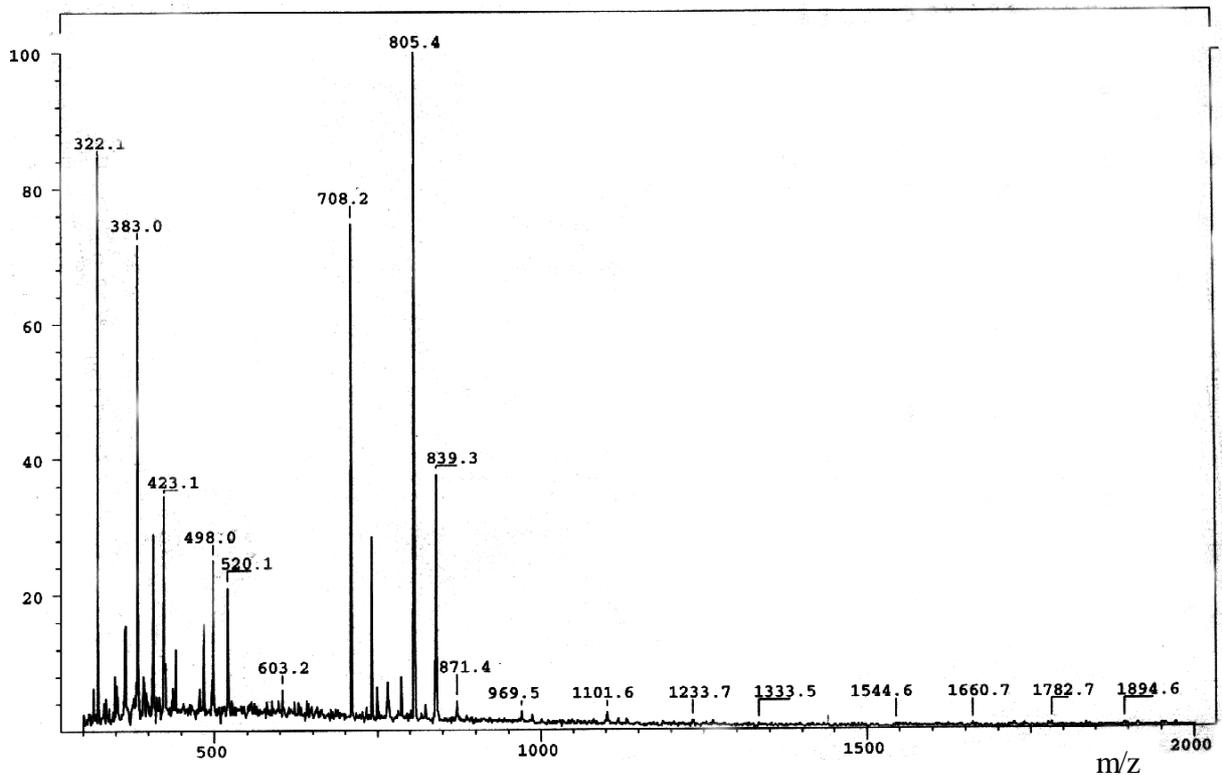


Abb. 4.13 Massenspektrum des 60% Methanol-Extraktes (240 min, 348 K) nach Direktinfusion

Rel. Intensität [%]

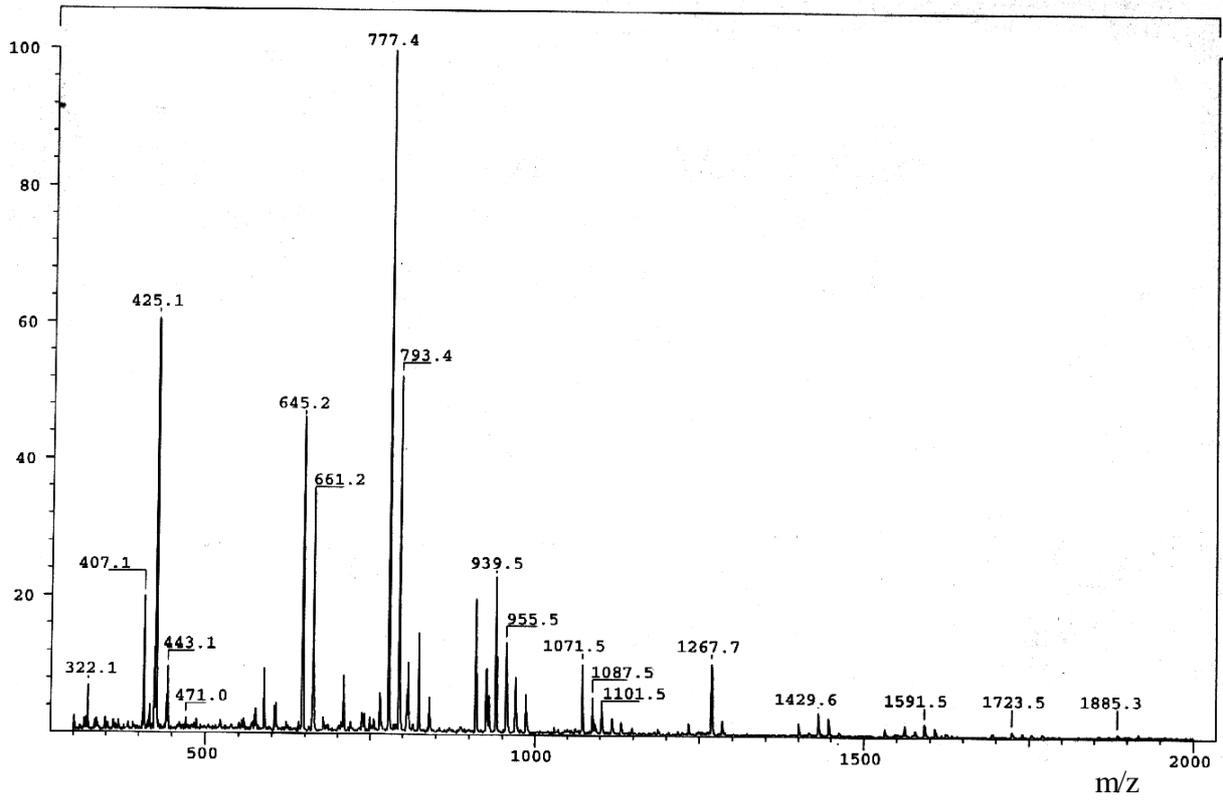


Abb. 4.14 Massenspektrum des Wasser-Extraktes (240 min, 373 K) nach Direktinfusion

4.6.2 Charakterisierung einer Mischung der reinen Hauptginsenoside (Standards)

Zuerst wurden die Ginsenosid-Standards gemischt und mit Hilfe der HPLC/MS analysiert. Zuvor waren die Retentionszeit und die Massenspektren der Standards einzeln vermessen worden.

Zum Unterschied gegenüber dem anfangs verwendeten isokratischen HPLC-Verfahren mit UV-Detektion wurde für die HPLC/MS-Untersuchungen mit dem Gradienten-HPLC-Verfahren gearbeitet. Daher resultieren hierbei andere Retentionszeiten für die einzelnen Ginsenoside. Die Elutionsreihenfolge der Hauptginsenoside ist im wesentlichen mit der des isokratischen HPLC-Programms identisch, außer den Ginsenosiden Rg₁ und Re am Chromatogrammanfang.

Die HPLC/MS-Chromatogramme der Mischung der Ginsenosid-Standards Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf und Rg₁ sind in Abbildung 4.15 wiedergegeben. In dieser Abbildung sind auf der Ordinate die relativen Intensitäten spezifischer Ionenmassen und auf der Abszisse die Retentionszeiten der Ginsenoside dargestellt.

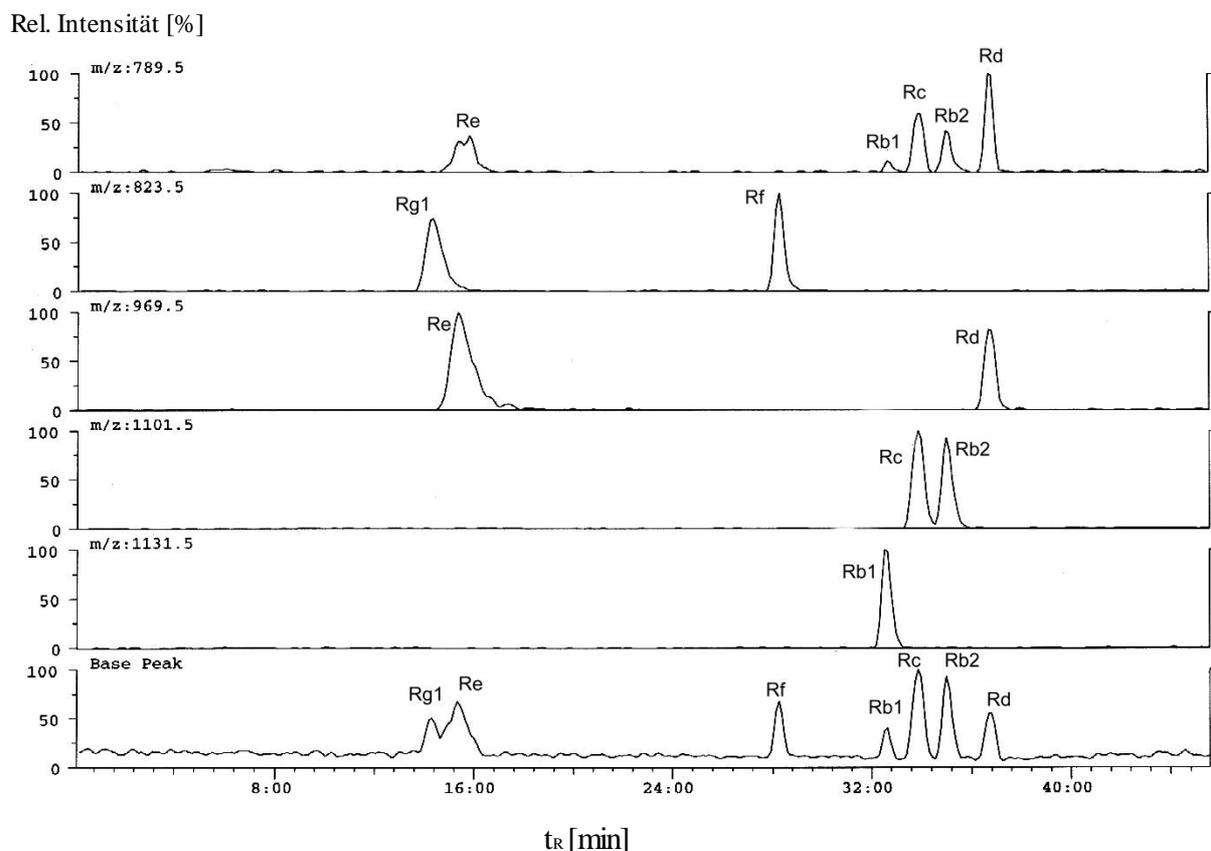


Abb. 4.15 HPLC/MS-Chromatogramm einer wässrigen Mischung der Hauptginsenosid-Standards (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf und Rg₁)

Die massenspektrometrischen Daten zur Detektion der Ginsenoside in den Chromatogrammen einschließlich der Retentionszeiten sind in Tabelle 4.13 aufgeführt.

Tab. 4.13 Massenspektrometrische Detektionsdaten und Retentionszeiten der verwendeten Ginsenosid-Standards (in Wasser gelöst) zu Abb.4.15

Ginsenosid	m/z	[M+Na] ⁺	t _R [min]	Fragment-Ion m/z 789,5
Rg ₁	823,5	[C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄ +Na] ⁺	14,4	-
Re	969,5	[C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈ +Na] ⁺	15,3	X ⁺
Rf	823,5	[C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄ +Na] ⁺	28,4	-
Rb ₁	1131,5	[C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃ +Na] ⁺	32,8	Y ⁺
Rc	1101,5	[C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂ +Na] ⁺	33,6	Y ⁺
Rb ₂	1101,5	[C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂ +Na] ⁺	35,0	Y ⁺
Rd	969,5	[C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈ +Na] ⁺	36,6	Y ⁺

Zur massenspektrometrischen Identifizierung der Einzelginsenoside im Chromatogramm dienen vorwiegend die Molekülionen [M+Na]⁺. Das Ion mit der Masse m/z 1131,5 läßt sich nur dem Ginsenosid Rb₁ eindeutig zuordnen. Die anderen [M+Na]⁺-Ionen sind zwar jeweils für zwei Ginsenoside repräsentativ, sind aber unter Berücksichtigung der Retentionszeiten ebenfalls für die Identifizierung eindeutig. So sind der Masse m/z 823,5 die Ginsenoside Rg₁ und Rf zuzuordnen, der Masse m/z 969,5 die Ginsenoside Re und Rd und der Masse m/z 1101,5 die Ginsenoside Rb₂ und Rc.

Die Strukturen der Fragment-Ionen X⁺ und Y⁺ sind in den Abbildungen 4.16a und 4.16b dargestellt.

Fragmentationen sind im Bereich der HPLC/MS-Messungen wegen des allgemein hohen Untergrundes zum Nachweis nur eingeschränkt geeignet. Ist ein Ion typisch für eine Substanzklasse (z.B. 789,5), tritt also bei allen Vertretern dieser Gruppe auf, so kann es als zusätzliche Identifizierungshilfe durchaus herangezogen werden, wenn die Retentionszeiten dabei Berücksichtigung finden. So lassen sich dann auch Re, Rb₁, Rc, Rb₂ und Rd eindeutig identifizieren. Außerdem gibt dieses Ion noch den Hinweis, daß an diesem Molekülteil bei der Herstellung der Extrakte keine Veränderung aufgetreten ist. Zusätzlich ist in Abbildung 4.15 im unteren Chromatogramm die HPLC-Detektion mit Hilfe des „Base Peaks“ wiedergegeben. Im „Base Peak“-Chromatogramm werden die Massenpeaks aus den Massenspektren mit der jeweils höchsten Intensität als Massenspur dargestellt. Im Gegensatz dazu wird beim „TIC“ (Totalionenstrom) die gemittelte Intensität aller im gescannten Massenbereich vorkommenden Massenpeaks als Massenspur aufgezeichnet. Auf Grund des starken Untergrundes in der HPLC/MS -Technik eignet sich der TIC in diesem Falle nicht als Darstellungsform.

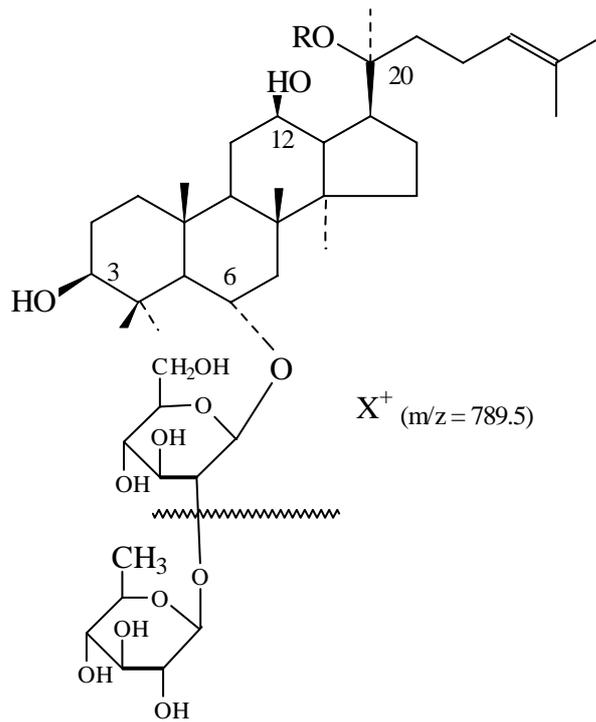


Abb.4.16a Struktur des Fragmentes X^+ (m/z 789,5) des Ginsenosids Re, R = -Glc (Glc: Glucose)

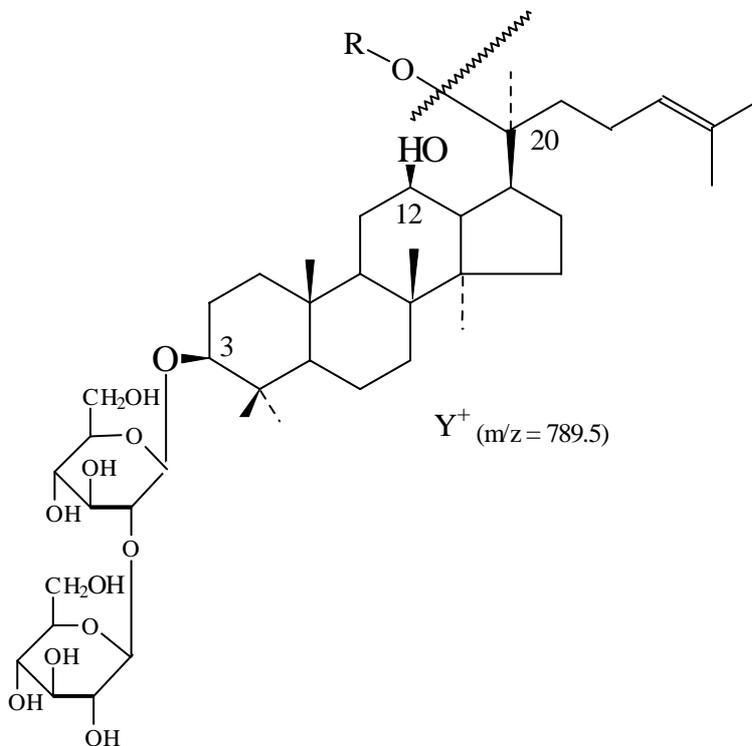


Abb. 4.16b Struktur des Fragmentes Y^+ (m/z 789,5) der Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc und Rd. Rb₁: R = -Glc⁶-Glc, Rb₂: R = -Glc⁶-Ara(p), Rc: R = -Glc⁶-Ara(f), Rd: R = -Glc (Glc:Glucose, Ara(p): Arabinose in Pyranose-Form, Ara(f): Arabinose in Furanose-Form)

4.6.3 Charakterisierung der Extrakte

Die Extrakte der Ammoniak- und der 60% Methanol-Extraktion (jeweils 4 h Extraktionsdauer) wurden mit Hilfe der HPLC/MS charakterisiert. Die Massenspuren der intensivsten Ionen des Ammoniak-Extraktes sind in Abbildung 4.17a, die des Methanol-Extraktes in Abbildung 4.17b dargestellt. Die Grundlage zur Auswertung der Chromatogramme bilden die Ergebnisse von den Hauptginsenosiden (Kapitel 4.6.1). In ähnlicher Weise wie für die Mischung der Hauptginsenoside wurden für diese Extrakte massenspektrometrische Detektionen mit Hilfe der $[M+Na]^+$ - Ionen m/z 823,5; m/z 969,5; m/z 1101,5 und m/z 1131,5 sowie den Fragment-Ionen entsprechend Tabelle 4.12 durchgeführt. Es wurde auch das „Base Peak“-Chromatogramm dargestellt. Die HPLC/MS-Aufnahmen sind denen der Mischung der Hauptginsenoside ähnlich. Es sind alle sieben Hauptginsenoside in den Extrakten nachweisbar.

Wie im HPLC/MS-Chromatogramm der Mischung der Standard-Ginsenoside (Abbildung 4.15) werden die Ginsenoside R_{g1} und R_f anhand der quasi-Molekülionen mit der Masse m/z 823.5 nachgewiesen. Zusätzliche Hilfen sind das „Base Peak“-Chromatogramm und die anderen Fragmentionen gemäß Tabelle 4.13.

Das HPLC/MS-Chromatogramm des Methanol-Extraktes (vgl. Abb.4.17 b) unterscheidet sich von dem des Ammoniak-Extraktes dadurch, daß hier zusätzlich noch die Malonylginsenoside (vgl. Kapitel 4.4) als Hauptkomponenten angezeigt werden. In Tabelle 4.14 sind die massenspektrometrischen Daten zur Detektion und die Retentionszeiten der Malonylginsenoside ebenfalls aufgeführt.

Zu dem Auftreten von Fragment-Ionen ist zu vermerken, daß das Ion m/z 203 aus einem Glucose/Natrium-Addukt $[Glc+Na]^+$ besteht und demzufolge aus allen Ginsenosiden gebildet werden kann. Aus Abbildung 4.17e sowie Tabelle 4.14 geht hervor, daß die Ginsenoside dieses Fragment-Ion bilden. Lediglich bei R_f und R_o sind die Intensitäten des Ions m/z 203 offensichtlich sehr gering.

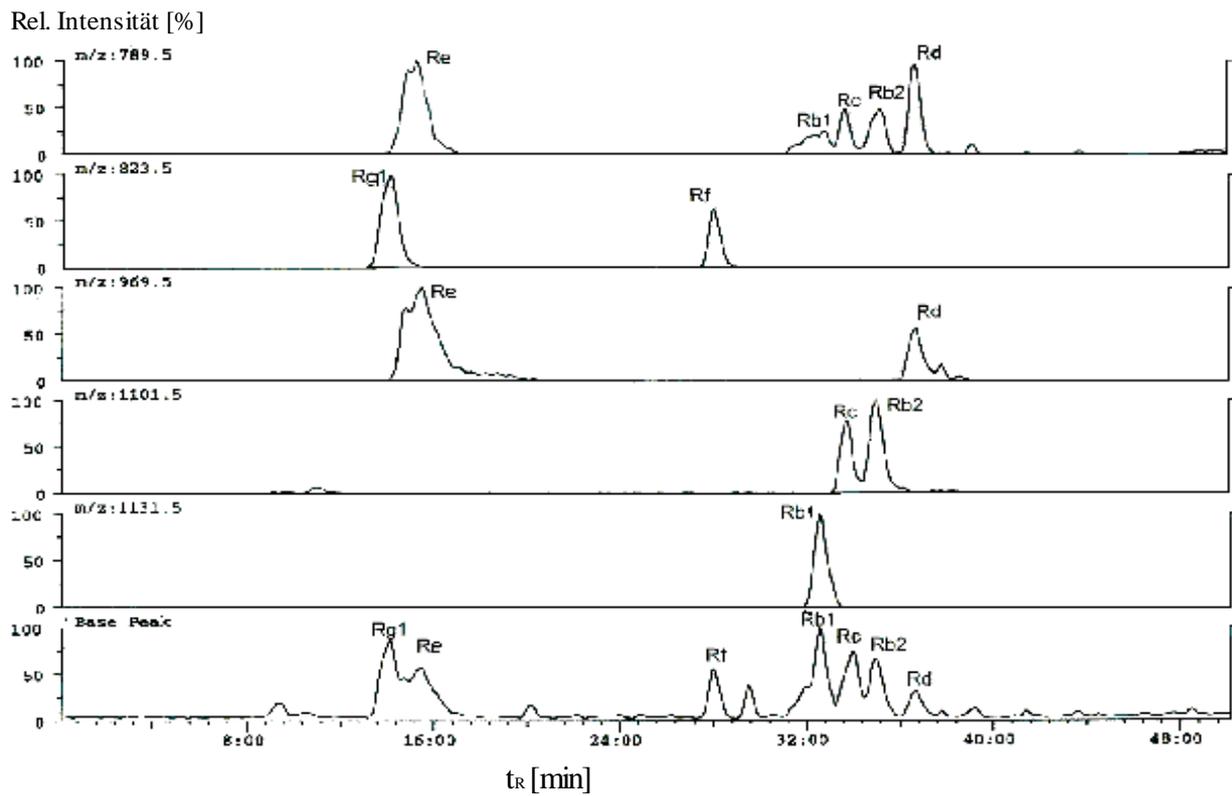


Abb. 4.17a HPLC/MS-Chromatogramm des Ammoniak-Extraktes (4 h Extraktionsdauer)

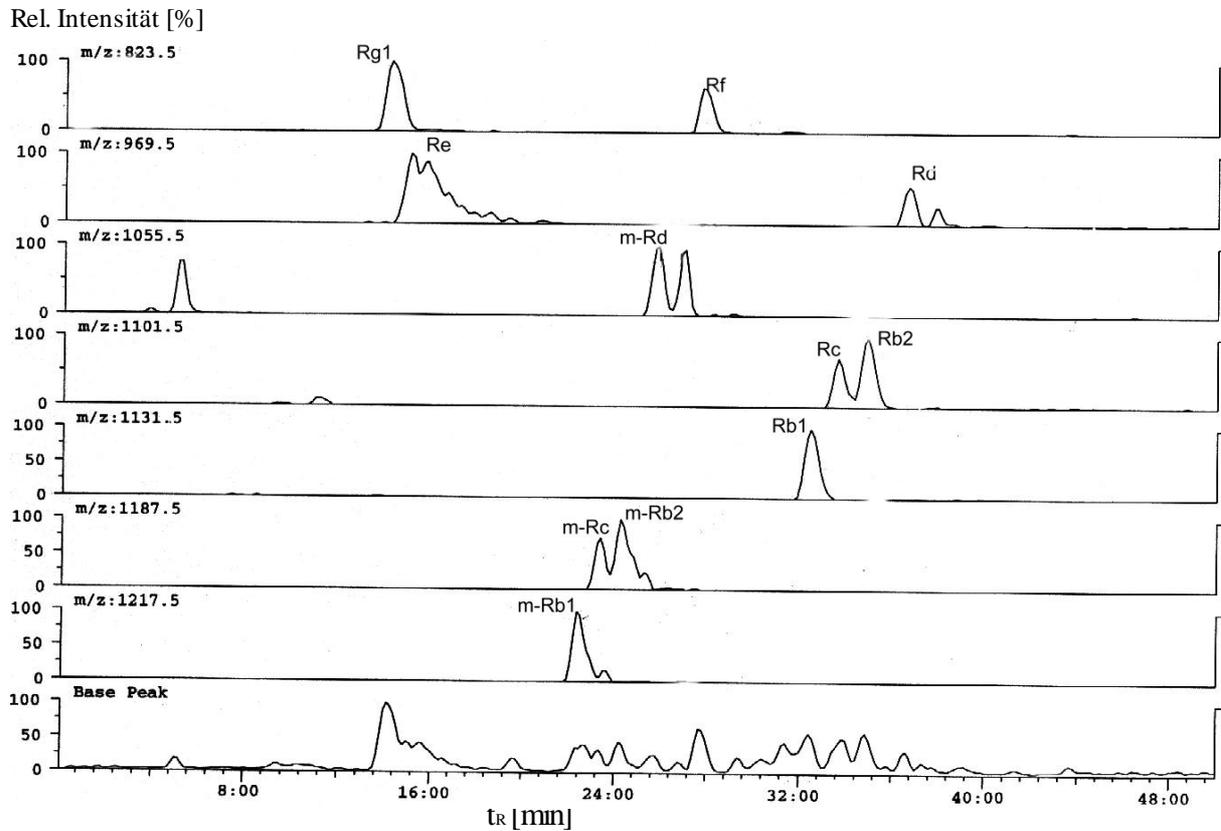


Abb. 4.17b HPLC/MS –Chromatogramm des Methanol-Extraktes (4 h Extraktionsdauer)

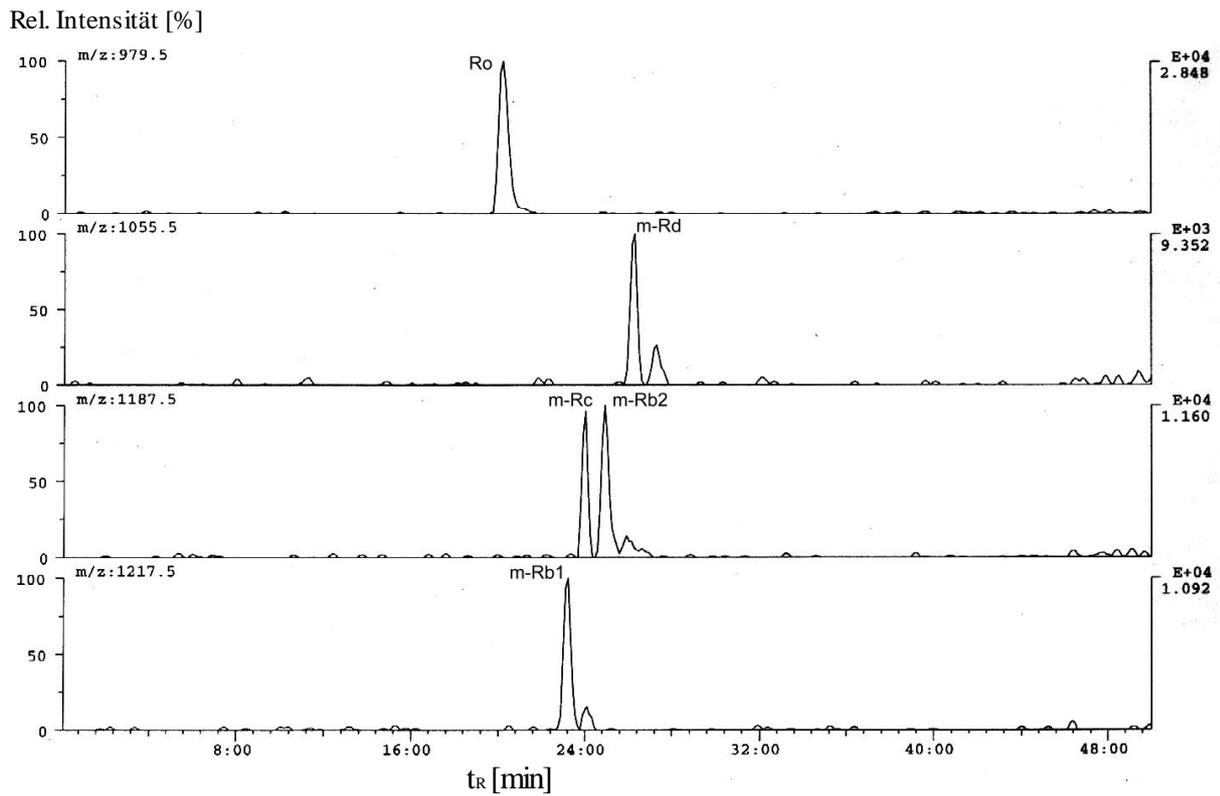


Abb. 4.17c HPLC/MS- Chromatogramm mit den Massenspuren der $[M+Na]^+$ - Ionen des Ginsenosids Ro und den Malonylginsenosiden des Ammoniak-Extraktes

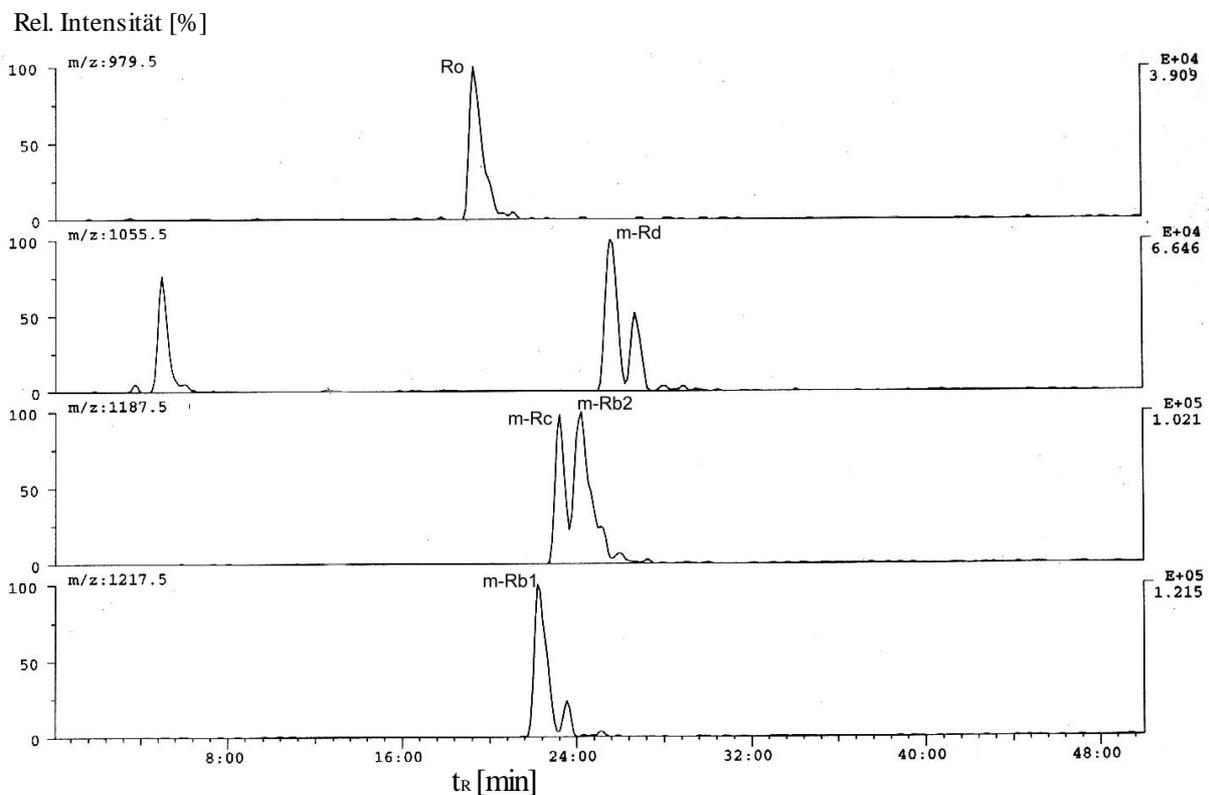


Abb. 4.17d HPLC/MS-Chromatogramm mit den Massenspuren der quasi-Molekülionen des Ginsenosids Ro und den Malonylginsenosiden des 60% Methanol-Extraktes

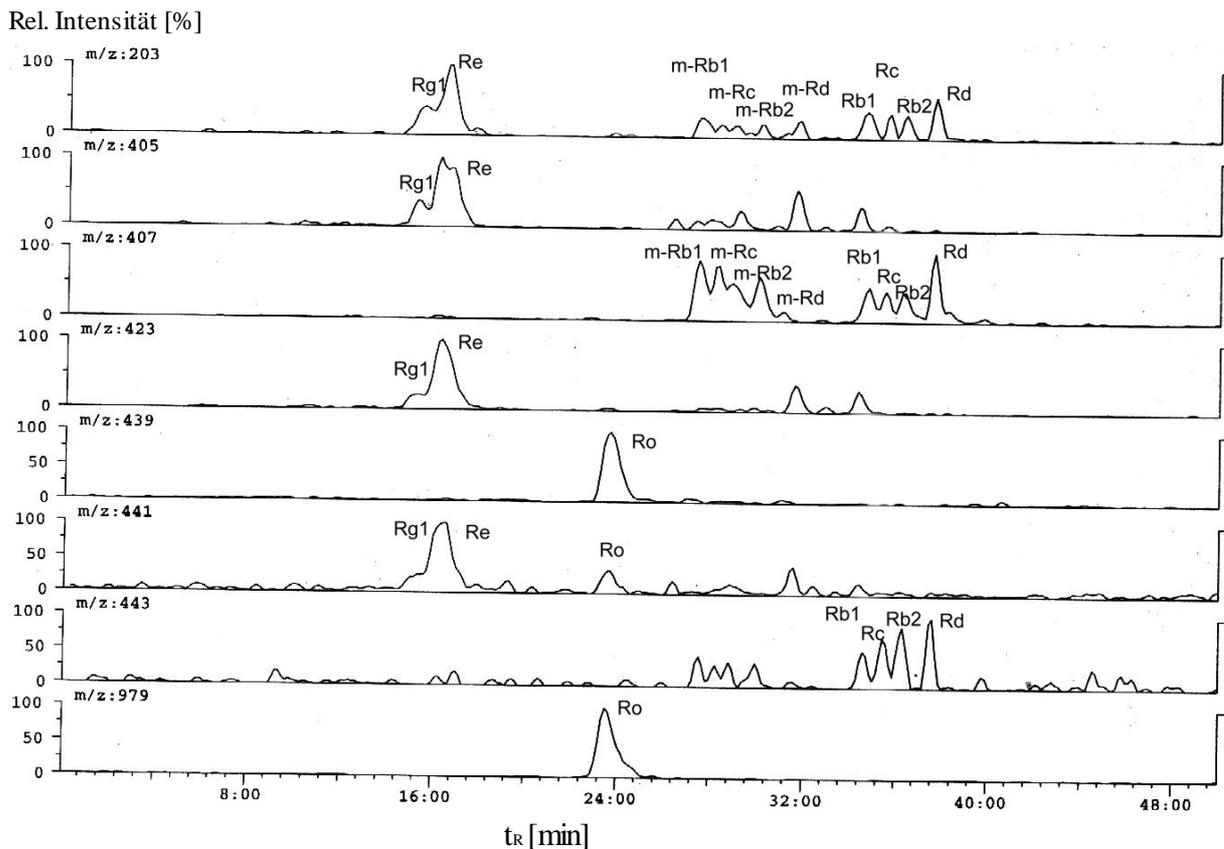


Abb. 4.17e HPLC/MS-Chromatogramm mit den Massenspuren aussagekräftiger Fragment-Ionen der Ginsenoside und des quasi-Moleküls des Ginsenosids Ro des Methanol-Extraktes

Die Fragment-Ionen m/z 407 und 443 treten sowohl in den Massenspektren der 20 (s)-Protopanaxadiole Rb₁, Rc, Rb₂ und Rd als auch in denen der Malonylginsenoside m-Rb₁, m-Rc, m-Rb₂ und m-Rd auf. Die Massenchromatogramme sind in Abbildung 4.17e dargestellt. Für die Massenspektrometrie der 20 (s)-Protopanaxatriole sind die Fragment-Ionen mit m/z 405, 423 und 441 charakteristisch. Die Fragment-Ionen m/z 805, welche noch ein Sauerstoffatom mehr enthalten als die Ionen X⁺ bzw. Y⁺ mit m/z 789 (Strukturen vgl. Abbildungen 4.16a und 4.16b), treten in den Massenspektren des Ammoniak- und des 60% Methanol-Extraktes mit hoher Intensität auf. Außerdem treten diese Ionen bei der Fragmentierung von Rg₁ und Rf auf.

Bemerkenswerte Fragment-Ionen sind die mit m/z 831 und m/z 875, da diese charakteristisch nur für die Malonylginsenoside sind. Bei einer genauen Betrachtung der relevanten Ionen fällt jedoch auf, daß die m-Verbindungen auch im Ammoniak-Extrakt nachzuweisen sind, jedoch

in einer deutlich geringeren Intensität, etwa um den Faktor 10 weniger als im 60% Methanol-Extrakt (vgl. Abbildungen 4.17c und 4.17d).

Im Kapitel 1.1.2 wurde auch das Ginsenosid Ro beschrieben. Diese Verbindung konnte jedoch bei den Untersuchungen mit der isokratischen HPLC und UV-Detektion nicht gefunden werden. Mit Hilfe der Gradient-HPLC/MS gelang es dagegen dieses Ginsenosid eindeutig nachzuweisen. Das Ginsenosid Ro ist sowohl im Ammoniak- als auch im 60% Methanol-Extrakt über das $[M+Na]^+$ - Ion mit m/z 975,5 zu detektieren. Die Intensitäten sind im Gegensatz zu denen der Malonylginsenoside in beiden Extrakten vergleichbar, wie aus den Abbildungen 4.17c und 4.17d hervorgeht. Zusätzlich zur Detektion mit Hilfe des $[M+Na]^+$ - Ions konnte Ro auch durch die Fragment-Ionen mit m/z 439 und 441 identifiziert werden (Abbildung 4.17e).

Tab. 4.14 Massenspektrometrischen Daten und Retentionszeiten der HPLC-Trennung von Ginsenosiden des Ammoniak- und 60% Methanol-Extraktes von Ginsengpulver. (Die Retentionszeiten beziehen sich auf den 60% Methanol-Extrakt.)

Ginsenosid	m/z $[M+Na]^+$	t_R [min]	Fragment-Ionen m/z	Ionenintensität NH ₃ -Extrakt	Ionenintensität MeOH-Extrakt
Rg ₁	823,5	14,0	203, 405, 423, 441, 805	$1,40 \cdot 10^5$	$2,17 \cdot 10^5$
Re	969,5	15,0	203, 405, 423, 441, 789,5	$9,20 \cdot 10^4$	$9,81 \cdot 10^4$
Rf	823,5	27,8	405, 423, 441, 805	$8,97 \cdot 10^4$	$102 \cdot 10^5$
Rb ₁	1131,5	32,6	203, 407, 443, 789,5	$1,61 \cdot 10^5$	$1,47 \cdot 10^5$
Rc	1101,5	33,5	203, 407, 443, 789,5	$8,49 \cdot 10^4$	$9,81 \cdot 10^4$
Rb ₂	1101,5	34,8	203, 407, 443, 789,5	$1,08 \cdot 10^5$	$1,37 \cdot 10^5$
Rd	969,5	36,0	203, 407, 443, 789,5	$5,17 \cdot 10^4$	$4,66 \cdot 10^4$
m-Rb ₁	1217,5	22,3	203, 407, 443, 831, 875	$1,09 \cdot 10^4$	$1,22 \cdot 10^5$
m-Rc	1187,5	23,2	203, 407, 443, 831, 875	$1,12 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^5$
m-Rb ₂	1187,5	24,0	203, 407, 443, 831, 875	$1,16 \cdot 10^4$	$1,02 \cdot 10^5$
m-Rd	1055,5	25,4	203, 407, 443, 831, 875	$9,35 \cdot 10^3$	$6,65 \cdot 10^4$
Ro	979,5	23,6	439, 441	$2,85 \cdot 10^4$	$3,91 \cdot 10^4$

Zur Identifizierung der Hauptginsenoside wurden wieder die $[M+Na]^+$ -Ionen m/z 823,5; m/z 969,5; m/z 1101,5 und m/z 1131,5 aufgezeichnet. Außer diesen Ionen kamen auch die entsprechenden $[M+Na]^+$ -Ionen der Malonyl-Ginsenoside für die Detektion zur Anwendung. Zur Detektion von m-Rd wurde das $[C_{51}H_{84}O_{21} + Na]^+$ -Ion mit m/z 1055,5 eingesetzt. Da die Elutionsreihenfolge der Hauptginsenoside und der Malonyl-Ginsenoside bei dem Gradienten-HPLC-Verfahren und dem isokratischen HPLC-Verfahren außer bei Rg_1 und Re übereinstimmt, wird der erste Peak des Doppelsignals bei m/z 1055,5 dem Malonyl-Ginsenosid m-Rd zugeordnet. Mit der Massenspur von m/z 1187,5 ist m-Rc und m-Rb₂, mit der von m/z 1217,5 m-Rb₁ eindeutig nachgewiesen. Die Ionen m/z 1187,5 besitzen die Summenformel $[C_{56}H_{92}O_{25} + Na]^+$, das Ion m/z 1217,5 hat die Zusammensetzung $[C_{57}H_{94}O_{26} + Na]^+$. Zum Vergleich zu den beiden beschriebenen Extrakten sind die Intensitäten einzelner Ionen im wässrigen Extrakt um den Faktor 10-100 kleiner.

Das Gradienten-HPLC-Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion, ermöglichte sowohl beim Ammoniak- als auch beim 60% Methanol-Extrakt (jeweils 4 h) in dieser Arbeit erstmals den Nachweis des in geringen Konzentrationen vorkommenden Ginsenosids Ro. Interessanterweise konnte auch nachgewiesen werden, daß im Ammoniak-Extrakt (4 h) doch noch Reste der Malonyl-Ginsenoside vorhanden waren, die wie das Ginsenosid Ro in diesen kleinen Konzentration nicht mehr mit der UV-Detektion erfaßbar waren.

Die HPLC/MS-Methode ermöglichte weiterhin eine Absicherung der Zuordnung der chromatographischen Signale zu den einzelnen Malonylginsenosid-Spezies, von denen keine Referenzsubstanzen verfügbar waren.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Extraktionen von Ginsengwurzelpulver mit verschiedenen Extraktionsmitteln, die Umwandlung der sauren in die neutralen Ginsenoside und einige Fraktionierungsmöglichkeiten der Ginsenoside untersucht. Um die wertvollen Inhaltsstoffe des Ginsengs, die Ginsenoside, zu extrahieren, wurde Ammoniak (60 °C, 20 bar), 60%iges Methanol (75 °C, Normaldruck) und Wasser (100 °C, Normaldruck) eingesetzt. Dafür, insbesondere für die Ammoniak-Hochdruckextraktion, mußten Extraktionsapparaturen konstruiert, gebaut und getestet werden.

Zur Beurteilung der Ginsenosid-Ausbeuten der einzelnen Extraktionsverfahren waren Analyseverfahren auszuwählen, anzupassen und zu erproben. Ausgewählt wurden HPLC-Verfahren mit UV- bzw. massenspektrometrischer Detektion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen zunächst die Einsetzbarkeit von Ammoniak als Extraktionsmittel, da die neutralen Ginsenoside damit nicht reagieren, aber von Ammoniak gelöst werden. Während die Extraktionen bei einer Extraktionszeit von je 4 Stunden mit siedendem Wasser relativ geringe Ausbeuten an getrocknetem Extrakt (ca. 5 Gew.-%) ergeben, betragen die Ausbeuten mit 60%igem Methanol ca. 13 Gew.-% und mit flüssigem Ammoniak ca. 16 Gew.-%. Die Summengehalte der sieben neutralen Ginsenoside (Hauptginsenoside) Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf und Rg₁ verhalten sich bei den einzelnen Extraktionsverfahren im wesentlichen wie die Extraktausbeuten. Die Hauptginsenosid-Summengehalte wurden für die Wasser-Extraktion mit ca. 0,5%, für 60%iges Methanol mit ca. 1,6% und für Ammoniak mit ca. 2,7% ermittelt.

Ein überraschendes und wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die durch die Ammoniak-Extraktion erfolgte Umwandlung der sauren (Malonyl-) in die neutralen Ginsenoside.

Das HPLC-Chromatogramm eines 60 % Methanol-Extraktes der Ginseng-Wurzel zeigte neben den neutralen Ginsenosiden Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf und Rg₁ noch zusätzliche Komponenten an, deren Identifizierung zunächst nicht möglich war. Dagegen enthielt das Chromatogramm eines Ammoniak-Extraktes (363 K, 4 h) vier der zusätzlichen Signale praktisch nicht mehr. Die Umwandlung wurde durch die mit der Ammoniak-Extraktion verbundenen Konzentrationszunahme der neutralen Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc und Rd im Vergleich zum 60 % Methanol-Extrakt bewiesen.

Da die reinen Malonyl-Ginsenoside als Standards nicht zur Verfügung standen, erfolgte die Zuordnung der chromatographischen Signale zu den einzelnen Spezies zunächst durch eine graphische Darstellung der Abhängigkeit der Retentionszeit-Differenz $t_{R \text{ Ginsenosid}} - t_{R \text{ Malonyl-}}$

Ginsenosid von der Retentionszeit t_R der Malonyl-Ginsenoside bzw. der entsprechenden neutralen Ginsenoside. Beide Auftragungen zeigen lineares Verhalten und führen zu einer Totzeit von $t_0 = 2,9$ min. Die direkte experimentelle Bestimmung der Totzeit ergab 2,7 min.

Die mit der Ammoniak-Extraktion einhergehende Ammonolyse der Malonyl-Ginsenoside ist aus zwei Gründen von Bedeutung: Da zum einen angenommen wird, daß die Malonyl-Ginsenoside nicht oder nur in minderm Maße oder nur verzögert pharmazeutisch wirksam sind, ist neben der Extraktion auch die Ammonolyse zu den neutralen Ginsenosiden pharmazeutisch interessant. Zum anderen sind die sauren Ginsenoside mengenmäßig bedeutend; sie sind nämlich in der Ginsengwurzel in vergleichbarer Menge wie die entsprechenden neutralen Verbindungen vorhanden. Das Extraktionsmittel Ammoniak ist leicht und vollständig verdampfbar. Die bei der Ammoniak-Extraktion entstandene Malonsäureverbindung könnte - falls erforderlich- durch einen Reinigungsschritt, beispielsweise mit Hilfe von reversed-phase-Material, von den neutralen Ginsenosiden abgetrennt werden.

Es wurden auch 60 % Methanol-Extrakte mit wässrigen NaOH-, KOH- und NH_3 -Lösungen zur Umsetzung gebracht und die Produkte mittels der HPLC analysiert. Die Reaktion mit den alkalischen Agenzien führte hierbei ebenfalls zur Umwandlung der sauren Ginsenoside in die neutralen Verbindungen Rb_1 , Rb_2 , Rc und Rd . Es wurden nicht nur methanolische Extrakte nachträglich mit Alkalien behandelt, sondern die Methanol/Wasser-Extraktionen wurden auch direkt in alkalischem Milieu vorgenommen.

Zur Untersuchung der Stabilität der Malonyl-Ginsenoside gegenüber Alkalien wurden 60 % Methanol-Extrakte (240 min, 75 °C) in Wasser gelöst, mit NaOH-Lösungen versetzt und unterschiedliche Zeiten auf 60 °C erhitzt. In allen Fällen verringerte sich der Anfangs-pH mit der Reaktionszeit und die Peakflächen der Malonyl-Ginsenoside nahmen ab. Bei einer Umsetzungszeit von 24 h waren mit der UV-Detektion keine Malonyl-Ginsenoside mehr nachweisbar. Weitere Versuche beweisen die Stabilität der neutralen Ginsenoside gegenüber den stark alkalischen Lösungen.

Die verschiedenen Extraktionen zeigen, daß die Ausbeuten an Ginsenosiden von der Extraktionszeit bei gleichem Extraktionsmittel bzw. vom Extraktionsmittel bei vergleichbarer Extraktionszeit abhängen. Zur Diskussion der sich daraus ergebenden Möglichkeiten von Fraktionierungen wurden die Verhältnisse (Quotienten) der Gehalte an einzelnen Ginsenosiden verglichen. Diese Quotienten der Extraktionen mit kürzerer Zeit (Soxhlet wurde einmal entleert) zu den Extraktionen mit Zeiten von 4 h liegen bei allen Extraktionsmitteln (Ammoniak, 60 %iges Methanol, Wasser) für die Panaxatriole Re , Rg_1 und Rf im allgemeinen höher als für die Panaxadiole Rb_1 , Rc , Rb_2 und Rd . Die Diolverbindungen werden von Ammoniak

besser extrahiert als von 60%igem Methanol, was auch auf der Umsetzung der sauren in die neutralen Ginsenoside beruht. Die Panaxadiole werden durch NH_3 wesentlich besser extrahiert als mit H_2O , aber auch die Panaxatriole werden mit Hilfe von NH_3 mehr extrahiert als mit Wasser. Auch bei diesen „Einmal“-Extraktionen zeigt Ammoniak das beste, Wasser das geringste Extraktionsvermögen.

Es wurden auch Versuche zur Fraktionierung der Ginsenoside durch zweifache Extraktion (Wechsel des Extraktionsmittels und gleichzeitige Änderung der Extraktionszeit) des Ginsengpulvers vorgenommen. Die Quotienten der Chromatogramm-Peakflächen aus den Extraktionen mit 60%igem Methanol 10 min zu Ammoniak 120 min haben mit Ausnahme der Ginsenoside Rg_1 (0,34) und Rf (0,50) Werte zwischen 0,21 und 0,25. Dies bedeutet, daß die 60 % Methanol-Extraktion (10 min) Rg_1 und Rf bevorzugt extrahiert. Diese Ginsenoside werden durch die länger dauernde NH_3 -Extraktion zum Teil aus den Malonyl-Ginsenosiden umgewandelt und bevorzugt abgetrennt.

Peakflächen-Quotienten der Extraktionen Ammoniak 10min / 60% Methanol 120 min:

Die Quotienten der Ginsenoside Rg_1 , Rf , Rb_1 und Rd betragen 0,21 bis 0,27. Die kürzere NH_3 -Extraktion bevorzugt also Rg_1 , Rf , Rb_1 und Rd gegenüber Re , Rc und Rb_2 .

Da diese einfachen Versuche zur Fraktionierung der Ginsenoside durch Extraktionen noch nicht zur Trennung von Gruppen oder einzelnen Verbindungen führten, wurde ein Trennversuch am 60% Methanol-Extrakt mit Hilfe einer präparativen RP-Säule bei Normaldruck durchgeführt. Hier war eine vollständige Trennung der Panaxatriole Re , Rg_1 sowie der relativ polaren Malonyl-Ginsenoside m-Rb_1 , m-Rc und m-Rb_2 von den weniger polaren Verbindungen Rb_1 , m-Rd , Rc , Rb_2 und Rd möglich.

Zum Nachweis sehr geringer Konzentrationen bestimmter Ginsenosid-Spezies und deren Identifizierung wurde die massenspektrometrische Detektion mit Hilfe von quasi-Molekülionen und einigen Fragment-Ionen genutzt. Die sieben Hauptginsenoside waren gut nachweisbar. Im Gegensatz zu dem HPLC/UV-Analysenverfahren hat das HPLC-Verfahren mit der massenspektrometrischen Detektion interessanterweise gezeigt, daß im Ammoniak-Extrakt (4 h) doch noch geringe Konzentrationen an Malonyl-Ginsenosiden vorhanden waren. Durch die HPLC-MS-Untersuchungen wurde weiterhin gezeigt, daß das mit der UV-Detektion nicht identifizierbare, in geringen Konzentrationen in der Ginsengwurzel vorkommende Ginsenosid Ro sowohl im 60% Methanol-Extrakt (4 h) als auch im Ammoniak-Extrakt (4 h) vorhanden war.

6 Literaturverzeichnis

- [1] H. Konodo, G. Tanaka, „Chemical constituents of Korean ginseng“, *J. Pharm. Soc. Japan* **401**, 779 (1915)
- [2] H. Schulten, F. Soldati, „Identification of Ginsenosides from Panax Ginseng in Fractions obtained by High Performance Liquid Chromatography by Field Desorption Mass Spectrometry, Multiple Internal Reflection Infrared Spectroscopy and Thin Layer Chromatography“, *J. Chromatogr.* **212**, 37 (1981)
- [3] R. Kasai, K. Matsura, O. Tanaka, S. Sanda, J. Shoji, „Mass Spectra of Trimethylsilyl Ethers of Dammarane-Type Ginseng-Sapogenins and Their Related Compounds“, *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 3277 (1977)
- [4] Y. Matsushima, Y. Nagata, M. Niyomura, K. Takakusagi, „Analysis of Antipyretics by Semimicro Liquid Chromatography“, *J. Chromatogr.* **332**, 269 (1985)
- [5] H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Matsushima, M. Tomoda, „Preparative high-performance liquid chromatography on chemically modified porous glass“, *J. Chromatogr.* **537**, 243 (1991)
- [6] M.K. Park, J.H. Park, S.B. Han, Y.G. Shin, I.H. Park, „High-performance liquid chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light scattering detection“, *J. Chromatogr. A* **362**, 77 (1996)
- [7] X. Wang, T. Sakuma, E. Safu-Adijaye, G. K. Shiu, „Determination of Ginsenosides in Plant Extracts from Panax ginseng and Panax quinquefolius L. by LC/MS/MS“, *Anal. Chem.* **71**, 1579 (1999)
- [8] T.W.D. Chan, P.P.H. But, S.W. Cheng, I.M.Y. Kwok, F.W. Lau, H.X. Xu, „Differentiation and Authentication of Panax ginseng, Panax quinquefolius and Ginseng Products by Using HPLC/MS“, *Anal. Chem.* **72**, 1281 (2000)
- [9] P. Pietta, P. Mauri, „Hydrolysis of ginsenosides in artificial gastric fluid monitored by high-performance liquid chromatography“, *J. Chromatogr.* **362**, 291 (1986)
- [10] T.G. Petersen, B. Palmqvist, „Utilizing column selectivity in developing a high-performance liquid chromatographic method for ginsenoside assay“, *J. Chromatogr.* **504**, 139 (1990)
- [11] H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Matsushima, M. Tomoda, „Simultaneous determination of ginsenosides and saikosaponins by high-performance liquid chromatography“, *J. Chromatogr.* **507**, 327 (1990)

- [12] H. Kanazawa, Y. Nagata, E. Kurosaki, Y. Matsushima, „Comparison of columns of chemically modified porous glass and silica in reversed-phase high-performance liquid chromatography“, *J. Chromatogr.* **632**, 79 (1993)
- [13] H. Yamaguchi, H. Matsuura, R. Kasai, K. Mizutani, H. Fujino, K. Ohtani, T. Fuwa, O. Tanaka, „Application of Borate Ion-Exchange Mode High-Performance Liquid Chromatography to Separation of Glycosides: Saponins of Ginseng, *Sapindus mukurossi* Buch.-Ham.“, *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 2859 (1986)
- [14] F. Soldati, O. Sticher, „HPLC-separation and Quantitative Determination of Ginsenosides from *Panax Ginseng*, *Panax quinquefolium* and from Ginseng Drug Preparations“, *Plant. Med.* **38**, 348 (1980)
- [15] Y. Nagai, O. Tanaka, S. Shibata, „Chemical Studies on Oriental Plant Drugs XXIV, Structure of Ginsenoside, A Neutral Saponin of Ginseng Root“, *Tetrahedron* **27**, 881 (1971)
- [16] S. Sanada, N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka, S. Shibata, „Studies on the Saponins of Ginseng. I. Structures of Ginsenoside-Ro, -Rb₁, -Rb₂, -Rc and -Rd“, *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 421 (1974)
- [17] S. Sanada, N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka, S. Shibata, „Studies on the Saponins of Ginseng. II. Structures of Ginsenoside-Re, -Rf and -Rg₂“, *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 2407 (1974)
- [18] I. Kitagawa, T. Taniyama, T. Hayashi, M. Yoshikawa, „Malonyl-ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc and Rd, four new Malonylated Dammarane-Type Triterpene Oligoglycosides from ginseng Radix“, *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 3353 (1983)
- [19] B. Griesing, „Flüssigkeitschromatographie von Ginseng-Extrakten aus verschiedenen Extraktionsverfahren“, Diplomarbeit, Universität –GH Siegen 1989
- [20] O. Schilke, E. Hohaus, H. Lentz, J. R. Kim, „HPTLC-Analyse von Ginsenosiden zur Bewertung von Ginseng-Extraktionen mit Methanol-Wasser, Wasser oder Ammoniak“, *Z. Naturforsch.* **46b**, 829 (1991)
- [21] W. C. Chang, S. J. Sheu, „Determination of ginsenosides in ginseng crude extracts by high-performance liquid chromatography“, *J. Chromatogr. A*, **685**, 243 (1994)
- [22] E. Bombardelli, A. Bonati, B. Gabetta, E. M. Martinelli, „Gas-Liquid Chromatographic Method for Determination of Ginsenosides in *Panax Ginseng*“, *J. Chromatogr.* **196**, 121 (1980)
- [23] Hans-Jürgen Schöpfer, „Neuestes aus der Ginsengforschung, *Panax Ginseng* C.A. Meyer, Chemie und Wirkung- eine Übersicht“, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **116**, 1 (1976)

- [24] Ulrich Sonneborn, „Ginseng, Neuere Untersuchungen immunologischer pharmakologischer und endokrinologischer Aktivitäten einer alten Arzneipflanze“, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **9**, 433 (1980)
- [25] U. Kübler, „Neue Aspekte bei der Wirkung von Heilpflanzen unter besonderer Berücksichtigung der Ginseng-Therapie“, *Acta med.* **28**, 1014 (1979)
- [26] A. Obermeier, „Zur Analytik der Ginseng- und Eleutherococcusdroge“, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München 1980
- [27] J.B. Hannay, J. Hogarth, „On the solubility of solids in gases“, *Proc. R. Soc. London*, **29**, 324 (1879)
- [28] G.M. Schneider, E. Stahl, G. Wilke, „Extraction with Supercritical gases“, Verlag Chemie, Weinheim (1980)
- [29] G. Brunner, S. Peter, „Zum Stand der Extraktion mit komprimierten Gasen“, *Chem. Ing. Tech.* **53**, 529 (1981)
- [30] R.R. Maddocks, J. Gibson, D.F. Williams, *Chem. Eng. Prog.* **75**, 49 (1979)
- [31] S. Peter, „Chemical engineering applications of supercritical solvent“, *Ber. Bunsens. Phys. Chem.* **88**, 875 (1984)
- [32] P. Davies, „Thermodynamic functions of gases“, Butterworths, London (1956)
- [33] J.C. Giddings, M.N. Myers, L. McLaren, R.A. Keller, „High pressure gas chromatography of nonvolatile species“, *Science* **159**, 67 (1968)
- [34] J.R. Kim, H. Lentz, „Extraktion von Ginsenosiden mit Ammoniak und Kohlensäure unter erhöhtem Druck“, *Talanta* **35**, 314 (1988)
- [35] W. Funk, V. Dammann, C. Vonderheid, G. Oehlmann, „Statistische Methoden in der Wasseranalytik“, Verlag Chemie, Weinheim (1990)
- [36] P. Pietta, P. Mauri, „Improved HPLC method for the analysis of ginsenosides in Panax Ginseng extracts and products“, *J. Chromatogr.* **356**, 212 (1986)
- [37] O. Schilke, „Extraktion von Ginsengwurzeln mit Ammoniak unter Druck und dünn-schichtchromatographische Charakterisierung der Extrakte“, Diplomarbeit, Universität –GH Siegen 1989
- [38] H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Matsushima, M. Tomoda, „Determination of acidic saponins in crude drugs by high-performance liquid chromatography on octadecylsilyl porous glass“, *J. Chromatogr.* **630**, 408 (1993)
- [39] K. Samukawa, H. Yamashita, H. Matsuda, M. Kubo, „Simultaneous Analysis of Saponins in Ginseng Radix by High Performance Liquid Chromatography“, *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 137 (1995)

- [40] H.Yamaguchi, R.Kasai, H.Matsuura, O.Tanaka, T.Fuwa, ,, High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Acidic Saponins of Ginseng and Related Plants“, Chem. Pharm. Bull. **36**, 3468 (1988)
- [41] I.Kitagawa, T.Taniyama, M.Yoshikawa, Y. Ikenishi, Y.Nakagawa, ,, Chemical Studies on Crude Drug Processing. VI. Chemical Structures of Malonyl-ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc and Rd Isolated from the Root of Panax C.A. Meyer“, Chem. Pharm. Bull. **37**, 2961 (1989)
- [42] W.A.Court, J.G.Hendel, J.Elmi, ,,Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of ginsenosides of Panax quinquefolium“, J. Chromatogr. A, **755**, 11 (1996)

7 Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen, Symbole und Einheiten

Abkürzungen

DC	Dünnschichtchromatographie
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
HPLC/MS	High Performance Liquid Chromatography / Mass Spectrometry (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie/ Massenspektrometrie)
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography (Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie)
MS	Massenspektrometrie
MeOH	Methanol
LM	Laufmittel
RSD	Relative Standard Deviation (Relative Standardabweichung)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
WFR	Wiederfindung

Symbole

H	Trennstufenhöhe
k'	Kapazitätsfaktor
L	Länge der Trennsäule
m	Masse
m/z	Masse-pro- Ladungsverhältnis, „Massenzahl“
N	Trennstufenzahl
Pc	kritischer Druck [Mpa]
R	Auflösung
s	Standardabweichung

T_c	kritische Temperatur [K]
t_R	Retentionszeit [min]
t'_R	Netto-Retentionszeit
t_0	Totzeit [min]
V_c	kritisches Volumen [ml/g]
w	Basisbreite eines Peaks im Chromatogramm
$w_{1/2}$	Peakbreite auf halber Höhe des Peaks
$w(R_x)$	Anteil eines Ginsenosids R_x an der Extraktgesamtmasse [%]

Einheiten

AU	Volt (1 AU = 1 V)
bar	1 bar=10 ⁵ Pascal
°C	Grad Celsius, 0°C = 273,15 K
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
K	Kelvin
l	Liter
m AU•s	Millivolt mal Sekunden (Peakflächen)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Mol
mV	Millivolt
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µS/cm	Mikrosiemens/Zentimeter (Leitfähigkeit)

7.2 Überblick der Ginsenoside und der Extraktionen

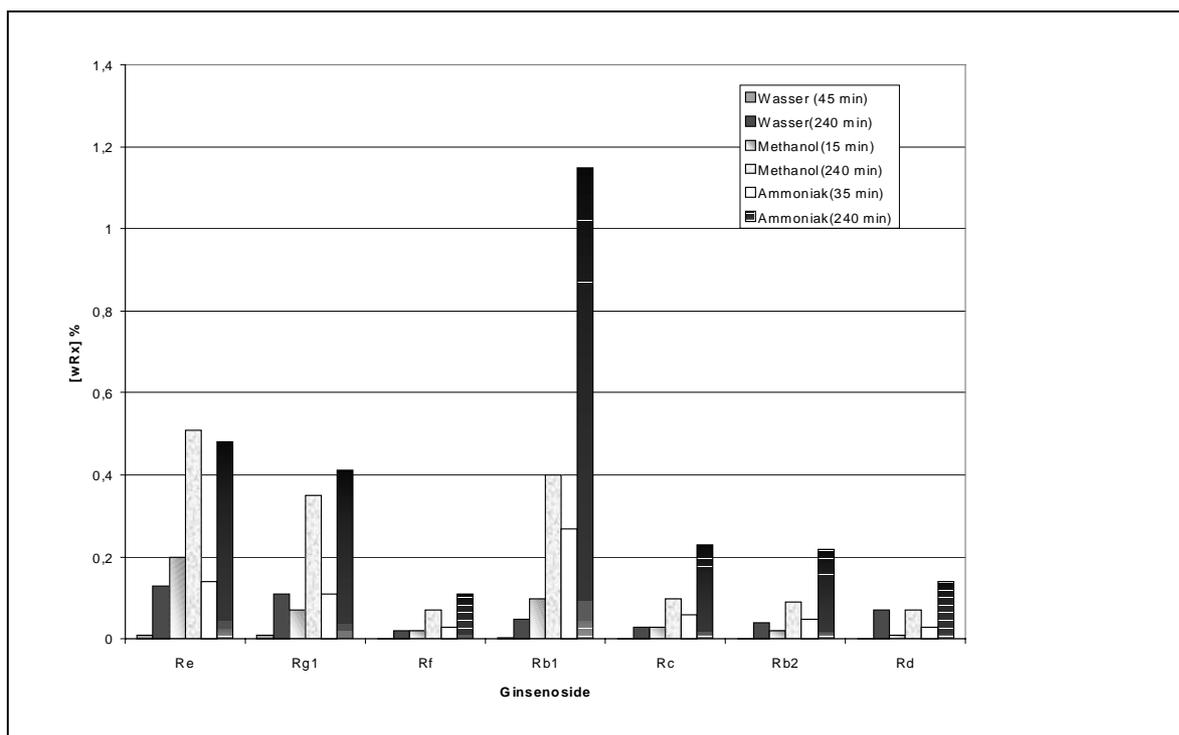
Tab. 7.1 Summenformel und Molmasse

Ginsenosid	Summenformel	Molmasse[g/mol]
Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	947,16
Rf	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801,05
Rg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801,02
Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1109,31
Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1079,28
Rb ₂	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1079,28
Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	947,16

Tab. 7.2 Extraktionsbedingungen, Extraktausbeuten, Summengerhalte der Hauptginsenoside, Hauptginsenosid-Gehalte im getr.Extrakt, Gehalte anderer Pflanzeninhaltsstoffe im Extrakt

Extraktionsmittel	Extraktionsbedingungen			Extraktausbeute [Gew.-%]	Ausbeute an Hauptginsenosiden ΣRx [Gew.-%]	Hauptginsenosid-Gehalte im getr. Extrakt [Gew.-%]	Gehalte andere Pflanzeninhaltsstoffe im Extrakt [Gew.-%] (Ausbeute getr. Extrakt – ΣRx)
	[min]	[K]	[bar]				
Ammoniak	35	334	20	7,80	0,69	9	7,11
Ammoniak	240	334	20	16,2	2,74	17	13,46
60%-Methanol	15	348	1	3,10	0,45	14	2,65
60%-Methanol	240	348	1	13,2	1,59	12	11,61
Wasser	45	373	1	0,80	0,03	4	0,77
Wasser	240	373	1	5,10	0,45	8	4,65

Abb.7.1 Graphische Darstellung der Hauptginsenosid-Gehalte in Ginsengpulver



7.3 Chromatographische Daten

Tab. 7.3 Die Peakflächen [m AU•s] der Chromatogramme der verschiedenen Extrakte

Extraktionsmittel Zeit	Wasser 45 min	Wasser 240 min	Methanol 15 min	Methanol 240 min	NH ₃ 35 min	NH ₃ 240 min	Standard (1µg/20µl)
<i>Ginsenosid</i>							
Re	18975	48287	145903	94420	52815	91073	93313
Rg ₁	46176	96895	126957	152530	98284	179666	220460
Rf	6885	18948	35883	29157	24858	46172	207402
Rb ₁	5203	17314	68105	70618	95266	202772	88400
Rc	5089	18434	34260	32116	39168	76089	164005
Rb ₂	5790	27874	25518	27588	34373	72693	159833
Rd	7925	44310	13814	23169	20709	47907	167759

Tab. 7.4 Peakflächen [m AU•s] der Chromatogramme der alkalischen 60% Methanol-Extrakte (4 h Extraktionszeit)

Ginsenosid	0,01 M NaOH Anfangs-pH=11,98 End-pH=10,01	0,01 M KOH Anfangs-pH=12,02 End-pH=10,21	2,6% wässr. NH ₃ -Lösung Anfangs-pH=11,89 End-pH=9,83
m-Rb ₁	0	0	0
m-Rc	36510	39451	27814
m-Rb ₂	0	0	0
Rb ₁	670254	701560	636067
m-Rd	0	0	0
Rc	261719	276420	270699
Rb ₂	247752	256958	233038
Rd	132811	134092	127414

Tab. 7.5 Peakflächen [m AU•s] der Chromatogramme der nach der Extraktion mit 0,01 M NaOH Lösungen behandelten 60 % Methanol-Extrakte; die anschließende Dauer der Umsetzung mit 0,01 M NaOH ist angegeben. Anfangs-pH=11,30.

Reaktionszeit	10 min (End-pH=10,93)	2 h (End-pH=10,34)	4 h (End-pH=10,20)	24 h (End-pH=9,96)
Ginsenosid				
m-Rb ₁	118032	48349	11774	0
m-Rc	105830	42569	36554	32368
m-Rb ₂	29595	22687	3297	0
Rb ₁	453094	575021	643433	678790
m-Rd	21790	10821	3124	0
Rc	187887	235896	256442	265746
Rb ₂	152632	195018	242096	248611
Rd	95126	112801	123966	129613

Tab. 7.6 Peakflächen [m AU•s] der Chromatogramme der nach der Extraktion mit alkalischen Lösungen behandelten 60 % Methanol-Extrakte

	60%MeOH Extrakt mit 0,1 M NaOH 10min (pH=12,89)	60%MeOH Extrakt mit 0,1 M NaOH 240min (pH=12,84)	60%MeOH Extrakt mit 6,5% wässr. NH ₃ 10 min (pH=12,81)	60%MeOH Extrakt mit 6,5 % wässr. NH ₃ 240 min (pH=12,69)
m-Rb ₁	0	0	0	0
m-Rc	34268	31942	30839	30632
m-Rb ₂	0	0	0	0
Rb ₁	687790	683209	656374	652164
m-Rd	0	0	0	0
Rc	270347	268839	255106	261183
Rb ₂	251408	253842	241122	244817
Rd	131926	132153	130549	137101