



DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR QUALITÄTSFORSCHUNG
(PFLANZLICHE NAHRUNGSMITTEL) E. V.
c/o Fachgebiet Obstbau TUM, 85350 Freising
XXXVII. VORTRAGSTAGUNG, Hannover, 2002

Anwendbarkeit der Diamant-ATR-IR-Technik bei der Qualitätsbewertung von Medizinal- und Gewürzdrogen

Hartwig Schulz und Rolf Quilitzsch

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen,
Institut für Pflanzenanalytik, Quedlinburg

Applicability of the diamond ATR-IR technique for quality evaluation of medicinal and spice drugs.

Abstract: Valuable components occurring in various medicinal and spice plants were studied by a new developed, sophisticated ATR-FT-IR technique. The field-portable FT-IR instrument used in this study provides reliable results in a very short time and offers a simple and low-cost solution especially for on-site measurements. Based on the received spectroscopic data a discrimination of different chemotypes or quantifications of individual essential oil components can be easily performed. Furthermore, the described spectroscopic technique has the potential to replace existing analytical procedures such as GC or chemical-physical measurements usually applied for quality control purposes.

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenanalytik, Neuer Weg 22-23, D-06484 Quedlinburg, E-Mail: H.Schulz@bafz.de

Einleitung

Während es in den letzten Jahren gelang, die Nah-Infrarot-Spektroskopie zur Bestimmung wertgebender Inhaltsstoffe in unterschiedlichen Pflanzenbestandteilen verschiedener Medizinal- und Gewürzpflanzen (Blätter, Wurzeln, Früchte, Blüten) erfolgreich einzusetzen [1,2], konnten entsprechend verwertbare Mittel-Infrarot (MIR)-Spektren von pflanzlichen Drogen bisher nicht erhalten werden. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass bei den herkömmlichen ATR-Messzusätzen kein ausreichender Kontakt zwischen der pflanzlichen Probe und dem ATR-Kristall hergestellt werden konnte. Lediglich für einige ausgewählte Lebensmittelprodukte wie z.B. Pflanzenöl, Marmelade und Wein wurden bisher effiziente IR-Routinemethoden zur Quantifizierung wertgebender Inhaltsstoffe beschrieben [3-5]. Erst seit kurzem ist es mit Hilfe der neu entwickelten Diamant-ATR-Technik (Abbildung 1) nun auch möglich, sehr gut aufgelöste und interpretierbare MIR-Spektren von pflanzlichen Proben ohne Durchführung aufwendiger Vorbereitungsschritte zu registrieren [6]. Durch eine spezielle Anpressvorrichtung können hierbei optimale und reproduzierbare ATR-Bedingungen bei variabel einstellbaren Drucken erzielt werden. Durch den für ATR-Messungen erforderlichen optimalen Kontakt des zu untersuchenden Pflanzenmaterials mit dem Zink-Selenid-Kristall werden intensive, fein strukturierte und gut reproduzierbare Spektren im Wellenzahlenbereich 650 - 4000 cm^{-1} erhalten.

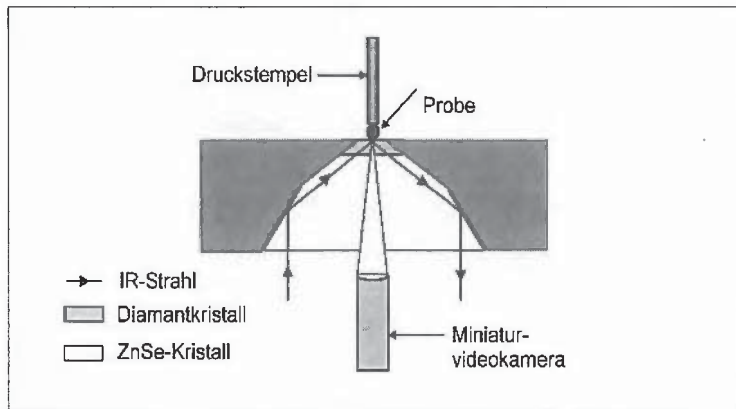


Abb.1: Schematischer Aufbau des ATR-Kristallverbundes aus Diamant/Zinkselenid

Methodik

Feste Pflanzenbestandteile werden schonend homogenisiert und mit definiertem Druck auf den Zn/Se-Kristall gepreßt. Die Reflexionsspektren werden im Bereich von $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} registriert. Flüssige Proben (z.B. Lösungsmittel-extrakte oder CO_2 -Extrakte von Pflanzen, ätherische Öle) werden direkt auf den Diamantkristall aufgetragen. Da der Durchmesser des ATR-Kristalls lediglich $1,8 \text{ mm}^2$ beträgt, reicht für die Messung eine Probenmenge von ca. $2 - 5 \mu\text{l}$ aus. Die inhaltsstofflichen Referenzdaten werden üblicherweise mit Hilfe standardisierter Chromatographie-Methoden (GC und HPLC) erstellt; prinzipiell ist es aber auch möglich, die erhaltenen IR-Daten mit Summenparametern wie z.B. dem Gehalt an ätherischem Öl sowie anderen Arzneibuch-Kennzahlen wie z.B. der Esterzahl, dem Aldehydgehalt oder dem optischen Drehwert zu korrelieren. Die Kalibrationsentwicklung der jeweiligen IR-Bestimmungsmethode erfolgt mit Hilfe kommerzieller Statistikprogramme (GRAMS/PLSplus/IQ bzw. OPUS/QUANT2). Für die quantitative Auswertung wird der PLS-Algorithmus mit der jeweils optimalen Anzahl an PLS-Faktoren genutzt. Die Leistungsfähigkeit der entwickelten Methoden wird anhand des Bestimmtheitsmaßes (R^2) sowie des Standardfehlers der Kreuzvalidation (SECV) beurteilt.

Ergebnisse und Diskussion

Anhand ausgewählter Modellsysteme wurde versucht, die Praxistauglichkeit der neu entwickelten ATR-IR-Methoden zu bewerten. In diesem Zusammenhang wurden an den ausgereiften, getrockneten Fruchtkapseln von Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.) bei insgesamt 153 Einzelpflanzen-Proben mit stark variierenden Alkaloidgehalten IR-Messungen im Bereich von 700 bis 2000 cm^{-1} durchgeführt. Die dabei erhaltenen spektralen Daten weisen eine gute Korrelation zu den mittels HPLC ermittelten Morphingehalten ($0,001 - 0,731 \%$) in der Droge auf ($R^2 = 0,84$; $\text{SECV} = 0,07 \%$). Da die beschriebene Methode bei Vorliegen einer geeigneten Kalibrationsfunktion innerhalb weniger Sekunden zuverlässige Analysenergebnisse liefert, bestehen sowohl in der Züchtung als auch in der Qualitätskontrolle interessante Anwendungsbereiche. Es ist im Rahmen weiterführender Arbeiten vorgesehen, entsprechende Kalibrationen auch für frische Pflanzenmaterialien

(Kapseln im Milchreifstadium) sowie für Morphinpräparate zu entwickeln. In diesem Zusammenhang soll auch versucht werden, die Verteilung der einzelnen Mohn-Alkaloide (Morphin, Codein, Thebain) in den angeführten Matrices simultan zu erfassen.

Da das eingesetzte, mobile IR-Spektrometer mit einer 12V-Autobatterie betrieben werden kann, eröffnen sich im Rahmen der Chemotyp-Differenzierung von Pflanzenpopulationen interessante Perspektiven für eine effiziente Einzelpflanzenanalytik in den jeweiligen Habitaten. Mit Hilfe der beschriebenen Analysetechnik können vor Ort Früchte verschiedener Umbelliferenarten wie z.B. Kümmel, Fenchel, Dill, Sellerie oder Cumin im Hinblick auf die jeweilige Zusammensetzung des ätherischen Öls untersucht werden. Die Umbelliferenfrüchte werden für die IR-Messung mit Hilfe der ATR-Anpressvorrichtung zerquetscht und das austretende ätherische Öl spektroskopisch vermessen; dieser Vorgang kann über das im Gerät integrierte Videomikroskop visuell gut verfolgt werden. Da bei dieser Probenzuführungstechnik auch spektrale Informationen der Pflanzenmatrix (z.B. Cellulosebestandteile des Fruchtkörpers) mit erfasst werden, können teilweise Schlüsselbanden der Ätherisch-Öl-Inhaltsstoffe überlagert werden, so dass hierdurch teilweise die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse erheblich erschwert wird. Alternativ bietet es sich daher an, die pflanzliche Probe in Gegenwart einer geringen Menge Tetrachlorkohlenstoff in einem Mörser zu verreiben und nachfolgend einige μL des resultierenden Mikro-Extraktes auf den ATR-Kristall aufzutragen. Das Lösungsmittel ist bereits nach kurzer Zeit abgedampft; auch eventuell noch vorhandene CCl_4 -Reste stören die Charakterisierung der ätherischen Öle nicht, da nur im Bereich von $740\text{-}780\text{ cm}^{-1}$ Schwingungsbanden dieses Moleküls zu beobachten sind. Eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung von Matrixbestandteilen besteht darin, mit Hilfe einer mobilen Mikro-Wasserdampf-Destillationseinheit eine geringe Menge des ätherischen Öls vor Ort für die IR-Bestimmung zu gewinnen.

Innerhalb der Art *Foeniculum vulgare* L. sind gegenwärtig fünf unterschiedliche Fenchel-Chemotypen beschrieben worden. Die Abgrenzung der einzelnen Formen erfolgt dabei anhand der unterschiedlichen Gehalte an Anethol, Estragol, Piperitenonoxid, Limonen und γ -Asaron im ätherischen Öl der Fenchel Früchte [7]. Da die angeführten Ätherisch-Öl-Inhaltsstoffe jeweils charakteristische Schlüsselbanden im IR-Spektrum aufweisen, ist eine qualitative Typisierung unbekannter Fenchel Früchte innerhalb weniger Sekunden ohne weiteres durchführbar (Abbildung 2). Im Bereich um 1740 cm^{-1} ist bei den IR-Spektren aller Chemotypen die intensive C=O-Valenzschwingung des Fenchons zu erkennen. Die Chemotypen A, B und C weisen zusätzlich die charakteristischen Aromatenbanden bei 1245, 1509 und um 1610 cm^{-1} auf. Für eine Differenzierung des Anethol-Typs (A) und des Estragol-Typs (C) können die Markerbanden bei 786, 963 und 1282 cm^{-1} (Anethol) sowie bei 1034 cm^{-1} (Estragol) sehr gut herangezogen werden. In entsprechender Weise sind in dem Spektrum B (49 % Estragol und 18 % Anethol im isolierten ätherischen Öl) die Absorptionsbanden beider Komponenten zu finden. Die intensive Bande des Piperitenonoxids (Spektrum D) fällt mit der Fenchonbande zusammen; alle anderen Absorptionen werden durch unspezifische C-H-Valenz- und Deformationsschwingungen (insbesondere von dem im Öl zu etwa 45 % enthaltenen Limonen) verursacht. Das Spektrum des γ -Asaron-Typs weist neben der Fenchonbande (1743 cm^{-1}) die typischen Aromatenschwingungen (1204 , 1511 und 1608 cm^{-1}) sowie die durch C-O-Valenzschwingungen der Methoxy-Substituenten verursachte breite Bande bei 1039 cm^{-1} auf.

Thymian (*Thymus vulgaris* L.) wird heute hauptsächlich zur Gewinnung des ätherischen Öls im Mittelmeerraum angebaut. Der heimische Anbau (vor allem Thüringen und Sachsen-Anhalt) orientiert sich dagegen in erster Linie auf die Verwendung als Medizinaldroge (Herstellung von Thymianfluidextrakten entsprechend DAB) sowie als Bestandteil von Gewürzmischungen. Seit kurzem werden Thymianöle und -extrakte aufgrund ihrer antibiotischen und antioxidativen Eigenschaften auch vermehrt in Tierfutter-Mischungen eingesetzt.

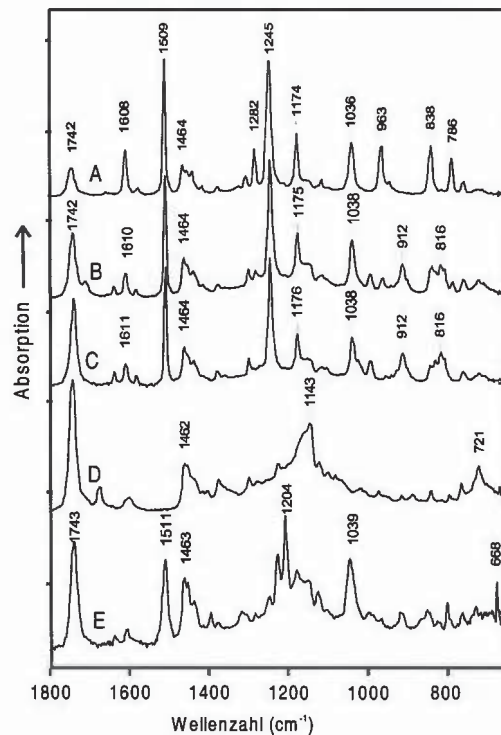


Abb.2: ATR-IR-Spektren von Fenchelfrucht-Mikroextrakten unterschiedlicher Chemotypen (A = Anethol-Typ, B = Anethol/Estragol-Typ, C = Estragol-Typ, D = Piperitenoxid-Typ, E = γ -Asaron-Typ)

Die in Abbildung 3 wiedergegebenen IR-Spektren der beiden Thymian-Chemotypen zeigen im Fingerprint-Bereich zwischen $900\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ deutlich die spektralen Unterschiede der beiden isomeren phenolischen Komponenten Carvacrol und Thymol; auch ohne Anwendung chemometrischer Auswerteverfahren läßt sich daher bereits eine qualitative Differenzierung der beiden Chemotypen sicher durchführen. Als Markerbanden können für Carvacrol die Absorptionsbanden bei 994 , 1116 sowie 1175 cm^{-1} und für Thymol die Absorptionsbanden bei 944 , 1090 sowie 1286 cm^{-1} herangezogen werden.

Fazit

Die vorgestellten ATR-IR-Methoden eröffnen völlig neue Möglichkeiten, schnelle Inhaltsstoff-Screenings von Wildpflanzen vor Ort (z.B. im Rahmen einer botanischen Sammelreise) durchführen zu können. Eine aufwendige Probenvorbereitung ist in der Regel nicht erforderlich, so dass die Messungen innerhalb weniger Minuten vorgenommen werden können. Im Gegensatz zur Nah-Infrarot-Spektroskopie sind prinzipiell keine umfangreichen Kalibrationsentwicklungen auf Basis zeitintensiver Referenzanalysen notwendig, sofern

lediglich eine Differenzierung unterschiedlicher Chemotypen angestrebt wird. Allerdings kann im Rahmen von Routinemessungen die Auswertung der Spektren wesentlich vereinfacht werden, wenn auf Basis einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) eine chemometrische Interpretation der spektralen Daten "automatisch" erfolgt. Da ätherische Öle oder Pflanzenextrakte hinsichtlich der Proben-Homogenität unproblematisch sind, lassen sich mit Hilfe geeigneter GC-Referenzdaten leistungsfähige Kalibrationsdatensätze entwickeln, die zuverlässige Bestimmungen der einzelnen Ölinhaltsstoffe zulassen. Anhand der chemometrischen Kenndaten R^2 und RMSECV wird für einzelne Kamillenöl-Inhaltsstoffe demonstriert, dass die angeführten Terpene mit sehr hoher Vorhersage-Qualität schnell und zerstörungsfrei auch bei Einsatz sehr geringer Probenmengen simultan bestimmt werden können (Tabelle 1). Für Thymian- und Basilikumöle konnten bei Anwendung des PLS-Algorithmus Kalibrationsgleichungen mit vergleichbarer Leistungsfähigkeit entwickelt werden, die bzgl. der Präzision den zugrunde liegenden GC-Referenzdaten kaum nachstehen.

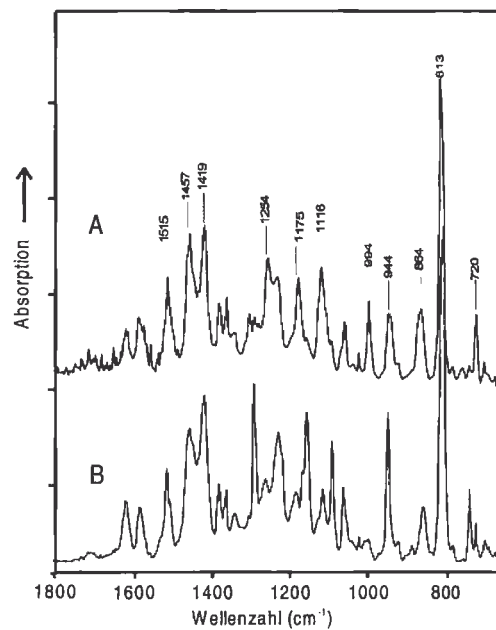


Abb.3: ATR-IR-Spektren der ätherischen Öle unterschiedlicher Thymian-Chemotypen (A = Carvacrol-Typ, B = Thymol-Typ).

Tabelle 1: IR-Korrelationsdaten einiger Kamillenöl-Hauptkomponenten (N= 53)

Ölkomponente	Bereich (%)	R ²	RMSECV (%)
α-Bisabolol	0 – 55,51	0,98	2,0
Bisabololoxid B	0 – 14,1	0,91	1,1
Chamazulen	0 – 16,84	0,96	0,9
cis-Spiroether	0 – 14,47	0,99	0,5
α-Farnesen	0 – 10,23	0,95	0,8
β-Farnesen	0 – 54,15	0,98	2,3

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. Manfred Feustel (Resultec Analytic Equipment in Garbsen, Germany) für die Bereitstellung eines TravelIR Spektrometers. Für die sorgfältige Durchführung der analytischen Arbeiten danken wir darüber hinaus den Mitarbeiterinnen Bärbel Zeiger, Dinka Colditz und Cornelia Helmund.

Literatur

1. H. Schulz, B. Steuer, H. Krüger, W. Schütze: Möglichkeiten und Grenzen NIR-spektroskopischer Qualitätsbestimmung pflanzlicher Drogen. *Z. Arzn. Gew. Pfl.* 2001, 3, 138 - 142.
2. H. Schulz: Application of NIRS in analysis of coffee, tea, tobacco, medicinal & aromatic plants and related products. In: *Near Infrared Spectroscopy in Agriculture* (Eds.: C. Roberts, J. Workman, J. Reeves). *A Tri-Societies Monograph* (im Druck).
3. F.R. van de Voort: Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International* 1992, 25, 397-403.
4. M.D. Guillen, N. Cabo: Characterization of edible oils and lard by Fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. *JAOCs* 1997, 74, 1281-1285.
5. R.H. Wilson, P.T. Slack, G.P. Appleton, L. Sun, P.S. Belton: Determination of the fruit content of jam using Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 1993, 47, 303-308.
6. H. Schulz, B. Schrader, R. Quilitzsch, B. Steuer: Quantitative Analysis of various Citrus Oils by ATR/FT-IR and NIR-FT-Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2002, 56, 117 -124.
7. H. Krüger, K. Hammer: Chemotypes of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *J. Essent. Oil Res.* 1999, 11, 79-82.