

Titel

Isolierung und Analytik von Anthecotulid aus *Anthemis cotula* L.

DIPLOMARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplompharmazeut

dem

Fachbereich Pharmazeutische Chemie

der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg

vorgelegt

von **Achim Meyer**

aus **Lich**

- | | |
|--------------|---|
| 1. Gutachter | Frau Prof. Dr. B. Dräger
Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität, Halle |
| 2. Gutachter | Herr Prof. Dr. P. Imming
Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität, Marburg |

Marburg/Lahn, im August 2003

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich in meiner Diplomzeit unterstützt haben.

Im Besonderen folgenden Personen und Personenkreisen:

- meiner Verlobten Julia Kersten
- Herrn Prof. P. Imming für seine nette und fachlich kompetente Unterstützung
- dem AK Imming für eine schöne Zeit
- meiner Familie und zukünftigen Verwandtschaft
- der NMR-Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Uni Marburg unter der Leitung von Dr. T. Kämpchen
- der Homepage von Bioimages.com sowie Julia Orth für die Bilder
- Herrn Dr. B. Hempel (Robugen GmbH, Esslingen) für das NMR-Spektrum von F. Bohlmann
- Herrn Dr. Zimmermann (Medizinische Mikrobiologie, Marburg) für die antimikrobielle Testung des ACs
- Herrn Dr. Tom Wendt (Herbarium der University of Texas, Austin) für die Identifizierung des Voucher specimen

Vor allem aber danke ich Gott für seine Liebe.

Inhaltsverzeichnis

I. THEORETISCHER TEIL	1
1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2. BOTANIK VON ANTHEMIS COTULA	3
3. VOLKSMEDIZINISCHE BEDEUTUNG VON ANTHEMIS COTULA	4
4. INHALTSSTOFFE	5
5. DATEN ZU ANTHECOTULID	6
6. ALLERGENE UND ALLERGIE-TYPEN	8
II. EXPERIMENTELLER TEIL	10
1. ALLGEMEINE VORBEMERKUNGEN	10
1.1 <i>Chromatographie</i>	10
1.2 <i>Spektroskopische und spektrometrische Methoden</i>	10
2. ISOLIERUNG VON ANTHECOTULID	12
2.1 <i>Gewinnung eines AC-Rohextrakts</i>	12
2.2 <i>Qualitativer Nachweis</i>	13
2.3 <i>Chromatographische Gewinnung reinen Anthecotulids</i>	14
2.4 <i>Flash-Chromatographie</i>	16
2.5 <i>Präparative Dünnschichtchromatographie</i>	16
3. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON ANTHECOTULID	17
3.1 <i>Nachweismethoden</i>	17
3.2 <i>Lagerstudie</i>	19
3.3 <i>Testreihe verschiedener Kamillenpräparate</i>	21
3.4 <i>Fazit</i>	23
4. KONFIGURATION UND KONSTITUTION VON ANTHECOTULID	25
5. REAKTION MIT S-NUKLEOPHILEN^{23,24}	27
5.1 <i>Mit L-Glutathion</i>	27
6. ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT	29
III. LITERATURVERZEICHNIS	31

Verzeichnis der Abkürzungen:

AC	Anthecotulid
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
DC	Dünnschichtchromatographie (engl. TLC)
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
FM	Fließmittel
GPP	Geranyldiphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie
KG	Kieselgel
LM	Lösungsmittel
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MRSA	methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NOE	Nuclear Overhauser Effect
Pen-G	Penicillin-G
PSC	präparative Schicht-Chromatographie
RP	reverse phase (Umkehrphase)
SE	Stufen-Entwicklung
t-BME	tert. Butylmethylether
TBME	Gemisch Toluol mit t-Butylmethylether
TMBE31	Fließmittelgemisch Toluol: t-BME = 3 : 1
VRE	vancomycin-resistenter Enterococcus

I. Theoretischer Teil

1. Einleitung und Zielsetzung

In den vergangenen Jahren sind die Zahl und Menge der verwendeten Phytotherapeutika stetig angestiegen. Auch altbekannte Heilpflanzen wie die Kamille erlebten eine Renaissance nicht zuletzt auch durch die Rationalisierung industrieller Verarbeitungsverfahren. Der industrielle Verbrauch von Kamillenblüten stieg über die Jahre auf die beträchtliche Menge von ca. 3500 Tonnen jährlich allein für Deutschland. Dadurch stieg natürlich auch das Interesse an der Kamillenforschung, insbesondere an der Aufklärung der wirksamen Inhaltsstoffe der Kamille. So wurde die volksmedizinische Verwendung der Kamille als Therapeutikum von Entzündungen jeglicher Art sowie Spasmen des Magen-Darm-Traktes wissenschaftlich untermauert. Nach weltweit 47 Publikationen im Jahr 1982 ließen sich im Jahr 2001 bereits 169 Publikationen zum Thema Kamille verzeichnen.¹

Die Kamille besitzt neben ihren anti-inflammatorischen und spasmolytischen Eigenschaften weiterhin ulkusprotektive, wundheilungsfördernde, antibakterielle und karminative Wirkung und gilt in der Volksheilkunde als Universalheilmittel.

Doch das positive Bild der Kamille wurde von Berichten über ihr allergenes Potential getrübt. Wie sich herausstellte, war die Kamille ein Opfer ihrer Verfälschungen geworden. Durch die große Gruppe der Asteraceen und ihrer Artenvielfalt gibt es *Matricaria*- und *Anthemis*-Arten, die Verfälschungen der Echten Kamille (*Matricaria recutita*) hervorbringen. Dazu gehören die Geruchlose Kamille (*Matricaria inodora*), die Strahlenlose Kamille (*Matricaria matricarioides*), die Römische Kamille (*Anthemis nobilis*), die Hundskamille (*Anthemis arvensis*) und die Stinkende Hundskamille (*Anthemis cotula*). Allergene sind sowohl in *Anthemis nobilis* als auch in den restlichen *Anthemis*-Arten zu finden. Dabei ist die Pflanze *Anthemis cotula* besonders auffällig, da sie ein stark allergenes Sesquiterpenlacton, das Anthecotulid (im Folgenden gelegentlich als AC abgekürzt) enthält. Wie Hausen et. al. 1984 feststellten, waren unter 50 berichteten Kamillen-Allergien lediglich 5 echte Kamillen-Allergien und 21 Allergien, die auf *Anthemis cotula* oder *Anthemis*-Arten zurückzuführen waren, ungeachtet der mit Sicherheit existierenden Dunkelziffer.²

Für die Wirksamkeit von Kamillenpräparaten ist die Abwesenheit von Allergenen, besonders des Anthecotulids, daher unabdingbar.

Die Kamille ist heutzutage in vielerlei Produkten enthalten. Angefangen beim Kamillen-Tee und der breiten Produkt-Palette an apothekenpflichtigen Kamillen-Konzentraten findet sich Kamille in fast allen Produkten rund um die Körperpflege zum Zweck der Entzündungslinderung und Beruhigung gereizter Haut. Sollte jedoch die enthaltene Kamille mit *Anthemis cotula* verunreinigt sein und das Allergen AC enthalten, wäre die anti-entzündliche Eigenschaft der Kamille mehr als aufgehoben.

AC ist ein Allergen, das sowohl Allergien vom Sofort-Typ (Typ I) als auch vom Spät-Typ (Typ IV) auslösen kann³, wobei die allergische Spät-Reaktion bedingt durch die stark sensibilisierende Wirkung die eindeutig größere Rolle spielt. Es verursacht bereits in Konzentrationen von 0,1 % deutliche und starke Kontakt-Dermatitiden, vorausgesetzt jedoch eine vorhergehende Sensibilisierung - also ein erster Kontakt mit dem Allergen - ist erfolgt. Anaphylaktische Reaktionen und irritative Hautreaktionen gegenüber AC sind äußerst selten.⁴ In *Anthemis cotula* kommt es in Mengen bis zu 1,8 % vor, des Weiteren wurden geringe Mengen von 0,003 – 0,01 % in einem Chemotyp/Chemodem der Echten Kamille⁵, dem Bisabololoxid B – Typ (Hauptvorkommen in Argentinien und Chile) nachgewiesen.²

In der Literatur findet sich eine vielfach angezweifelte Veröffentlichung von Yamazaki et. al. aus dem Jahr 1982, in der die Autoren in der Echten Kamille AC in Konzentrationen von bis zu 7,3 % gefunden haben wollen.⁶ Die erneute botanische Bestimmung des „Voucher Specimen“ durch Herrn Dr. Tom Wendt (Plant Resources Center, Herbarium der University of Texas, Austin) ergab, dass es sich zweifelsfrei um *Anthemis cotula L.* und nicht um Echte Kamille gehandelt hatte. Der hohe Gehalt von 7,3 % resultiert vermutlich aus der ausschließlichen Verwendung der Blüten (s. Kapitel 2.1).

Ziel dieser Arbeit ist es, das Vorkommen von AC in gängigen Kamillenpräparaten zu überprüfen, sowie verschiedene Eigenschaften des Allergens zu charakterisieren.

Im theoretischen Teil soll zuerst eine kurze Einführung zu Anthecotulid und seiner Stammpflanze *Anthemis cotula* sowie zu Allergenen allgemein und im speziellen Fall gegeben werden.

2. Botanik von *Anthemis cotula*

Anthemis cotula L., die Stinkende Hundskamille, gehört zur Familie der Asteraceen (Compositae). Es handelt sich um eine 30 – 60 cm hoch wachsende, einjährige Pflanze, die bevorzugt auf lehmigen Böden der gemäßigten und subtropischen Zone sogar bis in große Höhen gedeiht. Man findet die Stinkende Hundskamille oft an unbebauten Äckern und Wegrändern.

Sie ähnelt auf dem ersten Blick der Echten Kamille (*Matricaria recutita*). Eine genauere Betrachtung jedoch ermöglicht die eindeutige Differenzierung zwischen beiden Spezies. Im Gegensatz zur Echten Kamille besitzt die Stinkende Hundskamille keinen hohlen Blütenstandsboden (Abb. 1), wodurch sich die Echte Kamille (Abb. 2) eindeutig von allen ihren Verfälschungen unterscheiden lässt. Des Weiteren findet man bei *Anthemis cotula* linealborstige Spreublätter, die zwischen den äußeren Röhrenblüten oft fehlen, und einen kegelförmigen Blütenstandsboden. Die Früchte sind warzig-drüsig gerieft, die Blätter doppelt fiederspaltig, zerstreut behaart.



Abb. 1 (**Blüten-Längsschnitt** *Anthemis cotula*)



Abb. 2 (**Blüten-Längsschnitt** *Matricaria recutita*)

Die Stinkende Hundskamille blüht von Juni bis September und ist aufgrund des intensiven Herbizid-Einsatzes bzw. mangelnder Brach-Flächen immer seltener anzutreffen.

Im Landkreis Marburg-Biedenkopf ist sie in den vergangenen Jahrzehnten nach Beobachtungen des Botanikers Dr. W. Ludwig (persönl. Mitteilung, 2001) sehr stark, in Hessen insgesamt laut „Regionalstelle Hessen zur Floristischen Kartierung Deutschlands“ (W. Schnedler, persönl. Mitteilung, 2001) stark zurückgegangen.

Der Beinamen „Stinkende“ Hundskamille lässt bereits vermuten, dass die Pflanze schon am Geruch erkennbar ist. Das Pflanzenbestimmungsbuch Schmeil/Fitschen – Flora von Deutschland (Quelle & Meyer, 1996) beschreibt den Sachverhalt knapp mit „Pflanze stinkend“. Am stärksten wahrnehmbar ist der Geruch beim Zerreiben der Blätter.

Die Bedeutung von *Anthemis cotula* als Verfälschung von *Matricaria recutita* lässt sich auch an der Tatsache erkennen, dass im angelsächsischen Sprachgebrauch die Gattungen *Anthemis* und *Chamomilla* (*Matricaria*) synonym gebraucht werden.²

3. Volksmedizinische Bedeutung von *Anthemis cotula*

In der Volksmedizin und Esoterik wird *Anthemis cotula* gegen die verschiedensten Leiden und Krankheiten eingesetzt.

Verwendet werden vornehmlich die Blüten, die in unterschiedlicher Zubereitung zur inneren und äußeren Anwendung kommen. Als Kaltmazerat soll es bei missmutigen, launischen bis hysterischen Menschen, Cholerikern, Nörglern und hyperaktiven Kindern beruhigend und emotional entspannend wirken.⁷ Der Dekokt wirkt schweißtreibend, brechreizerregend, antidiarrhoisch, diaphoretisch und blähungstreibend. Äußerlich kommt die Hundskamille in Form von Breiumschlägen, heißen Umschlägen oder Bädern zur Anwendung und wird bei Hämorrhoiden und zur Durchblutungsförderung eingesetzt. Weitere innere Anwendungen sind: Skrofulose, Dysmenorrhoe, Gastritis, Kopfschmerzen, Genesung nach Fieber, etc. .⁸ Die starken Reaktionen der Hundskamille mit der Haut wurden sogar bei Ulzerationen genutzt, da die verursachten Ödeme und Irritationen erheblich leichter abheilen sollen.⁹

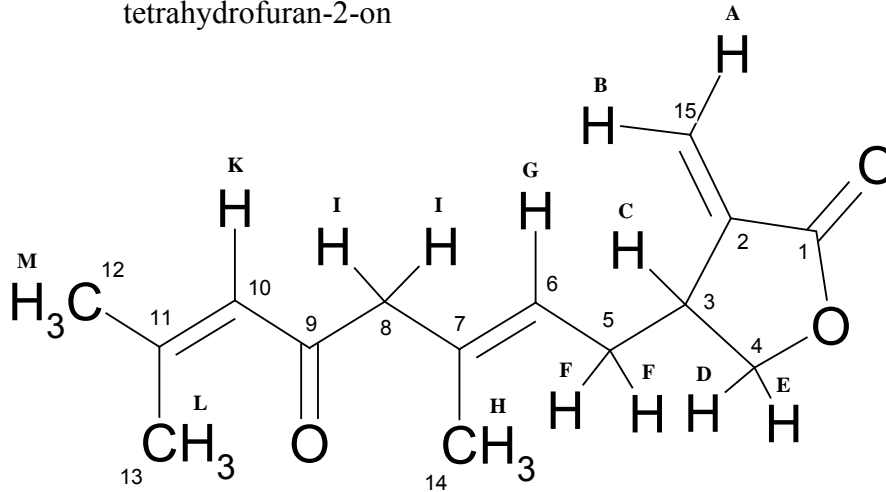
Alle genannten Indikationen sind medizinisch nicht belegt.

4. *Inhaltsstoffe*

- **Sesquiterpenlactone:** Bis zu 1,8 % Antheotulid sowie dessen Derivate ((Z)-6,7-Dehydro-5,6-dihydroantheotuloide; 8-O-Dihydroantheotuloide; (Z)-5-Oxo-6,7-dehydro-5,6-dihydroantheotuloide; 5-Oxo-6,13-dehydro-5,6-dihydroantheotuloide)¹⁰
- 10 % **Flavonoide:** Quercetagetin, Quercetin, Patuletin, Kaempferol¹¹
- 0,2 % **ätherische Öle**, davon 30,5 % Calaren, 20,9 % Farnesen, 15,8 % Farnesol (weiterhin α - und β -Pinen, Camphen, α -Felandren, Borneol, Nerol, Nerolidol u.a.)¹²
- **Magnesium-, Eisen-, Kalium- und Calciumsalze**¹³
- **Oxalsäure, Valeriansäure, Tannine**
- des Weiteren **Farbstoffe** und **Albumine**⁸

5. Daten zu Anthecotulid

IUPAC-Name: (E)-(+)-4-(3,7-Dimethyl-5-oxo-2,6-octadienyl)-dihydro-3-methylen-tetrahydrofuran-2-on



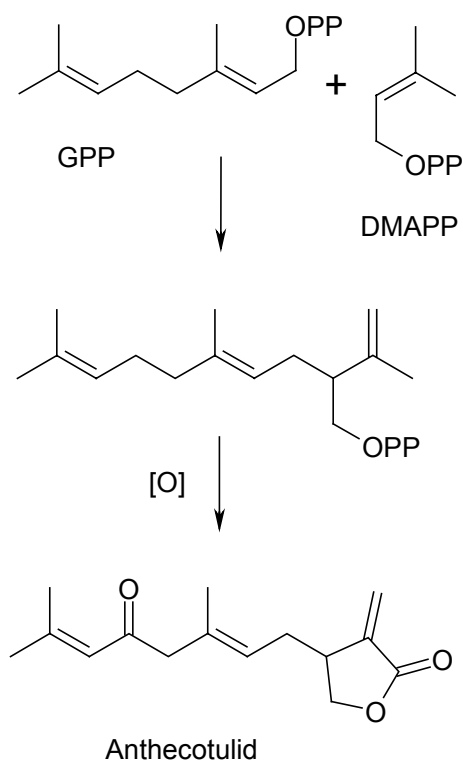
H	δ [ppm]	Multiplizität	C	δ [ppm]
A	6,13	d	1	170,81
B	5,64	d	2	138,07
C	3,15	m	3	38,71
D	3,91	dd	4	70,57
E	4,37	dd	5	32,16
F	2,35	m	6	124,01
G	5,21	tm (t)	7	133,72
H	1,62	d	8	55,05
I	3,00	s	9	198,55
K	6,02	qq (s)	10	122,96
L	2,09	d	11	156,37
M	1,88	d	12	20,72
			13	27,69
			14	16,91
			15	122,27

Tab. 1: $^1\text{H-NMR}$ von Anthecotulid¹²

Tab. 2: $^{13}\text{C-NMR}$ von Anthecotulid (in CDCl_3)¹³

Eigenschaften:	farblose, ölige Flüssigkeit
Löslichkeit:	unlöslich in Wasser; gut löslich in CHCl ₃ , t-BME
CAS-Nr. :	23971-84-8
ABDA Hauptstoff Nr.:	3004739
Summenformel:	C ₁₅ H ₂₀ O ₃
Molekulargewicht:	248,29
Spezifische Drehung:	$[\alpha]_{25}^{578} = + 116^\circ$ (CHCl ₃)
UV-Maxima:	231,5 und 203 nm ($\epsilon = 14100, 14500$)
IR-Maxima:	1780, 1693, 1670, 1625 /cm
Massenspektrum:	m/e 83 (100 %), m/e 55 (20 %), m/e 248 M ⁺ (0,88%), m/e 193 (0,56 %), m/e 151 (1,96 %), m/e 150 (1,08 %), m/e 149 (1,24 %), m/e 123 (1,60 %), m/e 109 (1,88 %), m/e 95 (1,36 %), m/e 93 (1,32 %), m/e 91 (1,72 %)

Anthecotulid ist ein acyclisches, irregulär gebautes Sesquiterpenlacton, da es eine 3,4-Verknüpfung statt einer 1,4-Verknüpfung aufweist (Isoprenregel).¹⁵ Die Biosynthese von Anthecotulid verläuft laut einer Untersuchung von van Klink et. al.¹⁶ über eine Kopf-Kopf-Kondensation von Geranyldiphosphat (GPP) mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), wobei die Isoprenbausteine ausschließlich durch den MEP (Methylerythritolphosphat) Biosyntheseweg gebildet werden.



Der Lacton-Ringschluß erfolgt wahrscheinlich wie bei Costunolid über die oxidative Bildung einer Carbonsäure-Gruppe, die mit einer (ebenfalls durch Oxidation entstandenen) Hydroxyl-Gruppe in γ -Stellung zum Lacton-Ring kondensiert.¹⁷

6. Allergene und Allergie-Typen

Pflanzeninhaltsstoffe können unterschiedliche Reize auf die Haut ausüben. Dabei kann es zu mechanischen, hautreizenden (irritativen), phototoxischen, photoallergischen und allergenen Wirkungen kommen, wobei die allergene Wirkung eindeutig den höchsten Stellenwert hat. Obgleich der Übergang zwischen verschiedenen Allergie-Typen fließend ist, lassen sich neben Sonderformen 4 Haupt-Allergie-Typen charakterisieren^{18,19}:

- **Typ I:** Überempfindlichkeitsreaktion, die durch IgE-Antikörper aus Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten ausgelöst wird und zu einer anaphylaktischen Reaktion führen kann.
- **Typ II:** Überempfindlichkeitsreaktion, die durch Bindung von IgG oder IgM an zellständige Antigene ausgelöst wird. Dazu zählt beispielsweise die Blutgruppenunverträglichkeitsreaktion bei Transfusionen.
- **Typ III:** Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion, die nach Reaktion von IgM oder IgG zu einer Aktivierung des Komplementsystems und nachfolgender Bildung von Immunkomplexen eine Gewebeschädigung auslöst. Als Beispiel hierfür ist die Alveolitis bei der Farmerlunge zu nennen.
- **Typ IV:** Spättyp-Reaktion, die durch Bildung spezifischer CD4-T-Lymphozyten und u.a. Ausschüttung von Lymphokinen cytotoxisch wirkt. Zu den Folgen dieser Reaktion zählt die allergische Kontaktdermatitis. Die Typ IV – Reaktion kann ihr Maximum nach 25 – 72 Stunden bzw. sogar erst nach Wochen erreichen.

Obwohl AC irritative und sogar phototoxische Reaktionen auslösen kann, verursacht es in den meisten Fällen starke bis sehr starke Typ IV – Reaktionen und wird daher in einigen Ländern wie den USA als Giftpflanze geführt.²⁰

Damit eine Substanz kontaktallergen wirken kann, müssen jedoch bestimmte stoffliche Voraussetzungen gegeben sein. Kontaktallergene sind meistens niedermolekulare Verbindungen mit Molgewichten von 100 – 1000, die als **Haptene** bzw. **Prohaptene** fungieren und erst nach Reaktion mit Hautproteinen ein Vollantigen bilden. Prohaptene müssen erst in vollwertige Haptene umgewandelt werden, was meistens durch Abspaltung von Zuckern oder einfache Oxidation erfolgt.¹⁹

Dazu dienen die in der Haut vorkommenden oxidierenden Enzym-Systeme wie das starke Cytochrom-P450-System oder auch Monoaminoxidasen und Peroxidasen.

Haptene bzw. umgewandelte Prohaptene besitzen elektrophile Zentren wie beispielsweise eine α,β -ungesättigte Keton-Gruppierung, die mit einer nukleophilen Gruppierung wie einer SH-, OH- oder NH_2 -Funktion eine Michael-Addition eingehen kann.

Im Fall der Sesquiterpenlactone aus Kompositen-Arten tritt oftmals eine α -Methylen- γ -butyrolacton-Gruppe auf, die durch ihre meist sterisch wenig behinderte exocyclische Methylen-Einheit den Angriffspunkt für Nucleophile darstellt. Für die Entstehung einer Kreuzallergie zu anderen Arten der Kompositen ist jedoch nicht nur dieses Struktur-Merkmal notwendig, sondern auch eine bestimmte Konfiguration des Lacton-Rings v.a. wenn ein weiterer Ring ankondensiert ist (z.B. Isoalantolacton) und die räumliche Ausdehnung des Rests am C-3.²¹

Unter einer Kreuzallergie versteht man eine allergische Reaktion einer von einem primären Allergen sensibilisierten Person auf ein sekundäres strukturverwandtes Allergen. So ist z.B. die Allergenität von Tulipalin A nicht mit der von Isoalantolacton vergleichbar bzw. kann nicht als Kreuzallergie bezeichnet werden trotz gleicher Partialstrukturen. Andererseits tritt im Vergleich von Alantolacton und Isoalantolacton eine Kreuzallergie auf. Der Passus Kreuzallergie sollte daher im Fall der Sesquiterpenlactone nur bei sehr ähnlichen Verbindungen verwendet werden.²²

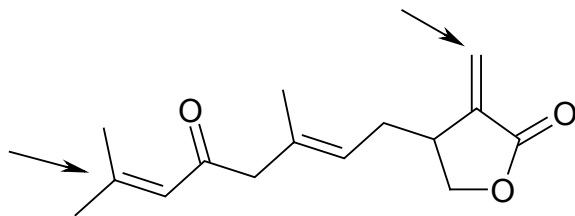


Abb. 3: Angriffspunkte für Nucleophile

Das α,β -ungesättigte Keton von AC ist durch die zwei Methyl-Gruppen stärker sterisch gegen Nucleophile abgeschirmt als die exocyclische Methylen-Gruppe des α -Methylen- γ -butyrolactons. Aufgrund dieser Tatsache wird vermutet, dass physiologische Verbindungen wie Cystein oder Glutathion vornehmlich mit dieser Struktur Michael-Addukte bilden. Wie bereits in einer früheren Studie belegt, hängt jedoch die Reaktivität der elektrophilen Zentren und des Nucleophils sehr stark vom pH-Milieu und vom Nucleophil selbst ab.^{23,24} Dazu später mehr.

II. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Vorbemerkungen

1.1 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie: Zur Dünnschichtchromatographie wurden TLC-, HPTLC- und RP-18-HPTLC-Fertigfolien und -platten der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Genauere Angaben finden Sie im jeweiligen Kapitel. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 254 nm, 366 nm, per DC-Scanner oder alternativ mit Sprühreagenz.

Flash-Chromatographie: Die Flash-Säulenchromatographie wurde entsprechend der Methode von Still²⁵ mit Kieselgel 60, Korngröße 40 - 63 µm (230 - 400 mesh ASTM) der Firma Merck (Darmstadt) durchgeführt.

1.2 Spektroskopische und spektrometrische Methoden

NMR-Spektren: ¹H-, ¹³C-, 2D-H,H-Cosy, 2D-phasensensitive NOESY- und NOE-Differenz-Messungen wurden an einem Jeol Eclipse+ 500 durchgeführt. Die chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die δ-Skala. Als interner Standard diente sofern nicht anders angegeben Tetramethylsilan (TMS). Zur Charakterisierung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s	Singulett
d	Dublett
dd	Dublett von Dubletts
t	Triplet
q	Quartett
m	Multiplett

DC-Scanner: Zur Bestimmung von UV-Maxima und Erstellung von UV-Spektrogrammen wurde ein Dual-Wavelength TLC-Scanner der Firma Shimadzu, CS-930 mit Data Recorder DR-2 verwendet.

Massenspektrometrie: Die Aufnahme der Massenspektren wurde mit einem doppel fokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer vom Typ VG 7070 H der Firma Vacuum Generators (Elektronenstoßionisation, 70 eV) durchgeführt.

2. Isolierung von *Anthecotulid*

2.1 Gewinnung eines AC-Rohextrakts

Etwa 400 g oberirdische Pflanzenteile von *Anthemis cotula* L. (geerntet in voller Blüte Ende Juli 2001 bei Gisseldorf, Kreis Marburg-Biedenkopf) werden mit 6000 ml Chloroform über 1 – 2 Tage mazeriert, abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Trester wird erneut mit 6000 ml Chloroform übergossen und nach ca. 12 Stunden wie oben beschrieben, verfahren.

Zur Entfernung der ionischen und wasserlöslichen Verbindungen wie Salze aus dem Extrakt wird der Rückstand in 400 ml t-Butylmethylether gelöst und nacheinander mit 5 % Zitronensäure, Kaliumhydrogencarbonat und Wasser ausgeschüttelt und über Magnesiumsulfat getrocknet.

Der nächstfolgende Schritt ist die Abtrennung von unpolaren Substanzen und evtl. noch vorhandenen stark polaren Verbindungen. Zum Einsatz kommt die Flash-Chromatographie nach Still²⁵ mit n-Hexan/t-Butylmethylether im Gemisch 1:1. AC eluiert in den grünen Fraktionen und falls die Trennung nicht richtig erfolgt evtl. auch in den folgenden gelben Fraktionen. Die Anwesenheit von AC wurde per DC (5 x 10 cm, Alugram Sil G/UV₂₅₄ KG 60) überprüft (s. 2.2 a) unter Verwendung desselben Fließmittelgemischs wie bei der Flash-Chromatographie.

Die Ausbeute der hier beschriebenen Extraktion beträgt etwa 0,7 %. Hausen et. al. beschreiben eine andere Methode, die jedoch nur eine Ausbeute von etwa 0,3 % liefert.²

Nach alleiniger Extraktion von Blüten bzw. Blättern und Stängeln ergab sich nach spektrometrischer Untersuchung (DC-Scanner) ein 7fach höherer Gehalt von AC in den Blüten von *Anthemis cotula* als in den Blättern und Stängeln. Für hohe Ausbeuten des Sesquiterpenlactons sollten daher möglichst die Blüten verwendet werden.

2.2 Qualitativer Nachweis

a) **Fluoreszenzlöschung:**

AC zeigt eine starke Fluoreszenzlöschung bei 254 nm. Im *Anthemis cotula* Roh-Extrakt ist es nach DC deutlich als dickster Fleck bei 254 nm erkennbar.

b) **Zimmermann-Reaktion:**

AC reagiert als CH-azide Verbindung (α,β -ungesättigtes Keton) mit Polynitroaromaten unter der Bildung eines farbigen Meisenheimer-Salzes und/oder eines Zimmermann-Produkts.²⁶

Sprühlösung A: 10 g 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol in 90 ml Toluol

Sprühlösung B: 6 g NaOH, 25 ml Wasser und 45 ml Methanol

Zur Detektion von Sesquiterpenen, Sesquiterpenlactonen bzw. CH-aziden Verbindungen zuerst mit A besprühen, danach mit B.²⁷

Im Fall von AC tritt eine violette Färbung ein, die jedoch nach 30 min bereits verblasst und eine leichte Braunfärbung hinterlässt. Verwendet man 1,3-Dinitrobenzol als Polynitroaromat so erhält man eine weinrote Färbung, die nach einiger Zeit in einen Violett-Braunton umschlägt.

c) **Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz²⁸:**

Mischung aus Anisaldehyd : Eisessig : konz. H_2SO_4 im Verhältnis 1:98:1 als Reagenz für Terpene. AC färbt sich violett nach Besprühen und Erhitzen auf 100 °C im Trockenschrank (5 – 10 min).

d) **UV-Maximum:**

Anthecotulid besitzt auf Kieselgel lediglich ein UV-Maximum bei 247 nm.

e) **Massenspektrometrie:**

Isoliertes Anthecotulid lässt sich an dem im Spektrum erscheinenden Molekül-Peak M^+ bei 248 und seinem Isotopen-Peak bei 249 erkennen. Liegt AC jedoch an Kieselgel gebunden und/oder in Gemischen mit anderen Substanzen vor, verschwinden der Molekül-Peak und die charakteristischen Fragment-Peaks fast komplett. AC lässt sich somit nicht mehr direkt massenspektrometrisch nachweisen obwohl die Massenspektrometrie mit Nachweisgrenzen im Nanogramm-Bereich eine der empfindlichsten Methoden überhaupt ist und ein Einbringen von AC-haltigem Kieselgel eine einfache Methode der qualitativen Analytik gewesen wäre.

2.3 Chromatographische Gewinnung reinen Anthecotulids

Zum Einsatz kamen DC-Fertigfolien 5 x 10 cm Alugram Sil G/UV₂₅₄ KG 60 der Schichtdicke 0,2 mm. Die Entwicklung der Platten erfolgte über eine Laufstrecke von 8 cm.

Fließmittel 1	Fließmittel 2	Verhältnis FM1:FM2	Rf-Wert AC	Bemerkung
n-Hexan			0,00	
Chloroform			0,05	starkes Tailing
t-Butylmethylether			0,54	
Diisopropylether			0,15	Tailing, teilweise Trennung
Dibutylether			0,06	Aufspaltung von 2 Banden
Methanol			0,74	
Toluol			0,29	Tailing, teilweise Trennung
Dichlormethan				breite Bande, keine Trennung
n-Hexan	t-Butylmethylether	1 : 1	0,19	
n-Hexan	t-Butylmethylether	4 : 6	0,25	
n-Hexan	t-Butylmethylether	3 : 7	0,33	
n-Hexan	t-Butylmethylether	2 : 8	0,42	
n-Hexan	t-Butylmethylether	1 : 9	0,49	
t-Butylmethylether	Toluol	1 : 1	0,37	
t-Butylmethylether	Toluol	1 : 5	0,32	Aufspaltung von 4 Banden
t-Butylmethylether	Toluol	1 : 9	0,27	Aufspaltung von 3 Banden
t-Butylmethylether	Toluol	1 : 3	0,45	Aufspaltung von 5 Banden
t-Butylmethylether	Toluol	1 : 2	0,47	Aufspaltung von 5 Banden
t-Butylmethylether	Chloroform	1 : 1	0,61	mäßige Trennung
t-Butylmethylether	Chloroform	2 : 1	0,52	
t-Butylmethylether	Dibutylether	1 : 1	0,37	keine Trennung
n-Hexan	Dichlormethan	1 : 1	0,22	mäßige Trennung
n-Hexan	Methanol	1 : 1	0,57	mäßige Trennung
n-Hexan	Chloroform	1 : 1	0,17-0,36	keine einheitliche Trennung
Toluol	Dichlormethan	1 : 1		keine Trennung
Methanol	Diisopropylether	1 : 1	0,69	keine Trennung
Methanol	Chloroform	1 : 1	0,77	keine Trennung

Tab. 3: Fließmitteltest per DC

Fazit: Zur Trennung des AC von unerwünschten Begleitsubstanzen ist ein Gemisch Toluol/t-Butylmethylether gut geeignet.

Zur Überprüfung, ob sich eventuell eine Gradienten-Elution gegenüber eine isokratischen Elution als vorteilhaft erweisen könnte, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Auf eine DC-Fertigfolie 10 x 20 cm Alugram Sil G/UV₂₅₄ KG 60 der Schichtdicke 0,2 mm wird in ca. 1 cm Höhe die Probe aufgetragen. Die DC-Platte wird jeweils mit einem Lösungsmittel bzw. Lösungsmittel-Gemisch bis zu einer bestimmten Höhe entwickelt. Zwischen dem Wechsel der Lösungsmittel wird die Platte getrocknet und mit dem neuen Lösungsmittel/-gemisch weiterentwickelt.

Bis zur 1. Markierung (5 cm) mit reinem Toluol, bis zur 2. Markierung (9 cm) mit Toluol/t-Butylmethylether (3:1), bis zur 3. Markierung (13 cm) mit Toluol/t-Butylmethylether (1:1) und mit reinem t-Butylmethylether bis zum Endpunkt (17 cm). Des Weiteren wurde noch eine zweite Stufen-Entwicklung mit Toluol/t-Butylmethylether (3:1) bis zur 2. Markierung und reinem t-Butylmethylether bis zum Endpunkt durchgeführt.

	Toluol/t-BME (3:1)	Toluol/t-BME (2:1)	SE 1 (4 Stufen)	SE 2 (2 Stufen)
Substanz 1	0,3	0,35	0,53	?
Substanz 2	0,39	0,43	0,59	0,59
AC	0,45	0,47	0,63	0,64
Substanz 3	0,48	0,5	0,65	0,67
Substanz 4	0,59	0,61	0,73	0,75

Tab. 4: R_f -Werte aufgetrennter Banden versch. TBME-Gemische

Substanz 1 zeichnet sich durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm aus, findet sich aber im Chromatogramm deutlich unterhalb der AC-Bande. Substanz 2 besitzt Eigen-Fluoreszenz bei 366 nm. Die Substanzen 3 und 4 sind grüne Pflanzen-Farbstoffe.

Wie man an den R_f -Werten bemerkt (Tab. 4), besitzt die Gradienten-Elution gegenüber einer isokratischen Elution mit binärem Lösungsmittelgemisch keinerlei Vorteil.

Die besten Trenn-Ergebnisse von Substanz 1 und 4 zeigen sich also bei einem Verhältnis Toluol/t-BME von 3:1 (fortan als TBME31 bezeichnet). Still et. al. fordern für die Flash-Chromatographie einen ΔR_f -Wert von mind. 0,1 jedoch idealerweise von 0,15 zur vollständigen Trennung zweier Substanzen. Diese Bedingung ist für die Substanzen 1 und 4 erfüllt, die Substanzen 2 und 3 jedoch liegen unabhängig vom LM-Gemisch recht dicht zusammen, so dass eine Abtrennung dieser Substanzen mittels Flash-Chromatographie nicht möglich ist. Hier muss eine andere Technik mit besserer Trennleistung eingreifen.

2.4 Flash-Chromatographie

Nach der Methode von Still²⁵ wurde eine Säule von 5 cm \varnothing und 27 cm Länge mit Kieselgel der Korngröße 43 - 60 μm gefüllt und gepackt. Die Probengröße betrug 2,05 g. Es wurden 50 Fraktionen à 20 ml gesammelt und auf ihren Gehalt überprüft. Dabei enthielten die Fraktion 7 – 10 vornehmlich einen grünen Farbstoff, die Fraktionen 11 – 26 das gros an AC, die Fraktionen 27 – 50 die Substanz 1 und 16 – 29 die Substanz 2 .

Deutlich erkennbar ist, dass sich gemäß den Ergebnissen der DC lediglich 2 Substanzen abtrennen ließen. Die anderen beiden Substanzen die gegenüber AC lediglich einen ΔR_f -Wert von 0,06 bzw. 0,03 besitzen, müssen durch eine Methode mit besserer Trennleistung abgetrennt werden. Dafür eignen sich zum einen die apparativ aufwändigen Verfahren wie HPLC etc. und zum anderen die verhältnismäßig günstige DC. Da es um die Aufreinigung größerer Mengen von Substanz geht, empfiehlt sich die Verwendung der präparativen Schichtchromatographie, die es ermöglicht, Mengen bis zu 1200 mg auf eine Platte aufzutragen.²⁹

2.5 Präparative Dünnschichtchromatographie

Für Mengen bis zu 400 mg kamen 20 x 20 cm PSC-Platten KG60F₂₅₄ der Schichtdicke 2 mm zum Einsatz. Die Entwicklung erfolgte in einer Trogkammer mit Kammersättigung und TBME31 als Fließmittel. Als Referenz diente der *Anthemis cotula* – Rohextrakt. Nach Identifizierung von AC unter UV-Licht (254 nm) wurde die Bande ausgekratzt und das Kieselgel fein gemörsert. Danach wurde t-BME zugesetzt, gut geschüttelt, abfiltriert und eingeeengt.

Die Dünnschichtchromatographie lieferte AC, welches nur noch eine leichten Gelbton besaß und damit fast vollständig von den Pflanzen-Farbstoffen getrennt werden konnte.

3. Quantitative Bestimmung von *Anthemis cotula*

3.1 Nachweismethoden

Es wurde mit dem in Kapitel 2 gewonnenen AC eine Verdünnungsreihe in t-BME hergestellt und mit Einmal-Kapillaren bestimmte Mengen auf eine DC-Platte aufgebracht. Aufgrund der besseren Auflösung der Banden und geringerer Probenmengen im Bereich weniger μg (sogar ng) bis max. 1 mg wurden hier 10 x 20 cm HPTLC-Platten KG60F₂₅₄ verwendet und über eine Laufstrecke von 8 cm mit TBME31 entwickelt.

Verdünnungsreihe:

	AC-Konzentration [%]	AC-Gehalt in 10 μl (μg)
S₁	1,3	130
S₂	0,5	50
S₃	0,1	10
S₄	0,05	5
S₅	0,01	1
S₆	0,001	0,1

Tab. 5

a) **Fluoreszenzlöschung:**

Mit bloßem Auge bereits lässt sich die Beziehung zwischen der Intensität der Fluoreszenzlöschung und der Menge an AC erkennen. Die Erkennungsgrenze liegt hier bei etwa 200 ng. Darunter ist eine Differenzierung unmöglich.

b) **Zimmermann-Reagenz:**

Ebenfalls rein visuelle Auswertung mit einer Nachweisgrenze von 1 μg (vmtl. bis 500 ng) bei Verwendung von 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol als Polynitroaromat (s. Abb. 4).

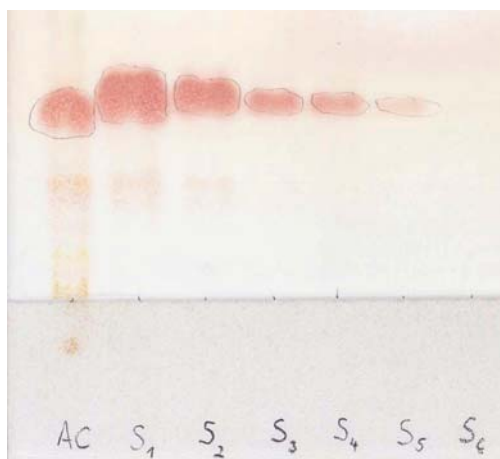
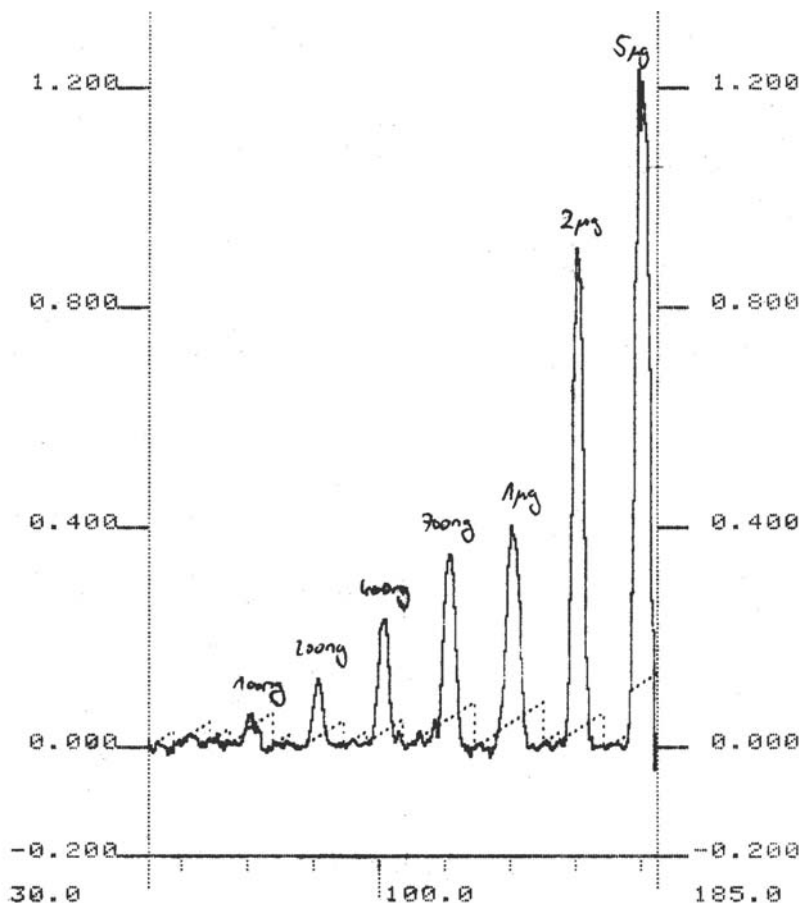


Abb. 4: Standards gegen
Anthemis cotula –

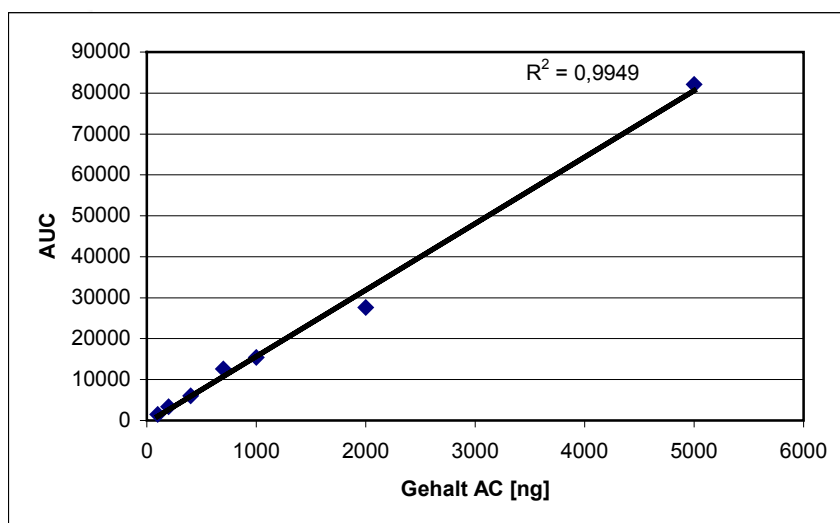
Rohextrakt

c) **UV-Maximum:**

Die Flecke werden über ihre gesamte Fläche mit einer Wellenlänge von 247 nm (s. qualitative Nachweise AC 2.2 d) gescannt. Die Fläche unter den Peaks ist proportional dem AC-Gehalt, was die lineare Regression und ein Bestimmtheitsmaß von 0,9949 eindeutig beweisen (Tab. 6). Als Nachweisgrenze dieser Methode ist nach unten stehender Grafik 100 ng zu wählen.



Gehalt AC [ng]	AUC
100	1494,176
200	3336,461
400	6000,140
700	12576,290
1000	15404,000
2000	27607,880
5000	82070,200



Tab. 6: Lineare Regression der Beziehung AUC/Gehalt AC

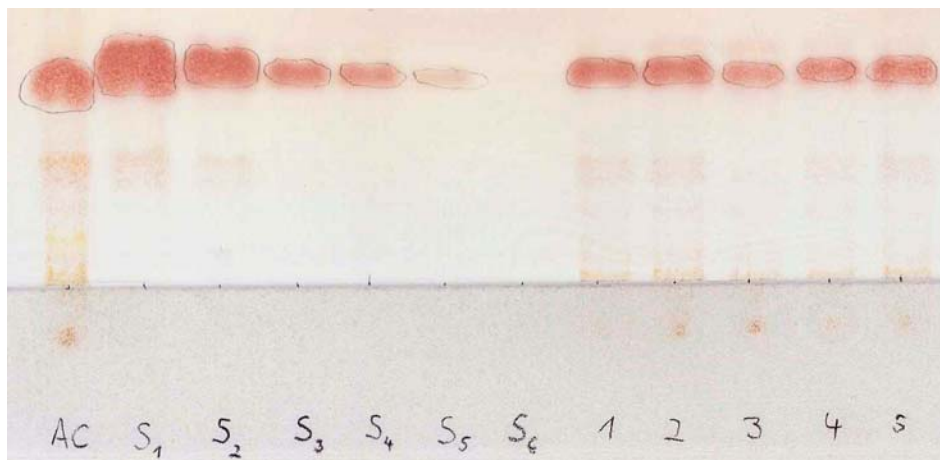
3.2 Lagerstudie

Zur Überprüfung der Stabilität von AC in getrockneten Pflanzenteilen von *Anthemis cotula* wurden Proben bei verschiedenen Temperaturen sowie offenen (Wägegglas) und geschlossenen Gefäßen (Jodzahlkolben mit Schliff) für 2 ½ - 3 Monate gelagert. Danach wurden die Proben mit Chloroform mazeriert und extrahiert und auf die Konzentration von 1g/10ml mit t-BME verdünnt. Es wurden 10 µl je Probe gegen die Standards S₁ – S₆ aufgetragen und auf einer HPTLC-Platte KG60F₂₅₄ mit TBME31 entwickelt.

Probe	Beginn	Temperatur	System
1	13.02.2003	4 °C	offen
2	04.02.2003	21 °C	geschlossen
3	13.02.2003	40 °C	offen
4	13.02.2003	21 °C	geschlossen
5	13.02.2003	21 °C	offen
AC	---	- 30 °C	offen

Tab. 7: **Proben der Lagerstudie**

Der Versuch endete am 4.5.2003. Die Detektion des ACs erfolgte mittels Zimmermann-Sprühreagenz und visueller Auswertung.



Man erkennt deutlich, dass Probe Nr. 3 einen geringeren Gehalt als alle anderen Proben aufweist. Es ist jedoch kein Unterschied zwischen Probe 1 (Kühlschrank) und Probe 2,4 und 5

(Zimmertemperatur) feststellbar. Erst zu Probe AC (Gefriertruhe) ist ein deutlicher Unterschied bemerkbar.

AC ist also in der Blütendroge bei Raumtemperatur mindestens monatelang haltbar, vermutlich noch erheblich länger bei Minus-Graden.

Andererseits ist bei der Destillation von Kamille nicht zu befürchten, dass AC aus Beimischungen von *Anthemis cotula* ins Destillat gelangt, da es sich bei diesen Temperaturen zersetzt.³⁰

AC ist eine sehr stabile Substanz, die gegenüber Luftsauerstoff wenig reaktiv und lichtunempfindlich ist und somit nicht unter Schutzatmosphäre gelagert werden muss.

3.3 Testreihe verschiedener Kamillenpräparate

Die meisten der zurzeit in Drogerien, Supermärkten und Apotheken erhältlichen Kamillenpräparate wurden nach Chloroform-Extraktion auf ihren Gehalt an AC überprüft.



Abb. 5: **Kamille in verschiedensten Zubereitungsformen**

Die Chloroform-Extraktion wurde der entsprechenden Zubereitungsform angepasst.

- Die Tees wurden über 1-2 Tage mit 200 ml Chloroform mazeriert, abfiltriert und das LM abgezogen.
- Die Konzentrate wurden unverändert eingesetzt.
- Das Extrahieren von Bädern, Shampoos, Lotionen, Cremes, Salben und Pasten erwies sich als am problematischsten, da hier große Mengen von Zusatzstoffen wie Tensiden, Emulgatoren und Salzen abgetrennt werden mussten. Dazu wurde zu Beginn mit 200 ml Chloroform und etwa 100 ml Wasser im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Sofern eine Phasengrenze zu beobachten war, wurde die Chloroform-Phase abgelassen, filtriert und das LM abgezogen. Meistens war jedoch eine Emulsionsbildung zu beobachten, die durch Festphasenextraktion separiert werden konnte. Zum Einsatz kam KG 60 der Korngröße 63 – 200 μm (70 – 230 mesh) in einer Glasfritte der Porengröße 3 (15 – 40 μm). Die Chloroform-Phase wurde gefiltert und einrotiert.

Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde ungefähr dieselbe Einwaage extrahiert und nach dem Abrotieren des Chloroforms mit t-BME auf 25 ml aufgefüllt.

Auf die DC wurden immer 10 µl der Lösung aufgetragen, die Kamillen-Konzentrate unverändert. Zur optimalen Trennung der Substanzen wurden 10 x 20 cm HPTLC-Platten KG60F₂₅₄ mit TBME31 als Fließmittel verwendet und gegen die Standards S₃ - S₅ aufgetragen.

Nr.	Zubereitungsform	Name des Präparates	Hersteller	Menge	AC-Gehalt
1	Bad	Intradermi Kamillenbad	Fa. Dr. Fr. Ebert Arzneimittel	10,0 g	--
2	Creme	Wuta Kamille + Glyzerin	Herbacin cosmetic GmbH	10,0 g	?
3	Creme	Florena-Men Shaving Creme	Florena cosmetic GmbH	10,0 g	--
4	Creme	Hand & Nagel Creme	Kamill cosmetics	10,8 g	--
5	Creme	Florena-Handcreme	Florena cosmetic GmbH	10,4 g	--
6	Creme	Atrix Hand Aktiv Pflege	Beiersdorf Hamburg	10,0 g	--
7	Konzentrat	Kamillosan-Konzentrat	Viatrix	1 ml	--
8	Konzentrat	Kamillin	Robugen	1 ml	--
9	Konzentrat	Kamille Spitzner N	Spitzner Arzneimittel	1 ml	--
10	Konzentrat	EuRho Vital Kamillenkonzentrat	EuRho Arzneimittel	1 ml	?
11	Konzentrat	Kamillopur	Steierl Pharma	1 ml	?
12	Konzentrat	Matmille	Dr. E. Ritsert	1 ml	--
13	Konzentrat	Kamille Madaus	Madaus AG Köln	1 ml	?
14	Konzentrat	Eukamillat	Biocur Arzneimittel	1 ml	--
15	Konzentrat	Cesrasanol	Cesra Arzneimittel	1 ml	?
16	Konzentrat	Kamillan Plus	Pharma Wernigerode	1 ml	--
17	Konzentrat	PC 30 N	Terra-Bio-Chemie Kirchzarten	1 ml	--
18	Konzentrat	Kamillan	Pharma Wernigerode	1 ml	?
19	Konzentrat	Chamo S	Johannes Bürger YSATFABRIK	1 ml	--
20	Konzentrat	Kamillan supra	Pharma Wernigerode	1 ml	?
21	Konzentrat	Chinomille	Chinosolfabrik Seelze	1 ml	?
22	Konzentrat	Kamillen-Konzentrat	Bio-Diät-Berlin	1 ml	--
23	Konzentrat	Kamille wild	Primavera life Sulzberg	1 ml	--
24	Lotion	Bübchen Milk	Bübchen Werk Ewald Hermes	10,0 g	--
25	Paste	Colgate Dentagard	Colgate Palmolive Hamburg	10,4 g	--
26	Salbe	Kamilloderm Salbe Plus	Serumwerk Bernburg AG	10,0 g	--
27	Shampoo	Timotei Shampoo Sonnen-Glanz	Lever Fabergé	10,0 g	--
28	Tee	Herba Kamillentee	Westdt. Teehandelsgesellsch.	10,2 g	?
29	Tee	Gut & Günstig Kamillentee	Westdt. Teehandelsgesellsch.	10,2 g	?
30	Tee	Meßmer Kamille	Meßmer Seevetal	10,0 g	--
31	Tee	Tegut – Dt. Küche Kamillentee	Intertee Handelsgesellsch.	10,2 g	?
32	Tee	Teehaus Kamillentee	Teehaus Dresden	10,3 g	--
33	Tee	Edward Tea	Lidl Stiftung & Co KG	10,0 g	--
34	Tee	Kamillenblüten-Tee	Caelo (über Berg-Apotheke Cölbe)	10,0 g	--

Tab. 8: Auf Anthecotulid getestete Präparate

Die in Tab. 8 mit „?“ gekennzeichneten Produkte wiesen eine nicht-eindeutige Fluoreszenzlöschung im Bereich der AC-Bande auf und zeigten mit Zimmermann-Reagenz eine schwache Violett-Färbung. Zur genaueren Differenzierung des Ergebnisses wurde daher eine weitere DC-Methode mit anderer stationären Phase herangezogen.

AC zeigt auf RP-18-Phase eine ähnliche Retention bei mittelpolaren Fließmitteln wie auf Normalphase. Verwendet wurden HPTLC-Platten 10 x 10 cm RP-18 WF₂₅₄S mit 0,2 mm Schichtdicke. Als Fließmittel diente Diisopropylether, womit AC einen R_F-Wert von 0,28 lieferte.

Das Probenvolumen wurde auf 20 µl vergrößert und gegen die Standards S₁ und S₅ unter Kammersättigung in einer Trogkammer entwickelt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht, dann per Zimmermann-Sprühreagenz und ergab für die Nummern 10, 11, 13, 15, 18, 20 und 21 weiterhin keine eindeutigen Befunde.

Als letzte und sensitivste Methode kam der DC-Scanner zum Einsatz. Gemessen wurde die Transmission bei einer eingestrahnten Wellenlänge von 247 nm (Maximum von AC). Der DC-Scanner konnte in keiner Probe AC-Gehalte über 100 ng nachweisen. Im Fall eines Tees entspräche dies einem AC-Gehalt von 0,0013 %, bei einem Kamillen-Konzentrat einem noch geringeren Gehalt von 0,0001 %.

3.4 Fazit

Alle getesteten Kamillen-Präparate waren frei von Antheotulid bzw. enthielten das Allergen höchstens in Spuren bis max. 0,0013 %, was jedoch keinesfalls zur Sensibilisierung gegen die Stinkende Hundskamille ausreicht. Zwar ist die Abwesenheit von AC in Tees nicht unbedingt erforderlich, da es wasserunlöslich ist und bei der Infus-Bereitung vermutlich zum größten Teil zersetzt werden würde, es kann jedoch bei Inhalation von aufsteigendem Dampf mitgerissen werden und Allergien verursachen.³¹

Welche Konzentrationen des Sesquiterpenlactons letztlich zur Sensibilisierung führen können, ist von vielen Faktoren abhängig. Zu den Wichtigsten zählen sicherlich die genetische Disposition und die stete Zunahme von Umwelteinflüssen in den Industrienationen.³²

Die Sensibilisierung gegen AC birgt jedoch nicht nur die Gefahr einer Kontakt-Dermatitis bei erneutem Kontakt, sondern auch die Möglichkeit einer Kreuzallergie gegen andere Kompositen-Arten.

Die allgemein bekannte Asteraceen-Allergie soll hiermit nicht gemeint sein, da die Wissenschaft schon mehrfach Hinweise auf eine Enantiospezifität von Allergenen geliefert

hat.¹⁹ Somit ist eine Sensibilisierung mit einem Allergen gegen alle Allergene derselben Familie sehr unwahrscheinlich.

Nichtsdestotrotz sollte auch die Anwendung der Echten Kamille in punkto Allergie nicht unkritisch betrachtet werden. Für die Cumarine Umbelliferon und Herniarin, die beide in der Echten Kamille vorkommen, wurde bereits der Beweis ihrer allergenen Wirkung erbracht.³³ Auch die Pollen-Allergie, die zwar unabhängig von den Inhaltsstoffen, aber nicht von der Hand zu weisen ist, mahnt zur bedachten Anwendung der Arzneipflanze *Matricaria recutita* bei empfindlichen Personen.

In einer Studie von Hausen et. al. ist ersichtlich, dass alle Kamillen-Chemotypen Reaktionen auslösen können. Z.B. kommt es nach Sensibilisierung mit Kamille vom Bisabololtyp beim erneuten Kontakt mit einer 1 %-igen Lösung bei 50 % der Versuchstiere nach 48 h zu einer mittelstarken Hautreaktion.²

Die Kamille sollte daher in Form von Konzentraten in jedem Fall vorsichtig dosiert werden und wie ein echtes Arzneimittel behandelt werden.

Die Qualität der getesteten Produkte spricht eine deutliche Sprache für die deutschen Hersteller.³ Da derzeit keine Kamille argentinischer Provenienz verwendet wird, entfällt die Möglichkeit einer eventuellen Eintragung von AC über den Kamillen-Chemotyp Bisabololoxid B.

Weiterhin verhindert die jährlich neue Aussaat von Kamille sowie die moderne Anbau-Technik ein Aufkommen von *Anthemis*-Arten.

Das einzige Manko der meisten zurzeit am Markt befindlichen Kamillen-Konzentrate ist das Fehlen einer einheitlichen Deklaration bezüglich der wichtigsten Inhaltsstoffe wie Bisabolol und Apigenin.

4. Konfiguration und Konstitution von Anthecotulid

Wie aus dem ^1H -NMR-Spektrum erkennbar, liegt Anthecotulid als ein Diastereomer vor. Eine Zuordnung der Methyl-Gruppen im ^1H - und ^2H -NMR gelang von Klink et. al. nach einem Deuterium-Markierungsexperiment, so dass ich deren Daten diesbezüglich übernehme.¹⁶

Die Konfiguration der Δ^5 -Doppelbindung, die in einer früheren Publikation¹⁰ bereits ohne genauere Begründung als E-konfiguriert angenommen wurde, konnte durch NOE-Differenzmessungen, 2D H,H-Cosy- und phasensensitive NOESY-Spektren von uns bestätigt werden.

Die absolute Konfiguration am asymmetrischen C-3 wurde bislang experimentell nicht bestimmt. Van Klink. et. al. vermuten lediglich eine R-Konfiguration des nativen Anthecotulids.

Somit ergibt sich für AC folgende räumliche Struktur:

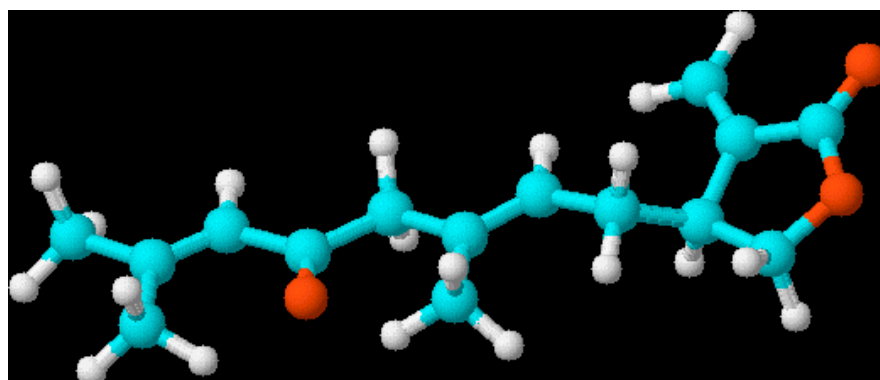
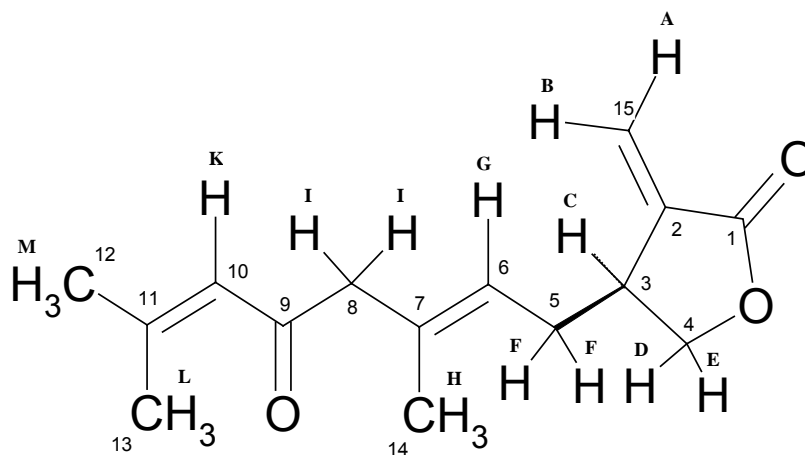


Abb. 6: räumliche Darstellung von AC (ACD/3D Viewer)



Die Wasserstoffe im ^1H -NMR-Spektrum lassen sich durch die Kopplungskonstanten genau zuordnen. Die KK liefert zudem Information über die im zeitlichen Mittel bevorzugte Konformation.

$$\begin{array}{llll} J_{\text{AB}} = 2,5 \text{ Hz} & J_{\text{CD}} = 5,3 \text{ Hz} & J_{\text{CE}} = 8,3 \text{ Hz} & J_{\text{DE}} = 9,2 \text{ Hz} \\ J_{\text{FG}} = 7,3 \text{ Hz} & & & \end{array}$$

Bohlmann et. al. geben noch die schwachen W-Kopplungen zwischen H_G und H_H mit 0,9 Hz sowie zwischen H_K und H_L mit 1,2 Hz und eine Fernkopplung zwischen H_H und H_K mit 1,2 Hz an.¹⁴

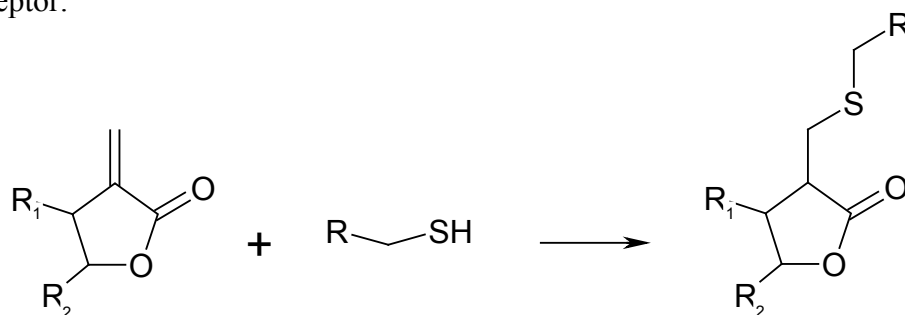
Die Wasserstoff-Atome B,C und D liegen in räumlicher Nähe zueinander (Abb. 6). Die Wasserstoff-Atome F und I sind symmetrisch zur Kohlenstoff-Kette angeordnet, da sie lediglich **ein** Signal ohne geminale Kopplungen aufweisen.

Der lineare Teil des Moleküls ist größtenteils planar angeordnet (C-8 bis C-12) und erlaubt lediglich eine Drehung um die Einfachbindungen zwischen C-7 und C-8 und zwischen C-5 und C-3.

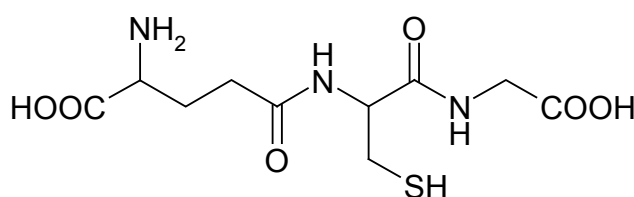
5. Reaktion mit S-Nukleophilen^{23,24}

Wie bereits in Kap. 6 (Theoretischer Teil) beschrieben, reagiert AC selbst nicht primär allergen, sondern muss als Hapten reagierend erst mit einem Nukleophil ein vollwertiges Allergen bilden. Die Bindung des Nukleophils kann an zwei Stellen im Molekül stattfinden. Zum einen an die von 2 Methyl-Gruppen sterisch abgeschirmte Doppelbindung am Ende des linearen Teils von AC und zum anderen an die Methylene-Gruppe des α -Methylen- γ -butyrolactons (s. Abb. 3).

Die Reaktion von Nukleophil und Elektrophil erfolgt in der Art einer Michael-Addition. Das Nukleophil fungiert also als Michael-Donor, das Elektrophil (in unserem Fall AC) als Michael-Akzeptor.



5.1 Mit L-Glutathion



Glutathion ist eine wichtige physiologische Verbindung und dient hauptsächlich dem Zweck der Entgiftung des Organismus weshalb es in allen Zellen vorkommt. Durch eine Reaktivitätsuntersuchung mit AC soll geklärt werden, welche Struktur des Sesquiterpenlactons bevorzugt mit der Thiol-Gruppe des Glutathions reagiert. Theoretisch ist die Bildung dreier Produkte denkbar (Zwei Mono-Addukte und ein Bis-Addukt).

DC-Monitoring:

40 μmol AC wurden in 5 Tropfen Aceton gelöst und zusammen mit 1 ml Phosphatpuffer pH 7,4 in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf-Cup) gegeben. Es bildete sich eine Emulsion, die auf der Unlöslichkeit von AC in Wasser beruht. Danach wurden 20 μmol Glutathion zugegeben und das Reaktionsgefäß in den Thermo-Schüttler bei 700/min und 25 °C gestellt.

Zu bestimmten Zeiten (5, 30, 90, 240 und 1380 Minuten) wurden mit einer 10 μl Kapillare Proben entnommen und auf eine 5 x 10 cm DC-Platte KG60F₂₅₄ gegen AC-Standard S₅ aufgetragen und bei Kammer sättigung mit n-Butanol/Wasser/Essigsäure im Gemisch 5 : 4 : 1 entwickelt.

Die halb-quantitative Bestimmung von AC erfolgte visuell unter der UV-Lampe (Fluoreszenzlöschung). Die Menge an Glutathion bzw. entstandene Produkte der Reaktion sprich Glutathion-AC-Addukte wurden mittels Ninhydrin-Sprühreagenz (0,25 % Ninhydrin in Aceton) identifiziert. Eine genaue qualitative Analyse der Reaktion soll später per NMR-Monitoring erfolgen.

Es ließ sich beobachten, dass bereits nach 30 Minuten nur noch die Hälfte an AC vorhanden war (R_f -Wert 0,72; Ninhydrin negativ). Nachdem nach 240 Minuten keine weitere Abnahme der AC-Menge zu verzeichnen war, wurden erneut 20 μmol Glutathion zugegeben. Nach vermutetem Ende der Reaktion etwa 19 h später wurde die letzte Probe genommen.

23 h nach Start der Reaktion waren nur noch Spuren von AC zu erkennen. Die Umsetzung ist also fast quantitativ verlaufen.

Neben der Abnahme des AC-Flecks war die Zunahme eines Flecks mit dem R_f -Wert 0,18 (Ninhydrin positiv) zu erkennen. Des Weiteren konnte noch ein kleinerer Fleck mit R_f -Wert 0,5 (Ninhydrin positiv) detektiert werden.

Daraus lässt sich folgern, dass die Reaktion von AC mit Glutathion vermutlich nicht vollständig selektiv verläuft, jedoch ein Produkt mit Präferenz gebildet wird.

¹H-NMR-Monitoring:

40 μmol AC wird in wenig Methanol-D₄ gelöst und mit der äquimolaren Menge an Glutathion in D₂O gelöst, versetzt. Dann wird so lange Methanol-D₄ zugegeben bis die Trübung verschwindet und die Lösung klar ist. Als interner Standard diente Dioxan.

Der erste Wert wurde nach 30 Minuten gemessen sowie 5 Werte im Abstand von 30 min, weitere 3 nach je 60 min und in den folgenden Tagen nach Gutdünken.

Die Reaktion zeigte anfangs keinen wirklichen Fortschritt, es war keine Veränderung im ^1H -NMR-Spektrum erkennbar. Erst nach einem Tag zeigten sich erste Anzeichen einer Reaktion. Das Monitoring wurde nach 10 Tagen beendet. Es zeigt, dass Glutathion zwar mit AC reagiert, die Reaktion aber sehr langsam abläuft und keinesfalls selektiv ist.

Die Integral-Intensität von H_A sowie von H_K des AC nahmen ab. Beim Glutathion war ein Rückgang des Peaks bei 3,3 ppm zu beobachten.

Es entstanden neue Signale bei 4,43 ppm (d), 3,92 ppm (d), 3,2 ppm (s) und 1,64 ppm (s).

Aufgrund der äußerst geringen Geschwindigkeit der Reaktion war eine Bestimmung der Reaktionskinetik nicht möglich.

Ein Grund, warum die Reaktion derart langsam ablief, ist sicherlich das pH-Milieu, das deutlich im Sauren lag, somit nicht-physiologische Bedingungen vorherrschten. Bei höheren pH-Werten ist die Thiol-Gruppe im Glutathion deprotoniert und damit viel reaktiver.²³

Mit der niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit begründet sich vermutlich auch die geringe Selektivität der Reaktion. Eine Präferenz der exocyclischen Methylengruppe bei der Reaktion von AC mit Glutathion konnte unter nicht-physiologischen Bedingungen somit nicht bestätigt werden.

6. Antimikrobielle Aktivität

Die Naturstoffgruppe der Sesquiterpene, Sesquiterpenoide und Sesquiterpenlactone ist für ihre biologische Aktivität bekannt, was immer wieder durch antibakterielle Studien belegt wird.³⁴ So entdeckte die Gruppe Kawazoe et. al. die Wirksamkeit eines Sesquiterpens aus *Artemisia gilvescens* gegen methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Dieser Stoff weist als allgemeine Strukturmerkmale einen Lacton-Ring sowie eine Cyclopentenon-Gruppierung auf.³⁵ Die genauen Struktur-/Wirkungsbeziehungen sind jedoch ungeklärt zumal ähnliche Verbindungen wie Arteminolide, Tanapartholide und Artecamin mit gleichen Strukturmerkmalen keine beachtenswerte Wirkung gegen MRSA zeigten.

Es ist daher unabdingbar, das Screening von ähnlichen Substanzen fortzuführen, um Aufschlüsse über die Struktur-/Wirkungsbeziehung zu erhalten.

In diesem Rahmen soll auch AC untersucht werden, da es sich durch einige reaktive Zentren und eine bewegliche Seitenkette möglicherweise als wirksam erweisen könnte. Der Gesamtextrakt von *Anthemis cotula* hat laut einer Untersuchung von Quarenghi et. al. eine dem Chloramphenicol ähnliche antibakterielle Wirksamkeit auch gegen Problemkeime wie *Staphylococcus aureus*.¹¹

AC wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Marburg getestet. Es besitzt keine antibakterielle Aktivität, insbesondere nicht gegen MRSA und VREs.

Testmedium:

Müller Hinton II Broth: pH 7,3 (+/- 0,1), Fa. Becton Dickinson (4312322; Heidelberg)

Testkeim / MHK in [$\mu\text{g/ml}$]	Anthecotulid
Staphylococcus aureus	> 10
Enterococcus faecalis	> 10
Escherichia coli	> 10
Pseudomonas aeruginosa	> 10
Staph. aureus (MRSA)	> 10
E. faecium (VRE)	> 10

Tab. 8: Antimikrobielle Aktivität von AC

Referenzdaten aus QC	Pen-G	Cefazolin
Staphylococcus aureus	< 0,03	< 8
Enterococcus faecalis	> 8	>16
Escherichia coli	n.t.	< 8
Pseudomonas aeruginosa	n.t.	> 32

Tab. 9: Referenzsubstanzen

Durch die schlechte Löslichkeit der Substanz kann bei Titration in die Müller-Hinton-II-Testbouillon ein Wirkverlust durch Ausfallen der Substanz nicht ausgeschlossen werden. Ob die Substanz nach direktem Aufbringen auf Plastikmaterial (Coaten) wachstumsinhibitorisch wirkt oder eventuell eine Biofilmbildung vermeiden kann, konnte bisher nicht getestet werden.

III. Literaturverzeichnis

- (1) Imming, P.; Hitziger, T.; Höll, P.; Ramadan, M.; Hempel, B. Die alte junge Kamille. *Pharmazeutische Zeitung* **2003**, *147*, 372 - 380.
- (2) Hausen, B. M.; Busker, E.; Carle, R. Sensitizing capacity of Compositae species. VII. Experimental studies with extracts and constituents of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert and *Anthemis cotula* L. *Planta Medica* **1984**, *50*, 229-234.
- (3) Rudzki, E.; Jalblonska, S. Kamillosan is a safe product of camomile for topical application: Results of patch testing consecutive patients with contact dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment* **2000**, *11*, 161-163.
- (4) Rowe, A. H. Camomile (*Anthemis cotula*) as a skin irritant. *Journal of Allergy* **1934**, *5*, 383-388.
- (5) Schilcher, H. Recent knowledge in quality evaluation of camomile blossoms respectively camomile oil. 2. Quality evaluation of the volatile oil in Flores *Chamomillae*. Grading of commercial camomiles into 4 respectively 5 chemical types. *PLANTA MEDICA* **1973**, *23*, 132-144. Journal Code:0066751.
- (6) Yamazaki, H.; Miyakado, M.; Mabry, T. J. Isolation of a linear sesquiterpene lactone from *Matricaria chamomilla*. *Journal of Natural Products* **1982**, *45*, 508.
- (7) Trethan, H. *Californische Essenzen*, 1999.
- (8) Felter, H. W.; Lloyd, J. U. *King's American Dispensatory*; Kress, Henriette, 2002.
- (9) Cook, W. *The Physiomedical Dispensatory*; Kress, Henriette, 1869.
- (10) Baruah, R. N.; Bohlmann, F.; King, R. M. Novel sesquiterpene lactones from *Anthemis cotula*. *Planta Medica* **1985**, 531-532.
- (11) Quarenghi, M. V.; Tereschuk, M. L.; Baigori, M. D.; Abdala, L. R. Antimicrobial activity of flowers from *Anthemis cotula*. *FITOTERAPIA* **2000**, *71*, 710-712 Journal Code:16930290R.
- (12) Graciela Malinskas, G. A.; Retamar, J. A. *Anthemis cotula* essential oil. *Essenze Derivati Agrumari* **1985**, *55*, 48-51.
- (13) Botanical.com *Mayweed*, 2000.
- (14) Bohlmann, F.; Zdero, C.; Grenz, M. Terpenes from higher plants. V. New sesquiterpene from *Anthemis cotula*. *Tetrahedron Letters* **1969**, 2417-2418.
- (15) Hänsel, R.; Steinegger, E. *Pharmakognosie - Phytofarmazie*; Springer, 1999; 699-704, 1322.

- (16) Klink, J. v.; Becker, H.; Andersson, S.; Boland, W. Biosynthesis of antheoctuloide, an irregular sesquiterpene lactone from *Anthemis cotula* L. (Asteraceae) via a non-farnesyl diphosphate route. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*, 1503 - 1508.
- (17) De Kraker, J.-W.; Franssen, M. C. R.; Joerink, M.; De Groot, A.; Bouwmeester, H. J. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiology* **2002**, *129*, 257-268.
- (18) Mutschler, E. *Arzneimittelwirkungen*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001.
- (19) Merfort, I. Was man über Pflanzen und ihre kontaktallergene Wirkung wissen sollte. *Zeitschrift für Phytotherapie* **2003**, 22-29.
- (20) Frohne, D.; Pfänder, H. J. *Giftpflanzen - Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte, Toxikologen und Biologen*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1986; 69-89.
- (21) Schaeffer, M.; Talaga, P.; Stampf, J. L.; Benezra, C. Cross-reaction in allergic contact dermatitis from alpha-methylene-gamma-butyrolactones: importance of the cis or trans ring junction. *Contact Dermatitis* **1990**, *22*, 32-36.
- (22) Basketter, D.; Dooms-Goossens, A.; Karlberg, A. T.; Lepoittevin, J. P. The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis* **1995**, *32*, 65-73.
- (23) Schmidt, T. J.; Lyss, G.; Pahl, H. L.; Merfort, I. Helenanolide type sesquiterpene lactones. Part 5: The role of glutathione addition under physiological conditions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 2849-2855.
- (24) Schmidt, T. J. Helenanolide-type sesquiterpene lactones-III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1997**, *5*, 645-653.
- (25) Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 2923-2925.
- (26) Kovar, K. A.; Francas, G.; Seidel, R. [The mechanism of the Raymond, Kedde and Baljet reactions]. *Arch Pharm (Weinheim)* **1977**, *310*, 40-47.
- (27) Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis*; Second Edition ed., 1996.
- (28) Stahl, E.; Schild, W. *Pharmazeutische Biologie - Drogenanalyse: Inhaltsstoffe und Isolierungen*, 1981; 437.
- (29) Frey, H.-P.; Zieloff, K. *Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie*; VCH, 1993.
- (30) Carle, R. Kamillenöl. *Pharmazeutische Biologie* **1996**, *136*, 2165-2176.

- (31) Wagner, H. *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999; 121-122.
- (32) Rook, A. Plant dermatitis. *Brit Med J* **1960**, 5215, 1771-1774.
- (33) Ceska, O.; Chaudhary, S. K.; Warrington, P. J.; Ashwood-Smith, M. J. Coumarins of chamomile, *Chamomilla recutita*. *Fitoterapia* **1992**, 63, 387-394.
- (34) Hoffmann, H. M. R.; Rabe, J. Synthese und biologische Aktivität von alpha-Methylene-gamma-butyrolactonen. *Angewandte Chemie* **1985**, 97, 96 - 112.
- (35) Kawazoe, K.; Tsubouchi, Y.; Abdullah, N.; Takaishi, Y.; Shibata, H. et al. Sesquiterpenoids from *Artemisia gilvescens* and an anti-MRSA compound. *J Nat Prod* **2003**, 66, 538-539.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der Angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Marburg/Lahn, im August 2003

© Achim Meyer, 2003