

UNTERSUCHUNGEN ZU
HYPERICUM PERFORATUM L. :
ANBAU UND SELEKTION, ANALYTISCHE UND
PRÄPARATIVE ARBEITEN

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt

von

Dietrich Granzow

aus Grünstadt

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
10. 10. 2000 angenommen

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Hölzl
Zweitgutachterin: Frau Priv. Doz. Dr. Dr. Abel

Tag der mündlichen Prüfung am: 10. 10. 2000

Die vorliegende Arbeit entstand
am Institut für Pharmazeutische Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Hölzl,
dem ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine stete und anregende
Diskussionsbereitschaft
und Anleitung zu großem Dank verpflichtet bin.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	5
3	RESUMEN	8
4	EINLEITUNG	11
4.1	NAME UND GESCHICHTE	11
4.2	BOTANIK UND PHYTOPATHOLOGIE	12
4.3	CHARAKTERISTISCHE INHALTSSTOFFE	14
4.3.1	NAPHTHODIANTHRONE	14
4.3.2	DERIVATE DES PHLOROGLUCINS	17
4.3.3	FLAVONOLE, FLAVONOLGLYKOSIDE UND BIFLAVONOIDE	18
4.3.4	XANTHONE	20
4.3.5	GERBSTOFFE UND PROCYANIDINE	21
4.3.6	ÄTHERISCHES ÖL	22
4.3.7	WEITERE INHALTSSTOFFE	22
4.4	PHARMAKOLOGIE	23
4.4.1	WIRKUNGEN DER SUBSTANZGRUPPEN	23
4.4.2	WIRKUNGEN VON JOHANNISKRAUTEXTRAKTEN	25
4.4.3	ANWENDUNGSGEBIETE	26
4.4.4	KLINISCHE STUDIEN	26
4.4.5	INTERAKTIONEN	27
4.5	ANBAU VON JOHANNISKRAUT IN DEUTSCHLAND	29
5	SELEKTION VON JOHANNISKRAUT-HERKÜNFTE	30
5.1	ZIELSETZUNG	30
5.2	SAATMATERIAL	30
5.3	BODENANALYTIK UND CADMIUMBESTIMMUNG DES PFLANZENMATERIALS	31
5.4	HPLC-METHODEN FÜR DIE QUANTITATIVEN BESTIMMUNGEN	32
5.5	ANBAU 1998	34
5.5.1	PFLANZENAUFGUCHT	34
5.5.2	BONITIERUNG	36
5.5.3	PROBENNAHME	36
5.5.4	PROBENVORBEREITUNG	36
5.5.5	QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN	37
5.5.6	ERGEBNISSE UND AUSWAHL DER HERKÜNFTE FÜR DEN ANBAU 1999	37
5.6	ANBAU 1999	40
5.6.1	PFLANZENAUFGUCHT UND ANLAGE DES VERSUCHSFELDES	40
5.6.2	BONITIERUNG	41

5.6.3	PROBENNAHME UND FESTLEGUNG DES ANALYSENUMFANGES	43
5.6.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN	44
5.6.5	ERGEBNISSE	44
5.6.5.1	Bonitierung	45
5.6.5.2	Ergebnisse der chemischen Untersuchungen	56
5.6.5.2.1	Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Herkünfte	56
5.6.5.2.2	Vergleiche zwischen den Herkünften	62
5.6.6	ABSICHERUNG DES BEFUNDES DER RUTINFREIHEIT	65
5.6.7	VERGLEICH DES 1. UND 2. AUFWUCHSES IM JAHR 1999	66
5.6.8	VERGLEICH DER RESULTATE VON 1998 UND 1999	69
5.6.9	STATISTISCHE UNTERSUCHUNGEN	70
5.6.10	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	77
6	<u>ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE ARBEITEN</u>	81
6.1	HYPERICIN	81
6.1.1	ISOLIERUNG VON HYPERICIN	81
6.1.2	IDENTITÄT UND REINHEIT	81
6.1.2.1	Nachweis mittels HPLC	81
6.1.2.2	UV-VIS-Spektren	82
6.1.2.3	¹ H-NMR- und Massenspektrum	82
6.2	I3,II8-BIPIGENIN	83
6.2.1	VORBEMERKUNGEN	83
6.2.2	HERSTELLENUNG EINES ANGEREICHERTEN EXTRAKTS	83
6.2.3	PRÄPARATIVE HPLC UND AUFARBEITUNG	84
6.2.4	IDENTITÄT UND REINHEIT	84
6.2.4.1	Nachweis mittels HPLC	84
6.2.4.2	UV-VIS-Spektrum	85
6.2.4.3	¹ H-NMR- und Massenspektrum	86
6.3	HYPERFORIN	87
6.3.1	ISOLIERUNG VON HYPERFORIN	87
6.3.2	IDENTITÄT UND REINHEIT	88
6.3.2.1	Nachweis mittels HPLC	88
6.3.2.2	UV-VIS-Spektrum	88
6.3.2.3	¹ H-NMR- und Massenspektrum	88
6.3.3	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN VON HYPERFORIN UND HYPERICUM-EXTRAKTEN	89
6.3.4	VERGLEICH DES ISOLIERTEN HYPERFORINS MIT ZUGEKAUFTE REFERENZSUBSTANZEN	91
6.3.4.1	HPLC-Untersuchungen	91
6.3.4.2	Ermittlung des spezifischen Absorptionskoeffizienten von Hyperforin	93
6.3.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	94
6.4	PROTOHYPERICINE	94
6.4.1	GEWINNUNG EINER FRAKTION MIT PROTOHYPERICINEN	94
6.4.2	IDENTITÄT UND REINHEIT	95
6.4.3	UMSETZUNG DER PROTOHYPERICINE UNTER LICHT EINWIRKUNG	95
7	<u>VALIDIERUNG DER HPLC-METHODEN</u>	97
7.1	EINLEITUNG	97
7.2	LINEARITÄT	97

7.2.1	HYPERFORIN	98
7.2.2	HYPERICIN UND PSEUDOHYPERICIN	99
7.2.3	FLAVONOIDE	100
7.3	PRÄZISION	102
7.3.1	HYPERFORIN	102
7.3.2	HYPERICIN UND PSEUDOHYPERICIN	103
7.3.3	FLAVONOIDE	104
7.4	RICHTIGKEIT	105
7.4.1	HYPERFORIN	105
7.4.2	HYPERICIN UND PSEUDOHYPERICIN	106
7.4.3	FLAVONOIDE	106
7.5	SPEZIFITÄT	108
7.6	BEWERTUNG	108
8	EXPERIMENTELLER TEIL	109
8.1	CHEMIKALIEN	109
8.2	REFERENZSUBSTANZEN	109
8.3	ANZUCHT UND KULTUR DER PFLANZEN	110
8.3.1	ANZUCHT UND KULTUR AUS SAATGUT	110
8.3.2	BODENANALYTIK UND UNTERSUCHUNG DER CADMIUMBELASTUNG DES PFLANZENMATERIALS IM JAHRE 1999	111
8.3.3	ANLEGEN VON ZELLKULTUREN	112
8.4	QUANTITATIVE ANALYTIK	113
8.4.1	ERNTE UND LAGERUNG DES PROBENMATERIALS	113
8.4.2	PROBENAUFARBEITUNG	114
8.4.3	EXTRAKTION	114
8.4.4	ANALYTISCHE HPLC	114
8.4.4.1	Hyperforin und Hypericine	114
8.4.4.2	Flavonoide	116
8.4.5	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN AN HYPERFORIN	117
8.4.6	SPEKTRALPHOTOMETRIE	118
8.5	QUALITATIVE ANALYTIK	118
8.5.1	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE MITTELS HPTLC	118
8.6	¹H-MNR-SPEKTROSKOPIE UND MASSENSPEKTROMETRIE	119
8.7	ISOLIERUNGEN	119
8.7.1	HYPERICIN	119
8.7.2	HYPERFORIN	120
8.7.3	I3, II8-BIAPIGENIN	121
8.7.4	PROTOHYPERICINFRAKTION	122
9	LITERATURVERZEICHNIS	124
10	ANHANG	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4-1 Blatt von <i>H. perforatum</i> im Durchlicht	11
Abbildung 5-1 Muster eines Box-Plots.....	44
Chromatogramm 5-1 Analytische HPLC	34
Chromatogramm 6-1 Trennung von Biapigenin	84
Chromatogramm 6-2 Trennung von Hyperforin	87
Chromatogramm 6-3 Hyperforin-Reinsubstanzen bei 274 nm.....	92
Diagramm 5-1 Gehalte an Hypericin und Pseudohypericin 1998 Verhältnis	38
Diagramm 5-2 Relationen von Hypericin zu Pseudohypericin 1998.....	38
Diagramm 5-3 Hyperforingehalte der Herkünfte 1998.....	39
Diagramm 5-4 Rostbefall der Herkünfte 1999	45
Diagramm 5-5 Box-Plot zur Wuchshöhe.....	46
Diagramm 5-6 Box-Plot zur Höhe des Blühhorizontes	47
Diagramm 5-7 Box-Plot zur Anzahl der Primärtriebe.....	47
Diagramm 5-8 Box-Plot zur Anzahl der Kurztriebpaare	48
Diagramm 5-9 Box-Plot zum Trockengewicht der Herkünfte	49
Diagramm 5-10 Box-Plot zum Verhältnis aus Trocken- zu Frischgewicht der Herkünfte .	49
Diagramm 5-11 Box-Plot zum Stengeldurchmesser der Herkünfte	50
Diagramm 5-12 Box-Plot zur Breite der Kronblätter	51
Diagramm 5-13 Box-Plot zur Länge der Kronblätter	51
Diagramm 5-14 Box-Plot des Quotienten von Kronblattbreite zur Länge der Herkünfte ..	52
Diagramm 5-15 Box-Plot zur Länge der Kronblätter der Herkünfte.....	52
Diagramm 5-16 Box-Plot zur Primärblattlänge der Herkünfte	53
Diagramm 5-17 Box-Plot zur Primärblattbreite der Herkünfte.....	53
Diagramm 5-18 Box-Plot zu den blühenden Anteilen der Herkünfte.....	54
Diagramm 5-19 Box-Plot zu den Blattanteilen der Herkünfte	55
Diagramm 5-20 Box-Plot zu den Stengelanteilen der Herkünfte	55
Diagramm 5-21 HPLC-Ergebnisse Herkunft 1	56
Diagramm 5-22 HPLC-Ergebnisse Herkunft2	57
Diagramm 5-23 HPLC-Ergebnisse Herkunft 5	58
Diagramm 5-24 HPLC-Ergebnisse Herkunft 6	59
Diagramm 5-25 HPLC-Ergebnisse Herkunft 7	60
Diagramm 5-26 HPLC-Ergebnisse Herkunft 10.....	61
Diagramm 5-27 HPLC-Ergebnisse der als Mischmuster bestimmten Herkünfte	61
Diagramm 5-28 Flavonoidverteilung der Herkünfte.....	62
Diagramm 5-29 Box-Plot zu den Pseudohypericingehalten der Herkünfte	63
Diagramm 5-30 Box-Plot zu den Hypericingehalten der Herkünfte.....	63
Diagramm 5-31 Box-Plot zu den Hypericin - Pseudohypericinrelationen der Herkünfte.	64
Diagramm 5-32 Box-Plot zu den Hyperforingehalten der Herkünfte	65
Diagramm 5-33 1. und 2. Aufwuchs Herkunft 1.....	67
Diagramm 5-34 1. und 2. Aufwuchs Herkunft 2.....	67
Diagramm 5-35 1. und 2. Aufwuchs Herkunft 3.....	68
Diagramm 6-1 Stabilität von Hyperforin in Lösung	90
Diagramm 6-2 Stabilität von Hyperforin im Extrakt und als Reinsubstanz.....	91
Diagramm 6-3 Umsetzung der Protohypericine	96
Diagramm 7-1 Eichgerade von Hyperforin.....	98
Diagramm 7-2 Eichgerade von Hypericin.....	99

<i>Diagramm 7-3 Eichgeraden der Flavonoide</i>	101
<i>Formel 4-1 Wichtige Naphthodianthrone</i>	16
<i>Formel 4-2 Hyperforin und Adhyperforin</i>	17
<i>Formel 4-3 Flavonoidglykoside</i>	19
<i>Formel 4-4 Flavonoidaglyka</i>	20
<i>Formel 4-5 Xanthone aus Johanniskraut</i>	21
<i>Formel 4-6 Epicatechin, Catechin und Procyanidin B2</i>	21
<i>Formel 4-7 Hauptbestandteile des ätherischen Öls aus Johanniskraut</i>	22
<i>Formel 6-1 Hypericin</i>	83
<i>Formel 6-2 I3, II8-Biapigenin</i>	86
<i>Formel 6-3 Struktur von Hyperforin</i>	89
<i>Foto 5-1 Anbau von Johanniskraut in Neumarkt 1999</i>	40
<i>Foto 5-2 HPTLC-Chromatogramm</i>	66
<i>Grafik 6-1 UV-VIS-Spektrum von Hypericin</i>	82
<i>Grafik 6-2 UV-VIS Spektrum von Biapigenin</i>	85
<i>Grafik 10-1 ¹H-NMR-Spektrum von Hypericin in Pyridin-d₅, 500 MHz, ä-Skala in ppm (Eichung gegen TMS)</i>	135
<i>Grafik 10-2 ¹H-NMR-Spektrum von I3,II8-Biapigenin in Methanol-d₄, 400 MHz, ä-Skala in ppm (Eichung gegen TMS)</i>	136
<i>Grafik 10-3 ¹H-NMR-Spektrum von Hyperforin in Methanol-d₄, 400 MHz, ä-Skala in ppm (Eichung gegen TMS)</i>	137
<i>Tabelle 4-1 Kelchblattausprägung der H. perforatum-Subspezies</i>	13
<i>Tabelle 5-1 Geerntete Pflanzen</i>	43
<i>Tabelle 5-2 Vergleich der Resultate 1998/1999</i>	69
<i>Tabelle 5-3 Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung</i>	70
<i>Tabelle 5-4 Untergruppen berechnet nach REGW</i>	72
<i>Tabelle 5-5 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson, Herkunft 2</i>	73
<i>Tabelle 5-6 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson Herkunft 5</i>	74
<i>Tabelle 5-7 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson Herkunft 6</i>	75
<i>Tabelle 5-8 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson Herkunft 7</i>	76
<i>Tabelle 5-9 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson Herkunft 10</i>	77
<i>Tabelle 6-1 ¹H-NMR-Signale und Zuordnung: Hypericin</i>	82
<i>Tabelle 6-2 ¹H-NMR-Signale und Zuordnung: Biapigenin</i>	86
<i>Tabelle 6-3 HPLC-Bestimmung von Hyperforin-Standards</i>	92
<i>Tabelle 6-4 Ermittlung der spezifischen Absorption von Hyperforin</i>	93
<i>Tabelle 7-1 Linearität Hyperforin</i>	98
<i>Tabelle 7-2 Linearität Hypericin</i>	99
<i>Tabelle 7-3 Linearität Flavonoide</i>	100
<i>Tabelle 7-4 Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten Flavonoide</i>	101
<i>Tabelle 7-5 Bestimmung der Präzision der Methode von Hyperforin</i>	102
<i>Tabelle 7-6 Bestimmung der Präzision der Methode von Hypericin</i>	103
<i>Tabelle 7-7 Bestimmung der Präzision der Methode von Flavonoiden</i>	104
<i>Tabelle 7-8 Berechnung der Präzision der Methode von Flavonoiden</i>	104
<i>Tabelle 7-9 Wiederfindungsrate von Hyperforin in Johanniskraut</i>	105

<i>Tabelle 7-10 Wiederfindungsrate von Hypericin in Johanniskraut</i>	<i>106</i>
<i>Tabelle 7-11 Wiederfindungsrate von Flavonoiden in Johanniskraut</i>	<i>107</i>
<i>Tabelle 7-12 Statistische Angaben zu den Wiederfindungsraten der Flavonoide.....</i>	<i>108</i>
<i>Tabelle 8-1 Referenzsubstanzen</i>	<i>109</i>
<i>Tabelle 8-2 Anzuchtbedingungen 1998</i>	<i>110</i>
<i>Tabelle 8-3 Anzuchtbedingungen 1999</i>	<i>110</i>
<i>Tabelle 8-4 Ergebnisse der Bodenanalysen</i>	<i>111</i>
<i>Tabelle 8-5 Eluentenzeitprogramm der Flavonoidbestimmung</i>	<i>116</i>
<i>Tabelle 10-1 Einzelergebnisse der chemischen Bestimmungen 1998</i>	<i>138</i>
<i>Tabelle 10-2 Rutingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>140</i>
<i>Tabelle 10-3 Hyperosidgehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabelle 10-4 Isoquercitringehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>142</i>
<i>Tabelle 10-5 Quercitringehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>143</i>
<i>Tabelle 10-6 Quercetingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>144</i>
<i>Tabelle 10-7 I3,II8-Biapigeningehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>145</i>
<i>Tabelle 10-8 Pseudohypericingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>146</i>
<i>Tabelle 10-9 Hypericingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>147</i>
<i>Tabelle 10-10 Hyperforingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften.....</i>	<i>148</i>

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
BaH	Bund der Arzneimittelhersteller
BAP	6-Benzylaminopurin
BaZ	Bundesanzeiger
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BPI	Bundesverband der pharmazeutischen Industrie
Cd	Cadmium
D ₂ /D ₄	Dopaminerge Rezeptoren Typ 2 und 4
DC	Dünnschichtchromatographie
EI	Elektronenstoßionisation
eV	Elektronvolt
et al.	Und andere
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
ha	Hektar
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
¹ H-NMR	Protonenresonanzspektroskopie
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
5-HT	5-Hydroxytryptophan, Serotonin
ICD	International statistical Classification of Diseases
ICH	International Conference of Harmonisation
L.	Linné
MAO	Monoaminoxidase
MHZ	Megahertz
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
M-S	Murashige-Skoog
MW	Mittelwert
n. Chr.	nach Christus

NAA	á Nahphtylaminoessigsäure
NH ₃	Ammoniak
NIH	National Institute of Health
nm	Nanometer
pH	pondus hydrogenii, pH-Wert
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
Ph. Helv.	Schweizer Arzneibuch
p. o.	per os
ppm	Parts per million
PSI	Pounds per Square Inch
r	Korrelationskoeffizient
Rf	Referenzwert
RP	Reversed Phase
s	Standardabweichung
S	Sekunde
SFE	Supercritical Fluid Extraktion
s _{rel}	Relative Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TMS	Tetramethylsilan
TWEEN [®] 20	Polysorbat; Monolaurylpolysorbitan
UV-Vis	Ultraviolett-Visible
vergl.	Vergleiche
WF	Wiederfindung
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Zusammenfassung

Der Anbau von Johanniskraut unterliegt einer wachsenden Bedeutung. Ausschlaggebend hierfür sind der wachsende Bedarf an Droge, der durch Wildsammlungen nicht mehr alleine zu decken ist, in Verbindung mit gestiegenen Anforderungen an die Qualität von Phytopharmaka.

Ziel dieser Arbeit war die Selektion von *Hypericum perforatum* L. aus Pflanzen verschiedener Herkunftsgebiete Europas. Der Erhebungszeitraum umfaßte dabei zwei Vegetationsperioden.

Die Selektion beinhaltete vornehmlich Kriterien, die dazu bestimmt waren, die Pflanzen verschiedener Herkünfte anhand geeigneter Merkmale chemisch und morphologisch eindeutig zu charakterisieren. Die im ersten Jahr 60 überlebenden Pflanzen stammten aus einem aus über 100 Pflanzen bestehenden Sortiment, das die meisten Länder West- und Mitteleuropas abdeckte, wobei vier Herkünfte als *Hypericum maculatum* L. identifiziert wurden. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang und bislang noch nicht beschrieben ist das Vorkommen geringer Mengen an Hyperforin in *Hypericum maculatum* L.

Zum Ende des ersten Versuchsjahres wurden 12 Herkünfte ausgewählt, die einen hohen Gehalt an Hypericin und Pseudohypericin neben Hyperforin aufwiesen, das Hypericin/Pseudohypericinverhältnis dieser für das zweite Versuchsjahr selektierten Herkünfte betrug als Zielwert 1:1, der teilweise erreicht wurde, mit Ausnahme einer Herkunft, bei der ein Hypericin/Pseudohypericin Verhältnis von 2:1 erzielt wurde.

Die Pflanzenvermehrung fand in beiden Jahren konservativ über Aussaat und, im ersten Jahr bei Herkunft 6, über eine Zellkultur statt. Der Aufwand für eine generelle Vermehrung der Pflanzen durch Zellkulturen ist in der Praxis ökonomisch sicherlich nicht zu vertreten, dieses Verfahren bietet indes die Möglichkeit, Erhaltungskulturen einer Herkunft anzulegen. Darüber hinaus kann man von einer Pathogenfreiheit der so vermehrten Pflanzen ausgehen, so daß sich eine periodische Vermehrung einer Herkunft durch Zellkulturen zur Bestandspflege als sinnvoll erweisen mag.

Im zweiten Versuchsjahr wurden 209 Pflanzen untersucht, die aus insgesamt 12 Herkünften stammten. Im Rahmen der Bonitierung wurden die folgenden morphologischen Eigenschaften charakterisiert: Primärblattlänge und –Breite, Kronblattlänge und –Breite, Kelchblattlänge, Wuchshöhe und Blühhorizont, Stengel-, Blatt-, und Blütenanteile. Dabei stellten sich charakteristische Unterschiede bei der Länge und Breite der Primärblätter heraus, die eine eindeutige Zuordnung zu Pflanzen einer Herkunft erlaubten.

Ein weiteres wichtiges Merkmal war auch die Anfälligkeit gegenüber *Colletotrichum gloeosporioides*, einer Pilzkrankung, deren Befallsdichte innerhalb der zwölf Herkünfte ebenfalls morphologisch erfaßt wurde.

Chemisch wurden 170 Pflanzen aus sechs Herkünften Einzeluntersucht, sowie 39 Pflanzen aus sechs Herkünften als Mischmuster bearbeitet.

Quantitativ bestimmt wurden die Inhaltsstoffe Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin, I3, II8-Biapigenin, Quercetin, Pseudohypericin, Hypericin und Hyperforin.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Fehlen von Rutin in einigen Pflanzen bestimmter Herkünfte festgestellt. Der Befund wurde anhand eines zweiten Analysenverfahrens anhand von Rückstellmustern bestätigt und kann auch in Hinblick auf die ausreichende Spezifität der zwei ausgewählten Analysenverfahren als gesichert angesehen werden.

Die Untersuchungen ergaben im Vergleich zum ersten Vegetationsjahr für Hyperforin, Hypericin und Pseudohypericin variable Gehalte innerhalb jeder Herkunft. Jedoch kristallisierte sich als reproduzierbares Charakteristikum das Verhältnis von Hypericin und Pseudohypericin zur eindeutigen Zuordnung einer Pflanze zu ihrer Herkunft heraus, wie auch das bereits erwähnte Fehlen oder Vorhandensein von Rutin.

Im Vergleich der beiden Anbaujahre zueinander handelte es sich hierbei um den am besten erhaltenen Wert.

Bei einem analytischen Vergleich der ersten und zweiten Ernte eines Anbaujahres zeigten die Ergebnisse eine höhere Deckung als bei einem Vergleich der beiden Anbaujahre.

Es wurden die Herkünfte 2 und 7 gefunden, die in Bezug auf ihre Inhaltsstoffe am homogensten beschaffen waren, wobei die eine für das erste Standjahr eine vergleichsweise geringe Ausbeute hatte, die andere Herkunft bei größeren Totalausfällen einen höheren Ertrag an Pflanzenmaterial ergab. Beide Herkünfte waren durchgängig frei von Rutin.

Die statistische Auswertung nach Pearson zeigte ausgeprägte Korrelationen an Gehalten unter den Flavonoidglykosiden und Aglyka einerseits und unter den Hypericinen andererseits. Hyperforin war nur teilweise und schwächer mit Hypericinen und I3, II8-Biapigenin korreliert. Dieser Befund ist erstmalig nachgewiesen und steht im Widerspruch

zu ähnlichen Arbeiten, die sich jedoch in Probestumfang und Art und Weise der Probenziehung erheblich von dieser Arbeit abheben (vergl. 5.6.10). Es konnte weiter statistisch nachgewiesen werden, daß es sich bei den Gehalten der Flavonoidglykoside Quercitrin und Isoquercitrin um Meßgrößen handelt, die in höherem Maße charakteristisch für eine Herkunft sind als andere Flavonoide.

Die Eigenschaft der Cadmiumakkumulation von *Hypericum perforatum* L., die mehrfach beschrieben wird, konnte durch die Überprüfung dreier Herkünfte nicht bestätigt werden.

Die Verfügbarkeit von hochreinen Referenzsubstanzen ist grundlegend für die quantitative Bestimmung von Inhaltsstoffen aus Pflanzenmaterial. Hypericin, Hyperforin, I3, II8-Biapigenin und eine hochangereicherte Protohypericinfraction wurden nach neuen oder hinsichtlich der erzielten Reinheit und technischen Handhabung optimierten Verfahren isoliert. Durch Vergleich von Literaturdaten wurde deren Identität mittels UV-VIS-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Protonenresonanzspektroskopie bestätigt.

Bei Stabilitätsuntersuchungen von Hyperforinreinsubstanz und hyperforinangereicherten Extrakten konnte eine erhebliche Labilität des Hyperforins, das in Cyclohexan gelöst war, festgestellt werden. Für Hyperforin wurde erstmals die spezifische Absorption festgelegt und durch einen Wiederholungsversuch einer zweiten, unabhängig isolierten Charge bestätigt. Der Vergleich mit kommerziell erhältlichen Standards zeigte große Unterschiede bei der spezifischen Absorptionen sowie der organoleptischen Prüfung (Farbe, Geruch). Die verschiedenen Chargen zeigten bei der HPLC-Untersuchung jedoch gute Übereinstimmung der Flächen unter Anwendung der Flächenprozentmethode.

Bei der Isolierung von I3, II8-Biapigenin wurde erstmals durch präparative HPLC aufgereinigt.

Hypericin konnte, unter Ausnutzung der Instabilität von Pseudohypericin in wäßrig-ammoniakalischer Umgebung, nur durch Säulenchromatographie an Polyamid, zu über 95% angereichert werden.

Durch die erstmals untersuchte Kinetik der Umsetzung von Protohypericin bzw. Protoseudohypericin zu Hypericin und Pseudohypericin unter Belichtung bei 500 LUX

wurden deutliche Unterschiede festgestellt. Protopseudohypericin erweist sich dabei im Vergleich zu Protohypericin als stabilere Verbindung.

Die Umsetzung der Protoverbindungen erfolgte dabei streng nach einer Kinetik erster Ordnung, und demzufolge quantitativ und equimolar.

Die Protostufen lagen in einem Rohextrakt einer unter Lichtausschluß bearbeiteten Droge zu annähernd 40% vor. Dieser hohe Gehalt läßt vermuten, daß Protohypericin bzw. Protopseudohypericin in der Pflanze keine biogenetische Vorstufe der Hypericine darstellen, sondern daß die Protoverbindungen die Endstufen der Biogenese sind und daß es sich bei der Umsetzung in der Pflanze um einen rein physikalischen, von der Belichtung abhängigen Prozeß handelt.

2 Summary

The cultivation of St. John's wort is of growing significance. What lies behind this is the expanding demand for plants which can no longer be satisfied by wild-growing plants in connection with more stringent quality demands.

The aim of this work was to select efficient plants or origins of St John's wort with standardised and defined properties from different parts of Europe. The period of data-acquisition included two vegetation-periods. The selection in particular comprised criteria intended to characterise the plants of different origins by chemical and morphological features.

The plants were propagated by sowing in both years. Additionally, one origin (no. 6) was propagated by tissue cultures in the first year because of the low amount of collected seeds. The expenditure for general propagation of plants by means of tissue cultures is, in practice, of little interest from an economic point of view, and this procedure however offers the ability to establish conservation cultures of a provenance. Furthermore it can be assumed, that plants propagated by tissue cultures are free from pathogens. Considering these two aspects, tissue cultures might become a useful tool in the cultivation of St. John's wort.

The 60 plants which survived in the first year were from a collection of more than 100 plants, including provenances from the most countries of Western and Central Europe. Four origins were identified as *Hypericum maculatum* L. Noticeable and hitherto not described is the incidence of hyperforin in *Hypericum maculatum* L. As a result of chemical analysis after the first year of investigation, 12 origins were selected which yielded a high content of hypericin and pseudohypericin as well as hyperforin. The ratio of hypericin to pseudohypericin in these selected origins partly reached a value of one with the exception of a provenance which yielded a hypericin/pseudohypericin ratio of 2.

In the second year, 209 plants belonging to these twelve origins were examined. All were tested in terms of their morphological characteristics, such as primarily leaf length and width, petal length and width, sepallength, total height and flowering behaviour. After harvesting and drying, the stem, leaf and blossom shares were weighted. The values derived from the primarily-leaves were proven to be the most characteristic. A further

important trait was also the susceptibility to *Colletotrichum gloeosporioides*, a fungal disease which was morphologically quantified.

Of 209 plants, 170 plants from six provenances were tested for their content of flavonoids (rutin, hyperosid, isoquercitrin, quercitrin, I3, II8-biapigenin and quercetin), hypericines (pseudohypericin, hypericin) and hyperforin. 39 plants from six provenances were analysed in twelve combined samples.

As a new result of the analysis, the absence of rutin in several origins was detected and confirmed by an alternative method and additional samples from the year before.

Compared with the first year of investigation (1998), the results showed a large variability concerning the contents of hyperforin, hypericin and pseudohypericin. As characteristic and reproducible chemical criteria, the hypericin/pseudohypericin ratio and the aforementioned absence of rutin was able to be determined.

The content found in a second harvest (1999) showed a better correspondence to the first harvest than to the data acquired in 1998. Two provenances (no's. 2 and 7) were proven to be more homogeneous in terms of their chemical constitution than other origins. While origin no. 2 yielded comparatively low amounts of material, no. 7 showed susceptibility to *Colletotrichum gloeosporioides*, resulting in a lower number of surviving plants. Both provenances were rutin-free.

The statistical interpretation according to Pearson showed distinct correlations between flavonoidglykosides and aglykones on the one hand and hypericines on the other. Hyperforin correlated only partially and less strongly with hypericines and I3, II8-biapigenin. This result was found for the first time and is in contradiction with similar works which differ in key areas such as sample amount and sample acquisition. Applying another statistical test (REGW), it could be shown that the quercetin and isoquercetin contents were the most characteristic and useful chemical features by which to describe an origin than other flavonoids.

The availability of high-purity referee substances is of great interest for the quantitative determination of plant material. Hypericin, hyperforin, I3-II8-biapigenin and a highly-enriched fraction of protohypericines were isolated and purified using new procedures or in ones optimised with regard to yield and handling. Comparing the results with literature

data, the identities of the substances were confirmed by means of UV-VIS-spectroscopy, mass-spectrometry and NMR spectroscopy.

The stability properties of hyperforin and hyperforin-enriched extracts in cyclohexan were poor compared with hydrophilic solvents like methanol and acetonitrile.

The specific absorption-coefficient of hyperforin was determined by spectrophotometry for the first time and confirmed by repetition.

Comparison with commercially available standards showed differences concerning the specific absorption and organoleptic examination (colour, smell). Following HPLC-analysis, the different samples showed good consensus of the areas by using the 100% peakcount method.

The purification of I3, II8-biapigenin was achieved using HPLC.

It was possible to enrich hypericin by making use of the instability of pseudohypericin under aqueous-ammoniacal conditions, only through column chromatography with polyamide, to over 95%.

By examining, for the first time, the kinetics of the conversion of protohypericin and protopseudohypericin to hypericin and pseudohypericin respectively, clear differences were determined under light-exposure of 500 lux. Protopseudohypericin was proven to be more stable than protohypericin. The conversion of protohypericines occurred strictly in accordance with first-order kinetics, quantitatively and in equimolar fashion. In a crude extract prepared from plant-material excluded from light, almost 40% of hypericines were identified as protohypericines. This result can point to the fact that protohypericines do not represent a biogenetic precursor of hypericines. Protohypericines could be the product of biosynthesis in St. John's wort, the last step in the conversion to hypericines is of a physical, light-dependent nature.

3 Resumen

El cultivo de la Hierba de San Juan crece en su importancia. Las razones se encuentran en un aumento de la demanda, que no puede ser saturada por la recolecta en el ámbito natural, al mismo tiempo que crecen las exigencias a la calidad de fitofarmacos.

El objeto de este trabajo consistió en la selección de *Hypericum perforatum* L. a base de plantas de diferentes procedencias europeas. El espacio de tiempo de este estudio fue de dos periodos de vegetación.

Los criterios para la selección tenían como finalidad básica, la caracterización de plantas de diferentes procedencias a base de criterios químicos y morfológicos adecuados para una caracterización inequívoca. En el primer año del sortido de más 100 plantas que en su procedencia recubrían la mayoría de los países del centro y oeste de Europa, sobrevivieron 60, de las cuales cuatro de ellas fueron indentificadas como *Hypericum maculatum* L. En este contexto es de interés y anteriormente nunca mencionado, la existencia de pequeñas cantidades de hypoforina en *Hypericum maculatum* L.

Al final del primer año se seleccionaron 12 procedencias, con un alto grado de hypericina y pseudohypericina además de hypoforina. Para el segundo año, la selección de la plantas tenía como objetivo una proporción de hypericina/pseudohypericina de 1:1, esto se logró, con una excepción en la cual la proporción fue de 2:1.

La reproducción de las plantas fue de manera clásica por siembra y en el primer año para la procedencia 6 por cultura celular. En la práctica la reproducción por cultura celular representa un aumento de trabajo y gastos, que en general no se podrá justificar. Sin embargo este método ofrece la posibilidad de lograr un cultivo libre de patologías, que se puede tener como fondo, al que siempre se puede recurrir.

En el segundo año fueron analizadas 209 plantas, de un total de 12 procedencias. Estas fueron caracterizadas según su morfología. Para ello se examinaron: largo y ancho de las hojas dorsales, largo y ancho de los pétalos, largo de los sépalos, el alto de la planta y el ancho de su florecimiento, las partes de flor, hoja y pedúnculo. Aquí se pudo comprobar que las diferencias en lo ancho y largo de las hojas dorsales, servían como caracterización inequívoca para determinar la procedencia de la planta. Una propiedad más, resultado ser la propensión ante *Colletotrichum gloeosporioides*, esta enfermedad producida por un hongo y el grado del daño que produjo en la planta, fue también registrada y seleccionada como característica.

Químicamente fueron analizadas 170 plantas de 6 procedencias individualmente y las restantes 39 plantas de las otras 6 procedencias, como mezcla.

Cuantitativamente fueron analizados las sustancias: rutina, hyporosida, isoquercitrina, quercitrina, I3, II8-Biapigenina, quercetina, pseudohypericina, hypericina e hyperforina.

En el transcurso de este trabajo, se pudo comprobar por vez primera la falta de rutino en algunas procedencias. Este resultado fue comprobado con ayuda de un segundo análisis a base de las muestras reservadas de la primera prueba. Por su respectiva especificación de los dos análisis queda verificado este resultado.

Los resultados, a diferencia de la cosecha del primer año, mostraban variabilidad en las cantidades de hypoforina, hypericina y pseudohypoforina, dentro de cada procedencia. Sin embargo se cristalizó que la proporción de hypericina y pseudohypericina era característica inequívoca de cada planta para su procedencia, al igual que la ya mencionada falta de rutino.

Comparado los resultados de los dos años entre ellos, es este el mejor valor, por lograr mayor correspondencia.

En la comparación analítica de la primera y segunda cosecha, dentro de un mismo año los resultados mostraban una mayor congruencia, que en la comparación entre los dos años.

Las procedencias 2 y 7 representaron ser las procedencias más homogéneas en cuanto a su contenido de hyperforina, hypericina y pseudohypericina. Sin embargo la cosecha del primer año de la procedencia 2 fue relativamente pequeña. La procedencia 7 tuvo a causa de *Colletotrichum gloeosporioides* en gran parte una pérdida total de las plantas, independientemente de esto resultó su cosecha mayor. Las dos procedencias eran liebres de rutina.

La evaluación estadística según Pearson, mostró gran correlación entre las flavonoidglycosidas y aglyca por una parte y entre las hypericinas por la otra. Hypoforina correlava solo en parte y en menor grado con las hypericinas y I3, II8-Biapigenina. Este resultado fue demostrado por vez primera y se encuentra en contradicción con otros trabajos realizados sobre este tema, pero que en volumen de pruebas y en el modo de trabajo, no son comparables con este (ver 5.6.10). Además se pudo mostrar estadísticamente, que los volúmenes de glycosina flavonoida, quercitrina y isoquercitrina es la medida mejor adecuada para la caracterización de una procedencia, que no los volúmenes de las otras flavonoidas.

La disponibilidad de sustancias de referencia, de un grado de pureza máxima, es básica para la evaluación cuantitativa de la composición del material vegetal. Hypericina, hyperforina, I3-, II8-Biapigenina y una fracción enriquecida de protohypericina fueron aisladas según métodos nuevos o optimados en cuanto a la pureza conseguida o la mejora del manejo técnico. En cuanto a la comparación con datos bibliográficos, la identidad se comprobó con ayuda de espectrografías UV-VIS, de masa, y de resonancia de protonos.

En pruebas de estabilidad de la sustancia pura de hyperforina y de extractos enriquecidos con hyperforina, se pudo mostrar una gran labilidad de la hyperforina, que se encontraba disuelta en cyclohexan. Para la hyperforina se pudo definir por vez primera la absorción específica. En un segundo análisis, con pruebas que fueron aisladas independientemente, se pudo verificar el resultado. La comparación con las sustancias estándares que se pueden adquirir comercialmente, mostraba grandes diferencias en la absorción específica, como también en la prueba organoléptica (color, olor). Sin embargo las diferentes pruebas tenían una gran correspondencia en el área según el método de área porcentaje, con la prueba de HPLC.

En la aislación de I3, II8-Biapigenina se purizó por primera vez con HPLC preparativa.

Se logró enriquecer a la hypericina a un 95%, aprovechando la inestabilidad de pseudohypericina en ambiente de agua amoniacádica, únicamente con cromatografía de columna con polyamida.

Por vez primera fue estudiada la cinética de la transformación de protohypericina a hypericina y de protopseudohypericina a pseudohypericina, bajo una iluminación de 500 LUX. Aquí se mostraron grandes diferencias. Protopseudohypericina resultó ser a comparación de protohypericina el compuesto más estable. La transformación de los protocompuestos, ocurrió estrictamente según una cinética de primera orden, cuantitativamente y equimolar.

En un extracto en crudo, extraído bajo exclusión de la luz, se encontraban alrededor de un 40% de la protofase. Esta cantidad considerable deja sospechar, que protohypericina y protopseudohypericina no representan en la planta una fase biogénica anterior a la de las hypericinas, sino que los protocompuestos son el final del ciclo biogénico y que en cuanto a la transformación, este proceso depende únicamente de la exposición solar.

4 Einleitung

4.1 Name und Geschichte

Johanniskraut, *Hypericum perforatum* L., ist eine Arzneipflanze, deren Nutzung sich bis in die Antike zurückverfolgen lässt. Die Herkunft des botanischen Namens leitet sich nach CZYGAN (1993) aus dem griechischen hyper (über) und eikon (Bild) ab. Pflanzen der Gattung *Hypericum* sollen zur Abwendung böser Geister über Götterfiguren oder Bildern befestigt worden sein. In einem Kräuterbuch des sechzehnten Jahrhunderts [FUCHS (1543)] wird Johanniskraut auch Fuga daemonum genannt, *Hypericum* diente in verschiedenen Kulturen zur Abschreckung von Geistern.

In einem weiteren Ansatz interpretieren HÖLZL et al. (1994) den Gattungsnamen als hyper (über) und ereikon (Heide), als über der oder größer als die Heide wachsend.

Die Artbezeichnung *perforatum* weist auf die durchscheinend punktierten Blätter [Abbildung 4-1, leicht verändert nach WICHTL, (1997)] hin. Es handelt sich dabei um Ölbehälter lysigenen oder schizogenen Ursprungs. Beide Möglichkeiten werden diskutiert [HEGI (1970)].

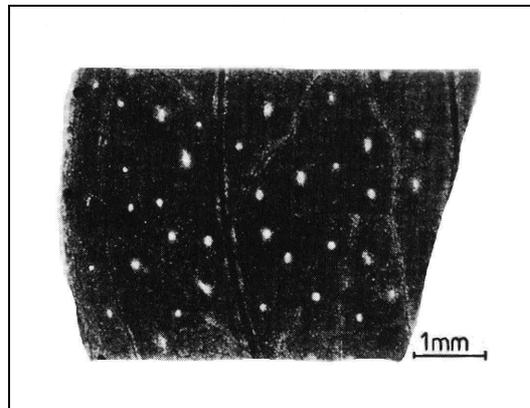


Abbildung 4-1 Blatt von *H. perforatum* im Durchlicht

Die deutsche Bezeichnung und deren Synonyme deuten auf die Blühzeit um St. Johannis (Johanniskraut, Walpurgiskraut, Sonnenwendkraut), auf die roten Farbstoffe (Herrgottsblut, Blutkraut) und die mitunter stark verholzten Stengel (Tüpfelhartheu, Hartheu) hin. Ferner wurde Johanniskraut auch zum Würzen des Bieres ähnlich wie Hopfen verwendet (Waldhopfenkraut, Feldhopfenkraut). Ein Grund für diese Verwendung

ist in der chemischen Verwandtschaft des Hyperforins (4.3.4) zu den Hopfenbitterstoffen (Humulon, Lupulon) zu sehen, die dem Bier Haltbarkeit und Geschmack verleihen sollen.

Eine erste Erwähnung findet die Gattung *Hypericum* nach CZYGAN (1993) bereits in der Antike bei Plinius dem Älteren (23-79 n. Chr.), sowie von Pedanios Dioskurides von Anazarbos (77 n. Chr) in seinem Werk *ἰατρικὴ ἰστορία* (in der lat. Übersetzung *de materia medica libri quinque*), das nach TSCHIERCH (1933) für mehr als eineinhalb Jahrtausende "...das Orakel der Heilmittellehre, die Bibel der Pharmakologen und oberste Instanz für die Kenntnis der Arzneipflanzen..." darstellt.

Dioskurides unterscheidet zwischen vier Johanniskrautarten, wobei der Begriff *hypericón* nach HEGI (1970) auf das in Griechenland weit verbreitete *H. crispum* (oder *H. barbatum*) zurückgeht. Weiter wurden *H. perforatum*, *H. ciliatum* sowie *H. coris* zugeordnet. Die Bezeichnung *Hypericum perforatum* ist bereits im Mittelalter gebräuchlich und wurde von dem Systematiker Carl von Linné 1753 in *Species planetarum* [CZYGAN (1993)] übernommen.

4.2 Botanik und Phytopathologie

Hypericum perforatum L. ist ein Vertreter der Familie der Hypericaceae (Hartheugewächse), die nicht mehr gebräuchliche Bezeichnung Guttiferae (lat.: gutta, Tropfen) deutet auf die Eigenart der Familie zur Bildung von Exkretbehältern hin.

Die Gattung *Hypericum* L. ist weltweit verbreitet und umfaßt bisher 378 bekannte Arten [ROBSON (1977)]. Sie stellt innerhalb der Ordnung der Theales insofern eine Besonderheit dar, als daß sie auch krautige, außertropische Vertreter zeigt.

Hypericum perforatum L. läßt sich nach HEGI (1970) wie folgt beschreiben:

Es handelt sich um eine ausdauernde Pflanze mit einer langlebigen, spindelförmigen Wurzel und vielfach verzweigtem Rhizom. Sie erreicht eine Höhe von 20 bis 100 cm, zeigt dabei einen aufrechten Wuchs, der im oberen Bereich der Pflanze ästig und mit zahlreichen Adventivsprossen versehen ist. Die Stengel weisen zwei Längskanten auf und sind zur Spitze hin mit Drüsen besetzt.

Die Laubblätter haben eine elliptisch-eiförmige bis längliche oder lineale Form, wobei sich Blattform und Größe je nach Position an der Pflanze geringfügig unterscheiden können. Sie sind durchscheinend punktiert und zeigen überwiegend am Rand schwarze Drüsen.

Die Blüten sind in einer Trugdolde angeordnet und mit kahlen, schwarzdrüsigen Stielen versehen. Die Kelchblätter sind etwa 6 mm lang und fein zugespitzt, gesägt oder ganzrandig. Die Kronblätter sind schief-elliptisch und bei einer Länge von 10-13 mm einseitig gekerbt, von goldgelber Farbe mit schwarzen Punkten oder Strichen.

Von Johanniskraut sind vier Subspezies beschrieben [HEGI (1970)], die sich hauptsächlich über die Breite der Kelchblätter identifizieren lassen. Als weitere Merkmale werden Laubblattform, Punktierung oder Strichelung der Kronblätter genannt. Tabelle 4-1 beschreibt die unterschiedliche Ausprägung der Kelchblätter bei den verschiedenen Subspezies.

Subspezies	Kelchblattlänge / Form
Hypericum ssp. angustifolium (DC) GAUDIN	0,7 bis 1 mm breit, 4 bis 6 mm lang, schmal-lanzettlich
Hypericum ssp. latifolium (KOCH) A. FRÖHLICH	2 bis 3 mm breit, 4 bis 6 mm lang, breit-lanzettlich bis eiförmig
Hypericum ssp. perforatum (subsp. vulgare NEILR. /subsp. typicum BECK)	1 bis 1,5 mm breit, bis 7 mm lang fein zugespitzt, lanzettlich
Hypericum ssp. veronense (SCHRANK) A. FRÖHLICH	0,7 bis 1 mm breit, 3 bis 4 mm lang

Tabelle 4-1 Kelchblattausprägung der *H. perforatum*-Subspezies

Johanniskraut ist in ganz Europa, auf den Kanaren und Nordafrika verbreitet. Von diesen Gebieten wurde es nach Nord- und Südamerika, dort vor allem nach Chile [HEGI (1970)] und Kanada eingeschleppt [HILDEBRAND et al. (1991)].

Bei einer Inkulturnahme von Johanniskraut muß den Krankheitserregern, die einen Bestand laut GÄRBER (1999) durchaus vernichten oder ernsthaft dezimieren können, Beachtung geschenkt werden.

Genannt werden von PLESCHER (1997) virale Erkrankungen und Pilzkrankungen, die während und unmittelbar nach der Keimung auftreten (*Pythium* sp und *Rhizoctonia* sp.) und Pilzkrankungen (Rotwelke, Mehltau), die in der Freilandkultur zu finden sind. Als tierische Schädlinge kommen die Larven einer nicht näher bestimmten Blattwespe (*Tenthredinidae*), der Johanniskraut-Blattkäfer (*Chrysomela hyperici*), der Schattenwickler (*Cnephasia* sp.) und die Schaumzikade in Betracht.

Die größte Bedeutung ist hier den Pilzerkrankungen beizumessen. Bei einer Untersuchung von GÄRBER (1999) wurden neben *Colletotrichum gloeosporioides* noch andere Pilze der Gattungen *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phoma*, *Gliocladium*, *Cylindrocarpon* gefunden. Bei Infektionsversuchen erwies sich lediglich *Colletotrichum gloeosporioides* als pathogen.

Die Erkrankung macht sich zunächst durch das Entstehen von bräunlich-fleckigen Läsionen bemerkbar, die leicht eingesunken erscheinen. Bei einer Ausweitung des Befalles tritt ein Knicken oder auch Brechen der Triebe oberhalb der Befallsstelle auf. Besonders auffallend ist der Befall der Tribspitzen, die infolge der unterbrochenen Wasserzufuhr welken. Es werden sowohl einzelne Triebe als auch sukzessive die ganze Pflanze befallen. Aufgrund der genannten Symptome trägt diese Erkrankung auch den Namen Rotwelke.

4.3 Charakteristische Inhaltsstoffe

4.3.1 Naphthodianthrone

Naphthodianthrone stellen die Substanzgruppe dar, der die Pflanze aufgrund der intensiven roten Farbe einige ihrer älteren Bezeichnungen verdankt. Mit Fagopyrin sind Naphthodianthrone im Pflanzenreich in nennenswerten Mengen nur noch in *Fagopyrum esculentum* L. beschrieben [FRIEDRICH et al. (2000)].

Hypericin, Pseudohypericin (berechnet als Hypericin), sowie die Protoverbindungen, aus denen nach Belichtung (In Formel 4-1 durch $h \cdot \dot{\iota}$ symbolisiert) die beiden erstgenannten Substanzen hervorgehen, machen laut HILLER et al. (2000) 95% des Gesamthypericins aus. Nach Angaben von BERGHÖFER^B (1987) liegen Hypericine zu 0,1% im Kraut der Pflanze vor, wobei der Gehalt in Blüten und Knospen das doppelte betragen kann. Eigenen Messungen zufolge wurden Gehalte von 0,2% in der Trockenmasse einer blühenden Pflanze ohne Stengelanteile ermittelt, was Gehalten von etwa 0,07% in der Frischpflanze entspricht.

Hypericin ist zugänglich durch die Belichtung von Protohypericin oder partialsynthetisch durch eine alkalische Dimerisierung, wie sie bei MEISENHEIMER (1991) durchgeführt wird, wobei von Emodin ausgegangen wird.

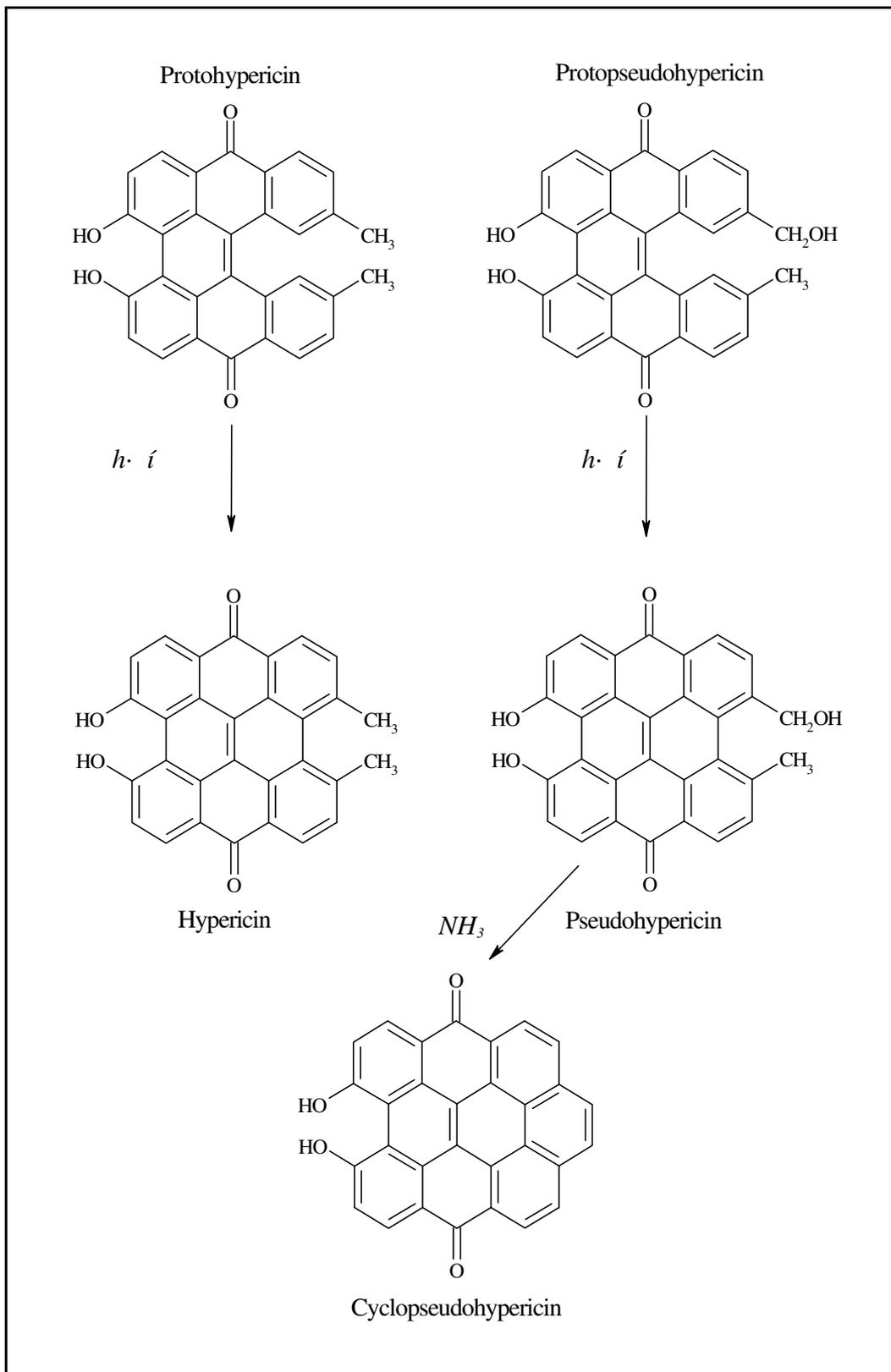
Der Vollständigkeit halber seien noch Isohypericin, Desmethylpseudohypericin, Hypericodehydrodianthron [BROCKMANN (1957)] sowie das Anthron Skyrin [BERGHÖFER (1987)] genannt.

Das genuine Vorkommen der in Formel 4-1 dargestellten Substanzen gilt als gesichert, oder, im Falle des Cyclopseudohypericins, als möglich. Der Gehalt dieser Substanz in Zusammenhang mit dem Pseudohypericingehalt kann nach HÄBERLEIN et al. (1992) einen Indikator für die Qualität einer Johanniskrautdroge oder deren Zubereitungen darstellen. Wird bei BROCKMANN et al. (1954) die Bildung des Cyclopseudohypericins aus Pseudohypericin noch durch Anwesenheit konzentrierter Schwefelsäure beschrieben, so gelingt bei HÄBERLEIN et al. (1992) die Umsetzung in methanolisch-alkalischem Milieu.

Bis 1995 galt für die Droge *Hyperici herba* sowie deren Zubereitungen eine Normierung auf Hypericin als wirksamkeitsbestimmenden Anteil im Rahmen der Aufbereitungsmonographie der Kommission E (Baz Nr. 228, Fassung von 1989) mit entsprechender Deklaration und Dosierungsanweisung. Im Zusammenhang mit dem "Bühler-Papier" (1995), einem Schreiben des BfArM an den BAH und den BPI wurde auf diese Standardisierung von Johanniskrautpräparaten verzichtet, da keine gesicherte Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Hypericingehalt und einem Johanniskraut enthaltenden Präparat belegt werden konnte. Es ist lediglich die Angabe des Drogen-Extrakt – Verhältnisses und der im Arzneimittel verarbeitete Extraktmenge notwendig [nach STEINHOFF (1996)].

Der Gehalt an Hypericin in einem Extrakt kann ein wichtiger Indikator für die in der Ausgangsdroge enthaltene Menge an Blütenanteilen sein, da dort der Hypericingehalt besonders hoch ist.

Ein Mindestgehalt an Hypericin und Pseudohypericin wird, vermutlich aus diesem Grunde, nur noch von PH. HELV. VIII (1997) verlangt. Die Droge besteht hier aus zur Blütezeit geernteten Triebspitzen von einem Mindestgehalt von 0,08% Hypericin und Pseudohypericin, berechnet als Hypericin.

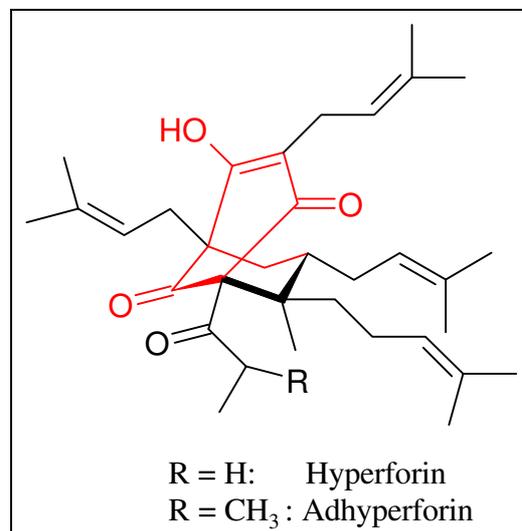


Formel 4-1 Wichtige Naphthodianthrone

4.3.2 Derivate des Phloroglucins

Die Derivate des Phloroglucins (Formel 4-2, das Grundgerüst ist rot gekennzeichnet), Hyperforin und Adhyperforin sind charakteristisch für *Hypericum perforatum* L. Andere Derivate des Phloroglucins sind in anderen Arten der Gattung *Hypericum* nachgewiesen [ROCHA et al. (1996), HU et al.(1999)] worden.

Hyperforin liegt nach eigenen Untersuchungen in einem mittleren Gehalt von 1% bis 2,5% in der getrockneten Pflanze vor. MAISENBACHER (1991) ermittelte für die Früchte (4%) einen höheren Gehalt als für die Blüten (2%) und ein von der Ontogenese der Pflanze abhängiges, ansteigendes Verhältnis von Adhyperforin zu Hyperforin.



Formel 4-2 Hyperforin und Adhyperforin

Neben Hyperforin konnte in jüngerer Zeit auch Hydroperoxycadiforin nachgewiesen und charakterisiert werden, das aufgrund seines geringen Gehalts von nur untergeordneter Bedeutung sein dürfte [RÜCKER et al. (1995)].

Hyperforin gilt als ausgesprochen oxidationsempfindlich [MAISENBACHER (1991), ORTH^A et al. (1999)] und als in bestimmten Lösungsmitteln instabil [ERDELMEIER (1999)]. Diese Aussagen konnten aufgrund eigener Beobachtungen bestätigt werden (vergl. dazu 6.3 3). TRIFUNOVIÆ et al. (1998), VERROTTA et al. (2000) sowie ORTH^A et al. (1999) konnten mehrere Oxidationsprodukte des Hyperforins nachweisen, wobei allerdings fraglich ist, inwieweit es sich hierbei nicht um ihrerseits wiederum labile Verbindungen handeln könnte, und ob diese für die Analytik der Droge oder deren Zubereitungen in der Praxis bedeutsam sind.

4.3.3 Flavonole, Flavonolglykoside und Biflavonoide

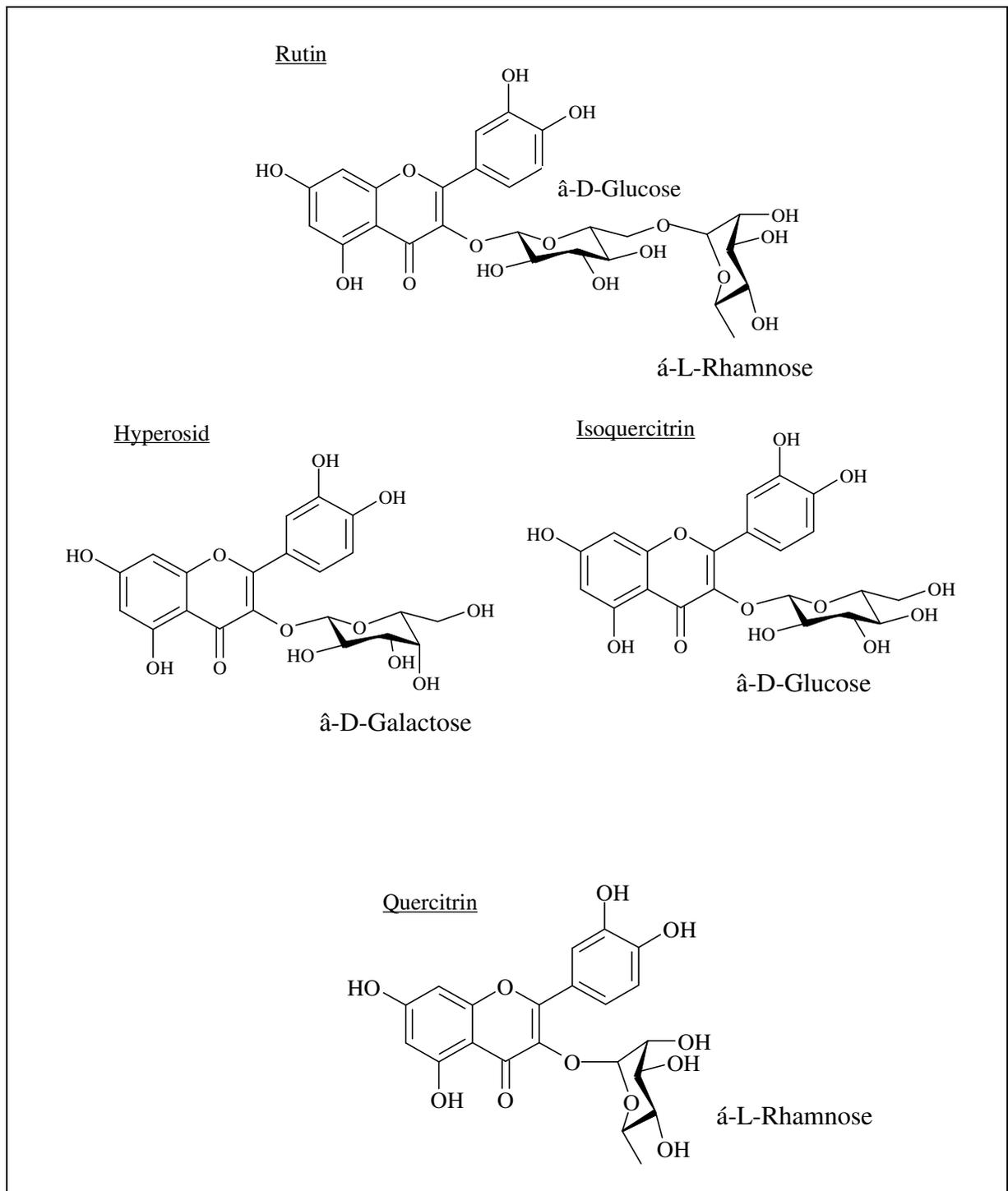
Die in der Literatur allgemein unter dem Begriff Flavonoide zusammengefaßte Substanzgruppe [SCHNEIDER (1991)] umfaßt neben den oben genannten Gruppen noch andere wie Catechine, Anthocyanidine und Leucoanthocyanidine. Der Begriff Flavonoide wird aus Gründen der Vereinfachung im weiteren Verlauf der Arbeit nur auf Flavonole, deren Glykoside sowie auf Dimere des Apigenins angewandt.

Flavonoide (vergl. Formel 4-3) sind zu etwa 2-4% in der Trockenmasse enthalten [HÖLZL et al. (1987)], wobei die Flavonoidglykoside Hyperosid und Rutosid neben Isoquercitrin und Quercitrin die Hauptkomponenten darstellen. Nach SCHÜTT et al. (1993) ist das Vorkommen von Rutin für *Hypericum perforatum* L. obligat.

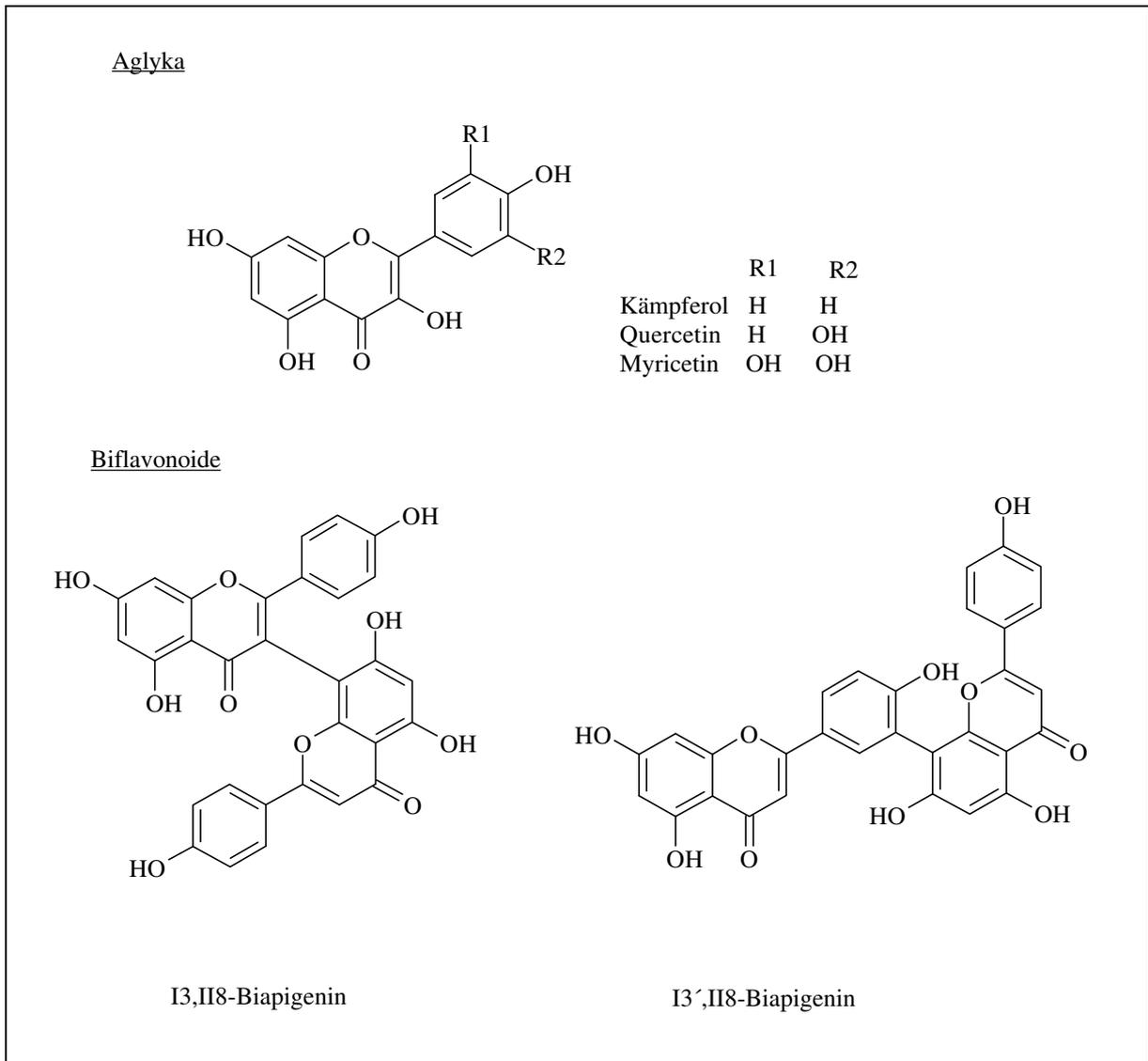
Die wichtigsten Vertreter der Aglyka stellen Quercetin, I3, II8-Biapigenin (BERGHÖFER^B 1987) mit Gehalten von 0,1 bis 0,5% der Trockenmasse und I'3, II8-Biapigenin, Amentoflavon, [BERGHÖFER (1989)] das zu etwa einem Zehntel der Konzentration von I3, II8-Biapigenin vorliegt, dar (vergl. Formel 4-4).

Das Vorkommen von I3, II8-Biapigenin ist für *Hypericum perforatum* L. charakteristisch [HÖLZL et al. (1994)]. Es ist in Blüten und Knospen zu finden.

Weiter sind noch Kämpferol, Luteolin und Myricetin enthalten [SCHÜTT et al. (1993)].



Formel 4-3 Flavonoidglykoside



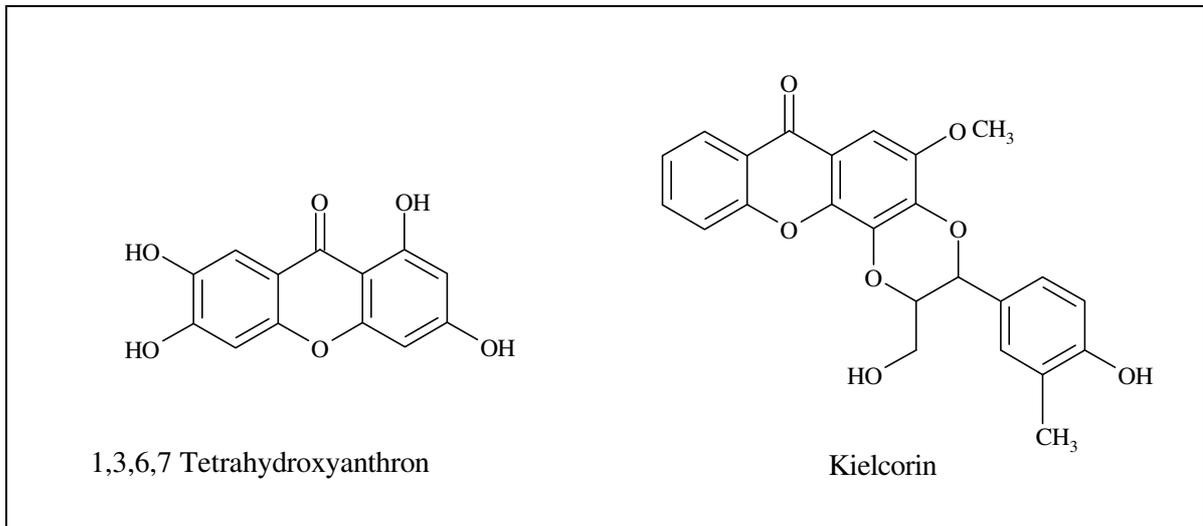
Formel 4-4 Flavonoidaglyka

4.3.4 Xanthone

Nach BENNET et al. (1989) stellen die Xanthone ein wichtiges chemotaxonomisches Merkmal für die Familien der Hypericaceae und der Gentianaceae, wobei im Unterschied zu den Enziangewächsen bei den Hartholzwächsen auch prenylierte Xanthone vorkommen.

Für *Hypericum perforatum* L. wurden bisher 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon, sowie Mangiferin, dessen Aglykon Kielcorin [BERGHÖFER^B (1987), SPARREBERG (1993)] und Isomangiferin beschrieben [KITANOV (1998)]. Dabei blieb das Vorkommen von Mangiferin im Gegensatz zu den Erkenntnissen von KITANOV (1998) bei BERGHÖFER^B

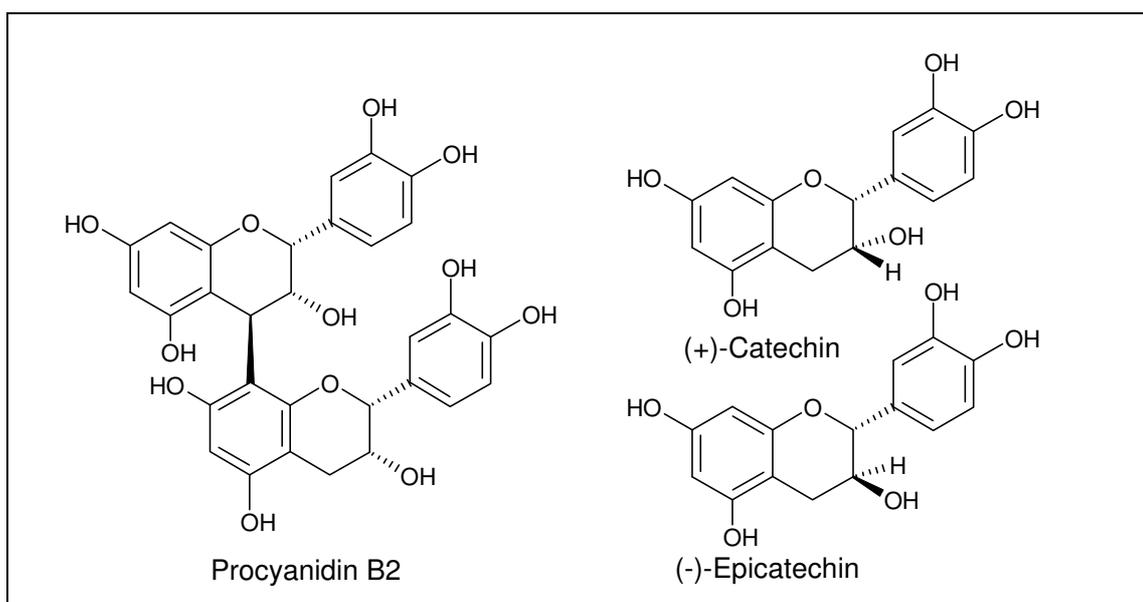
(1987) auf die Wurzel beschränkt. Xanthone liegen alle im Bereich unter 1‰ vor. Die Xanthone sind in Formel 4-5 dargestellt.



Formel 4-5 Xanthone aus Johanniskraut

4.3.5 Gerbstoffe und Procyanidine

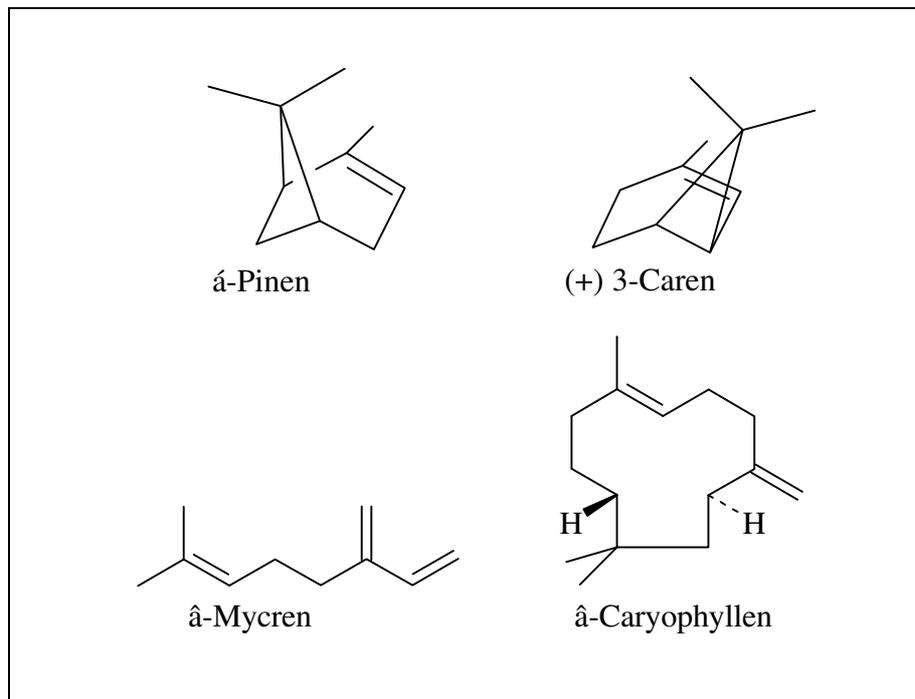
Johanniskraut enthält fast 14%, Procyanidine die über 80% des Gesamtgerbstoffgehaltes ausmachen [MELZER (1990)]. Procyanidine der Reihen A bis C wurden nachgewiesen, ebenso Catechin und Epicatechin. Dargestellt (Formel 4-6) sind hier Procyanidin B2 [Epicatechin-(4â 8) -Epicatechin], Catechin und Epicatechin.



Formel 4-6 Epicatechin, Catechin und Procyanidin B2

4.3.6 Ätherisches Öl

Johanniskraut enthält bis zu 1% ätherisches Öl aus den Ölbehältern in Laub- und Korollblättern [SCHÜTT et al. (1993)]. Die einzelnen Relationen der Komponenten (Formel 4-7) sind nach CAKIR et al. (1997) dabei spezifisch für die Art und setzen sich im Wesentlichen aus Monoterpenen wie α -Pinen, 3-Caren sowie dem Sesquiterpen β -Caryophyllen zusammen. SCHÜTT et al. (1993) berichtet über das Vorkommen von 2-Methyl-3-buten-2-ol, das als Abbauprodukt der Hopfenbittersäuren bekannt ist.



Formel 4-7 Hauptbestandteile des ätherischen Öls aus Johanniskraut

4.3.7 Weitere Inhaltsstoffe

Als weitere Inhaltsstoffe seien noch Pflanzensäuren wie Kaffee- und Chlorogensäure, Ascorbinsäure, Carotinoide, sowie Paraffine und Wachsalkohole genannt.

4.4 Pharmakologie

4.4.1 Wirkungen der Substanzgruppen

Hypericin galt als Hauptwirkstoff von *Hypericum perforatum* L. Nach Untersuchungen von SUZUKI et al. (1984) bestand der Wirkungsmechanismus in einer irreversiblen Hemmung der Monoaminoxidase vom Typ A. Dieser Befund wurde jedoch von SPARREBERG (1993) widerlegt.

Eine bedeutende Nebenwirkung, mit der Hypericin und Pseudohypericin in Verbindung gebracht werden, ist die Photosensibilisierung.

Laut HOMEPAGE DER VETERINÄRMEDIZINISCHEN FAKULTÄT ZÜRICH (2000) sind toxische Effekte beim Schaf bei einer täglichen Aufnahme von 100g Blättern zu erwarten, bei Rindern genügen ein halbes Prozent des Körpergewichtes. BROCKMÖLLER et al. (1997) gaben als Mindestdosis für eine photosensibilisierende Wirkung am Menschen einen Wert von über 11,25 mg p. o. an, der bei ordnungsgemäßer Einnahme von Zubereitungen aus Johanniskraut in keinem Fall erreicht werden dürfte. In einer vergleichenden Untersuchung von VANDENBOGAERDE et al. (1998) wurde ermittelt, daß in vitro die Phototoxizität von Pseudohypericin etwa nur 5% der Phototoxizität von Hypericin zeigte. Die Verfasser begründen diesen Effekt mit der Ausbildung kovalenter Bindungen des Pseudohypericins zum Albumin des zugesetzten fetalen Kalbsserums, so daß davon ausgegangen werden kann, daß überwiegend Hypericin Auslöser für den Hypericinismus genannten phototoxischen Effekt ist. Ursache für diesen Effekt kann nach FERNANDEZ et al. (1997) die lichtinduzierte Bildung von Singulett-Sauerstoff durch Hypericin sein, was von BOL'SHAKOVA et al. (1997) ebenfalls diskutiert wird.

Eine weitere belegte Eigenschaft von Hypericin ist dessen Wirkung auf Herpes simplex Viren Typ 2 [BOURNE et al. (1999)] und antiretrovirale Eigenschaften in vitro. Ein Einsatz in der Krebstherapie wird diskutiert [ZHANG et al. (1997)], auch unter Ausnutzung des photosensibilisierenden Effektes [KOREN et al. (1996), COLASANTI et al. (2000)].

Nach SATTLER (1997) flutet Hypericin langsamer als Pseudohypericin im Plasma an. Die Plasmahalbwertszeit wird mit etwa zehn Stunden für Hypericin und etwas über zwei Stunden für Pseudohypericin angegeben.

Auf Hyperforin konzentrieren sich neuere Bemühungen, die antidepressiven Wirkungen zuzuordnen. Nach CHATTERJEE et al. (1998) wird eine Aufnahmehemmung von Serotonin, Dopamin und Noradrenalin sowie GABA und L-Glutamat dem Hyperforin zugeordnet.

MÜLLER et al. (1997) und TEUFEL-MAYER et al. (1997) kamen zu ähnlichen Ergebnissen, darüber hinaus stellten sie bei längerer Versuchsdauer eine Erniedrigung der α -Rezeptoren- und eine Erhöhung der 5-HT₂-Rezeptordichte in der frontalen Cortex fest. Weiter werden Einflüsse auf die Ionenleitfähigkeit neuronaler Gewebe diskutiert [CHATTERJEE et al. (1999)].

Die antibakteriellen Eigenschaften des Hyperforins, die schon im Zuge dessen Entdeckung bekannt sind [GUREVICH et al. (1971)], wurden von SCHEMP et al. (1999) mit guten Resultaten für grampositive Erreger besätigt.

Hyperforin wird bei peroraler Applikation rasch resorbiert. Im Tierexperiment zeigte sich eine stark sedierende Wirkung [OSTROWSKI (1998)].

Bei der Applikation an Probanden wurden in therapeutisch üblichen Dosierungen von 300 oder 600 mg eines Hypericumextraktes maximale Konzentrationen im Plasma nach etwa drei Stunden erreicht, die Halbwertszeit des Hyperforins betrug acht bis neun Stunden [BIBER et al. (1998)].

Flavonoide sind im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet. Pro Tag werden, abhängig von der Ernährungsweise, schätzungsweise 1g Flavonoide zugeführt [METZ^A (2000)].

Quercetin und dessen Glykoside gelten als Antioxidantien [METZ^B (2000), (GORDON et al. (1998))]. In der Vergangenheit wurden mutagene Eigenschaften in vitro und kanzerogene Eigenschaften des Quercetins in vivo diskutiert. Die mutagene Wirkung in vitro gilt als erwiesen. In vitro wurde im Rahmen einer neueren Arbeit eine von der Anwesenheit von Cu(II)-Ionen abhängige DNA-Schädigung festgestellt [YAMASHITA et al. (1999)]. Eine kanzerogene Wirkung wird als vernachlässigbar eingestuft [EISENBRAND et al. (1997)]. Eine gute Übersicht über die dazu durchgeführten Untersuchungen geben EISENBRAND et al. (1997).

Es galt bisher als gesichert, daß die Flavonoidglykoside nur als Aglyka über das Darmepithel partiell resorbiert werden können [METZ^B (2000), HOLLMANN et al. (2000)]. Eine Hydrolyse von Flavonoidglykosiden mit α -glykosidischer Bindung kann nur im Kolonbereich durch Mikroorganismen stattfinden, die über α -Glykosidasen verfügen. Rutinpräparate galten daher als wirkungslos [METZ^B (2000)]. Tatsächlich wurde jedoch

bei Patienten mit Anus praeter eine Resorption der Flavonoidglykoside festgestellt [HOLLMANN et al. (2000)].

Die Wirkungen der Flavonoide sind vielfältig. Für Quercetin wurden antiprostanoide, antiatherosklerotische, antithrombotische, antihypertensive, antiarrhythmische, antivirale und antiretrovirale Wirkungen [METZ^B (2000)] und eine Hemmung der Monoaminoxidase vom Typ A gefunden [SPARREBERG (1993)].

Rutin wird aufgrund seiner kapillarstützenden und entzündungshemmenden Eigenschaften bei der Therapie des varikösen Symptomenkomplexes eingesetzt.

Für das Biflavonoid Amentoflavon wurden Interaktionen mit dem GABA-Rezeptor festgestellt [BAUREITHEL et al. (1997)].

Das Xanthon Norathyriol zeigte bei Untersuchungen von SPARREBERG (1993) die höchste Hemmung der Monoaminoxidase vom Typ A, jedoch ist hierbei das außerordentlich geringe Vorkommen dieser Substanz in *Hypericum perforatum* L. zu berücksichtigen.

Gerbstoffe haben eine adstringierende und antidiarrhöische Wirkung auf den Magen-Darm-Trakt, äußerlich angewandt unterstützen sie den Heilungsprozeß bei Irritationen und leichten Verletzungen von Haut und Schleimhaut [SCHNEIDER (1991)].

Für oligomere Procyanidine aus Johanniskraut wurde eine koronare Durchblutungsförderung und positiv inotrope Wirkung festgestellt [MELZER (1990)].

Procyanidin B2 spielt eine wichtige Rolle bei der Erhöhung der Löslichkeit von Hypericinen [BUTTERWECK^B et al. (1998)].

4.4.2 Wirkungen von Johanniskrautextrakten

Es wurden zahlreiche in vitro und in vivo-Untersuchungen durchgeführt, die die Wirksamkeit von Johanniskraut-Präparaten belegen. Bei den in vivo Untersuchungen sei auf die Ergebnisse von BUTTERWECK^A et al. (1998), BUTTERWECK et al. (2000) verwiesen, die mit Hilfe des forced swimming tests nach Porsolt eine Wirksamkeit eines Gesamtextraktes sowie einzelner Fraktionen nachweisen konnten durch Herabsetzung der Immobilitätsphase bei Versuchstieren. Eine Antagonisierung über den D₂/D₄-Antagonisten

Sulpirid läßt sich als Hinweis darauf interpretieren, daß das dopaminerge System zumindest bei der Testung von hypericin- und procyanidinhaltigen Fraktionen beteiligt war [BUTTERWECK et al. (1998)]. Hypericin und Pseudohypericin zeigten bei diesen Untersuchungen nur eine Wirkung in Verbindung mit der Procyanidinfraktion. ÖZTÜRK (1997) konnte an weiteren Modellen wie tail-flick und head dips ebenfalls Wirkungen nachweisen.

Bei Untersuchungen an Probanden [DEMISCH et al. (1990)] wurde eine lichtabhängige Erhöhung der Melatoninausscheidung beschrieben. Gleichzeitig nahm die Kortisolausscheidung im Urin nach dem Wecken der Probanden signifikant ab.

Die Wirkung auf unterschiedliche Neurotransmittersysteme wurde in vivo und in vitro untersucht: Noradrenerges und serotonerges System, dopaminerges System, GABA erges System. Eine Übersicht über die Arbeiten liefert KAUL (2000).

Diese Ergebnisse zusammengefasst, ist die Aussage zu treffen, daß es mehrere aktive Prinzipien des Johanniskrauts mit verschiedenen Angriffspunkten im Neurotransmitterstoffwechsel des zentralen Nervensystems gibt.

4.4.3 Anwendungsgebiete

Johanniskraut, *Hyperici herba*, wurde von der Aufbereitungskommission E positiv bewertet. Als Anwendungsgebiete werden der innerliche Einsatz bei psychovegetativen Störungen, depressiven Verstimmungszuständen, Angst und bzw. oder nervöser Unruhe genannt. Ölige Johanniskrautzubereitungen werden innerlich gemäß Kommission E bei dyspeptischen Beschwerden, äußerlich zu Behandlung und Nachbehandlung von scharfen und stumpfen Traumata, Myalgien sowie Verbrennungen 1. Grades eingesetzt [BAZ Nr. 228].

In der ROTEN LISTE (2000) werden etwa 100 Präparate aufgezählt, in denen Johanniskraut, teilweise in Kombination mit anderen Phythopharmaka, enthalten ist.

4.4.4 Klinische Studien

Es ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, auf alle Studien einzugehen. Übersichten finden sich bei LINDE (1996), VOLZ (1997) oder KAUL (2000).

Als kritisch wurden bei den von LINDE (1996) aufgeführten Studien die oft fehlende Klassifizierung des Grades der Erkrankung der Probanden nach Standardkriterien (ICD 10

der WHO) vor und nach einer klinischen Studie, fehlende Langzeitstudien, (keine der Studien dauerte länger als sechs Wochen), und fehlende Studien zur Dosisfindung [VOLZ (1997)] betrachtet, die weitere, im Design verbesserte Studien, notwendig machen [DE SMET et al. (1996)].

Neuere Studien mit verbesserter Diagnostik sind bei STEVINSON et al. (1999) zusammengestellt.

In vergleichenden Studien wurde versucht, die therapeutische Effizienz und Verträglichkeit von Johanniskraut zu Imipramin [VORBACH et al. (1997), PHILIPP et al. (1999)] und Amitryptilin [WHEATLEY (1997)] nachzuweisen. Nach einer von WILLIAMS et al. (2000) durchgeführten Metastudie erwiesen sich Johanniskrautpräparate als etwa gleich wirksam wie niedrig dosierte tricyclische Antidepressiva. Die unerwünschten Nebenwirkungen waren, bei vergleichbaren therapeutischen Effekten, bei den Johanniskrautpräparaten etwa nur halb so häufig und allgemein leichter.

Im Jahre 2000 empfahl das American College of Physicians-American Society of internal Medicine (ACP-ASIM) Johanniskraut zur Behandlung leichter Depressionen [WILLIAMS et al. (2000), SNOW et al. (2000)]. Diese Empfehlung ist insofern bemerkenswert, als daß Johanniskraut in den USA lediglich als Nahrungsergänzungsmittel eingestuft ist.

Im Jahre 1998 initiierte das National Institute of Mental Health (NIMH) eine Studie, die 336 Patienten mit einer Medikationsdauer von zwei bis sechs Monaten umfaßt. Verglichen werden ein Johanniskrautpräparat versus Placebo versus einem selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer (NIH Homepage, Stand: 07/00).

Zur Zeit liegen die Resultate noch nicht vor.

4.4.5 Interaktionen

Zum Ende des Jahres 1999 wurde über teilweise schwerwiegende Interaktionen in Zusammenhang mit der Einnahme von Johanniskrautpräparaten berichtet. Man stützte sich dabei auf Einzelfälle und Studien.

In einer Zusammenfassung [FUGH-BERMAN (2000)] werden Interaktionen mit Trazodon (MAO-Hemmer), Paroxetin, Sertralin (Serotoninreuptakehemmer), Theophyllin, Digoxin, Phenprocoumon sowie oralen Kontrazeptiva genannt.

Im Falle der Antidepressiva wurde ein mildes Serotoninsyndrom beschrieben, alle weiteren Wirkstoffe erfuhren eine Absenkung der Serumkonzentrationen.

Bei ROOTS (1999) wird weiter die Absenkung des Serumspiegels des Immunsuppressivums Cyclosporin beschrieben.

ROOTS (1999) und FUGH-BERMAN (2000) geben als mögliche Ursache dafür eine Induktion von Cytochrom P450 in der Leber an, die Aktivität dieses Enzymsystems soll etwa verdoppelt werden.

MARKOWITZ et al. (2000) konnten keinen signifikanten Unterschied der Pharmakokinetik der Modellsubstanzen Alprazolam und Dextromethorphan unter Verabreichung von 300 mg Johanniskrautextrakt, dreimal täglich verabreicht, feststellen. Die Verfasser räumen indes ein, daß die Probandenanzahl von sieben recht klein ist und daß nur ein Johanniskrautpräparat verabreicht werden konnte.

4.5 Anbau von Johanniskraut in Deutschland

1997 wurden in Deutschland etwa 600 t Johanniskrautdroge mit steigender Tendenz verarbeitet [BOMME (1997)].

Für den Anbau wurde eine Fläche von 300 ha belegt [PLESCHER (1997)]. Für das Jahr 2000 wird, nach Auskunft der Agrimed Hessen wV, ein Anbauumfang von 735 ha geschätzt, mit Schwerpunkten in Thüringen, Hessen (je 200 ha) und Bayern (100 ha).

Zusätzlich wird Johanniskraut aus Polen, Bulgarien, Ungarn, Argentinien, China Österreich, Chile, Südafrika, den Niederlanden sowie Italien und Frankreich importiert.

Man muß davon ausgehen, daß der Anbau in Deutschland aus Gründen der Qualitätssicherung und zur Bedarfdeckung auch in Zukunft weiter ansteigen wird.

Die Pflanzen werden üblicherweise im Gewächshaus angezogen und dann ins Freiland umgesetzt. Eine Direktaussaat ist zwar möglich, wird aber nicht empfohlen [BOMME (1997)], da der Saatgutverbrauch mit etwa 4 kg pro ha im Vergleich zur Voranzucht mit 50-100 g pro ha zu hoch ist.

Der Anbau erfolgt über zwei, bei gutem Zustand der Pflanzen oder günstigen klimatischen Bedingungen auch über drei Jahre.

Geerntet werden kann im ersten Kulturjahr einmalig, im zweiten Standjahr ist auch ein zweiter Aufwuchs möglich.

Die zu erwartenden Ertragszahlen unterliegen starken Schwankungen. Für das erste Jahr werden 1,5 bis 7 t/ha, für das zweite Jahr 2 bis 20 t/ha an getrockneter Ware angegeben [MERKBLÄTTER FÜR PFLANZENBAU (1986)].

Die wirtschaftliche Bedeutung der Droge *Hyperici Herba* wird durch die beeindruckenden Zahlen über Anbauflächen und benötigter Droge zur Weiterverarbeitung im industriellen Maßstab deutlich.

5 Selektion von Johanniskraut-Herkünften

5.1 Zielsetzung

Die für einen Anbau geeigneten Pflanzen einer Herkunft oder Sorte von *Hypericum perforatum* L. besitzt eine hohe Toleranz gegen Pilzkrankungen, einen hohen Gehalt an extraktionsfähigen Inhaltsstoffen und phäno- oder chemotypische Merkmale, die eine eindeutige Identifizierung der Droge oder des Extraktes möglich machen. Von besonderem Interesse ist die homogene Beschaffenheit von Pflanzen einer Herkunft sowohl in chemischer als auch in phänotypischer Hinsicht. Durch einen gleichmäßigen Habitus wird zum einen die Mechanisierung des Anbaus erleichtert, zum anderen erlaubt eine gleichmäßige Beschaffenheit der Inhaltsstoffe z. B. präzise Prognosen für die Beschaffenheit der aus der Droge hergestellten Zubereitungen.

Die Selektion von Pflanzen verschiedener Herkünfte erfolgte in zwei Stufen: Im ersten Jahr wurde anhand weniger Parameter die Variabilität der Herkünfte untereinander überprüft. Vorrang hatte hier die Auswahl von Pflanzen möglichst vieler und möglichst verschiedener Herkünfte, um eine breite Basis für eine Selektion zu erhalten.

Im zweiten Jahr erfolgte nach erneuter Aussaat ein Anbau der im ersten Jahr selektierten Herkünfte. Der Umfang vor allem der chemischen Bestimmungen wurde erweitert. Untersucht wurden nun möglichst viele Einzelpflanzen der im ersten Jahr ausgewählten Herkünfte. Galt das Hauptaugenmerk im ersten Jahr noch den Unterschieden zwischen verschiedenen Herkünften, so bildete im zweiten Jahr des Versuchs die Überprüfung der Variabilität von Einzelpflanzen innerhalb einer Herkunft den Schwerpunkt.

5.2 Saatmaterial

Das Saatmaterial für den Anbau von 1998, der in Marburg durchgeführt wurde, wurde von verschiedenen botanischen Gärten und aus Wildsammlung erhalten. Es wurden Samen aus dem europäischen Ausland (Spanien, Schweden, Polen, Rumänien, Bulgarien, Ungarn, Österreich, Schweiz, Italien, Slowakien, Tschechien, Estland, Portugal) und aus Deutschland bezogen. Eine im Ausland gesammelte Herkunft wurde über eine

Kalluskultur zwischenvermehrt. Das Saatgut oder die Jungpflanzen zeigten, in Bezug auf ihre geographische Herkunft, ein heterogenes Bild.

Für das zweite Anbaujahr wurde das Saatmaterial von den jeweils drei 1998 angebauten Pflanzen einer Herkunft gesammelt.

5.3 Bodenanalytik und Cadmiumbestimmung des Pflanzenmaterials

Für den Anbau 1999 war es notwendig, eine Bodenanalyse der in Frage kommenden Anbaufläche vorzunehmen, da die Beschaffenheit des Bodens den Wuchs und die Qualität von Johanniskraut entscheidend beeinflusst. Zwar gilt Johanniskraut als allgemein anspruchslos an den Boden, für eine Kultur muß jedoch die besondere Anfälligkeit für die Rotwelkekrankheit berücksichtigt werden. Boden, der eine Bildung von Staunässe begünstigt, ist ungeeignet, ebenso dem Wind ausgesetzte Standorte, an denen eine Verbreitung der Sporen von *Colletotrichum gloeosporioides* erleichtert wird. Der in Neumarkt untersuchte Boden war leicht, sandig mit humos-lehmigen Anteilen und war vor Wind geschützt.

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist der pH-Wert des Bodens in Verbindung mit der Cadmiumbelastung. PLESCHER (1997) konnte nachweisen, daß die Aufnahme von Cadmium nicht nur von der Bodenbelastung mit diesem Schwermetall abhängig ist, sondern auch vom pH-Wert des Bodens. So akkumuliert die Pflanze bei niedrigerem pH-Wert mehr Cadmium als im neutralen bis leicht alkalischen Bereich. Nach CHIZZOLA (1998) sind Ort (Akkumulation in bestimmten Organen) und das Ausmaß der Cadmiumaufnahme sowohl art- als auch herkunfts- oder sortenspezifisch. SCHNEIDER et al. (1996) stellten weiterhin fest, daß der Cadmiumgehalt mit dem zweiten und dritten Schnitt eines Jahres ansteigt. Überschreitungen des Höchstwertes von 0,5 mg/kg, der eine Empfehlung des BGA von 1994 darstellt [entnommen aus Cizzola (1998)], können durch geeignete Bodenwahl vermieden werden [SCHNEIDER et al. (1996)].

Die gefundenen Cadmiumwerte der Bodenuntersuchung lagen zwischen 0,19 und 0,3 mg/kg bei einem leicht sauren bis neutralen Milieu (vergl. Tabelle 8-3). Laut BOMME (1997) sollten die Cadmiumwerte im Boden nicht größer als 0,2 mg/kg bei neutralem bis leicht alkalischen pH-Wert sein. Dieser Wert wurde zumindest teilweise deutlich

überschritten. Die Einführung eines solchen Grenzwertes bleibt problematisch, da die entsprechende Analyse bislang noch durch den Königswasserauszug durchgeführt wird und keinen Aufschluß darüber gibt, ob und in welchem Ausmaß das Cadmium pflanzenverfügbar ist.

Die bei den Untersuchungen des Pflanzenmaterials auf eine Cadmiumbelastung erhaltenen Werte lassen nicht auf eine Akkumulation von Cadmium schließen. Das Detektionslimit lag bei einem Wert von 0,1 mg pro kg Pflanzenmaterial. Bei den Herkünften 1, 6 und 7, von denen je drei Mischmuster, herkunftsweise geordnet, angelegt wurden, wurde dieser Wert in keinem Fall erreicht oder überschritten.

5.4 HPLC-Methoden für die quantitativen Bestimmungen

Sämtliche quantitativen Bestimmungen wurden mittels HPLC durchgeführt. Im ersten Jahr wurde eine quantitative Bestimmung von Hypericin, Pseudohypericin und Hyperforin statt, im zweiten Anbaujahr noch zusätzlich von Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin, Quercetin und I3, II8-Biapigenin.

Bei der Entwicklung eines geeigneten Analysenschemas für die HPLC mußten folgende Tatsachen berücksichtigt werden:

Hypericine können erst nach Belichtung (Umsetzung der Protostufen) bestimmt werden.

Da sich Hyperforin unter Belichtung zersetzt, ist eine gleichzeitige Bestimmung von Hypericinen und Hyperforin nicht möglich.

Eine simultane HPLC-Bestimmung aller quantitativ relevanten Flavonoide ist, aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität, nur durch eine Gradientenmethode realisierbar. Durch die lange Dauer dieser Analysen in Verbindung mit der Instabilität des Hyperforins und der notwendigen Belichtung der Protohypericine ergeben sich für die chemische Charakterisierung einer Probe drei HPLC-Bestimmungen.

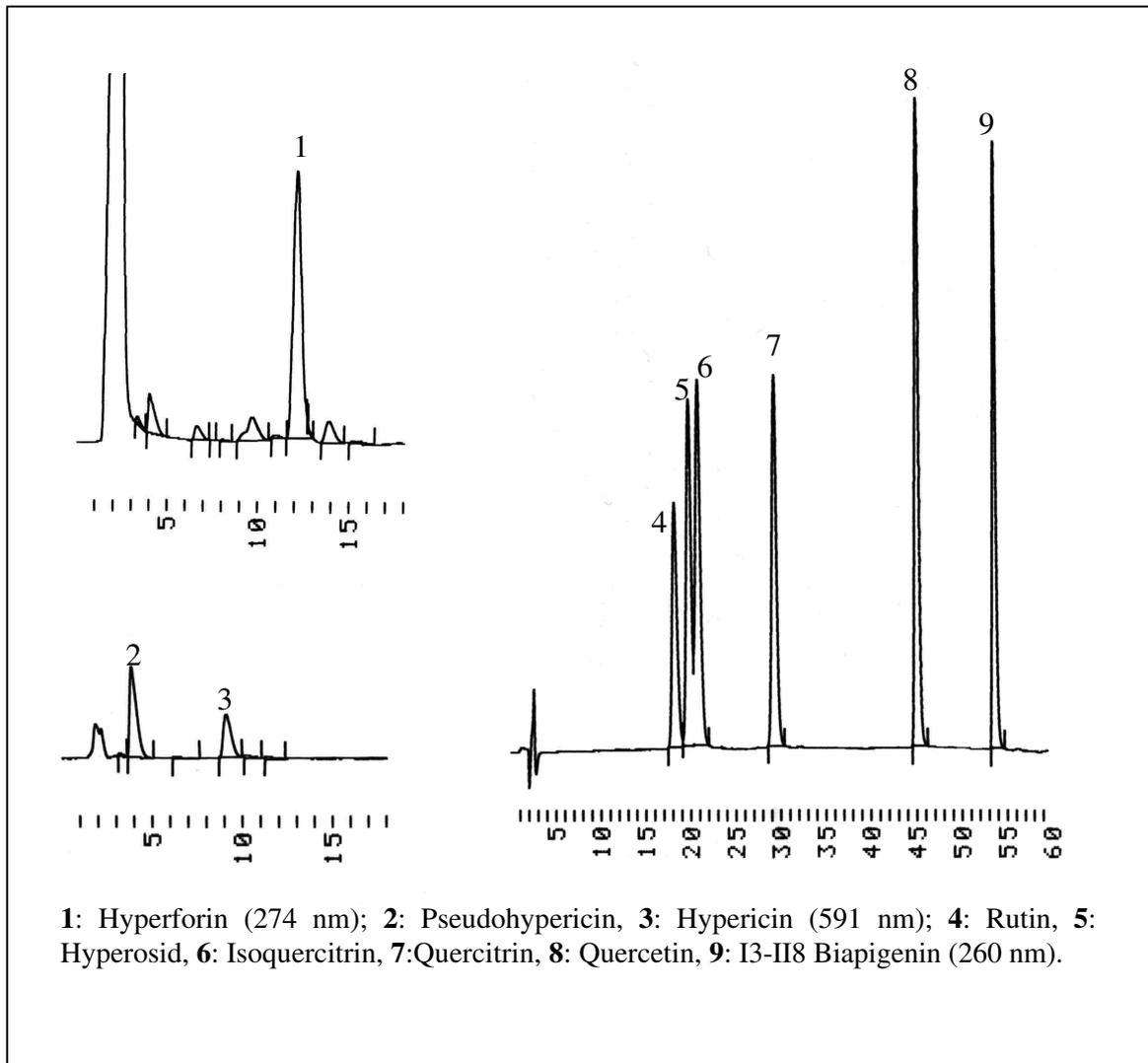
Bei der Bestimmung der Hypericine und des Hyperforins wurde auf eine isokratische Methode KRÄMER (1992), modifiziert nach GAEDCKE (1997) zurückgegriffen. Eine Analyse nimmt 20 min in Anspruch, so daß hier auch bei größerem Probenaufkommen die Stabilität des Hyperforins gewährleistet blieb.

Die Methode zur Bestimmung der Flavonoide wurde auf Basis eines Acetonitril-Phosphatpuffers entwickelt. Das Hauptproblem an der Entwicklung eines Gradientenprogramms lag einerseits darin, eine auch nach zahlreichen Analysen stabile Basislinie zu halten, andererseits in dem Druckabfall während der Auswaschphase, in der die lipophilen Komponenten von der Säule entfernt werden mußten.

Von jeder Aufarbeitung wurden ein Weißglavial zur Bestimmung der Hypericine nach Belichtung und ein Braunglasvial zur Bestimmung des Hyperforins befüllt.

Bei der Durchführung der Reihenuntersuchungen wurden zunächst die Bestimmungen von Hyperforin und Hypericinen durchgeführt und die Braunglasvials dann bei -18°C eingelagert, was bei der guten Stabilität der Flavonoide unproblematisch ist.

Chromatogramm 5-1 zeigt exemplarisch Muster der verschiedenen Bestimmungen. Die Chromatogramme zur Bestimmung der Hypericine wurden aus einem Extrakt erstellt, das Chromatogram zur Bestimmung der Flavonoide aus einem Mischstandard mit einer ungefähren Konzentration von 0,05 mg/ml je Flavonoid.



Chromatogramm 5-1 Analytische HPLC

5.5 Anbau 1998

5.5.1 Pflanzenaufzucht

Die Anzucht der Jungpflanzen erfolgte im Gewächshaus.

Dazu wurden die Samen zunächst in Tontöpfen Ende Februar 1998 ausgesät und nach zwei bis drei Wochen in Pflanzpaletten (Quick Pots) pikiert. Von jeder der insgesamt 110 Herkünfte wurden je drei Jungpflanzen einzeln in Töpfe ausgesetzt. Auf diese Weise wurden Einflüsse wie etwa der Bodenbeschaffenheit ausgeschlossen und für jede Herkunft definierte Bedingungen geschaffen.

Die Töpfe wurden Mitte Mai auf Beete im botanischen Garten in Marburg ausgebracht, die mit schwarzer Gewebefolie abgedeckt waren. Die Herkünfte wurden laufend durchnummeriert und mit einem Zusatz für das Anbaujahr (zum Beispiel 007/98) versehen.

Einen Sonderfall stellt die Herkunft 107/98 dar, da zuwenig Saatgut für eine einfache Aussaat zur Verfügung stand. Sie wurde daher über eine Suspensionskultur durch ein leicht modifiziertes Verfahren nach KARTNIG (1996) zwischenvermehrt.

Dazu erfolgte eine sterile Aussaat auf M-S-Festmedium, die Induktion von Petiolenabschnitten erfolgte in M-S-Flüssigmedium, dem BAP und NAA zugesetzt waren. Eine Subkultur wurde alle zwei bis drei Wochen angelegt. Dabei wurde beim Anlegen der ersten Subkultur nur ein einzelnes Zellaggregat zur Vermehrung verwendet.

Nach einigen Vermehrungszyklen wurden zur Rückdifferenzierung Kalli mit einem Durchmesser von etwa 5 mm auf hormonfreies Festmedium ausgelegt. Nach fünf Wochen hatten sich Sprosse mit Blättern gebildet. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte die Adaption an normale Umwelteinflüsse, die sich als problematisch erwies, da die Pflanzen sensibel auf Änderungen der Temperatur und der Luftfeuchte reagierten.

Innerhalb von zwei Wochen waren die Jungpflanzen adaptiert und konnten zeitgleich mit den anderen Herkünften ausgesetzt werden.

Die Pflanzen waren infolge der sterilen Bedingungen frei von möglichen Pathogenen und stammten, durch ihre Art der Vermehrung, von einem Samen ab.

5.5.2 Bonitierung

Mit Hilfe einer Bonitierung wird der Versuch unternommen, eine Pflanze nach äußerlichen Kriterien zu bewerten oder einer Gruppe zuzuordnen.

Alle Pflanzen wurden zum Zeitpunkt ihrer Blüte auf Wuchshöhe, Blattbreite und Länge, Blütenradius und Rostbefall hin untersucht. Zusätzlich wurden die Stengelspreiten untersucht. Dabei fielen einige Pflanzen mit vierkantigem Stengel 011/98, 040/98, 060/98 und 077/98 (*H. maculatum* L.) auf, die zwar chemisch bestimmt, aber von weiteren Versuchen ausgeschlossen wurden.

Im wesentlichen diente diese Bonitierung dazu, festzustellen, wie viele Pflanzen überlebt haben und ob es sich bei allen Herkünften tatsächlich um *H. perforatum* L. handelte. Eine Bonitierung, wie sie im Jahr 1999 durchgeführt wurde, erschien im Jahre 1998 nicht sinnvoll, da die Anzahl von Einzelpflanzen je Herkunft zu gering war, um ausreichend Datenmaterial, wie es für eine statistische Auswertung notwendig wäre, gewinnen zu können.

5.5.3 Probennahme

Die Ernte des Johanniskrauts erfolgte jeweils zum Zeitpunkt der Vollblüte. Als Vollblüte wurde der Zustand der Pflanze festgelegt, zu dem über 50% der Blüten der Pflanzen voll geöffnet waren. Geerntet wurde von jeweils drei Pflanzen das obere Drittel, von denen ein Mischmuster erstellt wurde.

5.5.4 Probenvorbereitung

Das Pflanzenmaterial wurde in offene Papiertüten gesammelt und über zehn Stunden bei 60 C bei Umluft getrocknet. Nach MEISENHEIMER (1991) wird dadurch ein enzymatischer Abbau des Hyperforins verhindert und Verluste dieses Inhaltstoffes, die beim Trocknen des Materials anfallen, auf ein Minimum reduziert.

Bis zur Analyse wurden die Proben trocken und vor Licht geschützt gelagert. Unmittelbar vor Durchführung der Extraktion wurde das gesamte Material einer Herkunft vermahlen und homogenisiert.

Die Extraktion erfolgte in einem Wasserbad mit einer Temperatur 60 °C unter Rückfluß - kühung mit Methanol. Nach 30 min wurde der Extrakt in einen Meßkolben abdekantiert und der Rückstand einer zweiten Extraktion unterworfen.

Der so erhaltene Extrakt wurde vor der Analyse membranfiltriert.

Vermahlung, Extraktion und Filtration fanden unter Ausschluß von Tageslicht statt.

5.5.5 Quantitative Bestimmungen

Bei den quantitativen Bestimmungen erfolgte zunächst die Bestimmung des Hyperforingehaltes. Um die Stabilität über den Analysenzeitraum zu gewährleisten, wurden jeweils nur Sechsergruppen untersucht.

Anschließend wurden die Proben zur Umsetzung der Protohypericine für 90 min dem Tageslicht ausgesetzt und auf Hypericine untersucht.

An jedem Analysentag wurde eine Kurzkalibrierung mit drei Standardkonzentrationen für Hyperforin und Hypericin durchgeführt.

5.5.6 Ergebnisse und Auswahl der Herkünfte für den Anbau 1999

Die erhaltenen Meßwerte der quantitativen Bestimmungen der überlebenden Pflanzen von 60 Herkünften von insgesamt 110 Herkünften wurden als einfache Balkendiagramme, aufsteigend sortiert, dargestellt.

Die entsprechenden Werte sind im Anhang (Tabelle 10-1) aufgeführt. Wie Diagramm 5-1 zu entnehmen ist, erstreckt sich das Hypericin - Pseudohypericinverhältnis von etwa 0,5 bis 1,8. Diagramm 5-2 stellt die Hypericin- und Pseudohypericingehalte dar, Diagramm 5-3 die Hyperforingehalte. Alle Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse. Drei der vier als *H. maculatum* L. identifizierten Herkünfte (011/98, 060/98 und 077/98) führten Hyperforin.

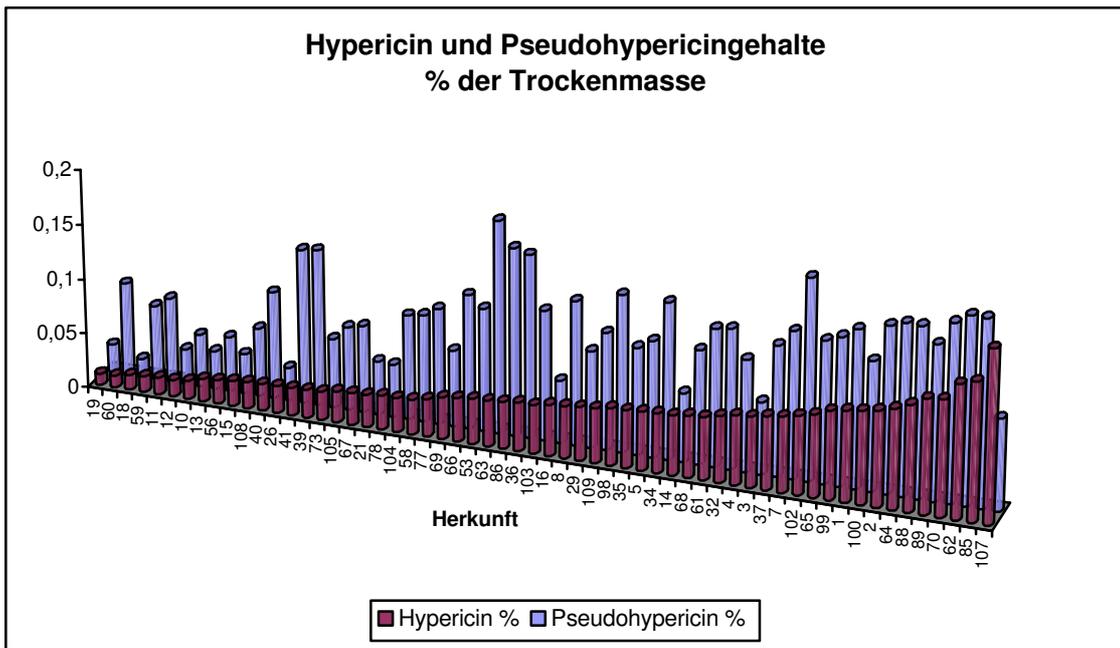


Diagramm 5-1 Gehalte an Hypericin und Pseudohypericin 1998 Verhältnis

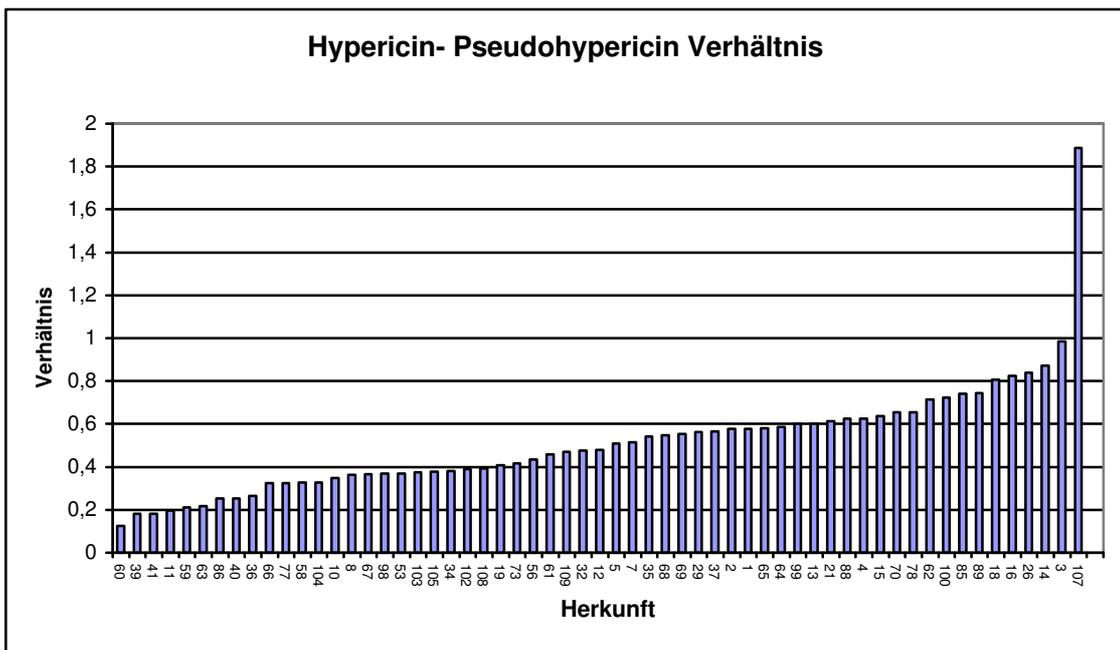


Diagramm 5-2 Relationen von Hypericin zu Pseudohypericin 1998

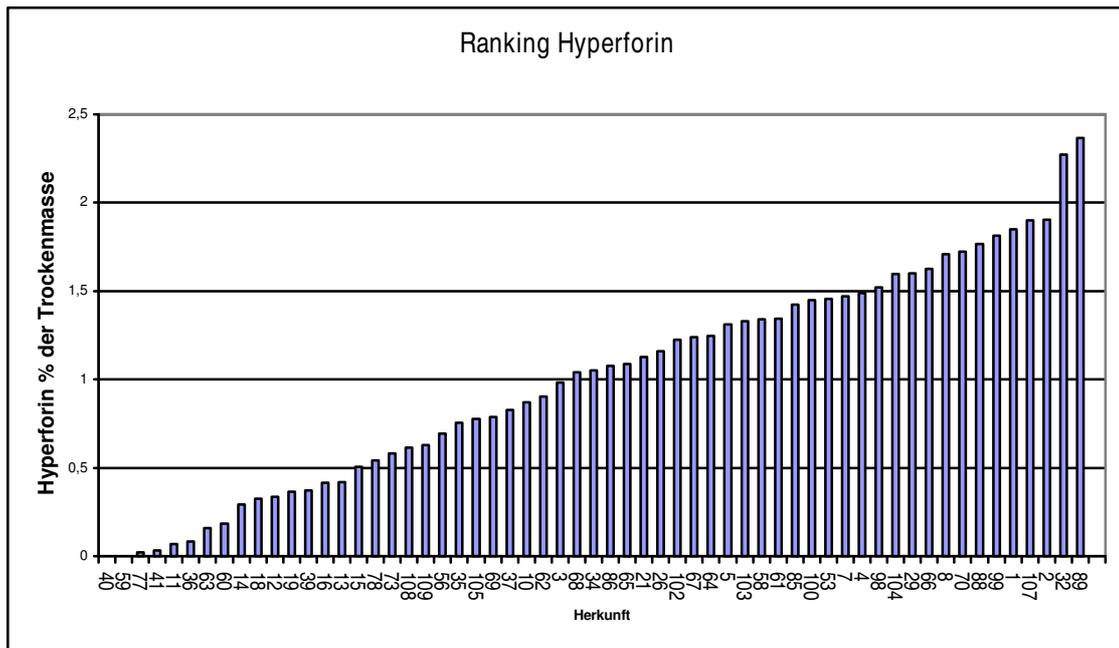


Diagramm 5-3 Hyperforingehalte der Herkünfte 1998

Die Auswahl erfolgte rein nach den Ergebnissen der chemischen Bestimmungen. Dazu wurden jeweils die Ergebnisse der Meßgrößen Hyperforin, Hypericin, Pseudohypericin und dem Verhältnis der Hypericine zueinander aufsteigend sortiert. 15 Herkünfte mit den meisten Treffern aus den vier Rubriken im Bereich der 20 gehaltvollsten Pflanzen wurden ausgezählt.

Bei der Auswahl wurde bewußt auf eine Einbeziehung der Boniturergebnisse verzichtet, da aus einer Stichprobenmenge von maximal drei Pflanzen je Herkunft keine Daten gewonnen werden können, die den Phänotypen eine Pflanze zuverlässig umschreiben könnten.

5.6 Anbau 1999

5.6.1 Pflanzenaufzucht und Anlage des Versuchsfeldes

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie unter 5.5.1 beschrieben, jedoch wurden die Jungpflanzen in der ersten Juniwoche des Jahres 1999 nicht getopft, sondern in das Freiland (Neumarkt / Oberpfalz) ausgepflanzt.

Für die einzelnen Herkünfte wurden neue Nummern vergeben. Die Begriffe Herkunft und Hype (eine Abkürzung, die 1999 für Herkunft eingeführt wurde) werden synonym verwendet.

Der Reihenabstand betrug je 50 cm, der Pflanzabstand innerhalb einer Reihe ebenso. Jede Herkunft wurde in einer Reihe angepflanzt, jeweils 20 Pflanzen zu einer Kasette, insgesamt vier Kassetten. Die Abgrenzungen der Kassetten sind als horizontale Unterteilungen auf dem Foto 5-1 zu sehen. Je Herkunft standen also 80 Pflanzen zur Verfügung. Der Anbau bestand aus insgesamt acht Kassetten.

Die Pflanzen der beiden inneren Kassetten wurden für weitere Untersuchungen verwendet, unter Auslassung zweier Randpflanzen ergab sich so eine maximale Anzahl von 38 Pflanzen je Herkunft.

Die Pflanzen der äußeren Kassetten wurden für die Saatgutgewinnung zurückbehalten.

Foto 5-1 zeigt die Kassetten und die reihenweise Anordnung der einzelnen Herkünfte. Die Aufnahme entstand etwa 5 Wochen nach dem Setzen der Jungpflanzen. Deutlich ist bei den beiden Herkünften rechts (Herkunft 1 und 2) die einsetzende Blüte zu sehen.

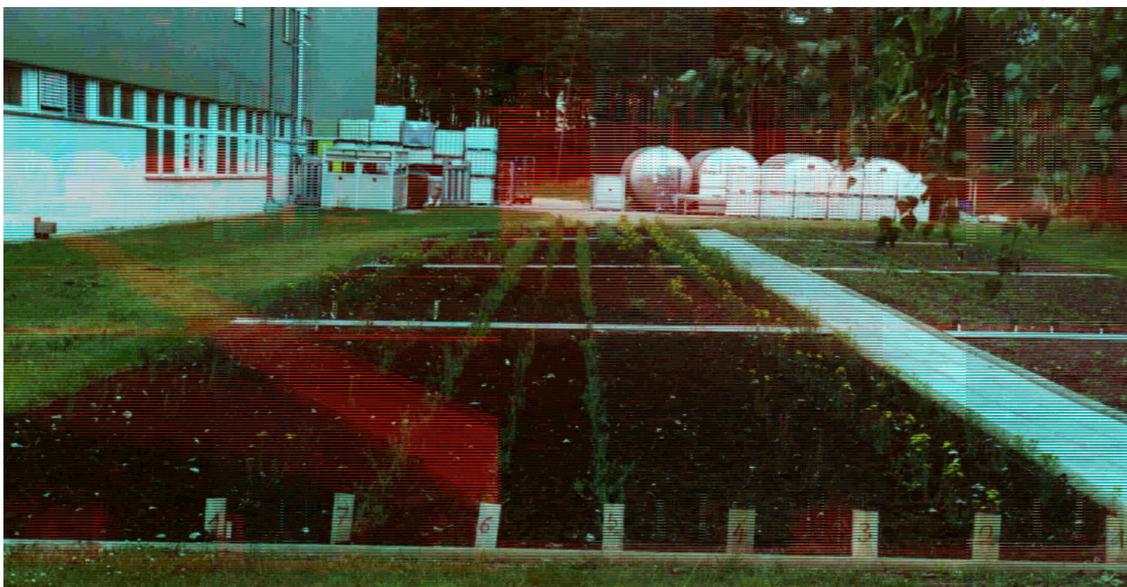


Foto 5-1 Anbau von Johanniskraut in Neumarkt 1999

5.6.2 Bonitierung

Die Bonituskriterien für den Anbau 1999 in Neumarkt / Oberpfalz wurden einer Merkmaltabelle des BUNDESSORTENAMTES (1997) übernommen, und wo für sinnvoll erachtet, modifiziert. Die Bonitierung wurde jeweils zum Zeitpunkt der Vollblüte durchgeführt.

Die untersuchten Größen und verwendeten Fachbegriffe sind im folgenden aufgeführt und definiert.

Vollblüte: Der Zeitpunkt, zu dem mindestens 50% aller Knospen einer Einzelpflanze voll geöffnet sind.

Welke:

- 1 = ohne Welke
- 3 = einzelne Welkesymptome, Triebe noch grün
- 5 = weniger als 50% aller Triebe mit deutlicher Welke
- 7 = mehr als 50% aller Triebe mit deutlicher Welke, einzelne Triebe noch grün
- 9 = die Pflanze ist abgestorben

Höhe Haupttrieb: Von dem stärksten und längsten Trieb wird die absolute Länge vom Boden bis zur Blatt/Blütenspitze gemessen (Angabe in cm).

Höhe Blühhorizont: Vom stärksten/längsten Trieb wird die Länge vom Stengel, an dem der erste Seitentrieb mit Blüte wächst, bis zu der Spitze dieses Triebes gemessen. (Angabe in cm).

Anzahl der Primärtriebe: Anzahl der Primärtriebe die aus dem Boden wachsen, teilweise auch kleine Triebe, welche noch keine Blüten tragen, abgestorbene Triebe werden mitgezählt.

Kurztriebpaare: Anzahl der Seitentriebe des Haupttriebs, gezählt wird ab dem ersten Seitentrieb mit Blüte.

Stengel: Durchmesser des Stengels, gemessen in mm unterhalb des ersten Seitentriebs mit Blüte.

Kronblatt: Länge und Breite eines Kronblattes (in mm).

Kelchblatt: Länge eines Kelchblattes (in mm).

Primärblatt: Es werden die zwei Primärblätter abgezupft, die direkt unterhalb des ersten Seitentriebs mit Blüte gewachsen sind. Länge und Breite werden gemessen (in cm).

Frischgewicht: Die gesamte Einzelpflanze wird etwa 7 cm über der Erde abgeschnitten und das Frischgewicht bestimmt (in g).

Trockengewicht: Die Einzelpflanzen werden in offenen gefütterten Papiertüten im Umlufttrockenschrank bei 60 °C für 10 Stunden getrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt (in g).

Anteile mit Blüten: Von der getrockneten Pflanze werden die Blütenanteile gewogen.

Blattanteile: Von der getrockneten Pflanze werden die Blattanteile gewogen.

Stengelanteile: Von der getrockneten Pflanze werden die Stengelanteile gewogen.

Standjahr: Die Bezeichnung Standjahr gibt das Alter der Pflanze an.

Aufwuchs: Unter Aufwuchs versteht man die Ernte. Erster Aufwuchs bedeutet erste Ernte im jeweiligen Standjahr

5.6.3 Probennahme und Festlegung des Analysenumfanges

Es wurde, wie im Jahr 1998, zur Zeit der Vollblüte geerntet. 1999 wurden die oberirdischen Teile für weitere Untersuchungen verwendet, und nicht, wie 1998, nur das obere Drittel der Pflanze. Die Erfahrungen des ersten Jahres zeigten, daß im ersten Standjahr die Blühhorizonte noch sehr undifferenziert sind. Es erschien sinnvoller, im zweiten Jahr der Aussaat das gesamte Kraut zuberücksichtigen.

Die Frage, in welchem Ausmaß Analysen von Einzelpflanzen einer Herkunft oder Mischmuster anzulegen sind, ergibt sich aus der Anzahl der überlebenden Pflanzen. Einzeluntersucht wurden in diesem Falle die Herkünfte 1, 2, 5, 6, 7 und 10. Aufgrund der sich daraus ergebenden Datenlage bleiben die sich anschließenden Darstellungen und Auswertungen größtenteils auf diese Herkünfte beschränkt.

Tab. 5-1 gibt über die geernteten Pflanzen Auskunft.

Herkunft	Überlebende Pflanzen von 38
1	27
2	37
3	13
4	6
5	18
6	24
7	30
8	1
9	8
10	34
11	0
12	9
13	2

Tabelle 5-1 Geerntete Pflanzen

Es ist anzumerken, daß die Anzahl der Pflanzen bei einigen der untersuchten Herkünfte zu niedrig erscheint. Weitere Untersuchungen hierzu werden unter 5.6.9 (Kolmogoroff-Smirnoff-Test) durchgeführt.

Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu 5.4.4, jedoch wurden zur chemischen Bestimmung die Stengelanteile der Haupttriebe verworfen, da die Vermahlung des Materials aufgrund der hohen Trockengewichte nur eingeschränkt möglich gewesen wäre.

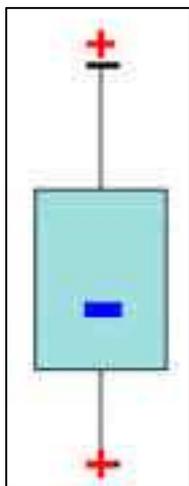
5.6.4 Quantitative Bestimmungen

Die quantitativen Bestimmungen erfolgten analog zu 5.5.5. Zusätzlich wurden noch die Gehalte der Flavonoidglykoside (Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin), deren Aglykon (Quercetin) sowie ein Biflavonoid (I3, II8-Biapigenin) quantifiziert.

Von den Herkünften 1, 2, 5, 6, 7 und 10 wurden von jeder Pflanze Einzelmuster bearbeitet. Die übrigen Herkünfte 3, 4, 9 und 12 wurden als Mischmuster bearbeitet, da aufgrund des geringeren Probenaufkommens eine Einzelbearbeitung nicht sinnvoll war. Die Resultate der chemisch einzeluntersuchten Herkünfte sind, nach untersuchten Inhaltsstoffen zusammengefaßt, im Anhang aufgeführt (Tabelle 10-2 bis 10-10).

5.6.5 Ergebnisse

Die erhobenen Daten wurden entweder als zwei- oder dreidimensionale Säulendiagramme oder als sogenannte Box & Whisker-Plots dargestellt (Abbildung 5-1):



Die waagerechte Linie innerhalb des Rechtecks bzw. der Box entspricht dem Median der jeweiligen Meßgrößen. Die unteren und oberen Begrenzungen der Box repräsentieren die 25. bzw. 75. Perzentile. Entsprechend liegen 50% aller Meßwerte der betreffenden Variable innerhalb des Rechtecks und 50% außerhalb. Die außerhalb der Box vertikal angeordneten Spannweitenlinien bzw. Whisker markieren die 5. und 95. Perzentile. Rote Kreuze symbolisieren Minimum bzw. Maximum des Datensatzes.

Abbildung 5-1 Muster eines Box-Plots

Aufgrund dieser Darstellungsweise ist es möglich, sich einen Überblick über die Beschaffenheit eines Datensatzes zumachen. Eine große Box ist Indiz für eine große Streuung. Durch die Position des Medians und eine unterschiedliche Länge der Whisker können Aussagen über die Schiefe einer Verteilung gemacht werden.

5.6.5.1 Bonitierung

Rotwelkebefall

Der Befall mit Rotwelke stellt für den Anbau von Johanniskraut eine ernstzunehmende Beeinträchtigung dar. So waren bei einer Untersuchung von SCHMATZ et al. (1998) knapp 50% eines Anbaus von Rotwelke befallen. Ein Versuch, den Befall mit Fungiziden einzudämmen, brachte keine befriedigenden Ergebnisse.

Vor diesem Hintergrund ist es von Vorteil, eine Herkunft mit entsprechender Toleranz zu ermitteln.

Diagramm 5-4 stellt die Unterschiede im Befall dar. Die dunkel unterlegten Säulen repräsentieren die Rotwelkeindizes der einzeluntersuchten Herkünfte. Die Anzahl der überlebenden Pflanzen ist abhängig vom Rotwelkeindex. Nicht erfaßt wurde der Befall mit Mehltau. Herkunft 10 war als einzige Herkunft bei niedrigem Rotwelkeindex durchgängig damit befallen.

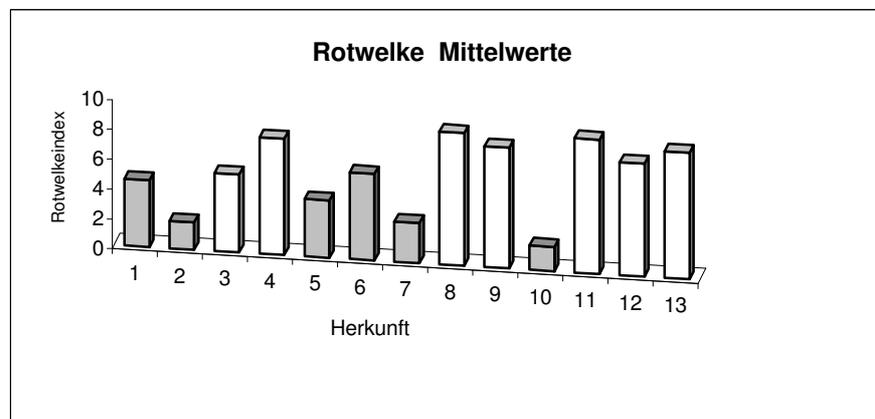


Diagramm 5-4 Rostbefall der Herkünfte 1999

Vollblüte

Der Zeitpunkt der Vollblüte ist von Herkunft zu Herkunft unterschiedlich. Man kann zwischen Herkünften unterscheiden, die bei geringem Frischgewicht einen früheren Blühzeitpunkt aufweisen und solchen, die später blühen und ein höheres Frischgewicht zeigen. Als früh blühende Herkünfte zeigten sich Herkunft 1, 2 und 3 mit dem 07. 07. 99 als Blühzeitpunkt, mittelspät blühten die Herkünfte 4, 5, 7, 9 und 12 (04. 08. / 17. 08. 99).

Als spät blühende Herkünfte erwiesen sich Herkunft 8 und 10 (08.09. 99). Von Vorteil ist ein früher Blühzeitpunkt, wenn ein zweiter Schnitt gewünscht wird. Nach BOMME (1997) steigt dann allerdings die Gefahr der Cd-Akkumulation, auch läßt die Qualität hinsichtlich des Blütenbesatzes nach.

Wuchshöhe und Höhe des Blühhorizontes

Von Belang für eine gute Bearbeitung der Pflanzen, wie Pflegemaßnahmen vor der Ernte (maschinelles Hacken) und der eigentlichen Ernte, sind die Homogenität der Wuchshöhe (Diagramm 5-5) sowie ein möglichst schmaler Blühhorizont (Diagramm 5-6). Durch einen scharf umrissenen Blühhorizont erhält man, entsprechende maschinelle Erntetechniken vorausgesetzt, eine qualitativ hochwertige Droge mit hohem Blütenanteil.

Bei der Untersuchung der Höhe des Blühhorizontes fällt auf, daß die Variabilität innerhalb einer Herkunft größer als bei der Wuchshöhe ist.

Hier weisen die Herkünfte 5 und 6 die geringste Streuung auf.

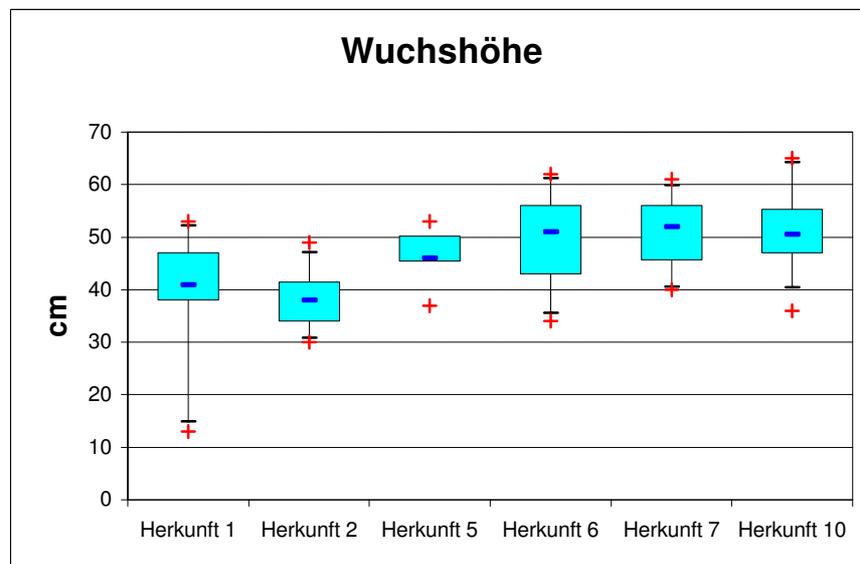


Diagramm 5-5 Box-Plot zur Wuchshöhe

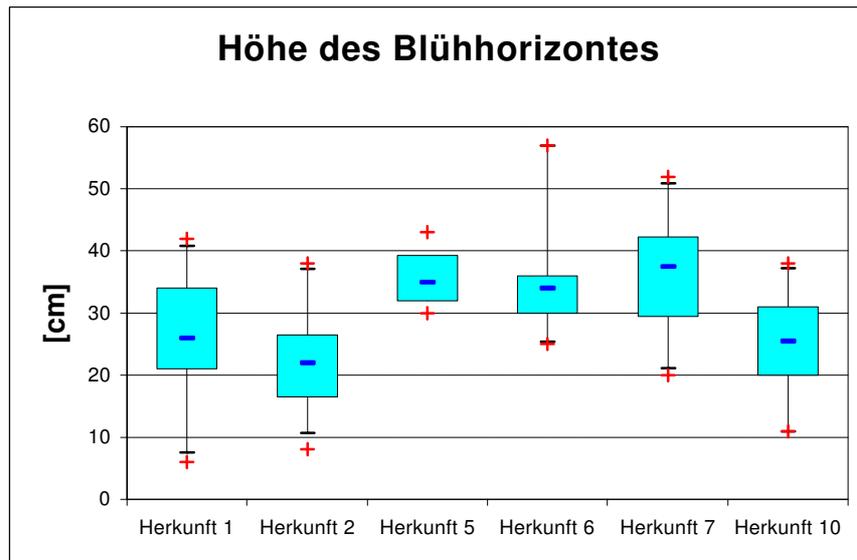


Diagramm 5-6 Box-Plot zur Höhe des Blühhorizontes

Anzahl der Primärtriebe und der Kurztriebpaare

Die Art und das Ausmaß der Verzweigung stellen einerseits ein Maß für das Wuchsverhalten der Pflanze dar, andererseits können sie für die Bearbeitung der Pflanzen im Feld von Belang sein.

Die beobachteten Streuungen sind allgemein recht hoch. Festzustellen ist ein direkter Zusammenhang zwischen dem Trockengewicht (Diagramm 5-9) und der Anzahl von Kurztriebpaaren (Diagramm 5-8), der bei einem Vergleich der Anzahl der Primärtriebe (Diagramm 5-7) mit dem Trockengewicht nicht gegeben ist.

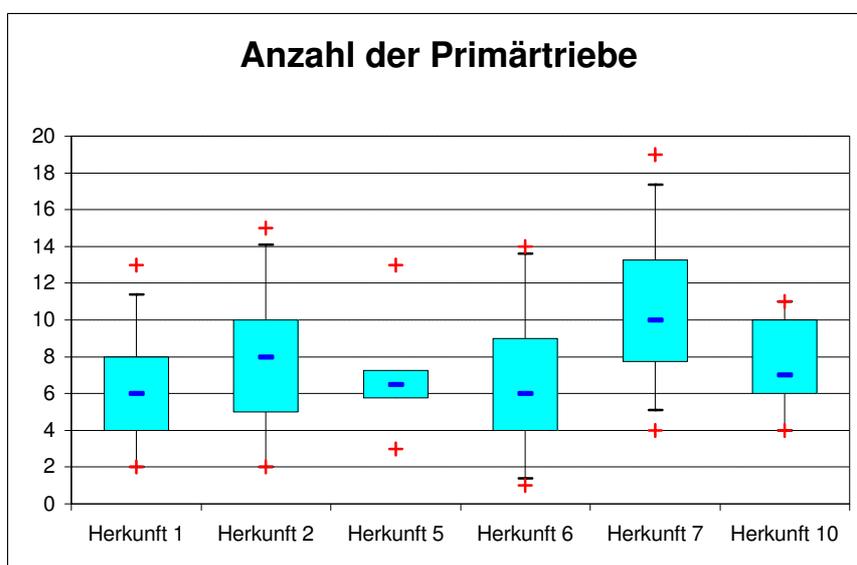


Diagramm 5-7 Box-Plot zur Anzahl der Primärtriebe

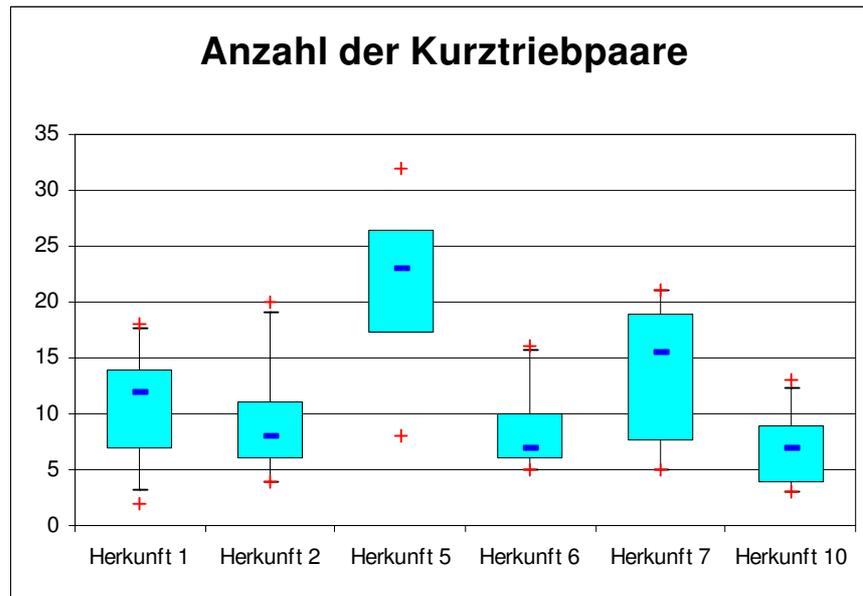


Diagramm 5-8 Box-Plot zur Anzahl der Kurztriebpaare

Trocken- und Frischgewicht

Die Trockengewichte (Diagramm 5-9) oder Frischgewichte sind wichtige Kenngrößen für den Ertrag einer Herkunft. Aus dem Verhältnis von Trocken zu Frischgewicht (Diagramm 5-10) läßt sich zudem auf die Gleichmäßigkeit des Trocknungsprozesses zwischen den Herkünften schließen.

Die Mediane liegen bis auf Herkunft 10 alle im Bereich von 0,3. Dies könnte Ursache des Befalls mit Mehltau sein, der nur bei Herkunft 10 auftrat. Der Mehltaubefall scheint zu einem geringfügig geringeren Wassergehalt in der Frischpflanze zu führen.

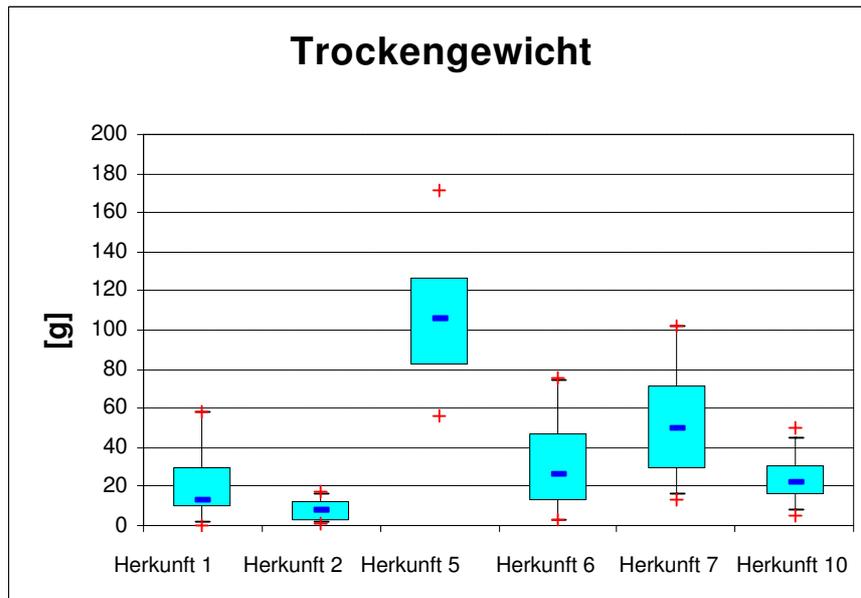


Diagramm 5-9 Box-Plot zum Trockengewicht der Herkünfte

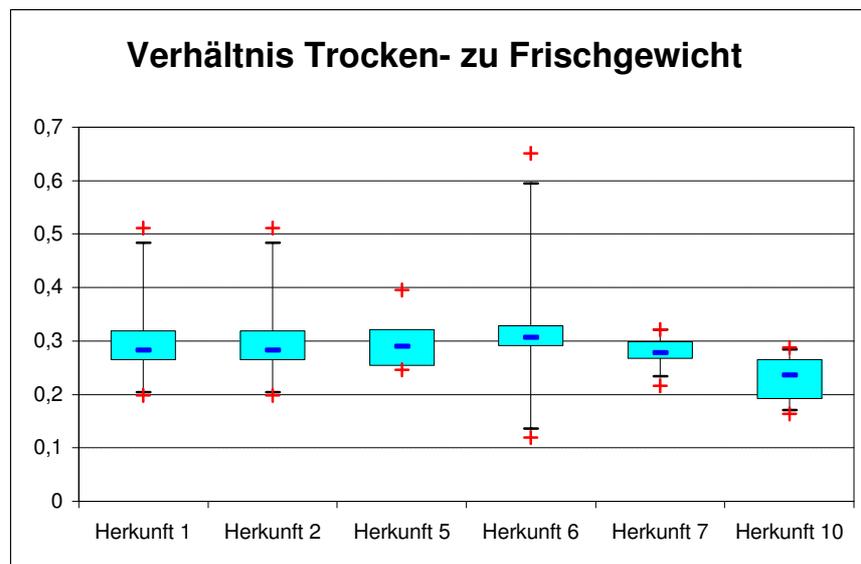


Diagramm 5-10 Box-Plot zum Verhältnis aus Trocken- zu Frischgewicht der Herkünfte

Stengeldurchmesser

Der Stengeldurchmesser (Diagramm 5-11) ist für die weitere Verarbeitung des Krautes von Bedeutung. Stengel von *Hypericum perforatum* L. neigen dazu, stark zu verholzen (Hartheu) und können so ein mechanisches Problem bei der Zerkleinerung oder Ernte der

Droge darstellen. Die Stengel selbst sind nach eigener Untersuchung frei von Hypericinen und Hyperforin. Sie können als qualitätsmindernd für die Droge betrachtet werden und einen weiteren Arbeitsschritt zu ihrer Abtrennung wie Windsichtung erfordern.

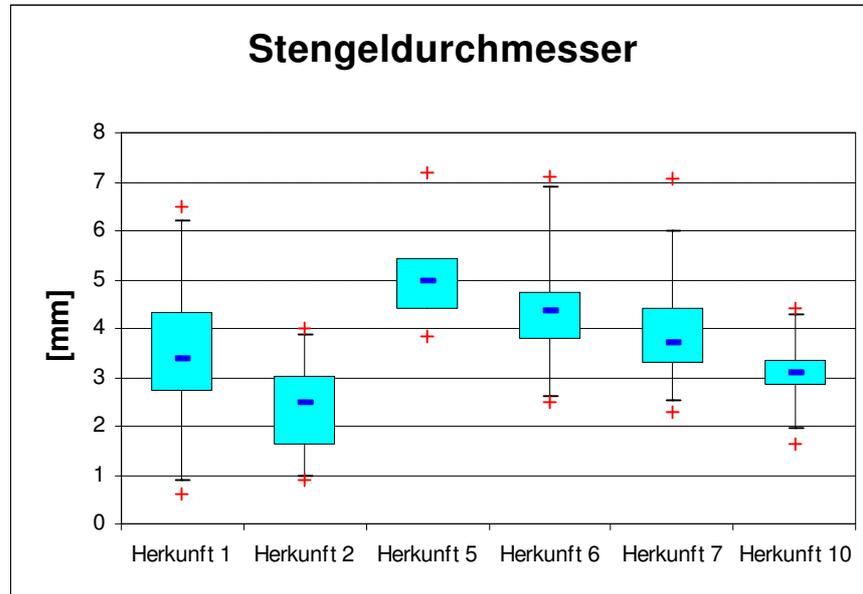


Diagramm 5-11 Box-Plot zum Stengeldurchmesser der Herkünfte

Kronblatt

Länge und Breite der Kronblätter (Diagramm 5-12, 5-13) sind sowohl innerhalb einer Herkunft als auch unter den Herkünften unterschiedlich ausgeprägt. Bildet man jedoch das Verhältnis dieser beiden Größen (Diagramm 5-14), so kann man feststellen, daß die Quotienten für alle beobachteten Herkünfte in einem Bereich liegen. Die entsprechenden Quotienten scheinen keine geeignete Größe zu sein, um Herkünfte von Johanniskraut voneinander zu unterscheiden, es handelt sich vielmehr um ein für Johanniskraut spezifisches Merkmal.

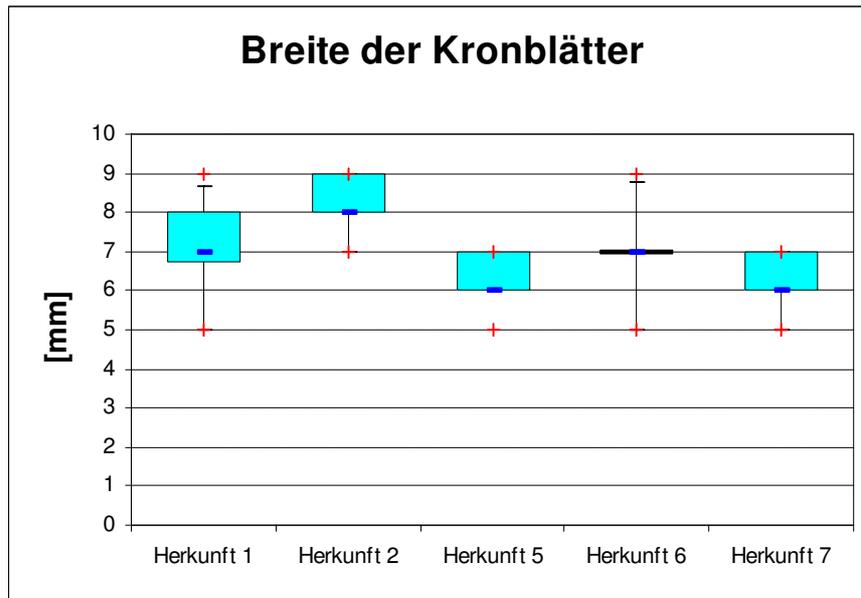


Diagramm 5-12 Box-Plot zur Breite der Kronblätter

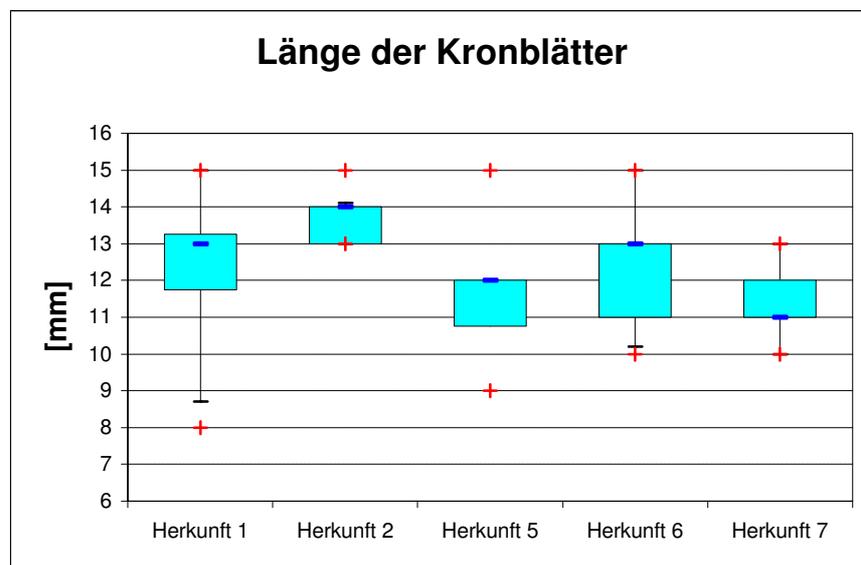


Diagramm 5-13 Box-Plot zur Länge der Kronblätter

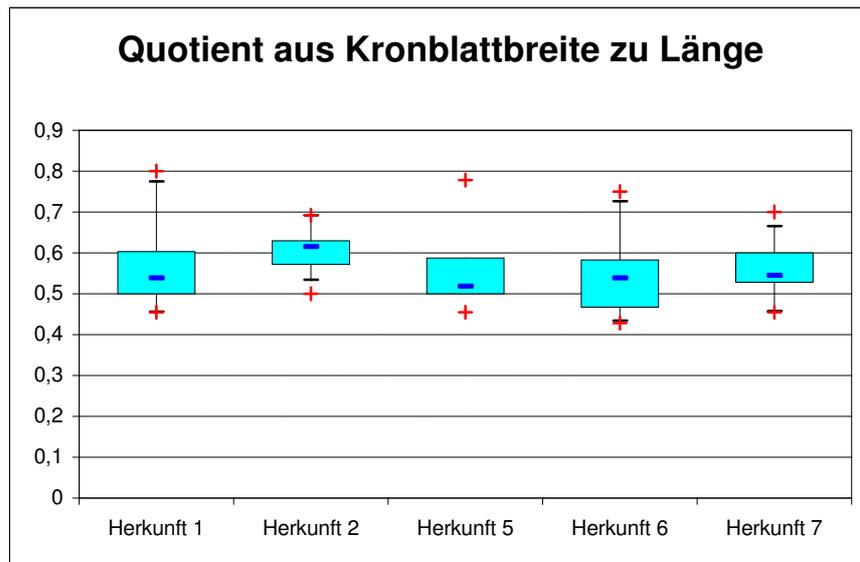


Diagramm 5-14 Box-Plot des Quotienten von Kronblattbreite zur Länge der Herkünfte

Länge der Kelchblätter

Es wurde nur die Länge der Kelchblätter gemessen, da bei Breiten zwischen eins und drei mm wäre die Messung im Feld zu ungenau wäre (Diagramm 5-15).

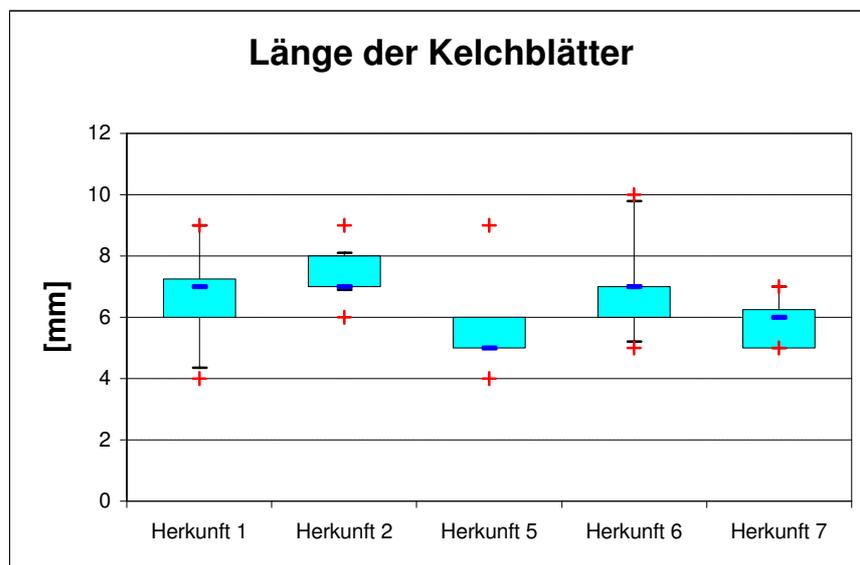


Diagramm 5-15 Box-Plot zur Länge der Kronblätter der Herkünfte

Länge und Breite des Primärblattes

Die Länge (Diagramm 5-16), mehr aber noch die Breite der Primärblätter (Diagramm 5-17), sind, je nach Herkunft, unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich bei den Herkünften um verschiedene Subspezies handelt (vergl. 4.2). Eine direkte Zuordnung nach HEGI (1970) ist indes nicht möglich, da dort keine absoluten Angaben gemacht werden.

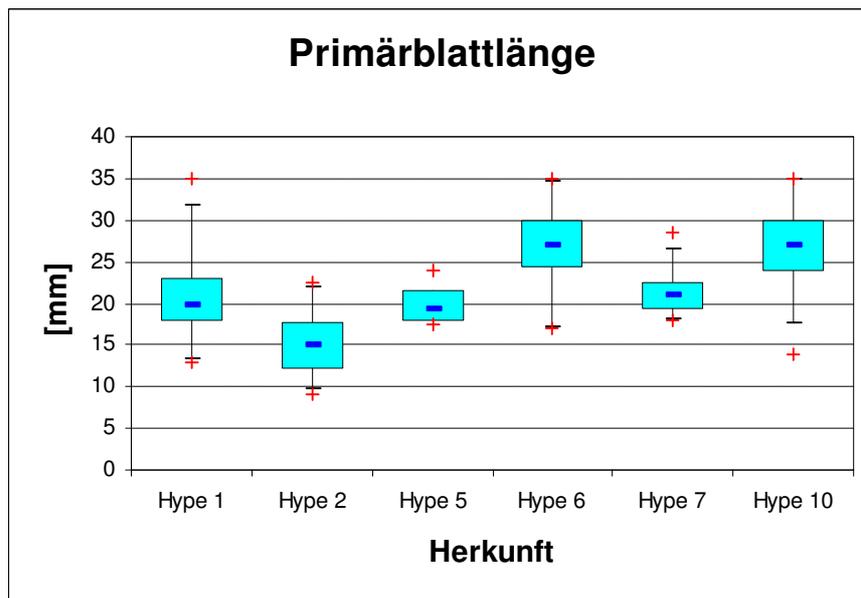


Diagramm 5-16 Box-Plot zur Primärblattlänge der Herkünfte

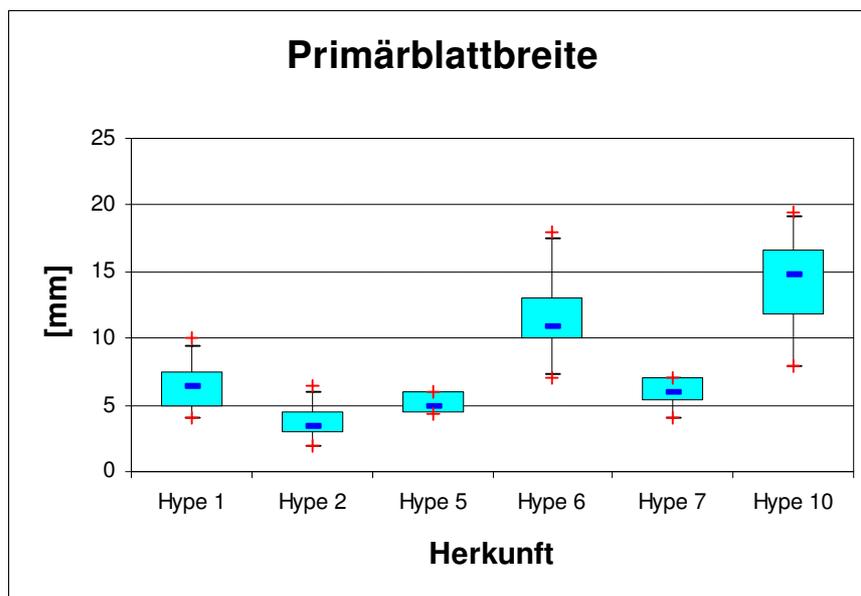


Diagramm 5-17 Box-Plot zur Primärblattbreite der Herkünfte

Bestandteile der Pflanzen

Die getrockneten Pflanzen wurden vor der Aufarbeitung für die quantitativen Bestimmungen noch bezüglich ihrer Blüten- (Diagramm 5-18), Blatt- (Diagramm 5-19) und Stengelanteile (Diagramm 5-20) untersucht. Die Werte lassen auf eine recht große Streuung schließen.

Daß ein hoher Blütenanteil auch einen entsprechend hohen Gehalt an Inhaltsstoffen, die entweder nur (I3, II8-Biapigenin), oder hauptsächlich in den Blüten (Hypericine), und Früchten (Hyperforine) vorkommen, bedeutet, konnte bei den folgenden chemischen Untersuchungen nicht bestätigt werden. So zeigt Herkunft 6 einen hohen Gehalt an Hypericin bei vergleichsweise geringem Blütenanteil (Diagramm 5-24).

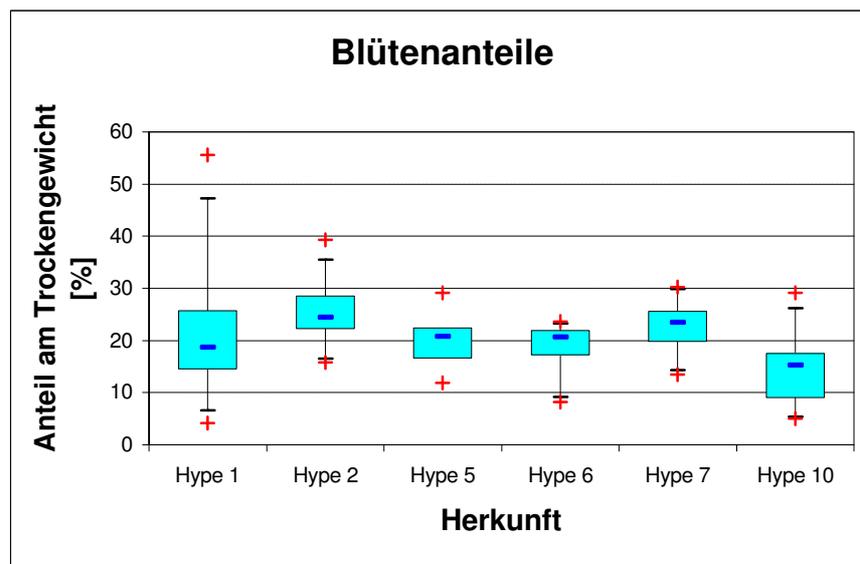


Diagramm 5-18 Box-Plot zu den blühenden Anteilen der Herkünfte

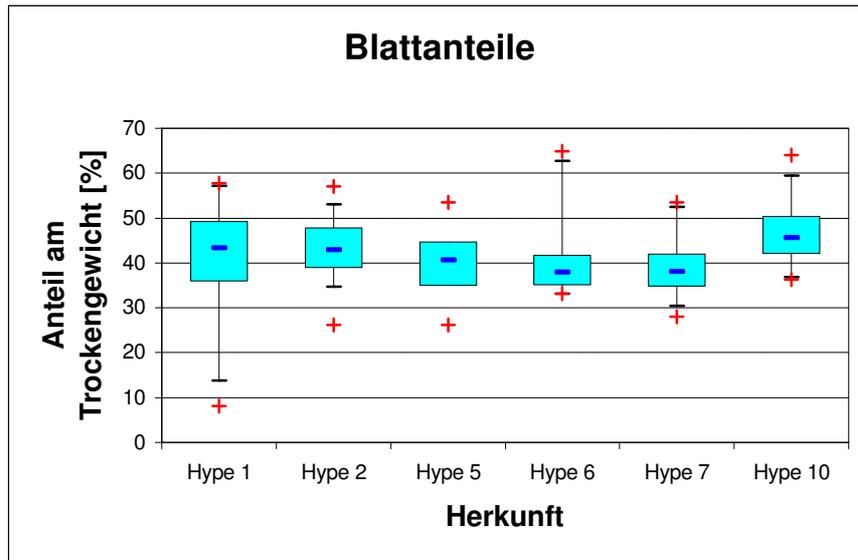


Diagramm 5-19 Box-Plot zu den Blattanteilen der Herkünfte

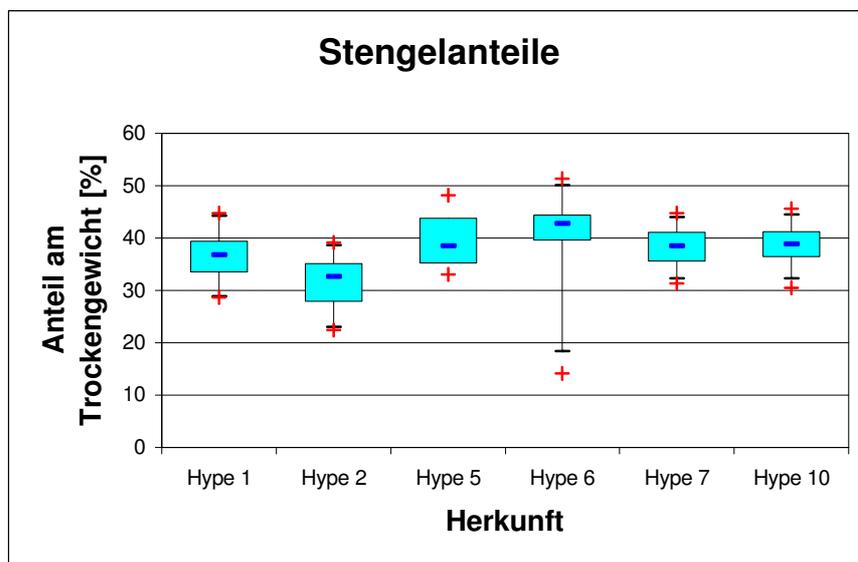


Diagramm 5-20 Box-Plot zu den Stengelanteilen der Herkünfte

5.6.5.2 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen ausgewählter Inhaltsstoffe von Einzelpflanzen, gruppiert nach Herkünften, wird in Form von Balkendiagrammen im Kapitel 5.6.5.2.1 vorgenommen, während im Kapitel 5.6.5.2.2 ein Vergleich der Herkünfte untereinander stattfindet. Kapitel 5.6.7 behandelt Vergleiche des 1. und 2. Aufwuchses, in Kapitel 5.6.8 werden Vergleiche der Anbaujahre 1998 und 1999 angestellt.

5.6.5.2.1 Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Herkünfte

Für die Darstellung der Ergebnisse wurden dreidimensionale Balkendiagramme gewählt. Die vorliegenden Diagramme können nur der Übersicht dienen, die Absolutwerte sind im Anhang, geordnet nach bestimmtem Inhaltsstoff, dargestellt (Tabelle 10-2 bis 10-10). Herkunft 1 (Diagramm 5-21) wird charakterisiert durch das Fehlen von Rutin. Hauptflavonoid stellt das Hyperosid dar. Insgesamt zeigt diese Herkunft bei wenigen Ausfällen ein inhomogenes Erscheinungsbild.

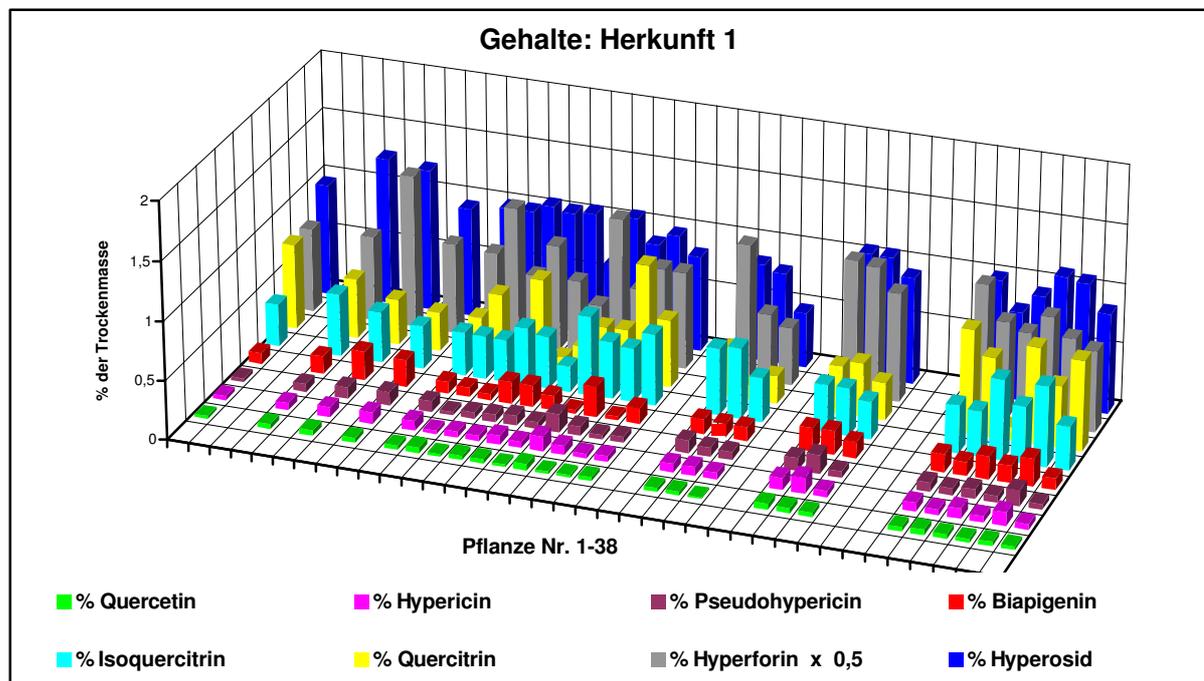


Diagramm 5-21 HPLC-Ergebnisse Herkunft 1

Herkunft 2 (Diagramm 5-22) ist ebenfalls rutinfrei. Anders als bei allen anderen Herkünften liegen als Hauptflavonoide Hyperosid und Quercitrin in einem ausgeglichenen Verhältnis zueinander vor. Sie hebt sich weiterhin durch ihre Homogenität bezüglich der Inhaltsstoffe bei gleichzeitig minimalen Ausfällen hervor.

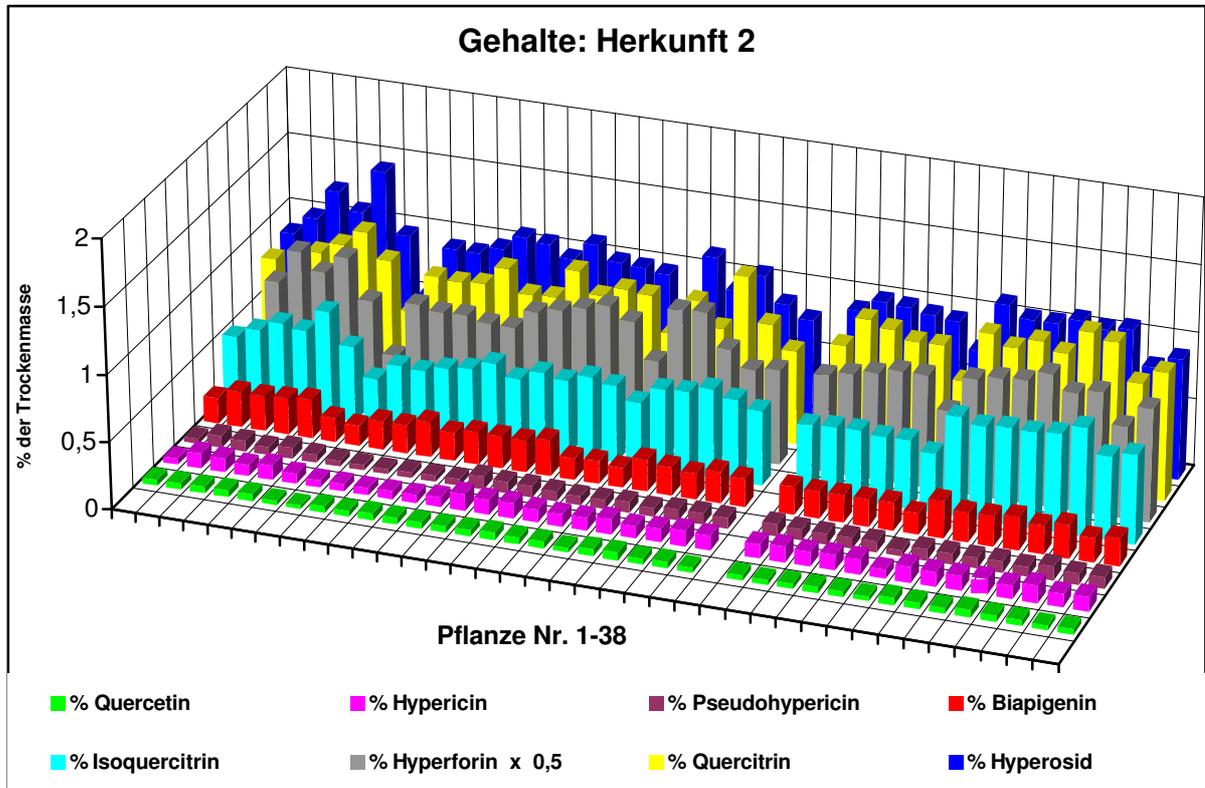


Diagramm 5-22 HPLC-Ergebnisse Herkunft2

Herkunft 5 (Diagramm 2-23) ist, bis auf Pflanze Nr. 14, rutinhaltig. Hauptflavonoide sind hier Hyperosid, Isoquercitrin und Rutin zu annähernd gleichen Teilen. Sie ist reich an Quercetin und arm an Quercitrin. Herkunft 5 weist viele Totalausfälle (vergl. Diagramm 5-4) bei geringer Homogenität auf.

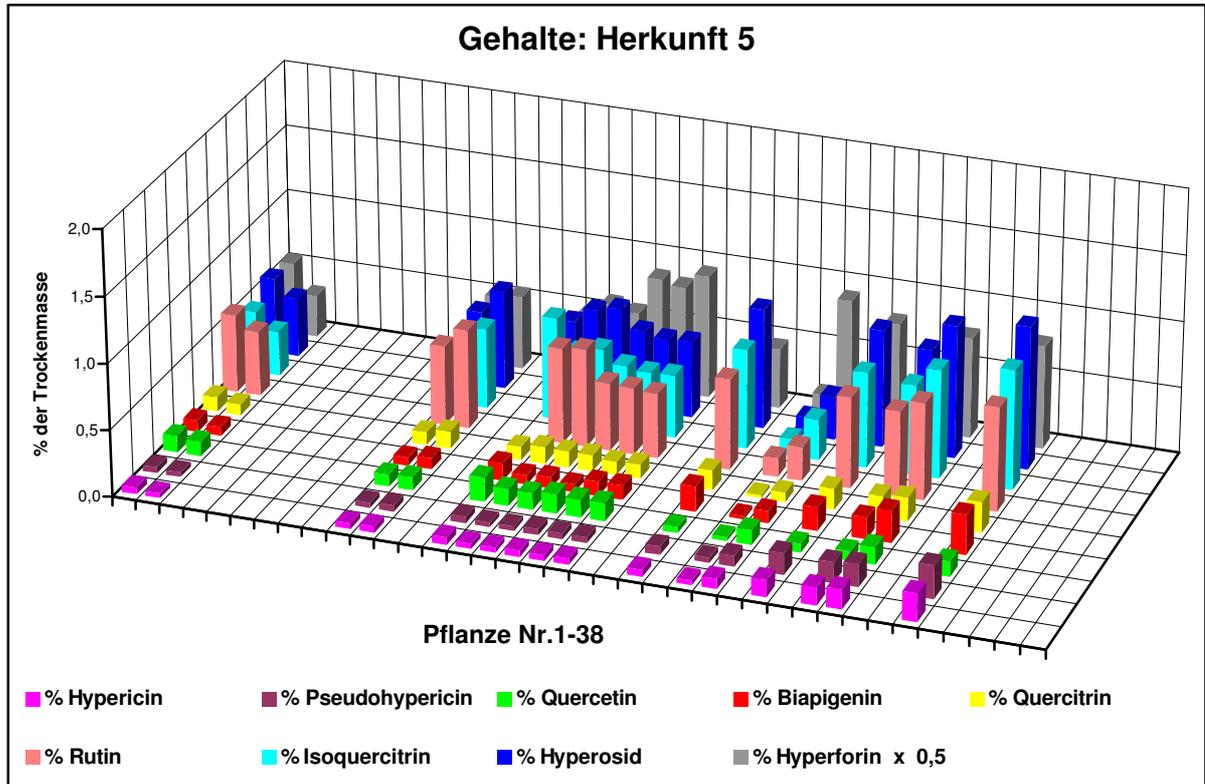


Diagramm 5-23 HPLC-Ergebnisse Herkunft 5

Herkunft 6 (Diagramm 5-24) ist routinhaltig, jedoch in geringerem Maße als Herkunft 5. Hauptflavonoid ist das Hyperosid. Sie kann ferner als reich an I3, II8-Biabinen bezeichnet werden. Bei dieser Herkunft wurden hohe Konzentrationen von Hyperforin ermittelt.

Das Hypericin – Pseudohypericinverhältnis beträgt hier fast 2 : 1 (vergl. dazu Diagramm 5-31). Die Anzahl der Totalausfälle infolge des Befalls mit Rotwelke (Diagramm 5-4) ist bei niedriger Homogenität hoch.

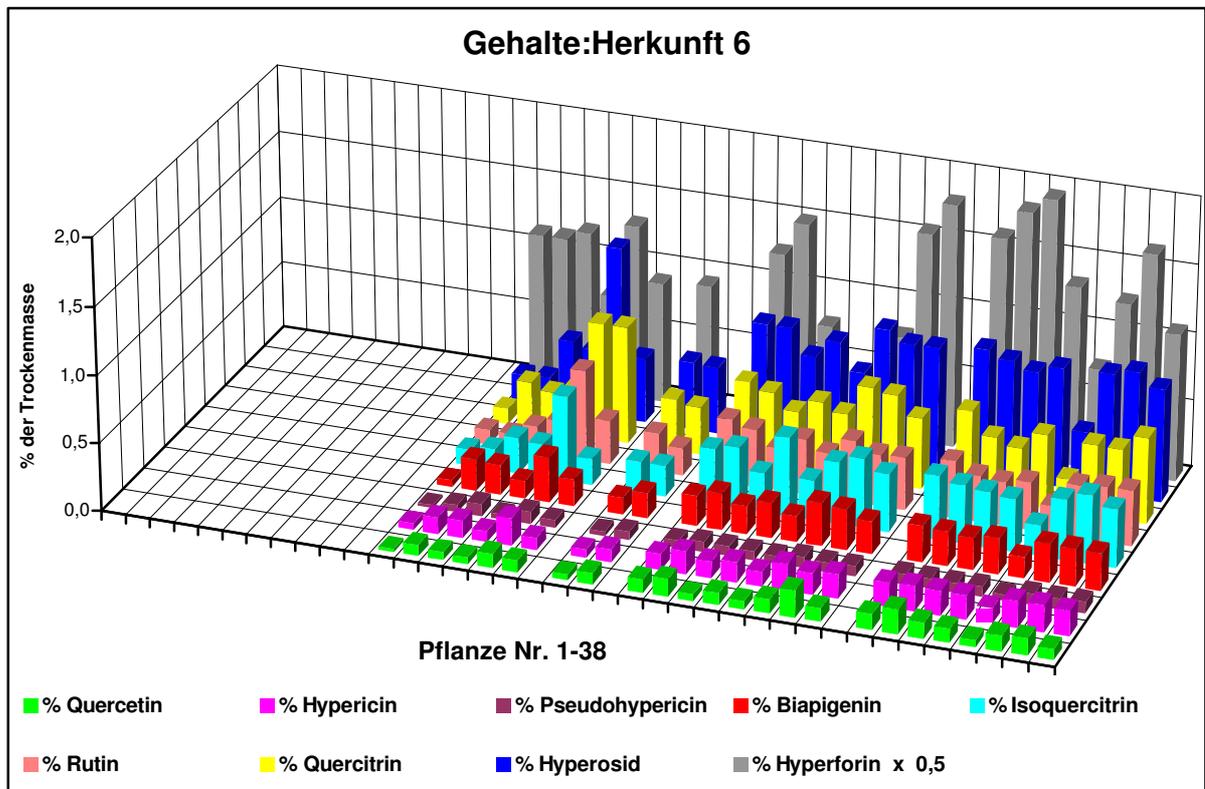


Diagramm 5-24 HPLC-Ergebnisse Herkunft 6

Herkunft 7 (Diagramm 5-25) ist frei von Rutin. Diese Herkunft hat den neben Herkunft 6 höchsten Hyperforingehalt. Die Hauptflavonoide sind Hyperosid und Quercitrin. Sie zeigt bei acht Ausfällen ein recht homogenes Erscheinungsbild in Bezug auf ihre Inhaltsstoffe.

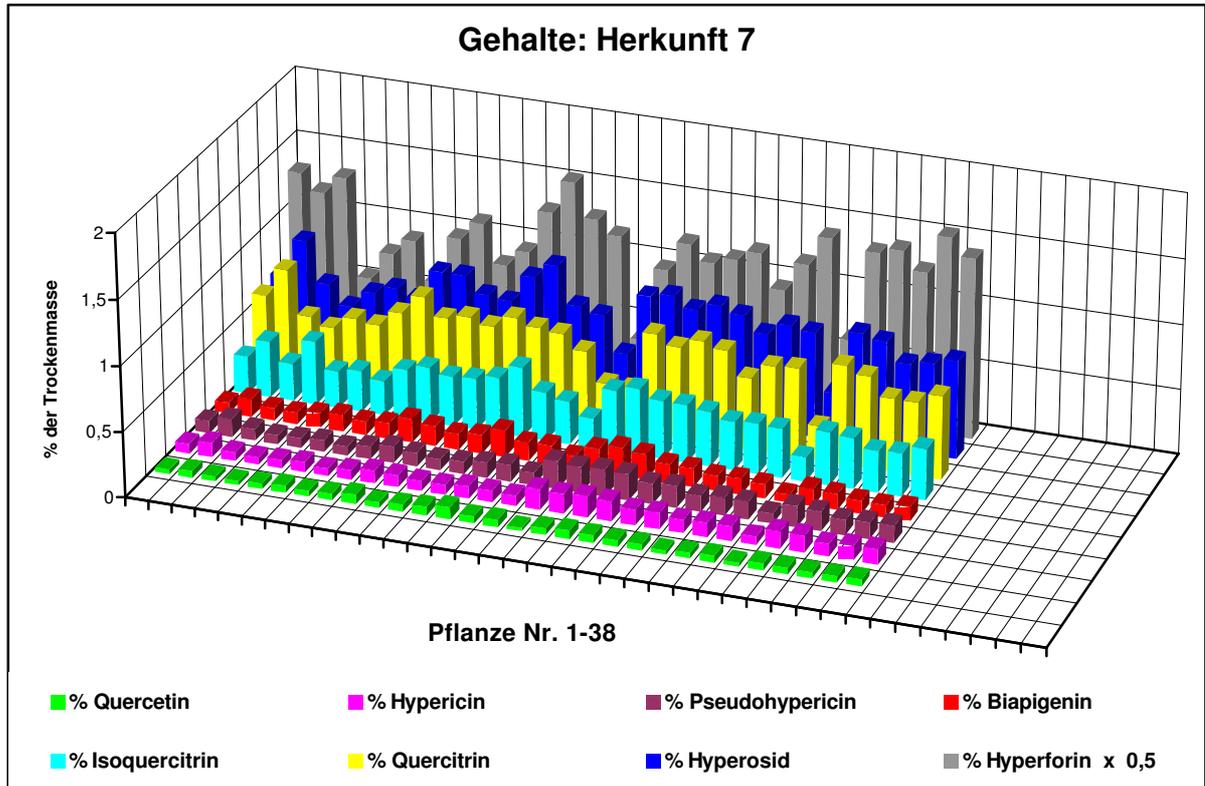


Diagramm 5-25 HPLC-Ergebnisse Herkunft 7

Herkunft 10 (Diagramm 5-26) zeigte sich bezüglich der analysierten Inhaltsstoffe als allgemein inhomogen und recht quercetinreich. Neun der Pflanzen waren rutinhaltig.

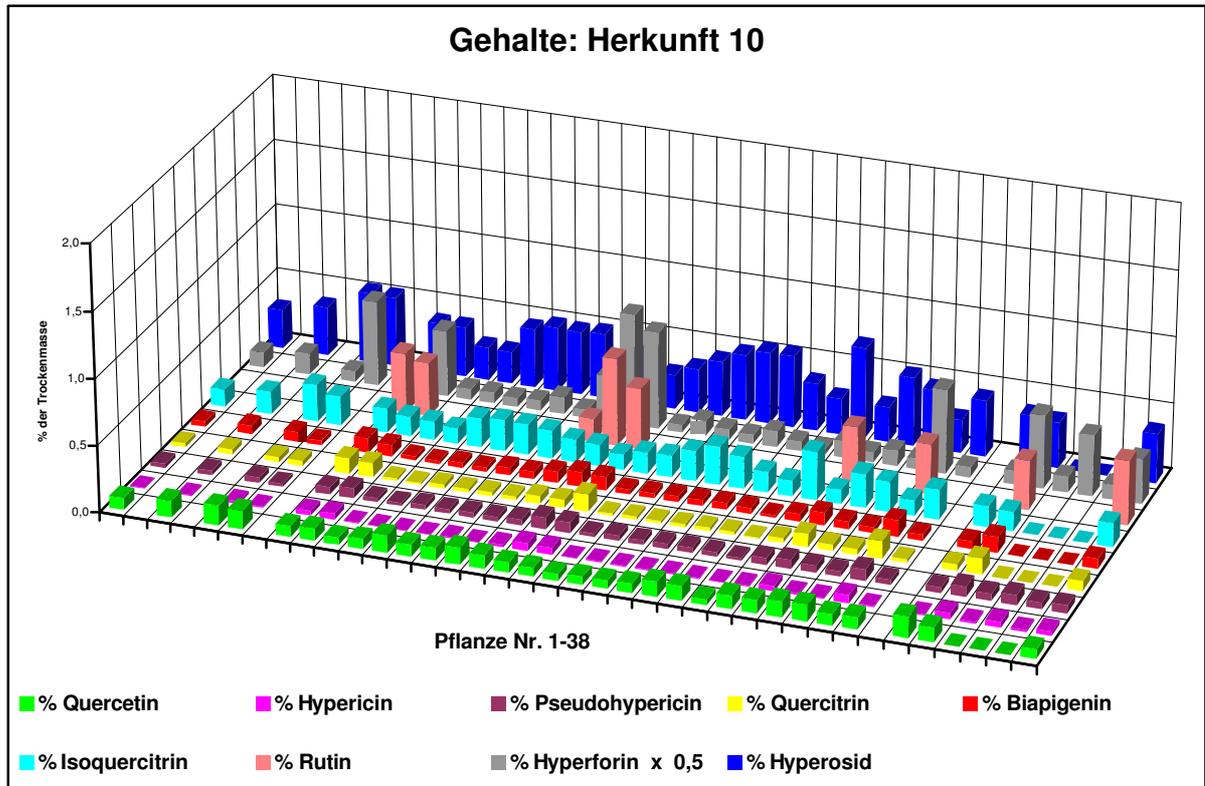


Diagramm 5-26 HPLC-Ergebnisse Herkunft 10

Bei der Analyse der Herkünfte, die als Mischmuster analysiert wurden (Diagramm 5-27), erwiesen sich die Herkünfte 3 und 12 als rutinfrei.

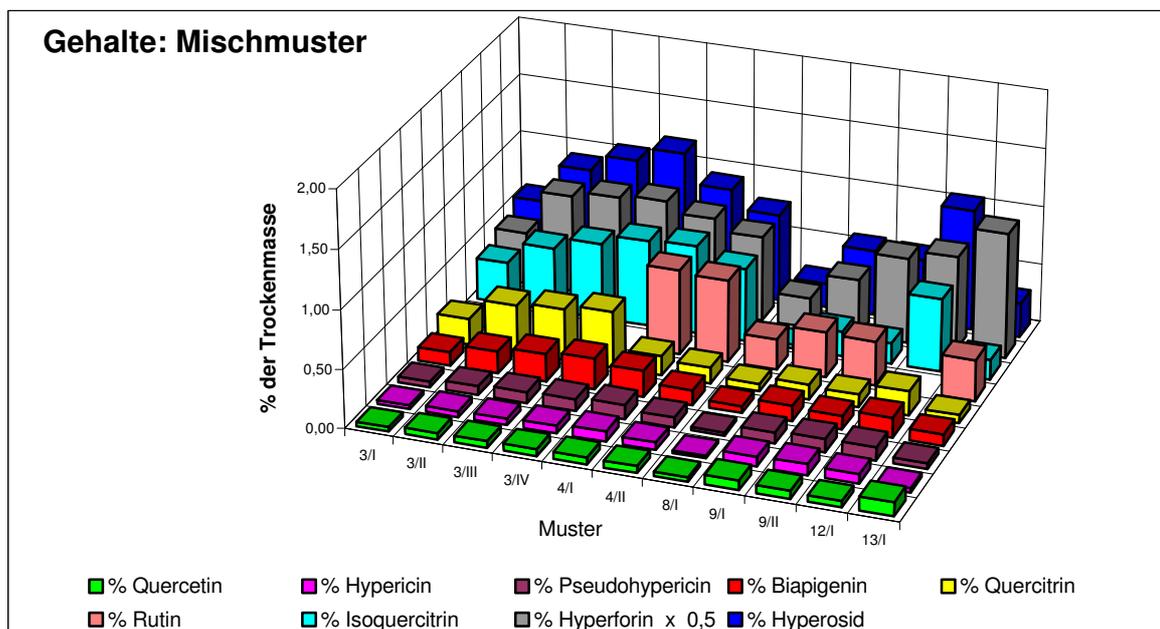


Diagramm 5-27 HPLC-Ergebnisse der als Mischmuster bestimmten Herkünfte

5.6.5.2.2 *Vergleiche zwischen den Herkünften*

Bei den vorliegenden Diagrammen wurde auf eine Einbeziehung der Herkünfte, die durch Mischmuster analysiert wurden, verzichtet.

Die ausschließlich rutinfreien Herkünfte hatten einen höheren Anteil an Hyperosid und Quercitrin als die rutinhaltigen, die wiederum einen erhöhten Quercetinanteil aufwiesen (Diagramm 5-28).

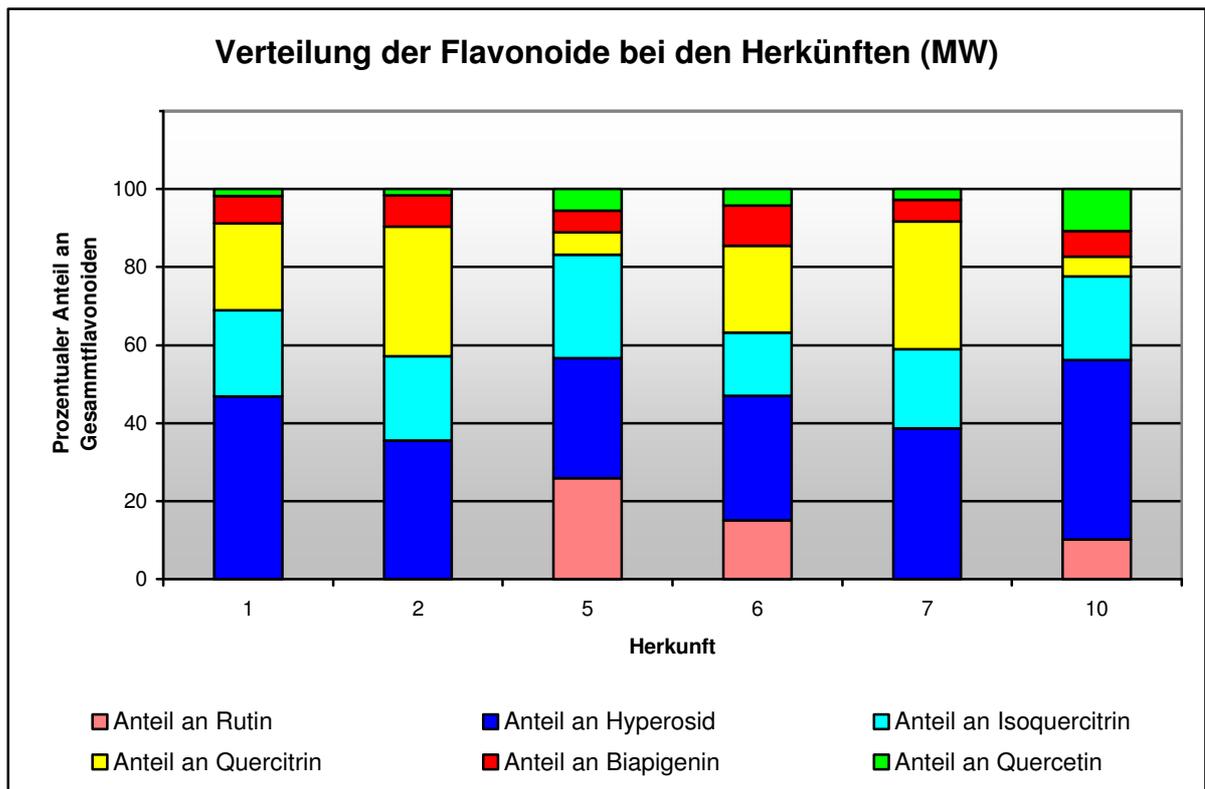


Diagramm 5-28 Flavonoidverteilung der Herkünfte

Die Pseudohypericingehalte (Diagramm 5-29) weisen sowohl innerhalb der Herkünfte als auch unter den Herkünften eine breite Streuung auf. Herkunft 7 war reich an Pseudohypericin, Herkunft 6 und 10 waren arm an diesem Inhaltsstoff.

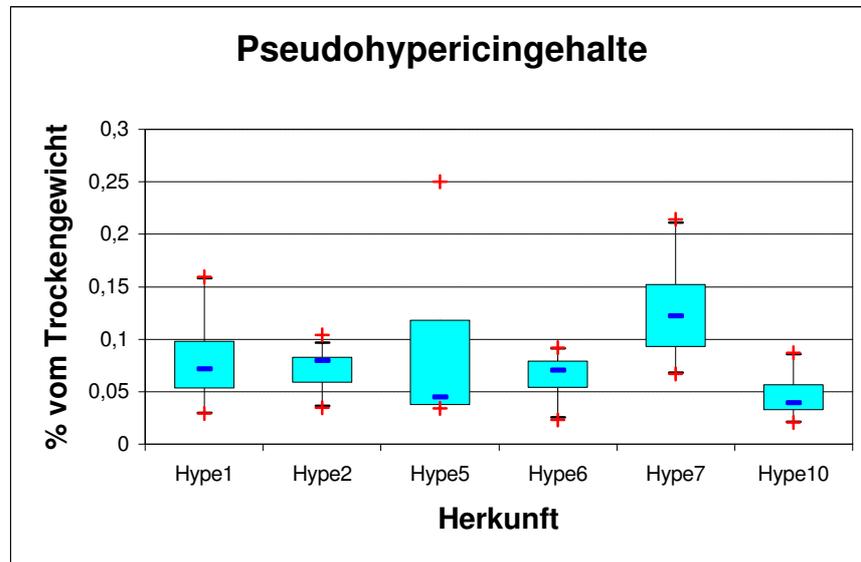


Diagramm 5-29 Box-Plot zu den Pseudohypericingehalten der Herkünfte

Die Hypericingehalte (Diagramm 5-30) sind ebenfalls einer breiten Streuung sowohl innerhalb der Herkünfte als auch unter den Herkünften unterworfen, als besonders hypericinreich erwies sich Herkunft 6.

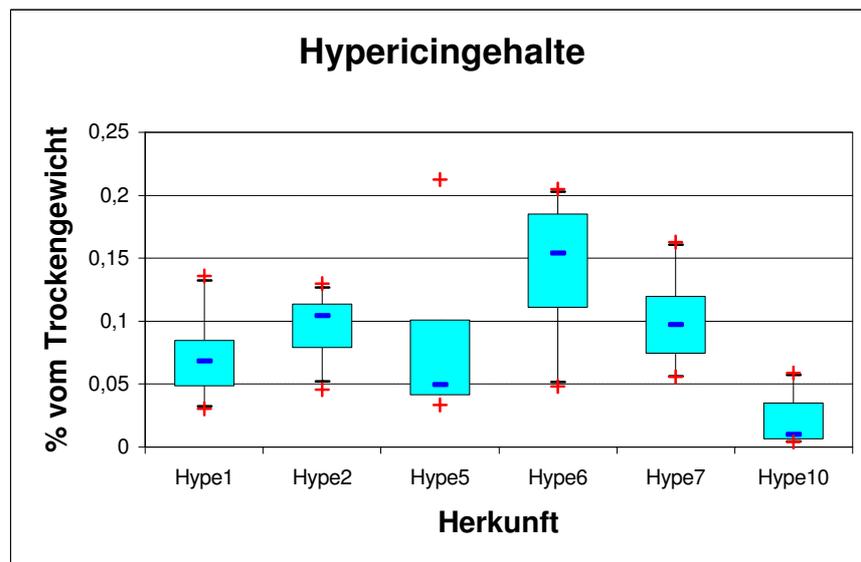


Diagramm 5-30 Box-Plot zu den Hypericingehalten der Herkünfte

Das Verhältnis aus Hypericin zu Pseudohypericin (Diagramm 5-31) unterliegt hingegen kleineren Streuungen als die Gehalte an Hypericin und Pseudohypericin. Die Herkünfte sind deutlich voneinander abgrenzbar.

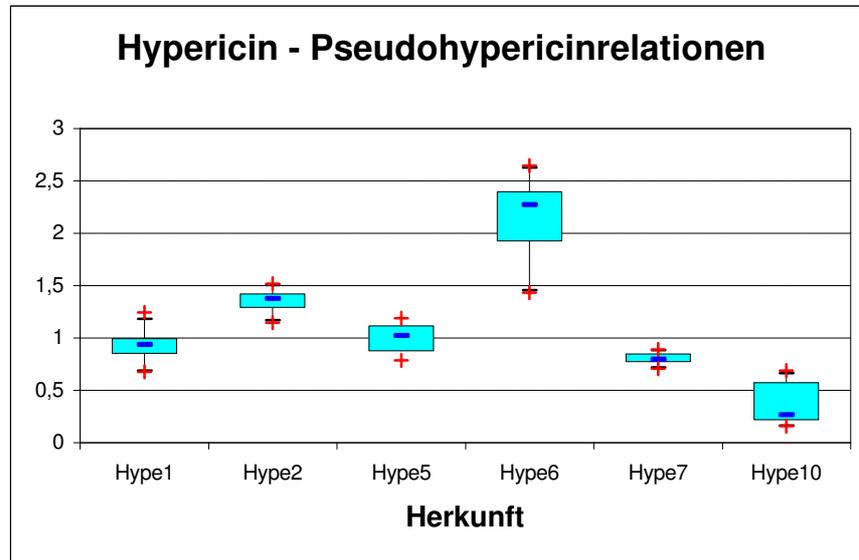


Diagramm 5-31 Box-Plot zu den Hypericin - Pseudohypericinrelationen der Herkünfte

Die Gehalte an Hyperforin sind durchweg einer breiten Streuung unterworfen. Da der Hyperforingehalt nach MEISENBACHER (1991) stark von der Ontogenese der Pflanze abhängig ist, mag hier noch die Ernte in unterschiedlichen Entwicklungsstadien eine Erklärung sein.

Als hyperforinreich erwiesen sich Herkunft 6 und 7, als besonders hyperforinarm Herkunft 10.

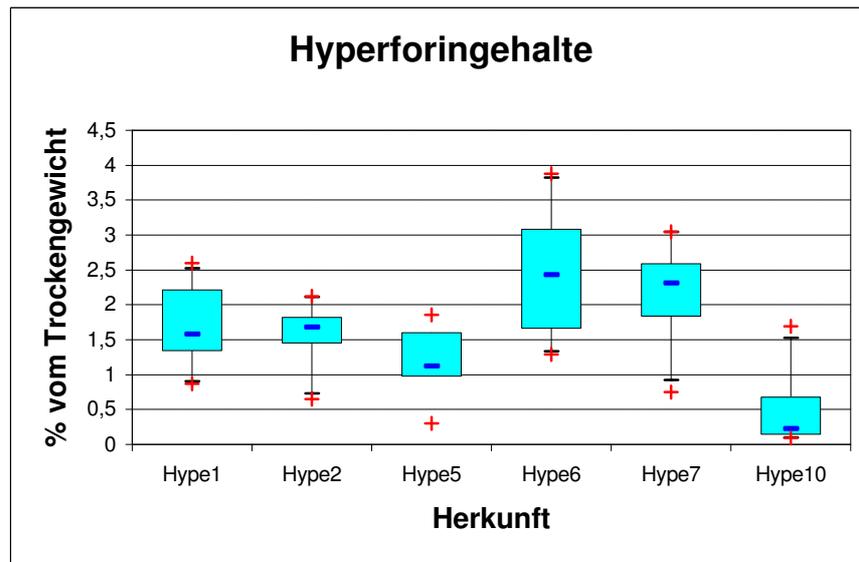


Diagramm 5-32 Box-Plot zu den Hyperforingehalten der Herkünfte

5.6.6 Absicherung des Befundes der Rutinfreiheit

Der Begriff der Rutinfreiheit bedarf zunächst einer Definition. Bei der HPLC-Bestimmung wurde die Integration von Peaks mit einem Area von kleiner 25 mV x s unterdrückt. Dies entspräche, unter näherungsweise Annahme einer Linearität des Rutins zu dessen resultierender Fläche in diesem Konzentrationsbereich, einem Gehalt von etwa 0,01% Rutin. Dieser Wert ist als Schwellenwert zu verstehen, bei dessen Unterschreitung die Rutinfreiheit einer Pflanze angenommen wurde.

Da rutinfreie Herkünfte von Johanniskraut in der Literatur nicht beschrieben worden sind, erschien es notwendig abzuklären, ob ein Fehler in der Analytik vorlag, oder ob das Merkmal der Rutinfreiheit einer Herkunft über mehrere Jahre auftritt.

Um einen Fehler der Analytik in der HPLC-Analyse auszuschließen, wurden alle Herkünfte stichprobenartig mittels HPTLC überprüft. Dabei erschienen die Flavonoidglykoside als orange gefärbte Banden. Geordnet nach steigendem R_f-Wert sind Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin und Quercitrin zu sehen. Die Resultate der Rutinfreiheit konnten in allen Fällen bestätigt werden.

Auf Foto 5-2 erkennbar sind die rutinfreien Herkünfte 1, 2, 3 (Bahn 1-3), die Flavonoidmischstandards (Bahn 4, 8, 12), die bereits in der HPLC eingesetzt wurden, die rutinhaltigen Herkünfte 4, 5, 6 (Bahn 5-7, auf Bahn 7 ist Rutin nur schwach erkennbar), die rutinfreie Herkunft 7 (Bahn 8), die rutinhaltigen oder teilweise rutinhaltigen Herkünfte 8,

9, 10 und 12 (Bahn 10, 11, 12 und 14, von Herkunft 10 wurde der Extrakt der rutinhaltigen Einzelpflanze 10 /14 aufgetragen), sowie die rutinhaltige Herkunft 13 (Bahn 15).

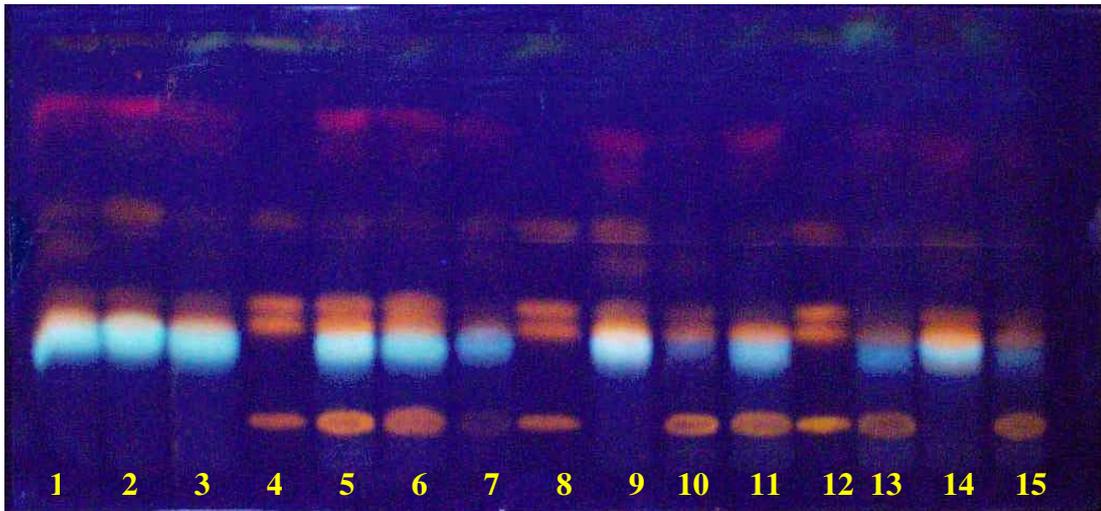


Foto 5-2 HPTLC-Chromatogramm

In einem zweiten Ansatz wurden Rückstellmuster aus dem Jahre 1998 der betreffenden rutinfreien Herkünfte durch die beschriebene HPLC untersucht sowie Muster aus dem Erhaltungssanbau in Marburg des Jahres 1999. Alle Resultate entsprachen den aus dem Versuchsanbau 1999 in Neumarkt untersuchten Herkünften.

5.6.7 Vergleich des 1. und 2. Aufwuchses im Jahr 1999

Allgemein sinken die Erträge nach BOMME (1997) beim zweiten Aufwuchs sowohl in Hinsicht der Hypericingehalte, als auch in der absoluten Menge an geerntetem Pflanzenmaterial. Beim zweiten Aufwuchs wurde jedoch nur ein Haupttrieb geerntet, um Saatgut der untersuchten Pflanzen erhalten zu können. Es kann also lediglich eine Aussage über die Menge der untersuchten Inhaltsstoffe des zweiten Aufwuchses getroffen werden, nicht aber über die Menge des Pflanzenmaterials, das theoretisch zu ernten war.

Von drei Herkünften konnte ein zweiter Aufwuchs geerntet werden. Von diesen wurde je Herkunft ein Mischmuster erstellt.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen des ersten und zweiten Aufwuchses sind in den Diagrammen 5-33 bis 5-35 dargestellt. Eine durchgehende Abnahme bestimmter Inhaltsstoffe kann nicht festgestellt werden.

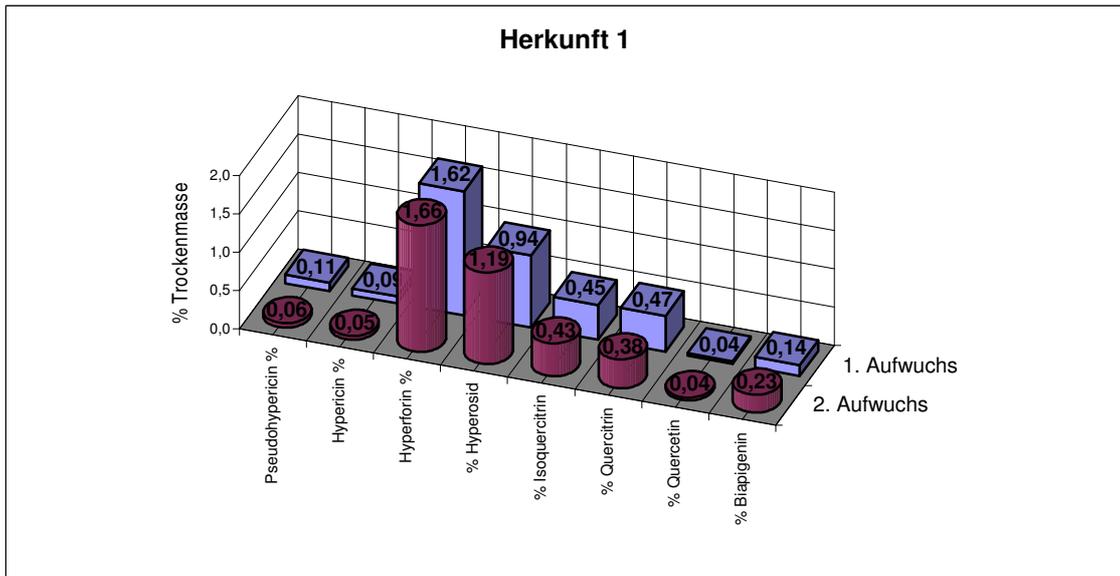


Diagramm 5-33 1. und 2. Aufwuchs Herkunft 1

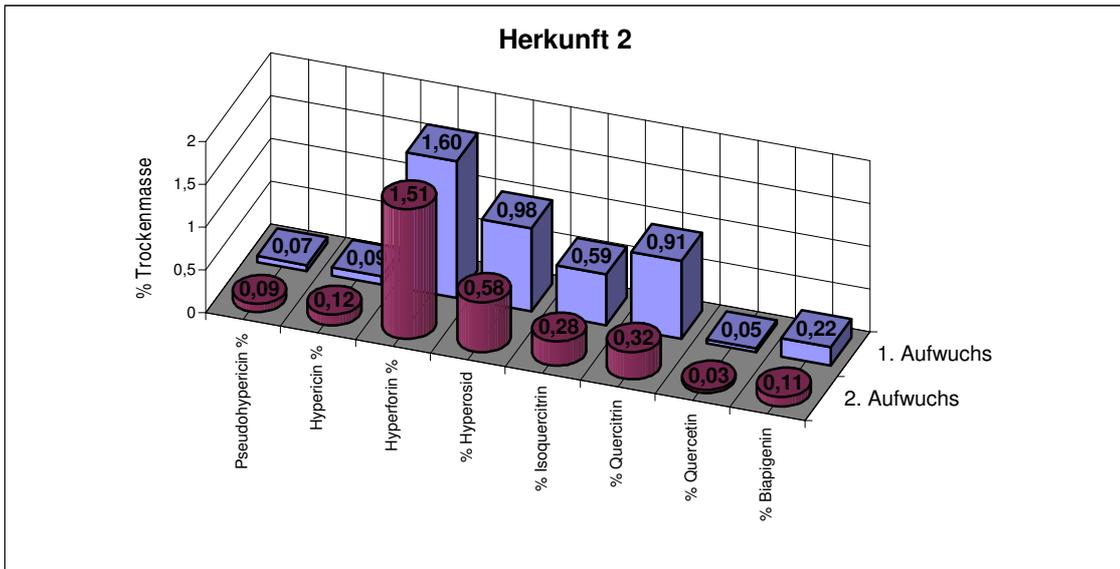


Diagramm 5-34 1. und 2. Aufwuchs Herkunft 2

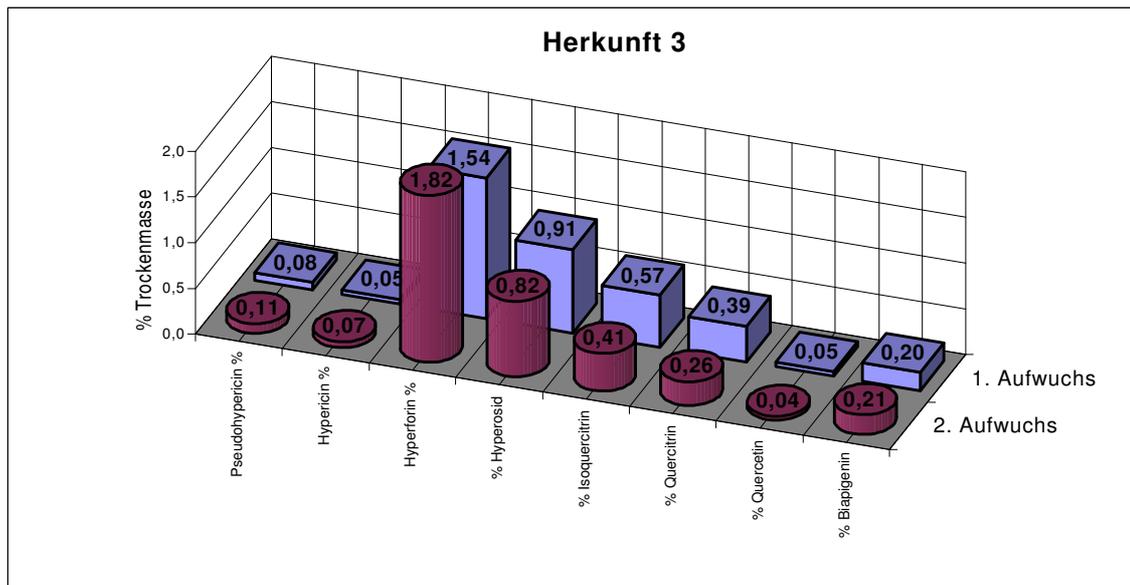


Diagramm 5-35 1. und 2. Aufwuchs Herkunft 3

5.6.8 Vergleich der Resultate von 1998 und 1999

Herkunft (nach 1999 nummeriert)	Inhaltsstoff	Gehalt [%] 1998	Gehalt [%] 1999 (MW)	Hypericin/ Pseudo- hypericin- verhältnis 1998	Hypericin/ Pseudo- hypericin- verhältnis 1999 (MW)
1	Pseudo- hypericin	0,16	0,08	0,75	0,88
	Hypericin	0,12	0,07		
	Hyperforin	1,73	1,56		
2	Pseudo- hypericin	0,07	0,07	0,86	1,4
	Hypericin	0,06	0,10		
	Hyperforin	0,98	1,63		
5	Pseudo- hypericin	0,12	0,08	0,75	0,875
	Hypericin	0,09	0,07		
	Hyperforin	1,45	1,24		
6	Pseudo- hypericin	0,08	0,07	2,0	2,0
	Hypericin	0,16	0,14		
	Hyperforin	1,90	2,5		
7	Pseudo- hypericin	0,15	0,13	0,60	0,77
	Hypericin	0,09	0,10		
	Hyperforin	1,90	1,08		
10	Pseudo- hypericin	0,13	0,05	0,54	0,4
	Hypericin	0,07	0,02		
	Hyperforin	1,47	0,45		

Tabelle 5-2 Vergleich der Resultate 1998/1999

Die aus beiden Jahren erhaltenen Werte (Tabelle 5.2) zeigen eine teilweise starke Abweichung, was sich unter anderem durch die unterschiedlichen Bedingungen der Kultur und Probennahme erklären läßt. Im allgemeinen sind die 1999 gefundenen Werte niedriger, das Hypericin/Pseudohypericinverhältnis ist 1999 größtenteils leicht zugunsten des Hypericins verschoben. Herkunft 10 zeigt, möglicherweise aufgrund ihres Befalles von Mehltau, 1999 einen stark erniedrigten Gehalt der drei untersuchten Inhaltsstoffe

5.6.9 Statistische Untersuchungen

Grundlage für die weitere Untersuchung der Datensätze mit statistischen Tests war zunächst die Prüfung auf Normalverteilung nach Kolmogoroff-Smirnow. Tabelle 5-3 zeigt die für die einzelnen Substanzen gefundenen P-Werte.

Herkunft	Inhaltsstoff	P- Wert	Herkunft	Inhaltsstoff	P- Wert
1	Rutin	/	6	Rutin	0,879
	Hyperosid	0,937		Hyperosid	0,164
	Isoquercitrin	0,510		Isoquercitrin	0,527
	Quercitrin	0,957		Quercitrin	0,944
	Quercetin	0,949		Quercetin	0,887
	Biapigenin	0,978		Biapigenin	0,947
	Pseudohypericin	0,765		Pseudohypericin	0,506
	Hypericin	0,581		Hypericin	0,520
	Hyperforin	0,696		Hyperforin	0,937
2	Rutin	/	7	Rutin	/
	Hyperosid	0,579		Hyperosid	0,770
	Isoquercitrin	0,967		Isoquercitrin	0,561
	Quercitrin	0,944		Quercitrin	0,518
	Quercetin	0,968		Quercetin	0,409
	Biapigenin	0,798		Biapigenin	0,628
	Pseudohypericin	0,034		Pseudohypericin	0,663
	Hypericin	0,264		Hypericin	0,866
	Hyperforin	0,851		Hyperforin	0,615
5	Rutin	0,879	10	Rutin	0,724
	Hyperosid	0,164		Hyperosid	0,699
	Isoquercitrin	0,527		Isoquercitrin	0,773
	Quercitrin	0,944		Quercitrin	0,131
	Quercetin	0,887		Quercetin	0,960
	Biapigenin	0,947		Biapigenin	0,518
	Pseudohypericin	0,506		Pseudohypericin	0,090
	Hypericin	0,520		Hypericin	0,004
	Hyperforin	0,937		Hyperforin	0,001

Tabelle 5-3 Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung

In drei Fällen unterschreiten die P - Werte 0,05. Dies deutet auf eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung hin. Die in der Tabelle gekennzeichneten Meßgrößen liegen bei den entsprechenden Herkünften nicht normalverteilt vor und werden von einer weiteren statistischen Untersuchung ausgenommen.

Es wurde nun durch eine Varianzanalyse untersucht, inwieweit die einzelnen Herkünfte sich bezüglich ihrer Inhaltsstoffe signifikant voneinander abheben.

Das Verfahren der Wahl stellt die ANOVA (*analysis of variance*) dar. Bei statistischen Voruntersuchungen auf die Homogenität der Varianzen nach Bartlett, aber auch nach dem robusteren Verfahren nach Levené konnte keine Homogenität festgestellt werden, so daß auf eine Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis, auch H-Test genannt, zurückgegriffen werden mußte. Dieses Verfahren ähnelt der einfaktoriellen Varianzanalyse, es bedient sich aber der Rangfolge der Meßwerte. Ebenso wie beim U-Test, der jeweils nur zwei Stichproben aufgrund der Ränge vergleicht, handelt es sich beim H-Test um ein parameterfreies Prüfverfahren für ordinalskalierte, stetige Zufallsvariablen, so daß auch hier keine weiteren Voraussetzungen bezüglich Art und Form der Verteilung erfüllt sein müssen. Es ist mithin zulässig, auch die nicht normalverteilten (vergl. Tabelle 5-3) Stichproben mit diesem Verfahren zu untersuchen. Es wird geprüft, ob die Stichproben einer gemeinsamen Grundgesamtheit entstammen. Ist das der Fall, bedeutet dies zugleich, daß die Stichproben zusammengenommen derselben Verteilung genügen. So läßt sich zum Beispiel mit diesem Test die Frage klären, ob Stichproben vereinigt werden dürften oder ob die einzelnen Herkünfte sich bezüglich ihrer Inhaltsstoffe signifikant voneinander abheben.

P gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, mit der unter Annahme der Nullhypothese das Ergebnis zustande kommt, oder anders ausgedrückt bedeutet dies, ob die Gruppen vereinigt werden dürften, weil sie einer gemeinsamen Grundgesamtheit entnommen sein dürften. Bei einem so kleinen P-Wert, der wie hier fast 0 erreicht, ist von einer gemeinsamen Grundgesamtheit mit Sicherheit nicht auszugehen.

Die ermittelten P-Werte lauten:

Rutin: 3,0697E-31, Hyperosid: 1,098E-19, Isoquercitrin: 6,1035E-17, Quercitrin: 1,89E-27, Quercetin: 6,1035E-17, I3, II8-Biapigenin: 5,7358E-21, Hypericin: 3,2691E-20, Pseudohypericin: 2,6359E-13, Hyperforin: 1,3305E-19.

Da alle Werte für P hier ausgesprochen klein sind, muß die Nullhypothese abgelehnt werden. Die Herkünfte unterscheiden sich also signifikant voneinander in Bezug auf den Gehalt der analysierten Inhaltsstoffe.

In einem weiteren Schritt werden multiple Vergleiche angestellt (Tabelle 5-4). Die Berechnung erfolgt nach REGW (Ryan, Einot, Gabriel, Welsch) mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ (5%). Ziel des Verfahrens ist es, neue Untermengen mit Gruppierungen zu bilden, die keine signifikanten Unterschiede mehr aufweisen. Je

mehr Untermengen errechnet werden, desto spezifischer ist dieses Merkmal für die betreffende Herkunft. Bei Isoquercitrin und Quercitrin unterscheiden sich vier von sechs Herkünften signifikant voneinander. Es handelt sich hier um brauchbare Meßgrößen, um eine Herkunft zu charakterisieren oder von anderen Herkünften abzugrenzen.

Merkmal	Unter- menge 1	Unter- menge 2	Unter- menge 3	Unter- menge 4
Rutin (nur Herkunft 5 und 6)	Herkunft 5	Herkunft 6		
Hyperosid	Herkunft 5, 6, 7	Herkunft 1, 2	Herkunft 10	
Isoquercitrin	Herkunft 6, 7	Herkunft 5, 2	Herkunft 10	Herkunft 1
Quercitrin	Herkunft 10, 5	Herkunft 1, 6	Herkunft 7	Herkunft 2
Biapigenin	Herkunft 5, 7, 1	Herkunft 2, 6	Herkunft 10	
Quercetin	Herkunft 6, 2, 5, 1	Herkunft 10	Herkunft 7	
Pseudohypericin (ohne Herkunft 2)	Herkunft 6, 5, 1	Herkunft 10	Herkunft 7	
Hypericin (ohne Herkunft 10)	Herkunft 1, 5	Herkunft 2, 7	Herkunft 6	
Hyperforin (ohne Herkunft 10)	Herkunft 2, 1	Herkunft 7,6	Herkunft 5	

Tabelle 5-4 Untergruppen berechnet nach REGW

In einer weiteren Untersuchung wurden die Daten auf Korrelationen untersucht. Gefundene Korrelationen verdienen bei den Inhaltsstoffen besondere Beachtung, die biogenetisch miteinander verwandt sind wie zum Beispiel Flavonoidglykoside und deren Aglykon untereinander und Hypericin und Pseudohypericin, oder gehäuft in bestimmten Teilen der Pflanzen auftreten wie Hypericine, Biapigenin und Hyperforin.

Wie bereits durch die Rangvarianzanalyse nachgewiesen werden konnte, unterscheiden sich die Herkünfte signifikant in ihren Inhaltsstoffen voneinander, so daß ein solcher Test nur innerhalb einer Herkunft vorgenommen werden kann.

Die Berechnungen wurden nach Pearson durchgeführt.

Herkunft 1

Eine Korrelation der Gehalte liegt vor zwischen Hypericin und Pseudohypericin ($r = 0,97$) und Quercetin und Hyperosid ($r = 0,53$). Schwächer korreliert sind Pseudohypericin und Hypericin mit Hyperforin ($r = 0,38 / 0,32$) sowie mit Biapigenin ($r = 0,49 / 0,48$). Keine Korrelation gibt es zwischen Biapigenin und Hyperforin.

Herkunft 2 (ohne Pseudohypericin)

Die bei Herkunft 2 auftretenden Korrelationen sind wesentlich zahlreicher als bei Herkunft 1. Tabelle 5-5 stellt die gefundenen Korrelationen dar.

	Hyperosid	Isoquercitrin	Quercitrin	Quercetin	Biapigenin	Hypericin	Hyperforin
Hyperosid Korrelationskoeffizient	1,00	0,71	0,73	0,62	0,73	0,37	0,74
Isoquercitrin Korrelationskoeffizient	0,71	1,00	0,72	0,46	0,54	0,55	0,64
Quercitrin Korrelationskoeffizient	0,73	0,72	1,00	0,36	0,35	0,41	0,57
Quercetin Korrelationskoeffizient	0,62	0,46	0,36	1,00	0,65	0,21	0,65
Biapigenin Korrelationskoeffizient	0,73	0,54	0,35	0,65	1,00	0,36	0,53
Hypericin Korrelationskoeffizient	0,37	0,55	0,41	0,21	0,36	1,00	0,58
Hyperforin Korrelationskoeffizient	0,74	0,64	0,57	0,65	0,53	0,58	1,00

Tabelle 5-5 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson, Herkunft 2

Herkunft 5

Hier (Tabelle 5-6) sind, ähnlich wie bei Herkunft 2, die Flavonoidglykoside deutlich korreliert, weiter Biapigenin mit Hypericinen. Die höchste Korrelation zeigen, wie bei Herkunft 1, Hypericin und Pseudohypericin zueinander.

	Rutin	Hyperosid	Isoquercitrin	Quercitrin	Quercetin	Biapigenin	Pseudohypericin	Hypericin	Hyperforin
Rutin Korrelationskoeffizient	1,00	0,91	0,87	0,83	0,23	0,56	0,40	0,41	0,17
Hyperosid Korrelationskoeffizient	0,91	1,00	0,94	0,96	0,09	0,83	0,68	0,68	0,32
Isoquercitrin Korrelationskoeffizient	0,87	0,94	1,00	0,90	0,23	0,85	0,66	0,68	0,28
Quercitrin Korrelationskoeffizient	0,83	0,96	0,90	1,00	0,09	0,87	0,79	0,80	0,38
Quercetin Korrelationskoeffizient	0,23	0,09	0,23	0,09	1,00	0,03	-0,12	-0,05	0,50
Biapigenin Korrelationskoeffizient	0,56	0,83	0,85	0,87	0,03	1,00	0,89	0,89	0,34
Pseudohypericin Korrelationskoeffizient	0,40	0,68	0,66	0,79	-0,12	0,89	1,00	1,00	0,31
Hypericin Korrelationskoeffizient	0,41	0,68	0,68	0,80	-0,05	0,89	1,00	1,00	0,33
Hyperforin Korrelationskoeffizient	0,17	0,32	0,28	0,38	0,50	0,34	0,31	0,33	1,00

Tabelle 5-6 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson Herkunft 5

Herkunft 6

Auch innerhalb der Herkunft 6 (Tabelle 5-7) sind die Korrelationen unter den Flavonoidglykosiden stark ausgeprägt. Ferner korreliert Biapigenin gut mit Hypericinen und einigen Flavonoiden. Auch hier korrelieren, wie bei den folgenden Herkünften, die beiden Hypericine miteinander.

	Rutin	Hyperosid	Isoquercitrin	Quercitrin	Quercetin	Biapigenin	Pseudohypericin	Hypericin	Hyperforin
Rutin Korrelationskoeffizient	1,00	0,94	0,88	0,82	0,49	0,74	0,62	0,69	0,32
Hyperosid Korrelationskoeffizient	0,94	1,00	0,95	0,71	0,64	0,83	0,76	0,85	0,51
Isoquercitrin Korrelationskoeffizient	0,88	0,95	1,00	0,64	0,67	0,83	0,71	0,84	0,58
Quercitrin Korrelationskoeffizient	0,82	0,71	0,64	1,00	0,51	0,73	0,58	0,55	0,17
Quercetin Korrelationskoeffizient	0,49	0,64	0,67	0,51	1,00	0,72	0,54	0,68	0,69
Biapigenin Korrelationskoeffizient	0,74	0,83	0,83	0,73	0,72	1,00	0,89	0,91	0,45
Pseudohypericin Korrelationskoeffizient	0,62	0,76	0,71	0,58	0,54	0,89	1,00	0,87	0,41
Hypericin Korrelationskoeffizient	0,69	0,85	0,84	0,55	0,68	0,91	0,87	1,00	0,60
Hyperforin Korrelationskoeffizient	0,32	0,51	0,58	0,17	0,69	0,45	0,41	0,60	1,00

Tabelle 5-7 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson Herkunft 6

Herkunft 7

Auffallend bei Herkunft 7 (Tabelle 5-8) sind die im Vergleich zu Herkunft 2, 5, und 6 wesentlich schwächeren Korrelationen von Hyperforin mit Hypericinen sowie mit Biapigenin.

	Hyperosid	Isoquercitrin	Quercitrin	Quercetin	Biapigenin	Pseudo-hypericin	Hypericin	Hyperforin
Hyperosid Korrelationskoeffizient	1,00	0,78	0,74	0,75	0,76	0,43	0,44	0,65
Isoquercitrin Korrelationskoeffizient	0,78	1,00	0,53	0,65	0,76	0,38	0,39	0,38
Quercitrin Korrelationskoeffizient	0,74	0,53	1,00	0,53	0,46	0,14	0,16	0,52
Quercetin Korrelationskoeffizient	0,75	0,65	0,53	1,00	0,76	0,11	0,14	0,56
Biapigenin Korrelationskoeffizient	0,76	0,76	0,46	0,76	1,00	0,50	0,50	0,28
Pseudohypericin Korrelationskoeffizient	0,43	0,38	0,14	0,11	0,50	1,00	0,99	0,16
Hypericin Korrelationskoeffizient	0,44	0,39	0,16	0,14	0,50	0,99	1,00	0,20
Hyperforin Korrelationskoeffizient	0,65	0,38	0,52	0,56	0,28	0,16	0,20	1,00

Tabelle 5-8 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson Herkunft 7

Herkunft 10 (ohne Hypericin und Hyperforin)

Herkunft 10 (Tabelle 5-9) zeigt ebenfalls Korrelationen innerhalb der Flavonoidglykoside.

	Hyperosid	Isoquercitrin	Quercitrin	Quercetin	Biapigenin	Pseudohypericin
Hyperosid Korrelationskoeffizient	1,00	0,98	0,06	0,72	0,27	-0,30
Isoquercitrin Korrelationskoeffizient	0,98	1,00	0,00	0,66	0,21	-0,33
Quercitrin Korrelationskoeffizient	0,06	0,00	1,00	0,29	0,91	0,67
Quercetin Korrelationskoeffizient	0,72	0,66	0,29	1,00	0,42	-0,20
Biapigenin Korrelationskoeffizient	0,27	0,21	0,91	0,42	1,00	0,60
Pseudohypericin Korrelationskoeffizient	-0,30	-0,33	0,67	-0,20	0,60	1,00

Tabelle 5-9 Ergebnisse der Korrelationsberechnung nach Pearson Herkunft 10

Die Prinzipien der angewendeten Verfahren werden bei SACHS (1997) eingehend beschrieben.

5.6.10 Diskussion der Ergebnisse

Die in beiden Jahren aufgetretenen Verluste durch den Befall der Rotwelke waren beträchtlich. Sie betragen jeweils um 50%. Entgegen dem Ergebnis von BOMME (1997) stellte sich der Befall von Mehltau als eindeutig qualitätsmindernd für die Droge (Herkunft 10, vergl. Diagramm 5-10) heraus.

Beim Entwurf des Selektionsprogramms wurde auf eine Untersuchung des zweiten Standjahres zugunsten eines hohen Probenaufkommens bewußt verzichtet, es ist zwar gesichert, daß die Pflanzen im zweiten Standjahr erst ihre volle Größe erreichen [BOMME (1997), BÜTER et al. (1996)], dies hätte den zeitlichen Aufwand jedoch verdoppelt.

Die morphologischen Untersuchungen erwiesen sich nur in wenigen Bereichen für die Charakterisierung einer Herkunft als sinnvoll. Bestimmte Merkmale zeigten eher eine allgemeine Übereinstimmung (Kelchblattlänge und Kelchblattbreite) und können als Merkmal für *Hypericum perforatum* L. betrachtet werden.

Gut hoben sich einige Herkünfte in ihrer Form des Primärblattes voneinander ab, was nach HEGI (1970) ein Hinweis darauf sein könnte, daß verschiedene Subspezies von *Hypericum*

perforatum L. untersucht wurden. Dort werden keine absoluten Aussagen hinsichtlich der Länge und Breite der Blätter getroffen. Der Begriff und die Definition der Primärblätter (vergl. 5.6.2) wurde in dieser Arbeit erstmalig verwendet.

Bei den chemischen Untersuchungen fielen zwei qualitative Merkmale auf, die den Literaturangaben widersprechen.

Die Herkünfte 1, 2, 3, 7 und 12 waren rutinfrei, Herkunft 10 zum größten Teil. Herkunft 10 war zum Zeitpunkt der ersten Selektion einem Wildbestand entnommen worden, dies könnte das nur teilweise Fehlen oder Vorhandensein von Rutin erklären. Die anderen drei Herkünfte wurden über mindestens fünf Jahre in verschiedenen botanischen Gärten kultiviert und wiesen dieses Merkmal konstant auf.

Laut SCHÜTT et al. (1993) ist das Vorhandensein von Rutin ein für *Hypericum perforatum* L. typisches, essentielles Merkmal, gleichzeitig enthalten die Pflanzen der rutinfreien Herkünfte aber teils große Mengen an Hyperforin, dessen Vorhandensein für *Hypericum perforatum* L. ebenfalls typisch und essentiell ist, und das bei möglichen Verfälschungen wie *H. maculatum* L. fehlen würde [SCHÜTT et al. (1993)]. Hier muß angemerkt werden, daß, entgegen früherer Beobachtungen [BERGHÖFER^B (1987)], auch *H. maculatum* L. in geringem Maße Hyperforin enthält.

Die Wahrscheinlichkeit ist als äußerst gering einzuschätzen, daß es bei den beschriebenen Herkünften durch die Bildung von Artbastarden, die prinzipiell möglich ist, [SCHULTE et al. (1999)] zu rutinfreien, hyperforinreichen und über mehrere Generationen stabilen Hybriden kommen kann. Die beschriebenen Herkünfte stammen zudem noch von räumlich weit entfernten Standorten.

Herkunft 6 wies ein umgekehrtes Hypericin/Pseudohypericinverhältnis von 2 : 1 auf als bei OSTROWSKI (1988) beschrieben. Dies ist insofern von Bedeutung, als daß HÄBERLEIN et al. (1992) eine Umsetzung des Pseudohypericins zu Cyclopseudohypericin in Stabilitätsmustern von Johanniskrautextrakten oder Drogenzubereitungen feststellen konnten. Ein hoher Anteil an Hypericin und ein kleiner Anteil von Pseudohypericin in der Droge wäre demnach von Vorteil für die Stabilität von Hypericin in Johanniskraut-Zubereitungen, wenn vorausgesetzt wird, daß Hypericin und Pseudohypericin bei der Gehaltsbestimmung der Hypericine als Summe berechnet werden.

Bei Wildsammlungen in unmittelbarer und mittelbarer Nähe des ursprünglichen Fundortes von Herkunft 6 gab es noch eine weitere, etwa 5 km entfernte Pflanze mit einem annähernd

gleichen Hypericin/Pseudohypericinverhältnis. Da der Fundort zudem durch die geologischen Gegebenheiten wie Gebirge und Meer recht isoliert ist, kann man von einem höchst seltenen Merkmal ausgehen.

In quantitativer Hinsicht gibt es große Unterschiede zwischen den Herkünften und, je nach Herkunft, auch innerhalb einer solchen.

Es wurden Herkünfte gefunden, die in bezug auf ihre Inhaltsstoffe homogener beschaffen sind (Herkunft 2 und 7, vergl. Diagramme 5-22 und 5-25) als die Herkünfte 1, 5, 6 und 10.

Ein Vergleich der Resultate mit vorhergehenden Arbeiten, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben, ist eingeschränkt möglich, da meistens nur Blüten zur chemischen Untersuchung herangezogen [Büter et al. (1998), Ostrowski (1988), SCHÜTT (1996)] wurden oder unterschiedlich getrocknet [Schütt (1996)] wurde.

Auch unterscheiden sich sämtliche Arbeiten erheblich in Probenumfang und analytischem Pensum.

SCHÜTT (1996) untersuchte den Gehalt der Inhaltsstoffe Hypericin, Pseudohypericin, Hyperosid, Quercitrin, Biapigenin und Quercetin, BÜTER (1998) untersuchte zusätzlich zu den in dieser Arbeit bestimmten Inhaltsstoffen Amentoflavon, aber nicht Hyperforin.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Bestimmung von Amentoflavon absichtlich unterlassen, da es sich bei einem Gehalt von bis zu 0,5‰ [SCHÜTT et al. (1993)] nicht um einen Hauptinhaltsstoff von *Hypericum perforatum* L. handelt, auch wenn pharmakologische Wirkungen von Amentoflavon [BAUREITHEL (1997)] nachgewiesen wurden.

Bei den statistischen Untersuchungen konnten teils deutliche Korrelationen festgestellt werden. Am auffallendsten ist hier die Korrelation von Hypericin zu Pseudohypericin, die auch von SCHÜTT (1995) festgestellt wurde, wenn auch in geringerem Maße, was aber eventuell durch die in der vorliegenden Arbeit größere Stichprobenmenge zu erklären ist.

Die gefundenen Korrelationen waren von Herkunft zu Herkunft unterschiedlich ausgeprägt und bei den Herkünften 2 und 7 am zahlreichsten (vergl. Tab. 5-2 und 5-8).

Allgemein waren mehr und ausgeprägtere Korrelationen festzustellen als bei vorangegangenen Arbeiten. Ein Grund hierfür ist sicherlich die recht breite Datenlage, ein anderer Grund könnte auch der sein, daß die Blüten von *Hypericum perforatum* L, die bei den erwähnten Arbeiten alleine zu dessen chemischen Charakterisierung herangezogen wurden, keine auf andere Organe der Pflanze übertragbaren Ergebnisse liefern.

Eine Analyse der Daten zu den Gehaltsbestimmungen nach REGW zeigte, daß Isoquercitrin und Quercitrin in besonderem Maße zur Charakterisierung einer Herkunft geeignet sind. Inwieweit dieses Ergebnis eine allgemeine Bedeutung haben kann, ist jedoch nicht geklärt.

Ein klimatischer Einfluß auf die Menge der untersuchten Inhaltsstoffe ist anzunehmen, da jedoch 1998 und 1999 an unterschiedlichen Standorten angebaut wurde und sich dieser Einfluß nicht von standortspezifischen Faktoren wie unterschiedliche Böden, aber auch Sonnenlichteinfall trennen läßt, kann dieser nicht weiter verfolgt werden.

Eine Cadmiumakkumulation, wie sie bei SCHNEIDER et al. (1996) beschrieben wurde, konnte bei den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Es kann, da nur drei Herkünfte untersucht wurden, für die genügend Pflanzenmaterial zur Verfügung stand, keine allgemeine Aussage getroffen werden. Gesichert ist damit, daß eine Gefahr der Cadmiumakkumulation bei den Pflanzen der Herkünfte 1, 6 und 7 nicht gegeben ist.

6 Analytische und präparative Arbeiten

6.1 Hypericin

6.1.1 Isolierung von Hypericin

Zur Isolierung von Hypericin wurde getrocknetes Pflanzenmaterial zunächst einer Extraktion nach Soxhlet mit Dichlormethan unterworfen. Nach der Trocknung der Extraktionshülse wurde erschöpfend (etwa acht Stunden) mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wird einige Stunden direktem Sonnenlicht ausgesetzt, um so die Protostufen der Hypericine umzusetzen. In die Lösung wurde Polyamid gebracht und nach einer zehnstündigen Einwirkdauer abfiltriert. Das mit Hypericinen beladene Polyamid wurde mit Wasser gewaschen, danach bis zur völligen Farblosigkeit der Waschflüssigkeit mit einer 0,5%igen Lösung von Ammoniak in Wasser behandelt. Nach Umkonditionieren mit Wasser und Methanol wurde Hypericin mit Methanol, dem 0,5% Ammoniak zugesetzt wurde, eluiert.

Das Eluat wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt, gewogen, in Methanol gelöst und durch präparative HPLC weiter aufgereinigt.

Das Prinzip der Isolierung von Hypericin, die reversible Adsorption an Polyamid, lehnt sich eng an eine vorherige Arbeit an [Stock (1992)]. Neu ist hier jedoch, daß Pseudohypericin nun durch Behandlung mit einer wässrig-ammoniakalischen Lösung zum Großteil umgesetzt wurde. Das aufgefangene, intensiv orange gefärbte Eluat zeigte unter Diodenarraydetektion als Hauptbestandteil unter Vergleich der UV-VIS-Spektren mit HÄBERLEIN et al. (1992) Cyclopseudohypericin.

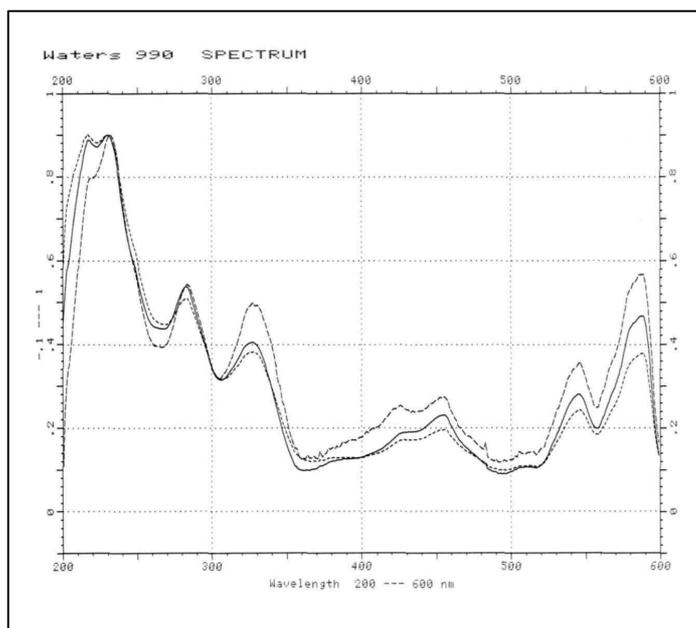
6.1.2 Identität und Reinheit

6.1.2.1 Nachweis mittels HPLC

Das isolierte Hypericin wurde durch HPLC nach GAEDCKE (1997) und OSTROWSKI (1998) auf seine Identität und seine Reinheit (Anteil an Gesamtfläche bei 591 nm) untersucht. Die Retentionszeit entsprach der einer vorliegenden Bezugssubstanz, der mittlere Anteil an der Gesamtabsorption betrug 96,55%.

6.1.2.2 UV-VIS-Spektren

Durch Diodenarraydetektion während der HPLC-Untersuchung wurde ein UV-VIS-Spektrum des dem Hypericins entsprechenden Peaks im Maximum und in den Wendepunkten aufgenommen. Die Spektren sind in Lage und Verhältnis der Maxima zueinander identisch (Grafik 6-1). Zum einen ist damit die Reinheit der Substanz nachgewiesen, zum anderen die Peakreinheit der analytischen Trennung (vergl. 7.4.3).



Grafik 6-1 UV-VIS-Spektrum von Hypericin

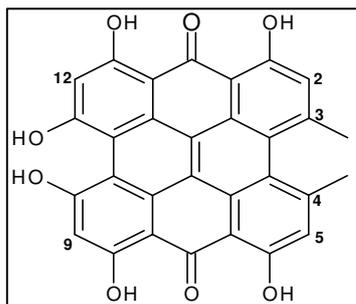
6.1.2.3 $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektrum

Das Protonenspektrum wurde in deuteriertem Pyridin bei 500 MHz aufgenommen und gegen TMS geeicht.

Proton	Signal Multiplizität	Shift (ppm) Gemessen	Shift (ppm) ¹	Shift (ppm) ²
H3, H4	s, 3H	2,66	2,69	2,67
H9, H12	s, 2H	7,38	6,50	6,48
H2, H5	s, 2H	7,46	7,37	7,35

¹[Sattler (1996)], ²[Meisenbacher (1991)]

Tabelle 6-1 $^1\text{H-NMR}$ -Signale und Zuordnung: Hypericin

*Formel 6-1 Hypericin*

Die abweichende chemische Verschiebung von H9 und H12 (Tabelle 6-1, Formel 6-1) läßt sich damit begründen, daß hier deuteriertes Pyridin, in den beiden zitierten Fällen Dimethylsulfoxid-d₆ als Lösungsmittel verwendet wurde.

Das MS-Spektrum mit EI bei 70 eV liefert ein Signal bei m/z 504 und entspricht dem Molekulargewicht des Hypericins.

6.2 13,118-Biapigenin

6.2.1 Vorbemerkungen

Biapigenin-Standardsubstanz ist bislang nicht im Handel erhältlich. Für die quantitativen Untersuchungen mußte sie daher selbst isoliert werden. Abweichend von bisher beschriebenen Verfahren zur Isolierung von 13,118-Biapigenin [BERGHÖFER^A (1987), SCHÜTT (1996)] wurde die Endstufe der Isolierung mit präparativer HPLC vollzogen, da eine Trennung mittels DC nur unbefriedigende Resultate in Bezug auf Ausbeute und auch Reinheit zeigte.

6.2.2 Herstellung eines angereicherten Extrakts

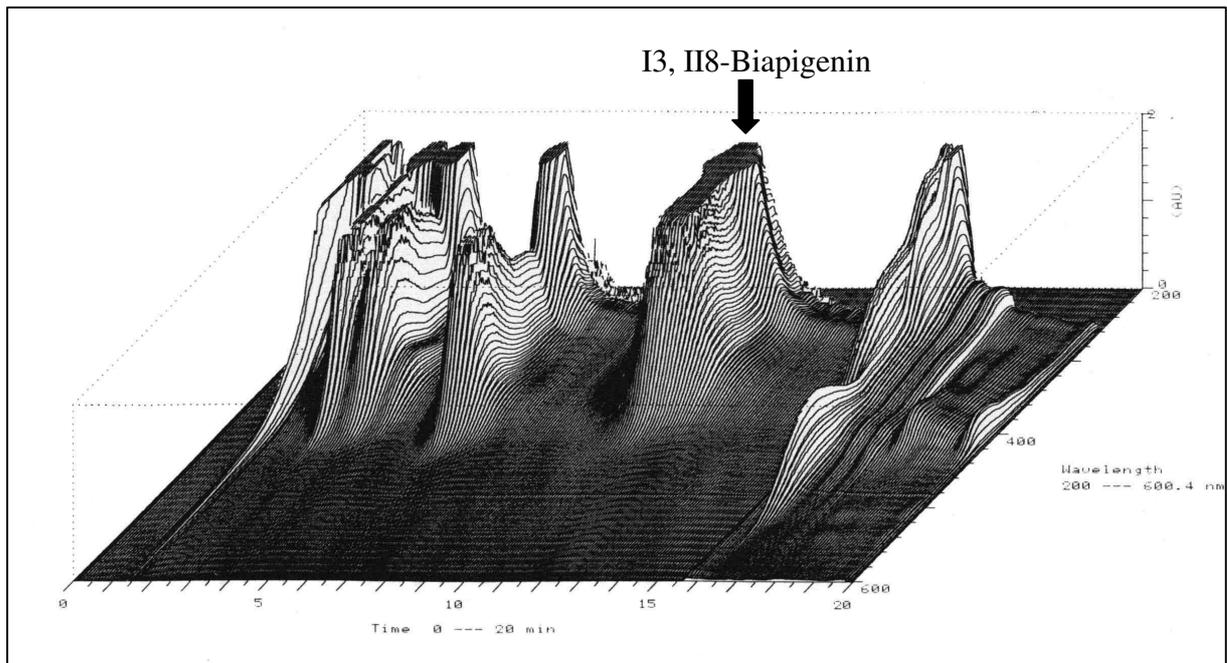
Getrocknete, blütenreiche Anteile der Droge wurden über 5 Stunden mit Dichlormethan zur Entfernung lipophiler Bestandteile wie Hyperforinen oder Chlorophyllen nach Soxhlet extrahiert und nach dem Trocknen der Extaktionshüse mit Aceton ausgezogen. Der so erhaltene Extrakt wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, in Ethylacetat aufgenommen und gegen Wasser ausgeschüttelt. Die Oberphase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, in Methanol aufgenommen und zur Entfernung der Hypericine mit Polyamid versetzt, bis die Rotfärbung verschwand. Die

Suspension wird filtriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und mit Methanol auf 20 mg/ml Extrakt eingestellt.

6.2.3 Präparative HPLC und Aufarbeitung

Da es nicht möglich war, Hypericine und andere Begleitsubstanzen quantitativ aus dem Extrakt zu entfernen, mußte hier ein Eluentengradient eingesetzt werden (vergl. 8.6.3). Chromatogramm 6-1 zeigt eine Trennung und demonstriert die gute Separation von Begleitsubstanzen.

Die vereinigten Fraktionen werden bis zur Trockne und dem vollständigen Verschwinden des Geruches von Essigsäure bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.



Chromatogramm 6-1 Trennung von Biapigenin

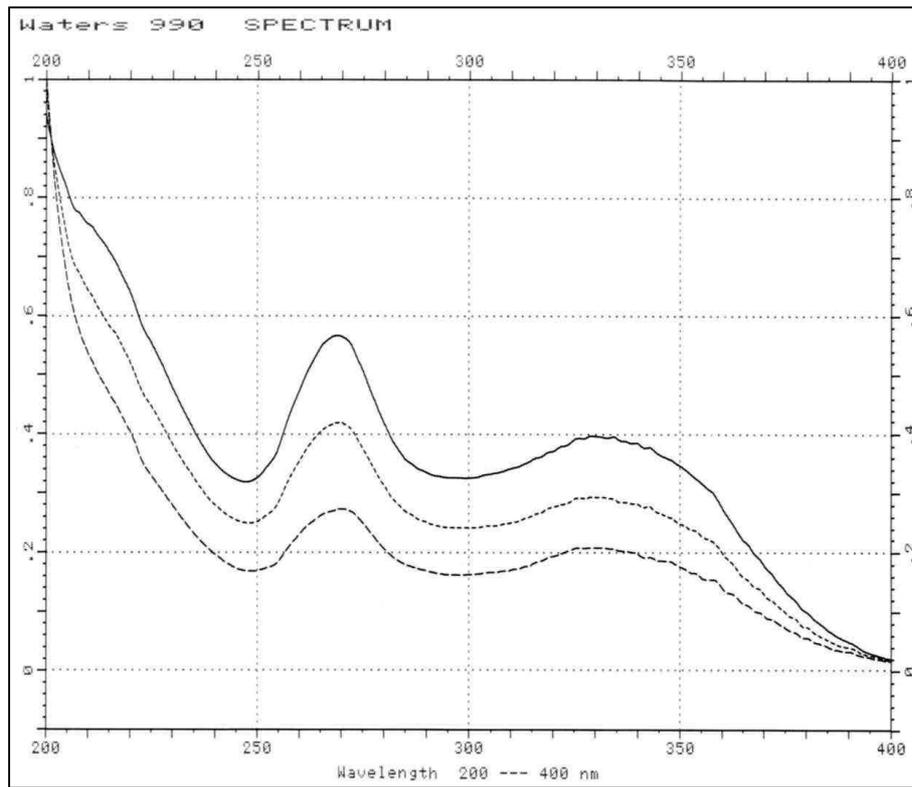
6.2.4 Identität und Reinheit

6.2.4.1 Nachweis mittels HPLC

Das so erhaltene I3, II8-Biapigenin hatte bei der Überprüfung durch HPLC mit 2 Systemen [Gradient I, OSTROWSKI, (1988)], sowie dem unter 2.4.3. vorgestellten Lauf für Flavonoide einen Anteil von über 98% bzw. 99% an der Gesamtpeakfläche.

6.2.4.2 UV-VIS-Spektrum

Das durch Diaodennarray-Detektion aufgenommene UV-VIS-Spektrum (Grafik 6-2) zeigt die zwei für Flavonoide typischen Maxima. Retentionszeit sowie Lage und Intensität der Maxima in den Wendepunkten und dem Peakmaximum zueinander entsprechen den in der Literatur gefundenen Werten [OSTROWSKI (1988)].



Grafik 6-2 UV-VIS Spektrum von Biapigenin

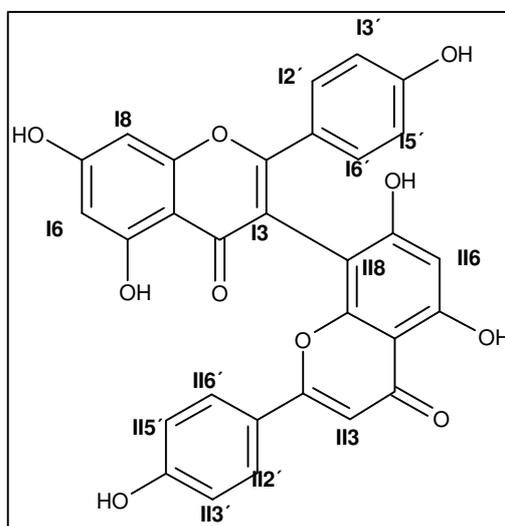
6.2.4.3 $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektrum

Das Protonenspektrum wurde in deuteriertem Methanol bei 400 MHz aufgenommen und gegen TMS geeicht. Die gefundenen Signale wurden mit Literaturwerten verglichen (Tabelle 6-2, Formel 6-2).

Proton	Signal Multiplizität	Shift (ppm) Gemessen	Shift (ppm) STOCK (1992)	Shift (ppm) BERGHÖFER ^B (1987)
HII2', HII6'	d, 2H	7,43	7,51	7,53
HI2', HI6'	d, 2H	7,23	7,37	7,31
HII3', HII5'	d, 2H	6,67	6,74	6,77
HI3', HI5'	d, 2H	6,55	6,61	6,63
HII3, HI8	s, 2H	6,42, 6,41	6,42, 6,37	6,53, 6,50
HI6, HII6	s, 2H	6,21	6,17	6,28

Tabelle 6-2 $^1\text{H-NMR}$ -Signale und Zuordnung: Biapigenin

Das MS-Spektrum mit EI bei 70 eV liefert ein Signal bei m/z 538 und entspricht dem Molekulargewicht des I3, II8-Biapigenins.



Formel 6-2 I3, II8-Biapigenin

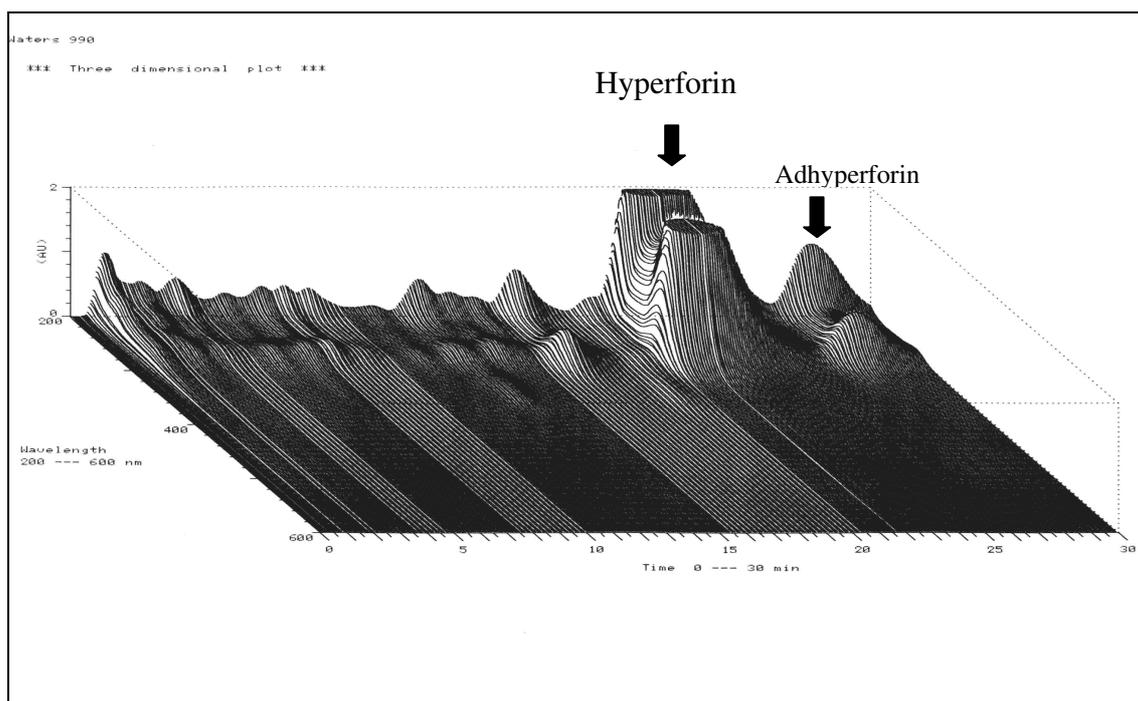
6.3 Hyperforin

6.3.1 Isolierung von Hyperforin

Ausgangsmaterial war die methanol-lösliche Fraktion eines experimentellen SFE-Extraktes der Firma NateCO₂ (Wolnzach) der Charge L-2239 (a). Dazu wurde der Extrakt mit Methanol im Ultraschallbad angelöst, filtriert und auf eine Konzentration von 40 mg/ml Extraktgehalt eingestellt.

Es wurden jeweils 20 mg des Extraktes, gelöst in Methanol, auf die Säule gegeben. Die dem Hyperforin entsprechenden Fraktionen wurden nach Zugabe des gleichen Volumens an Wasser so lange am Rotationsverdampfer eingengt, bis sämtliche organischen Lösungsmittel entfernt waren. Das Hyperforin setzte sich dann im Rundkolben als wachsartige, farblose Substanz ab. Der Niederschlag wurde so lange (mit zwischenzeitlichem Anlösen der Substanz in Methanol) gewaschen, bis das Waschwasser eine neutrale pH- Reaktion ergab. Chromatogramm 6-2 veranschaulicht die präparative Trennung von Hyperforin.

Die Zuordnung des mit Adhyperforin bezeichneten Peaks erfolgte durch Vergleich des UV-VIS-Spektrums und Lage des Peaks mit einer vorangehenden Arbeit [MEISENHEIMER (1991)]. Sie ist also als höchst wahrscheinlich anzunehmen, aber nicht durch eigens isolierte Referenzsubstanz abgesichert.



Chromatogramm 6-2 Trennung von Hyperforin

6.3.2 Identität und Reinheit

6.3.2.1 Nachweis mittels HPLC

Der Nachweis des Hyperforins erfolgte durch zwei unterschiedliche HPLC-Systeme [OSTROWSKI (1998), GAEDCKE (1997)]. Dabei wurden Anteile von 97,7% und 98,8% der Gesamtfläche als Hyperforin detektiert.

6.3.2.2 UV-VIS-Spektrum

Aufgrund der Struktur des Hyperforins sind die Absorptionsmaxima pH-abhängig. Durch Ausbildung einer Keto-Enol-Tautomerie kommt es zu Verschiebungen der Maxima [BERGHÖFER^B (1987)]. Dieser Umstand und die Tatsache, daß zumindest native Extrakte eine Vielzahl von Hyperforinen mit einem jeweils ähnlichen Spektrum enthalten, lassen ein UV-VIS-Spektrum wenig aussagekräftig erscheinen.

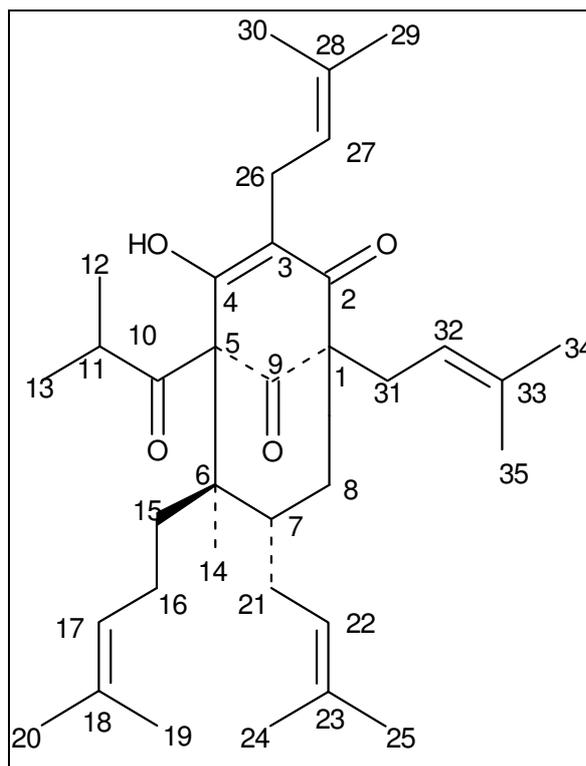
6.3.2.3 ¹H-MNR- und Massenspektrum

Das Protonenresonanzspektrum wurde in deuteriertem Methanol bei 500 MHz aufgenommen und gegen TMS geeicht. Aus der Literatur entnommene Meßwerte werden, soweit genannt, in Klammern gesetzt. Hyperforin ist durch vier ABX-Systeme charakterisiert, wobei die vier olefinischen Protonen H17, H22, H27 sowie H32 zwischen 4,95 ppm und 5,09 ppm zur Resonanz kommen. Die entsprechenden AB-Teile der Protonen an C16, C21, C31 und C36 sind bei 3,10 ppm (2H,m), 2,45 ppm (2H, m) 2,10 ppm, (2H, m) sowie 1,95 ppm (2H, m) zu finden.

Die Protonen der acht olefinischen Methylgruppen an den Kohlenstoffatomen C18, C23, C27 und C33 kommen zwischen 1,57 ppm und 1,70 ppm zur Resonanz.

Die Protonen der beiden aliphatischen Methylgruppen an C11 liefern je ein Signal (3H, d) bei 1,03 ppm sowie 1,08 ppm.[1,04 ppm, 1,14 ppm MEISENBACHER (1991)].

Bei 0,97 ppm kommen die Protonen der Methylgruppe an C6 als Singulett (3H, s) zur Resonanz [0,97 ppm ERDELMAIER (1998), 1,00 ppm (MEISENBACHER (1991)].



Formel 6-3 Struktur von Hyperforin

Das MS-Spektrum mit EI bei 70 eV liefert ein Signal bei m/z 536 und entspricht dem Molekulargewicht des Hyperforins.

6.3.3 Stabilitätsuntersuchungen von Hyperforin und Hypericum-Extrakten

In Hinsicht auf die quantitative Bestimmung, aber auch auf eine effektive präparative Aufarbeitung ist die Kenntnis des Stabilitätsverhaltens von Hyperforin von Bedeutung. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Proben angelegt, um zunächst die Stabilität von Hyperforin-Reinsubstanz in je zwei hydrophilen (Acetonitril, Methanol) sowie zwei lipophilen (Chloroform, Cyclohexan) Lösungsmitteln zu testen. Die Analysen der Stabilitätsmuster in hydrophilen Lösungsmitteln wurden mit einer Umkehrphase (vergl. 8.4.5) chromatographiert. Zur Durchführung der Analysen im lipophilen Bereich wurde eine Normalphase (vergl. 8.4.5) eingesetzt. Die erhaltenen Kurven zeigen eine stark unterschiedlich ausgeprägte Stabilität. Während die Proben, die mit Acetonitril, Methanol sowie Chloroform angesetzt wurden, über den Zeitraum von acht Stunden eine gute Stabilität des Hyperforins zeigten, waren im Falle des Cyclohexans bereits nach etwa drei Stunden 50% des Hyperforins abgebaut (Diagramm 6-1).

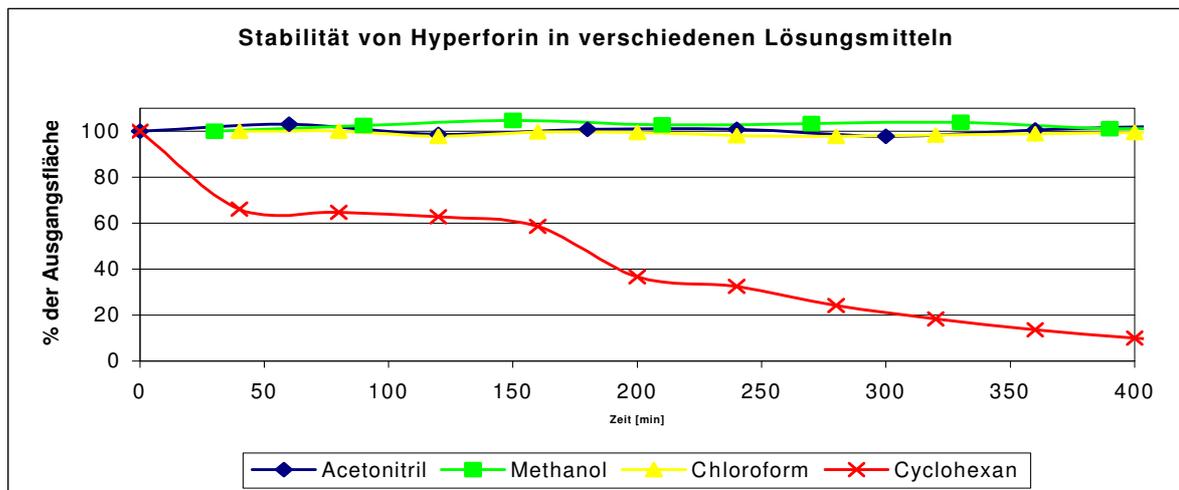


Diagramm 6-1 Stabilität von Hyperforin in Lösung

In einem zweiten Ansatz wurden das Verhalten von Hyperforin sowie einem Extrakt von Johanniskraut jeweils mit und ohne Zusatz von Vitamin E in Cyclohexan, dem Lösungsmittel, in dem ein rascher Abbau des Hyperforins erfolgte, untersucht. Durch den Zusatz von Vitamin E sollte ein oxidativer Abbau, wie er für Hyperforin laut TRIFUNOVIC et al. (1998) nachgewiesen ist, verhindert werden.

Mit der Untersuchung des Extraktes sollte die Beobachtung von BERGHÖFER^B (1987) nachvollzogen werden, daß nicht weiter bekannte Bestandteile im Extrakt die Stabilität von Hyperforin positiv beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Diagramm 6-2 dargestellt. Es fällt auf, daß die Zugabe von Vitamin E die Stabilität von Hyperforin sowohl im Extrakt als auch als Reinsubstanz herabsetzt. Vitamin E ist ungeeignet, den oxidativen Abbau von Hyperforin in lipophiler Umgebung zu verhindern.

Der Extrakt ohne Zusatz von Vitamin E war mit fortschreitender Dauer des Versuchs nur geringfügig stabiler als die Reinsubstanz und der Extrakt mit Vitamin E-Zusatz.

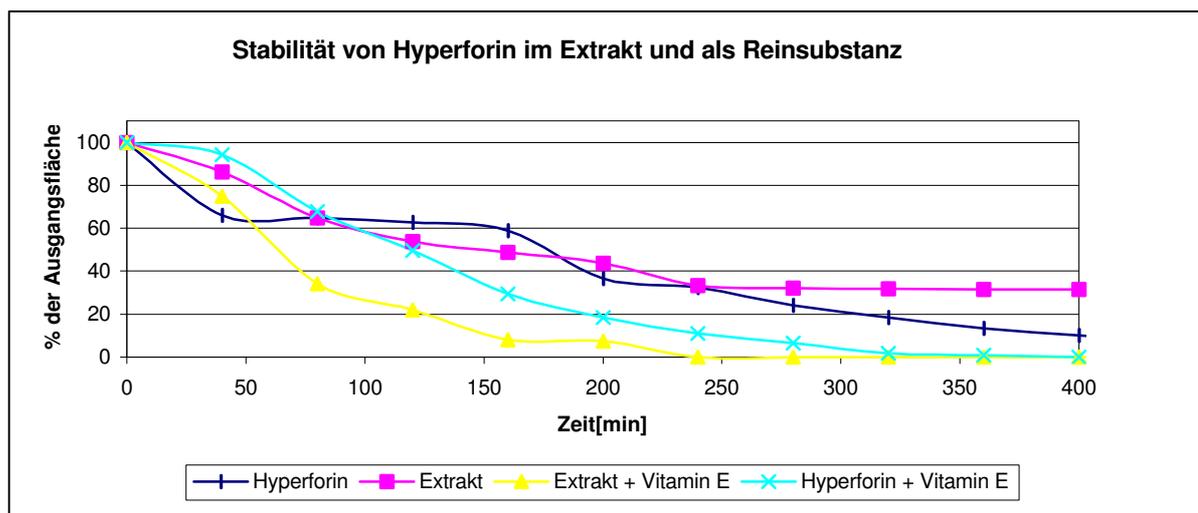


Diagramm 6-2 Stabilität von Hyperforin im Extrakt und als Reinsubstanz

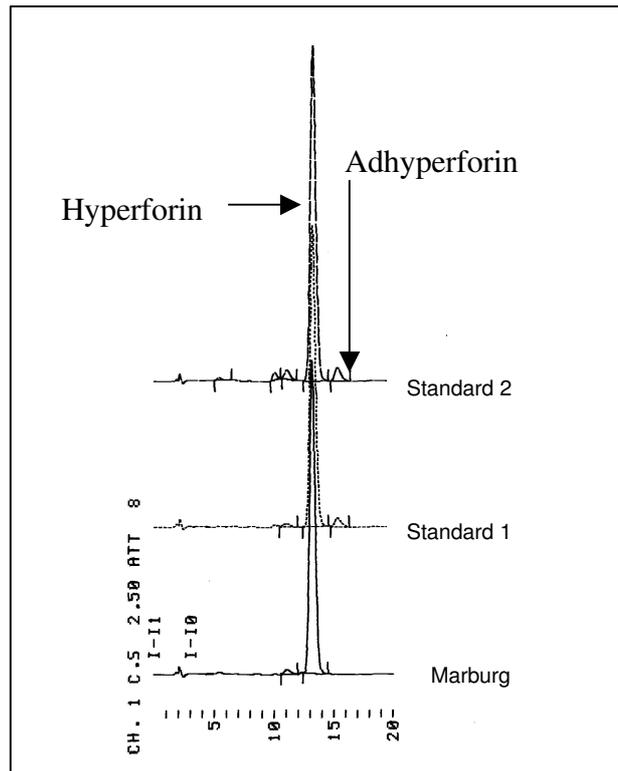
6.3.4 Vergleich des isolierten Hyperforins mit zugekauften Referenzsubstanzen

6.3.4.1 HPLC-Untersuchungen

Das unter 6.3.1 isolierte Hyperforin war völlig farb- und fast geruchlos und von fester, wachsartiger Beschaffenheit. Ein nach BERGHÖFER^B (1987) isoliertes Hyperforin, aber auch kommerzielle Referenzsubstanzen wiesen eine leichte gelb-grünliche Färbung, einen charakteristischen Eigengeruch auf und waren von öligter Konsistenz.

Zunächst wurde eine HPLC-Untersuchung der selbst isolierten (im folgenden Marburg genannt) sowie zweier kommerzieller Referenzsubstanzen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Messungen veranschaulicht Chromatogramm 6-3. Beide zugekauften Referenzsubstanzen wiesen neben Hyperforin auch Adhyperforin und andere, weniger lipophile Stoffe als Hyperforin als Verunreinigungen auf. Die entsprechenden Resultate der HPLC-Bestimmung sind in Tabelle 6-3 zusammengefaßt.

Vergleicht man die gefundenen Werte in bezug auf Area zu injizierter Menge, so fällt deren gute Übereinstimmung auf.



Chromatogramm 6-3 Hyperforin-Reinsubstanzen bei 274 nm

Probe	Marburg	Standard 1	Standard 2
Fläche [$\mu\text{V} / \text{s}$]	3483983	3399015	3783892
Fläche berechnet auf 1 μg [$\mu\text{V} / \text{s}$]	1171087	1213934	1182466
Injizierte Menge [μg]	2,975	2,8	3,2
Deklariertes Gehalt (%)	-----	96,4	93
Anteil an Gesamtpeakfläche in (%)	98,6	96,0	91,3

Tabelle 6-3 HPLC-Bestimmung von Hyperforin-Standards

6.3.4.2 Ermittlung des spezifischen Absorptionskoeffizienten von Hyperforin

Eine wichtige Größe zur Charakterisierung einer Standardsubstanz stellt der spezifische Absorptionskoeffizient dar. Mit Hilfe dieser Konstante können auch mit einer einfachen spektralphotometrischen Messung qualitative Aussagen getroffen werden. Das Photometer wurde gemäß Ph. Eur. 1997 kalibriert. Es wurde eine Verdünnungsreihe, bestehend aus mindestens sechs unterschiedlichen Konzentrationen, dreimal gegen Methanol bei 274 nm vermessen.

Bei der Substanz Marburg wurde ein Wert von 149 gefunden, der auch durch eine zweite, unabhängig von der ersten isolierten Charge bestätigt werden konnte.

Wie aus Tab. 3-4 ersichtlich, weichen die Werte von Standard 1 und Standard 2 erheblich von diesem Wert ab. Da diese Werte größer als 149 sind, liegt es nahe, daß die enthaltenen Begleitstoffe ein bei 274 nm stärkeres Absorptionsvermögen als das Hyperforin haben, die jedoch bei der HPLC-Analyse nicht erfaßt wurden. Über die Gründe hierfür können lediglich Mutmaßungen angestellt werden. Möglich wären ausgesprochen lipophile Substanzen, die auf der Säule verbleiben.

So ist ein Rückschluß auf Verunreinigungen, die in der HPLC unauffällig (vergl. Chromatogramm 6-3) erscheinen, über den spezifischen Absorptionskoeffizienten erlaubt.

Substanz	Konzentration [µg/ml]	Meß-Punkte	Spezifische Absorption	Mittelwerte	Regressionskoeffizient
Marburg	49,1 – 2,2	18	148,4 ; 150,1 ; 149,8	149,4	0,9980
Marburg 2	57,7 – 11,6	6	148,8 ; 149,5 ; 148,7	149,0	0,9998
Standard 1	56 – 11,2	6	181,1 ; 180,3 ; 180,0	180,5	0,9996
Standard 2	32 – 11,5	6	195,4 ; 195,3 ; 194,6	195,1	0,9970

Tabelle 6-4 Ermittlung der spezifischen Absorption von Hyperforin

6.3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Hyperforin ist unter bestimmten Bedingungen eine höchst labile Substanz. Für die HPLC bietet sich, aufgrund der schlechten Stabilität der Reinsubstanz und auch des Extraktes in Cyclohexan und der guten Stabilität in Methanol die Analytik mit RP-Phasen an. Eine Stabilisierung der Substanz mit einem lipophilen Antioxidans war nicht erfolgreich.

Die Isolierung durch präparative HPLC wurden neu entwickelt und sind, vor allem in Hinsicht der Aufarbeitung des Eluates im Vergleich zu einer anderen Arbeit, stark vereinfacht worden [ORTH^B et al. (1999)].

Die untersuchten Referenzsubstanzen waren unterschiedlicher Qualität. Bei der HPLC-Untersuchung erwies sich die selbst isolierten Chargen als diejenigen mit der höchsten Reinheit.

Durch die Spektralphotometrie kann unter minimalem Zeit- und Substanzeinsatz über die Berechnung der spezifischen Absorption die Reinheit von Hyperforin geprüft werden. Die unterschiedlichen zugekauften Chargen hatten eine große Abweichung in Bezug auf die ermittelte spezifische Absorption voneinander, während beide selbst isolierten Chargen gleiche Werte lieferten.

6.4 Protohypericine

6.4.1 Gewinnung einer Fraktion mit Protohypericinen

Tiefgefrorene, blütenreiche Frischdroge wurde vermahlen und 5 Stunden mit Dichlormethan nach Soxhlet extrahiert. Die Droge wurde getrocknet und einer weiteren Extraktion mit Methanol über 8 Stunden unterworfen. Der Extrakt wird mit 3g Polyamid versetzt und einige Stunden stehen gelassen. Die Hypericine werden mit ammoniakalischem Methanol (0,5%) eluiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die so hypericinangereicherte Fraktion (Rohextrakt) wird wieder in Methanol gelöst, auf eine Polyamidsäule gegeben und mit Methanol gewaschen. Danach wurde mit ammoniakalischem Methanol (0,5%) unter Kontrolle der Fraktionen eluiert. Die Protoverbindungen erscheinen als dunkelviolettfarbene Bande unter den Hypericinen. Alle Schritte fanden unter Ausschluß von direktem Tageslicht statt.

Anzumerken ist, daß der Anteil an Protoverbindungen im Rohextrakt an den Gesamtypericinen etwa 40% betrug.

6.4.2 Identität und Reinheit

Die Identität der Protohypericine wurde indirekt über die Aufnahme der UV-VIS-Spektren vor und nach der Umsetzung in Hypericin und Protoseudohypericin bestätigt. Lage und Form der Maxima entsprechen den Literaturwerten [GAEDCKE (1997)]. Durch die Berechnung der Zunahme der Konzentrationen von Hypericin und Pseudohypericin nach der Belichtung durch Tageslicht über eine Dauer von 90 min wurden 93,66% Protoanteil für Pseudohypericin und 90,69% Protoanteil für Hypericin gefunden. In 5% igem ammoniakalischen Methanol zeigen ausschließlich die Protohypericine eine intensive grüne Färbung. Das Protoseudohypericin ist, im Gegensatz zum Pseudohypericin, in wässrig-ammoniakalischer Umgebung stabil.

6.4.3 Umsetzung der Protohypericine unter Lichteinwirkung

Die Umsetzung der Protohypericine erfolgte durch Belichtung mit einer handelsüblichen Lampe, bestückt mit einer handelsüblichen 60 Watt-Glühbirne im Abstand von 50 cm und einem Winkel von 45° (Lichtstärke 500 Lux) durch ein Weißglasvial. Das Fließmittel, das zur Analytik der Hypericine verwendet wurde, wurde leicht modifiziert, um eine adäquate Trennung und Integrierbarkeit von Pseudohypericin und dessen Protostufe zu gewährleisten. Für die Reihenanalytik der Hypericine war dieses Fließmittel (vergl. 8.6.4) aufgrund der längeren Analysendauer wenig geeignet, dort wurde durch eine ausreichend lange Belichtungsdauer die Abwesenheit der Protohypericine sichergestellt.

Diagramm 6-3 zeigt den Verlauf der Umsetzung

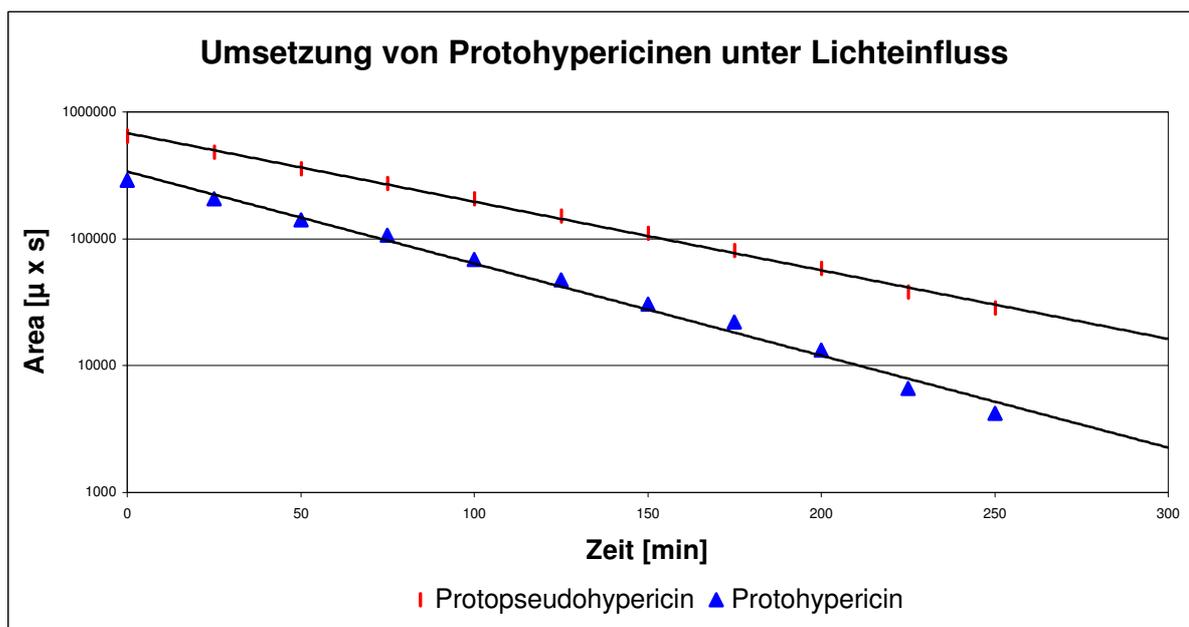


Diagramm 6-3 Umsetzung der Protohypericine

Die Skalierung der Y-Achse wurde hier logarithmisch vorgenommen. Man erhält zwei Geraden, die eine unterschiedliche Steigung zeigen. Daraus läßt sich ableiten, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten für beide Protohypericine nicht identisch sind, und daß jeweils Reaktionen erster Ordnung vorliegen, die dafür sprechen, daß neben Hypericin und Pseudohypericin jeweils keine weiteren Hypericinderivate entstehen.

Während beim Protohypericin bereits nach 50 min 50% des Ausgangswertes erreicht sind, ist dies beim Protoseudohypericin nach etwa 60 min der Fall. Die im Protoseudohypericin zusätzlich vorkommende Hydroxylgruppe besitzt offensichtlich einen stabilisierenden Effekt auf die Protoverbindung.

7 Validierung der HPLC-Methoden

7.1 Einleitung

Um eine adäquate Durchführung der quantitativen Bestimmungen zu gewährleisten, ist eine Validierung der verwendeten Methoden unerlässlich. Als Grundlage für die Methodik der Validierung boten sich die Leitlinien ANALYTICAL VALIDATION und VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES. DEFINITION AND TERMINOLOGY (2000) der ICH an.

Art und Umfang der Validierungsschritte sind jeweils abhängig vom analytischen Problem. So konnte im Umfang dieser Arbeit, soweit es sich als sinnvoll erwies, auf einige Schritte verzichtet werden. Die linearen Bereiche wurden zum Beispiel so weit überprüft, daß sich alle Meßwerte innerhalb dieser Bereiche befanden. Die Überprüfung der Nachweisgrenzen ist nur dann erforderlich, wenn in speziellen Fällen Inhaltsstoffe nicht nachgewiesen werden oder es sich um Grenzprüfungen handelt. Bei der Durchführung der Validierung wurde ein jeweils frisch bereiteter Extrakt verwendet.

Die selbst isolierten Standardsubstanzen wurden auf Identität und Reinheit mittels zweier HPLC-Systeme überprüft, bei den gekauften Standards wurde die Reinheit lediglich auf einem HPLC-System überprüft.

Die Identität ergab sich aus der Lage der Peaks von Einzelstandards im Vergleich zu einem Chromatogramm, das aus der Analyse eines Gesamtextraktes erhalten wurde.

Die Berechnung der Flavonoide erfolgte als kristallwasserfrei. Dies wurde bei der rechnerischen Korrektur der Einwaagen ebenso berücksichtigt wie eventuelle Verunreinigungen, die nach der 100%-Methode berechnet wurden.

Alle HPLC-Bestimmungen (Hyperforin, Hypericin, Flavonoide) der Validierung wurden hintereinander anhand eines Extraktes bearbeitet, unter den Bedingungen, die auch bei den Gehaltsbestimmungen vorlagen.

7.2 Linearität

Die Überprüfung auf Linearität gibt Aufschluß darüber, in welchem Konzentrationsbereich der geprüften Substanz die Menge an Substanz mit der Größe des Meßsignals korreliert ist.

7.2.1 Hyperforin

Die Linearität der Bestimmung wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,032 mg bis 0,32 mg Hyperforin pro ml Standardlösung bestimmt. Die jeweiligen Konzentrationsintervalle sind in Tabelle 7-1 wiedergegeben.

Das eingesetzte Hyperforin wurde zuvor mit präparativer HPLC isoliert. Es wies eine Reinheit von 98,33% auf (6.3.2.1).

Zur Erstellung der Standardgeraden wurden 5 Eichlösungen sowie die Stammlösung jeweils 2 mal mit 10 µl injiziert (Tabelle 7-1). Es wurde eine Eichgerade (Diagramm 7-1) erstellt.

Analyse	Einwaage Hyperforin in mg/ml (X)	Mittelwert Area [µV s] Hyperforin (Y)
1	0,032	372157
2	0,064	726566
3	0,107	1201531
4	0,16	1724774
5	0,213	2381207
6	0,32	3461015

Tabelle 7-1 Linearität Hyperforin

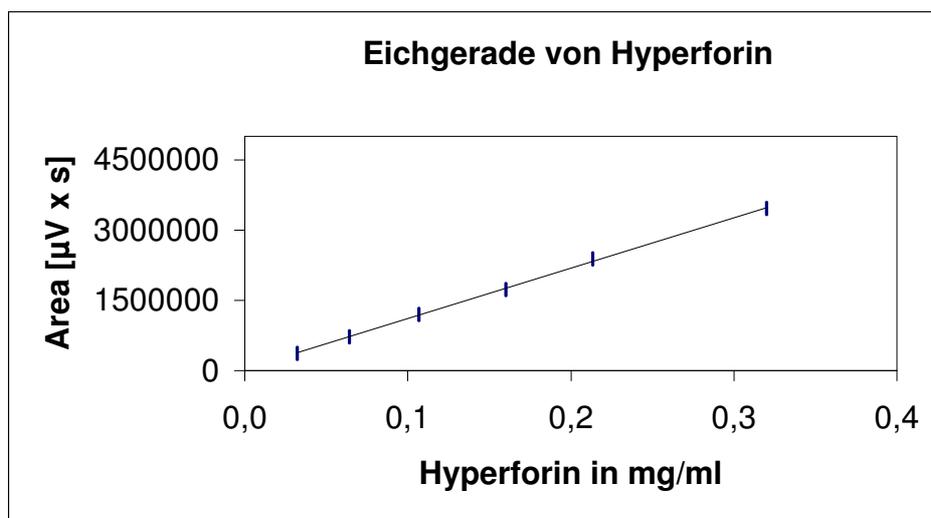


Diagramm 7-1 Eichgerade von Hyperforin

Es ergab sich eine lineare Regression mit einer hohen Korrelation:

Geradengleichung: $f(x) = 1E+07x + 38343$

Korrelationskoeffizient: $r = 0,99964$

7.2.2 Hypericin und Pseudohypericin

Zur Linearitätsbestimmung wurde Hypericin eingesetzt, welches zuvor mittels präparativer HPLC isoliert wurde (6.1.1). Der Standard besitzt einen Gehalt von 96,55%.

Pseudohypericin wurde als Hypericin berechnet.

Stammlösung: 4,00 mg Hyperforin, genau gewogen, wurden mit Methanol, dem zur Verbesserung der Löslichkeit 1% Pyrimidin zugegeben wurde, zu 100,00 ml verdünnt. Die Eichlösungen werden durch Verdünnen der Stammlösung erhalten.

Zur Erstellung der Standardgeraden wurden die 5 Eichlösungen sowie die Stammlösung jeweils 2 mal mit 10 μ l injiziert (Tabelle 7-2). Es wurde eine Eichgerade (Diagramm 7-2) erstellt.

Analyse	Einwaage Hypericin in mg/ml	Area [μ V s] Hypericin (MW)
1	0,0041	148986
2	0,0082	309880
3	0,01367	518761
4	0,0205	780792
5	0,0273	1086350
6	0,041	1565022

Tabelle 7-2 Linearität Hypericin

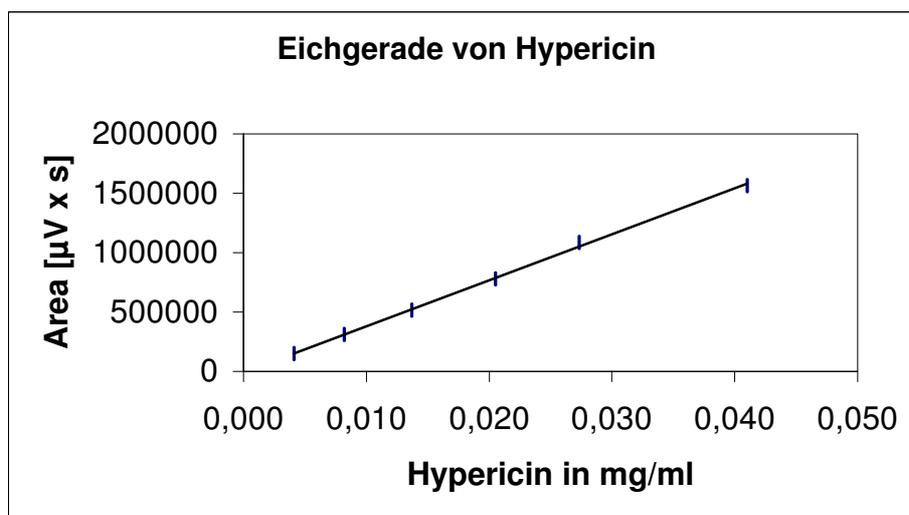


Diagramm 7-2 Eichgerade von Hypericin

Es ergab sich eine lineare Regression mit einem Korrelationsfaktor, der auf eine hohe lineare Abhängigkeit schließen läßt:

Geradengleichung: $f(x) = y = 4E+07x - 6039,8$

Korrelationskoeffizient: $r = 0,99939$

7.2.3 Flavonoide

Die Linearität der Bestimmung wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,08 mg bis 0,15 mg/ml je Flavonoid in der Eichlösung (Mischstandard) ermittelt.

Je 15,00 mg des Flavonoids, genau gewogen, wurden nacheinander in einen 100 ml Meßkolben gebracht und dieser mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt (Stammlösung).

Zur Erstellung der Standardgeraden wurden 5 Eichlösungen, die durch Verdünnung der Stammlösung erhalten wurden, sowie die Stammlösung jeweils 2 mal mit 10 µl injiziert (Tabelle 7-3). Aus den erhaltenen Flächen wurde der Mittelwert gebildet. Es wurden Eichgeraden (Diagramm 7-3) erstellt.

Folgende Werte wurden erhalten:

Eichlösung Nr.	1	2	3	4	5	6
Rutin [mg]	0,0089	0,0149	0,0447	0,0746	0,0893	0,1491
Area Rutin [iV s]	222913	342603	1106612	1749517	2199996	3406764
Hyperosid [mg]	0,0097	0,0145	0,0484	0,0726	0,0968	0,1451
Area Hyperosid [iV s]	307413	453354	1523050	2303806	2987632	4559590
Isoquercitrin [mg]	0,0101	0,0152	0,0506	0,0759	0,1013	0,1519
Area Isoquercitrin [iV s]	350000	522646	1812547	2617208	3497472	5301317
Quercitrin [mg]	0,0084	0,0137	0,0421	0,06824	0,0842	0,1365
Area Quercitrin [iV s]	315319	462505	1612414	2517578	3093418	5003955
Quercetin[mg]	0,00853	0,01432	0,04266	0,07161	0,08532	0,14322
Area Quercetin[iV s]	440227	698980	2154886	3500266, 5	4306640	6999092
Biapigenin[mg]	0,0099	0,0149	0,0496	0,0745	0,0993	0,1489
Area Biapigenin[iV s]	365172	498716	1812459	2698834	3445204	5206816

Tabelle 7-3 Linearität Flavonoide

Es ergeben sich folgende Werte für den Regressionskoeffizienten r und die Geradengleichungen (Tabelle 7-4):

Substanz	Geradengleichung f(x)	Korrelationskoeffizient r
Rutin	$y = 2E+07x + 19143$	0,9995
Hyperosid	$y = 3E+07x + 3690,5$	0,9999
Isoquercitrin	$y = 3E+07x + 1891,7$	0,9999
Quercitrin	$y = 4E+07x + 7019,7$	0,9998
Quercetin	$y = 5E+07x + 34128$	0,9997
Biapigenin]	$y = 4E+07x + 7019,7$	0,9996

Tabelle 7-4 Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten Flavonoide

Die ermittelten Korrelationen weisen auf eine hohe lineare Abhängigkeit zwischen injizierter Menge und Meßsignal hin.

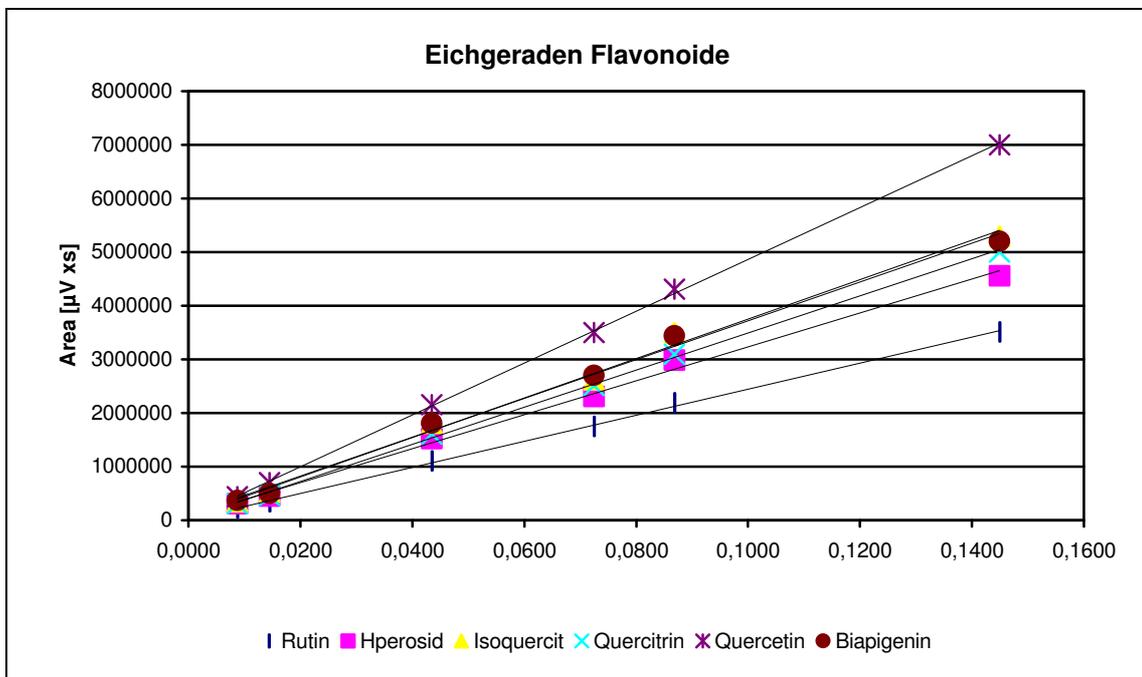


Diagramm 7-3 Eichgeraden der Flavonoide

7.3 Präzision

Durch die Findung der Präzision wird nachgewiesen, daß die jeweiligen Meßwerte unter den spezifischen Bedingungen der Analyse reproduzierbar sind.

7.3.1 Hyperforin

Bei der Ermittlung der Präzision wurden sechs Proben aufgearbeitet und analysiert (Tabelle 7-5). Berechnet wurden die Standardabweichung, der Variationskoeffizient und der Vertrauensbereich des Mittelwertes ($p = 95\%$).

Laufende Nr.	Johanniskraut [mg/ml]	Gehalt an Hyperforin in %
1	10	2,62
2	10	2,646
3	10	2,61
4	10	2,641
5	10	2,691
6	10	2,69

Tabelle 7-5 Bestimmung der Präzision der Methode von Hyperforin

Mittelwert: 2,65%
Standardabweichung: S: 0,031%
Variationskoeff.: S_{rel}: 1,18%

Der Vertrauensbereich des Mittelwertes befindet sich mit 95% Wahrscheinlichkeit ($p = 95\%$) bei angenommener t-Verteilung in einem Intervall von 2,61% bis 2,68%. Die Methode zur Bestimmung von Hyperforin aus Johanniskraut erwies sich als präzise.

7.3.2 Hypericin und Pseudohypericin

Bei der Ermittlung der Präzision wurden sechs Proben aufgearbeitet und analysiert (Tabelle 7-6). Berechnet wurden die Standardabweichung, der Variationskoeffizient und der Vertrauensbereich des Mittelwertes ($p = 95\%$)

Laufende Nr.	Extrakt [mg/ml]	Gehalt an Hypericin in %	Gehalt an Pseudohypericin in %
1	10	0,205	0,078
2	10	0,202	0,082
3	10	0,200	0,079
4	10	0,193	0,080
5	10	0,203	0,079
6	10	0,200	0,078

Tabelle 7-6 Bestimmung der Präzision der Methode von Hypericin

Hypericin:

Mittelwert: 0,201%

Standardabweichung: S: 0,0027%

Variationskoeff.: S_{rel} : 1,32%

Der Vertrauensbereich des Mittelwertes befindet sich mit 95% Wahrscheinlichkeit ($p = 95\%$) bei angenommener t-Verteilung: in einem Intervall von 0,198% bis 0,204%.

Pseudohypericin, berechnet als Hypericin:

Mittelwert: 0,079%

Standardabweichung: S: 0,0013%

Variationskoeff.: S_{rel} : 1,69

Der Vertrauensbereich des Mittelwertes befindet sich mit 95% Wahrscheinlichkeit ($p = 95\%$) bei angenommener t-Verteilung in einem Intervall von 0,078% bis 0,081%. Die Methode zur Bestimmung von Hypericin und Pseudohypericin aus Johanniskraut erwies sich als präzise.

7.3.3 Flavonoide

Bei der Ermittlung der Präzision wurden sechs Proben aufgearbeitet und analysiert (Tabelle 7-7). Die Drogenkonzentration beträgt 10 mg/ml.

Ergebnisse der Bestimmung:

Nr.	1	2	3	4	5	6
Substanz	Substanzgehalt [%]					
Rutin	0,446	0,478	0,461	0,448	0,459	0,447
Hyperosid	0,966	0,971	0,973	0,964	0,967	0,966
Isoquercitrin	0,461	0,467	0,482	0,482	0,489	0,483
Quercitrin	0,714	0,704	0,702	0,704	0,712	0,702
Quercetin	0,109	0,107	0,107	0,112	0,111	0,108
Biapigenin	0,318	0,310	0,320	0,320	0,318	0,305

Tabelle 7-7 Bestimmung der Präzision der Methode von Flavonoiden

Berechnet wurden die Standardabweichung, der Variationskoeffizient und der Vertrauensbereich des Mittelwertes ($p = 95\%$) bei angenommener t-Verteilung (Tabelle 7-8). Die Methode zur Bestimmung von Flavonoiden aus Johanniskraut erwies sich als präzise.

Substanz	Mittelwert [%],	Standardabweichung [%]	Rel. Standardabweichung %	Vertr.-bereich MW für $p = 95$ [%]
Rutin	0,456	0,0113	2,47	0,445-0,468
Hyperosid	0,968	0,0031	0,32	0,965-0,971
Isoquercitrin	0,477	0,0098	2,06	0,467-0,488
Quercitrin	0,706	0,005	0,71	0,701-0,711
Quercetin	0,109	0,0017	1,57	0,107-0,111
Biapigenin	0,315	0,0057	1,81	0,309-0,321

Tabelle 7-8 Berechnung der Präzision der Methode von Flavonoiden

7.4 Richtigkeit

Der Nachweis der Richtigkeit wird durch die Ermittlung einer Wiederfindungsrate (WF) erbracht.

7.4.1 Hyperforin

6 Ansätze der Probe mit bekanntem Gehalt wurden mit einer definierten Menge an Trockenextrakt mit ebenfalls bekanntem Gehalt versetzt, extrahiert und analysiert. Tabelle 7-9 stellt die Ergebnisse dar:

Analyse	Zugabe von Trockenextrakt als Hyperforin in mg zu 1000 mg Johanniskraut	% Gesamt-Hyperforin berechnet	% Gesamt-Hyperforin gefunden	WF in%
1	14,39	4,14	4,11	100,76
2	7,65	3,45	3,44	100,38
3	5,81	3,23	3,25	99,39
4	16,67	4,41	4,36	101,10
5	12,53	3,96	3,95	100,39
6	7,83	3,46	3,48	99,48

Tabelle 7-9 Wiederfindungsrate von Hyperforin in Johanniskraut

Mittelwert: 100,40%

Standardabweichung: S: 0,573%

Variationskoeff.: S_{rel} : 0,570%

Der Vertrauensbereich des Mittelwertes liegt mit 95% Wahrscheinlichkeit bei angenommener t-Verteilung in einem Intervall von 99,80% bis 99,73%. Der Nachweis der Richtigkeit ist damit erbracht.

7.4.2 Hypericin und Pseudohypericin

6 Ansätze der Probe mit bekanntem Gehalt wurden mit einer definierten Menge an Trockenextrakt mit ebenfalls bekanntem Gehalt versetzt, extrahiert und analysiert. Tabelle 4-10 stellt die Ergebnisse dar:

Analyse	Zugabe von Trockenextrakt als Gesamthypericin in mg zu 1000 mg Johanniskraut	% Gesamt-Hypericin berechnet	% Gesamt-Hypericin gefunden	WF in %
1	0,780	0,330	0,330	99,96
2	0,430	0,308	0,314	101,66
3	0,326	0,314	0,313	99,71
4	0,859	0,347	0,351	101,22
5	0,703	0,337	0,341	101,31
6	0,411	0,319	0,318	99,99

Tabelle 7-10 Wiederfindungsrate von Hypericin in Johanniskraut

Mittelwert: 100,77%

Standardabweichung: S: 0,784%

Variationskoeff.: S_{rel} : 0,778%

Der Vertrauensbereich des Mittelwertes liegt mit 95% Wahrscheinlichkeit bei angenommener t-Verteilung in einem Intervall von 99,95% bis 101,59%. Der Nachweis der Richtigkeit ist damit erbracht.

7.4.3 Flavonoide

6 Ansätze der Probe mit bekanntem Gehalt wurden mit einer definierten Menge an Trockenextrakt mit ebenfalls bekanntem Gehalt versetzt, extrahiert und analysiert. Tabelle 7-11 stellt die Ergebnisse dar:

Probe	1	2	3	4	5	6
Rutin zugesetzt [mg]	2,42	3,05	3,16	5,21	5,94	6,36
Rutingehalt berechnet	0,643	0,719	0,743	0,936	0,996	1,106
Rutingehalt gefunden	0,654	0,731	0,761	0,927	0,987	1,115
Wiederfindung	101,65	101,67	102,53	99,02	99,05	100,80
Hyperosid zugesetzt [mg]	6,840	3,636	2,760	7,272	5,952	3,480
Hyperosidgehalt berechnet	1,104	1,194	1,231	1,458	1,520	1,659
Hyperosidgehalt gefunden	1,095	1,201	1,234	1,461	1,580	1,645
Wiederfindung	99,181	100,600	100,234	100,155	103,925	99,157
Isoquercitrin zugesetzt [mg]	1,84	2,32	2,48	3,968	4,56	4,848
Isoquercitrin-gehalt berechnet	0,858	0,916	0,961	1,108	1,126	1,237
Isoquercitrin-gehalt gefunden	0,868	0,921	0,958	1,089	1,120	1,245
Wiederfindung	101,08	100,59	99,67	98,31	99,39	100,62
Quercitrin zugesetzt [mg]	0,345	0,435	0,465	0,744	0,855	0,909
Quercitrin-gehalt berechnet	0,714	0,725	0,764	0,767	0,792	0,815
Quercitrin-gehalt gefunden	0,764	0,737	0,737	0,762	0,804	0,817
Wiederfindung	103,24	101,57	100,01	99,43	101,51	100,28
Quercetin zugesetzt [mg]	0,642	0,809	0,865	1,384	1,591	1,691
Quercetinge-gehalt berechnet	0,177	0,195	0,197	0,247	0,272	0,292
Quercetinge-gehalt gefunden	0,180	0,199	0,201	0,241	0,271	0,294
Wiederfindung	101,74	102,96	101,04	97,84	99,60	100,56
Biapigenin zugesetzt [mg]	0,311	0,392	0,419	0,670	0,770	0,818
Biapigenin-gehalt berechnet	0,366	0,374	0,384	0,391	0,414	0,420
Biapigenin-gehalt gefunden	0,365	0,383	0,386	0,399	0,414	0,416
Wiederfindung	99,51	102,26	100,55	101,92	99,99	99,03

Tabelle 7-11 Wiederfindungsrate von Flavonoiden in Johanniskraut

Berechnet wurden die Standardabweichung, der Variationskoeffizient und der Vertrauensbereich des Mittelwertes ($p = 95\%$) bei angenommener t-Verteilung (Tabelle 7-12).

Substanz	WF Mittelwert [%]	Standardabweichung [%]	Rel. Standardabweichung %	Vertr.-bereich MW für $p = 95\%$ [%]
Rutin	100,4	1,188	1,183	99,19-101,68
Hyperosid	100,60,	1,752	1,742	98,77-102,44
Isoquercitrin	100,00	1,013	1,013	98,94-101,06
Quercitrin	101,32	1,145	1,130	100,12-102,52
Quercetin	100,16	1,352	1,349	98,74-101,58
Biapigenin	100,75	1,202	1,193	99,49-102,01

Tabelle 7-12 Statistische Angaben zu den Wiederfindungsraten der Flavonoide

Der Nachweis der Richtigkeit ist damit erbracht.

7.5 Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität wurden alle drei Bestimmungsmethoden mit Diodenarray-Detektion durchgeführt.

Die Spektren in den Peakmaxima sowie den Wendepunkten waren nach Form und Lage der Maxima identisch.

Die Methode ist spezifisch.

7.6 Bewertung

Die verwendeten Verfahren zur Untersuchung der quantitativ wichtigsten Inhaltsstoffe erwiesen sich als linear, spezifisch, präzise und richtig.

8 Experimenteller Teil

8.1 Chemikalien

Für die Isolierung und Prüfung der Reinsubstanzen sowie für die quantitative Bestimmungen mittels HPLC wurden Acetonitril, Methanol und Ethylacetat in HPLC-Qualität (LiChrosolv[®]) verwendet. Die Lösungsmittel für Stabilitätsuntersuchungen, Phosphorsäure sowie Natriumdihydrogenphosphat wurden in der Qualität pro Analyse eingesetzt. Für die spektralphotometrischen Untersuchungen sowie die Protonenresonanzspektroskopie wurde Methanol der Qualität Uvasol[®] beziehungsweise Methanol-d₄ und Pyridin-d₅ der Qualität Uvasol[®] verwendet. Wasser, das für die analytische HPLC und Zellkulturen benötigt wurde, wurde durch eine Millipore[®]-RX-20 Aufbereitungsanlage (Eschborn) in HPLC-Qualität erhalten. Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders bezeichnet, von Merck (Darmstadt) bezogen.

8.2 Referenzsubstanzen

Die für die analytischen Untersuchungen verwendeten Substanzen wurden entweder selbst isoliert oder bezogen (Roth, Karlsruhe), Tabelle 8-1 zeigt die Herkunft der Standards.

Substanz	Chargen-Nr.
Isoquercitrin	Roth-27940958
Rutin	Roth-7422
Hyperosid	Roth-14520587
Quercitrin	Roth-2719907
Quercetin	Roth-40415194
I,3-II8-Biapigenin	Selbst isoliert
Hypericin	Selbst isoliert
Hyperforin	Selbst isoliert

Tabelle 8-1 Referenzsubstanzen

Da bei den quantitativen Bestimmungen nach der Flächenprozentmethode gearbeitet wurde, wurden die selbst isolierten Standardsubstanzen zur Überprüfung der Reinheit auf zwei HPLC-Systemen getestet, der Gehalt der von Roth bezogenen Standardsubstanzen

wurde nur anhand der zur Gehaltsbestimmung herangezogenen HPLC-Methode verifiziert. Die Bestimmung erfolgte nach der 100% Flächenmethode.

8.3 Anzucht und Kultur der Pflanzen

8.3.1 Anzucht und Kultur aus Saatgut

Die Samen der Herkünfte für die Anbaujahre 1998 und 1999 wurden jeweils Ende Januar in Töntöpfe ausgesät und zur Keimung gebracht. Nach etwa vier Wochen wurden die Jungpflanzen in Quick-Pot-Platten (Einzeldurchmesser der Pflanzlöcher 4cm) pikiert. Nach weiteren vier Wochen erfolgte das Auspflanzen (Neumarkt, 1999) oder Umtopfen in Plastiktöpfe (\varnothing 11cm) und Aussetzen ins Freiland (Marburg, 1998)

Genauere Angaben sind Tabelle 8-2 und 8-3 zu entnehmen.

Datum Aussaat	Datum Keimung	Datum Pikierung	Datum Austopfen	Zusammensetzung Aussaat- und Pikiererde	Zusammensetzung Topferde
15.02. 1998 – 25.05. 1998	2 Wochen nach Aussaat	4 Wochen nach Aussaat	8 Wochen nach Aussaat	50% Industrieerde Typ P mit einem Torfanteil von 70% und 30% Ton (Fa. Archud, Lauterbach) und 1g Volldünger/Liter, 25% Perlite, 25% scharfer Sand	75% Industrieerde Typ P mit einem Torfanteil von 70% und 30% Ton (Fa. Archud, Lauterbach) mit 2g Volldünger/Liter, 25% scharfer Sand

Tabelle 8-2 Anzuchtbedingungen 1998

Datum Aussaat	Datum Keimung	Datum Pikierung	Datum Austopfen	Zusammensetzung Aussaaterde
15.03. 1999 – 25.04. 1999	2 Wochen nach Aussaat	4 Wochen nach Aussaat	8 Wochen nach Aussaat	50% Industrieerde Typ P mit einem Torfanteil von 70% und 30% Ton (Fa. Archud, Lauterbach) und 1g Volldünger/Liter, 25% Perlite, 25% scharfer Sand

Tabelle 8-3 Anzuchtbedingungen 1999

Die Jungpflanzen wurden im Gewächshaus bei 20°C und Tageslicht sowie Assimilationslicht (Natriumdampfampe 400 Watt vom Typ SON-T Agro der Firma Philipps) gehalten. Eine Düngung der Kulturen erfolgte lediglich in Marburg (1998).

8.3.2 Bodenanalytik und Untersuchung der Cadmiumbelastung des Pflanzenmaterials im Jahre 1999

Da im Jahr 1998 mit standardisierten Erden und Mischungen gearbeitet wurde, erschien eine Bodenuntersuchung überflüssig.

Im Jahre 1999 für den Versuchsanbau in Neumarkt wurde eine Bodenanalyse in Bezug auf einige Parameter durchgeführt. Dabei wurde ein Muster je Kassette gezogen. Die Analysen wurden extern (Agrolab, Oberhummel) durchgeführt. Die Bodeneinteilung erfolgte nach Kriterien der landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Bayern.

Tabelle 8-4 stellt die Ergebnisse dar.

Kassette Nr.	pH	P ₂ O ₅ [mg/100 g]	K ₂ O [mg/100 g]	Bodenart/-klasse	Cadmiumlast [mg/kg]
1	7,1	45	19	0 hl'S/12	0,219
2	7,0	47	19	0 hl'S / 12	0,197
3	6,7	29	10	0 hl'S / 12	0,301
4	6,8	24	13	0 hl'S / 12	0,303
5	7,2	46	33	0 hl'S / 12	0,189
6	7,1	47	10	0 hl'S / 12	0,213
7	6,9	34	7	0 hl'S / 12	0,135
8	7,0	31	11	0 hl'S / 12	0,188

Tabelle 8-4 Ergebnisse der Bodenanalysen

Vom von den quantitativen Bestimmungen verbliebenen Probenmaterial der Herkünfte 6, 1 und 7 wurden je drei Mischmuster angelegt und extern auf ihre Cadmiumbelastung (Phytos, Neu-Ulm) überprüft. Die Messung erfolgte, wie bei den Bodenproben auch, durch Atomabsorptionsspektroskopie nach einem Salpetersäure (für das Pflanzenmaterial) beziehungsweise Königswasseraufschluß (für die Bodenproben). Alle neun Proben lagen in ihrer Cadmiumbelastung unter der Detektionsgrenze von 0,1 mg/kg.

8.3.3 Anlegen von Zellkulturen

Von einer Herkunft (107/98) wurde bei der Sammlung des Saatgutes zu wenig Material erhalten. Da eine Direktaussaat zu riskant erschien, wurde eine Zwischenvermehrung über Zellkultur vorgenommen.

Es wurde eine sterile Aussaat auf hormonfreiem MS-Medium durchgeführt. Die Samen wurden unter Rühren mit einer wäßrigen, 5-prozentigen Lösung von Natriumhypochlorid, der zur Herabsetzung der Oberflächenspannung etwas TWEEN 20 zugesetzt wurde, für 20 Minuten oberflächensterilisiert. Anschließend wurde nochmals mit 96%igem Ethanol 30 Sekunden entfettet. Die Samen wurden unter aseptischen Bedingungen (Laminar Flow) solange mit autoklaviertem destilliertem Wasser gewaschen, bis kein Chlorgeruch mehr wahrnehmbar war.

Anschließend wurden die Samen auf halbkonzentrierten, hormonfreiem MS-Festmedium in Petrischalen ausgebracht. Die Zusammensetzung für einen Liter Medium lautet wie folgt:

M-S-Fertigmedium, vitaminhaltig, 2,3 g (Firma DUCHEFA, Art. Nr. 0222) wurde mit Caseinhydrolysat 50 mg, myo-Inosit 100 mg, Zucker (Handelsware) 15 g, Polyvinylpyrrolidon 40000 100 mg; mit 0,4% Gelrite[®] (Roth) versetzt. Danach wurde auf 1000 ml mit Wasser aufgefüllt und, soweit möglich, nach dem Lösen der Bestandteile, auf pH 5,8 eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium in sterile Petrischalen (∅ 10cm, 20 ml Medium) ausgegossen. Die Petrischalen wurden zur Keimung der Samen in einen Brutschrank (Certomat BS-1, Braun, Melsungen) mit Temperaturkontrolle (26°C) und Belichtung (Standard-Kaltlichtröhren, 25 Watt, 1200 Lux) gebracht.

Zellvermehrung durch Suspensionskultur:

Die Induktion erfolgte etwa eine Woche nach der Aussaat sobald beide Keimblätter erkennbar waren. Dazu wurden Petiolenabschnitte präpariert. Die Petiolenabschnitte wurden in Erlenmeyerkolben mit 250 ml Fassungsvermögen, die mit 80 ml des obigen Mediums befüllt wurden, überführt. Zur Induktion des Zellwachstums wurden dem Medium 5ppm 6-Benzylaminopurin (Roth, Karlsruhe) und 0,5 ppm á-

Naphthylaminoessigsäure (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Da es sich um eine Flüssigkultur handelte, wurde hier der Zusatz von Gelrite[®] unterlassen. Die Erlenmeyerkolben wurden mit Aluminiumfolie verschlossen und in den Brutschrank gebracht. Die Bedingungen waren dieselben wie bei der sterilen Aussaat, die Kolben wurden zusätzlich noch bei 110 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Von einem einzelnen Aggregat wurde zur Vermehrung eine Subkultur angelegt.

Die Zellaggregate wurden alle zwei bis drei Wochen in neues Flüssigmedium umgesetzt. Dazu wurden diese in einem Edelstahlsieb mit einem geeigneten Werkzeug zerkleinert und etwa 50 mg des Materials in einen Kolben mit frischem Medium überimpft.

Rückdifferenzierung auf Festmedium:

Zur Rückdifferenzierung wurden die Zellaggregate unter sterilen Bedingungen wieder auf hormonfreies Festmedium aufgelegt. Geeignete Gefäße hierzu waren handelsübliche 1,5 l Einmachgläser, die mit 200 ml Festmedium gefüllt waren. Die Rückdifferenzierung erfolgte wieder im Brutschrank.

Die Pflanzen wurden adaptiert, sobald die Pflanzen ein dichtes Wurzelwerk gebildet hatten. Dies war nach sechs Wochen der Fall.

Zur Adaptierung an normale Umweltbedingungen wurden die Pflanzen dem Medium entnommen und in Quick-Pots ausgesetzt, die mit Perlit gefüllt waren und anschließend in ein Gewächshaus unter einem Folienzelt verbracht. Die Adaption war nach etwa zwei Wochen bei Ausfällen von 30% abgeschlossen. Die Jungpflanzen wurden dann in Quick-Pots mit normaler Pikiererde (Tabelle 8-2) umgesetzt.

8.4 Quantitative Analytik

8.4.1 Ernte und Lagerung des Probenmaterials

Das Pflanzenmaterial wurde jeweils zum Zeitpunkt der Vollblüte geerntet (50% aller Knospen sind geöffnet).

1998 wurde das obere Drittel der Pflanze geerntet, in beschriftete Papiertüten verpackt und diese offen bei 60°C unter Umluft in einem Trockenschrank (TU-1, Heraeus GmbH, Hanau) für zehn Stunden getrocknet.

1999 wurde, aufgrund des unterschiedlichen Wuchsverhaltens im Vergleich zu 1998, die Ganzpflanze zum Zeitpunkt der Vollblüte geerntet. Die Trocknung erfolgte analog zu

1998.

Die Lagerung erfolgte in den Papiertüten, in denen getrocknet wurde; trocken und vor Licht geschützt bei Raumtemperatur.

8.4.2 Probenaufarbeitung

1998 wurden die aus drei Pflanzen erhaltenen Mischmuster gewogen und mittels einer Schlagmühle mit 0,25 mm Siebeinsatz (Culatti, Schweiz) fein gemahlen und homogenisiert. Die Mühle wurde nach der Bearbeitung eines Musters gereinigt.

1999 wurde das Pflanzenmaterial gewogen und nach Stengelanteilen, Blattanteilen und Blütenanteilen manuell getrennt. Die Stengel wurden nach dem Wiegen verworfen, Blatt- und Blütenanteile nach dem Wiegen der Einzelanteile vereinigt.

Unmittelbar nach dem Wägen wurde die Droge fein gemahlen und homogenisiert.

8.4.3 Extraktion

Die Extraktion erfolgte unter Rückflußkühlung mit Methanol. Dazu wurden 1 g der Droge, genau gewogen, mit 50,0 ml Methanol in einen 50 ml Rundkolben gebracht. Die Proben wurden anschließend bei 60°C Wasserbadtemperatur für 30 min extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt in einen 100ml Meßkolben, der mit einem Trichter mit wenig Glaswolle versehen war, vorsichtig abdekantiert. Die Rundkolben wurden erneut mit 50 ml Methanol aufgefüllt, die Extraktion für 30 min fortgesetzt. Die Extrakte wurden ebenfalls in den jeweiligen Meßkolben gegeben und der Meßkolben bis zur Marke aufgefüllt.

8.4.4 Analytische HPLC

8.4.4.1 Hyperforin und Hypericine

Durchführung der HPLC-Analysen

Zur Durchführung der HPLC-Analysen wurden von jeder Probe 4ml des Extraktes in 5ml Einwegspritzen (Braun, Melsungen) aufgezogen und durch einen Einwegmembranfilter mit einer Porengröße von 45µm und Polyestermembran (Machery und Nagel, Düren) filtriert. Der erste Durchlauf wurde jeweils verworfen, um, für den Fall einer Adsorption

von Inhaltsstoffen an die Membran, diese zunächst abzusättigen. Der zweite Durchlauf wurde je in ein Braunglasvial und Weißglasvial 4,5 ml (Waters, Eschborn) filtriert. Das Weißglasvial wurde mit einem selbstabdichtenden Silikon-Teflonseptum versehen, das Braunglasvial mit einem Einwegseptum aus Teflon (Waters, Eschborn).

Die Weißglasvials wurden für 90 min dem Tageslicht ausgesetzt, um eine Umsetzung der Protohypericine in Hypericine zu erreichen. Zeitgleich wurde der Hyperforingehalt der Proben in den Braunglasvials ermittelt.

Chromatographische Bedingungen:

HPLC Pumpe Ms DS 600 mit Säulenofen 600S, UV- Vis- Detektor Lambdamax, Autosampler 712 WISP (Waters, Eschborn), Säule Eurospher[®] 100 RP 18, 3 x 250 mm, 5 µm, Vierkanal-online-Degasser (Knauer, Berlin), Integrator Merck-Hitachi D 2000 (Merck, Darmstadt).

Eluent: Methanol, Ethylacetat, wäßriger 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat- Puffer, eingestellt auf pH 2,1 (67:16:17);

Fluß: 0,8 ml/min;

Druck: 2700 PSI;

Injektionsvolumen: 10 µl;

Temperatur: 40 °C;

Detektion des Hyperforins bei 274 nm, der Hypericine bei 591 nm.

Für jeden Analysentag wurde mit drei Standards zur Überprüfung des Systems eine Kurzkalibrierung durchgeführt. Die erhaltenen Meßwerte wurden in vorbereitete Exceltabellen übertragen, mit deren Hilfe eine Berechnung der Hyperforinkonzentrationen nach der Methode des externen Standards vorgenommen wurde. Lag bei der Überprüfung der Areas eine Probe unter oder über den in der Validierung (Kapitel 4) auf Linearität festgelegten Bereichen, so wurde das Injektionsvolumen des Autosamplers erhöht.

Die Ermittlung der Hypericin und Pseudohypericinkonzentrationen, berechnet als Hypericin, erfolgte bis auf die Detektion bei 591 nm unter identischen Bedingungen wie die Hyperforinbestimmung. Da jedoch die Bestimmungen im Winter vorgenommen wurden, war eine Umsetzung der Protohypericine durch Tageslicht nicht immer gewährleistet. Waren bei einem ersten Testlauf noch Protostufen detektierbar, so wurde mit Kunstlicht (handelsübliche 60 Watt-Glühbirne, Abstand 30 cm) nachbelichtet. Die Vials wurden nach der Analyse bis zur Durchführung der Bestimmung der

Flavonoidgehalte beschriftet und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert.

8.4.4.2 Flavonoide

Die quantitativen Bestimmungen zur Ermittlung der Flavonoidgehalte wurden apparativ wie die quantitativen Analysen auf Hypericine und Hyperforin durchgeführt. Die chromatographischen Bedingungen lauteten:

Eluent A: wäßriger 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer, eingestellt auf pH 2,1

Eluent B: Acetonitril.

Tabelle 8-5 stellt das Eluentenzeitprogramm dar:

Zeit [min]	Anteil B [%]	Zeit [min]	Anteil B [%]
Initial	15	40 bis 51	42
0 bis 15	18	51 bis 54	55
15 bis 30	20	54 bis 60	90
30 bis 40	30	60 bis 65	15

Tabelle 8-5 Eluentenzeitprogramm der Flavonoidbestimmung

Fluß: 0,8 ml/min;

Druck: 3300 PSI;

Injektionsvolumen: 10 μl ;

Temperatur: 25 $^{\circ}\text{C}$;

Detektion: 260 nm.

Wie bei der Bestimmung des Hypericin-, Pseudohypericin- und Hyperforingehaltes wurden auch hier an jedem Meßtag Kurzkalibrierungen, allerdings mit Mischstandards, durchgeführt.

Dazu wurden Stammlösungen der Einzelsubstanzen (Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin, Quercetin, I3, II8-Biapigenin) mit einer Konzentration von je 1 mg/ml hergestellt. Von diesen Stammlösungen wurden Mischstandards im Konzentrationsbereich 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml und 0,01 mg/ml angelegt. Da bei den Flavonoidstandards verschiedene Kristallwassergehalte vorlagen, wurde dies rechnerisch bei der

Gehaltsbestimmung berücksichtigt.

Die erhaltenen Meßwerte wurden wie bei den vorangegangenen Bestimmungen nach der Methode des externen Standards berechnet.

8.4.5 Stabilitätsuntersuchungen an Hyperforin

Die Stabilitätsuntersuchungen erfolgten in hydrophilen und lipophilen Lösungsmitteln. Es wurden Lösungen von Hyperforin in einer Konzentration von 5 mg/ml und eines methanolischen Extraktes in einer Konzentration von 11,2 mg/ml angesetzt.

Folgende Gerätekonfiguration wurde verwendet:

HPLC Pumpe Ms DS 600 E, Diodenarraydetektor 996, Autosampler 712 WISP, Auswertungssoftware Millenium[®] V2.1 (Waters, Eschborn), Vierkanal-online-Degasser (Knauer, Berlin).

Die chromatographischen Bedingungen für die hydrophilen Stabilitätsmuster lauteten wie folgt:

Säule: LiChrospher[®] 100 RP 18, 4 x 250 mm, 5µm (Merck, Darmstadt);

Eluent: Acetonitril/Methanol/Phosphorsäure (59/40/1);

Fluß: 0,6 ml/min;

Druck: 1800 PSI;

Temperatur: Raumtemperatur;

Detektion: 274 nm.

Die chromatographischen Bedingungen für die lipophilen Stabilitätsmuster lauteten wie folgt:

Säule: LiChrospher[®] Si 60, 4 x 250 mm, 5µm (Merck, Darmstadt);

Eluent: Cyclohexan/Chloroform/Isopropanol (82/7,5/0,5);

Fluß: 1,0 ml/min;

Druck: 2000 PSI;

Temperatur: Raumtemperatur;

Detektion: 274 nm.

Injiziert wurden jeweils 20 µl des Analyten alle 20 Minuten über einen Zeitraum von 6 Stunden und vierzig Minuten.

8.4.6 Spektralphotometrie

Es wurde ein Spektrophotometer PM QII mit Monochromator M4QIII (Leitz) und einer Quarzküvette mit 1cm Schichtdicke verwendet. Das Gerät wurde gemäß Ph. Eur. 1997 kalibriert. Zur Vermeidung von Verdünnungsfehlern wurde in aufsteigenden Konzentrationen gemessen, es wurde mit einer Küvette gemessen, die vor jeder Messung mit 200 µl des Analyten gespült wurde. Eine Überprüfung des Nullwertes fand alle 5 Messungen gegen Methanol statt.

8.5 Qualitative Analytik

8.5.1 Dünnschichtchromatographie mittels HPTLC

Zur Bestätigung der Rutinfreiheit einiger Herkünfte wurde eine HPTLC-Analyse rutinfreier und rutinhaltiger Extrakte aus der Flavonidbestimmung und von Rückstellmustern durchgeführt.

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F254, HPTLC (Glas 0,25 mm) 200 mm x 100 mm (Firma Merck);

Mobile Phase: Ethylacetat : Ameisensäure : Wasser (30 : 2 : 3), Kammersättigung, Steighöhe: 7 cm;

Auftragsmenge und Art: 10µl, strichförmig bei einer Breite von 10 mm je Bande und einem Seitenrand von 10 mm;

DC-Kammer: DESAGA Standard-Trennkammer;

Tauchkammer: Selbst gefertigt, Fassungsvermögen 200 ml Tauchlösung;

Detektion : 0,5% Naturstoffreagenz A (Roth, Karlsruhe), in Methanol mit einem Zusatz von 2% Polyethylenglykol 4000.

Die Platten wurden entwickelt, bei Raumtemperatur getrocknet, in der Detektionslösung eingetaucht und im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet.

Auswertung: Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht mit der Wellenlänge von 366 nm. Die Zuordnung der Substanzonen erfolgte durch Vergleich mit aufgetragenen

Mischstandards in Hinsicht auf Färbung, Lage und Intensität der Banden.

8.6 ¹H-MNR-Spektroskopie und Massenspektrometrie

Die Kernresonanzspektren wurden entweder mit einem Jeol Eclipse + 500 oder einem Jeol GX 400 Spektrometer (Jeol GmbH, Eching) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm, bezogen auf die δ -Skala, angegeben. Die Spektren wurden durch zugesetztes TMS kalibriert ($\delta_{\text{TMS}} = 0$ ppm).

Die Aufnahme der EI-Massenspektren erfolgte an einem Massenspektrometer vom TypVG 7070 H des Herstellers Vakuum Generators, ausgerüstet mit einem Datensystem des Typs Vector 1 des Herstellers Teknivent. Die Elektronenenergie betrug 70 eV.

8.7 Isolierungen

8.7.1 Hypericin

107 g getrocknete Droge werden vermahlen und 5 Stunden mit Dichlormethan nach Soxhlet extrahiert. Die Droge wird getrocknet und einer weiteren Extraktion mit Methanol über acht Stunden unterworfen. Der so erhaltene Extrakt (32 g) wird auf eine Säule mit Glasfritte (Porosität 4, \varnothing 4 cm, Säulenbetthöhe 13 cm), die mit 30 g Polyamid (ICN, Eschwege) gefüllt ist, aufgetragen. Es wird zunächst mit 2,5 l Methanol zum Eluieren der Flavonoide gespült, danach wird durch Anlegen von Unterdruck an den Säulenausgang mit 1 Liter Wasser umkonditioniert. Durch Spülen mit einer einprozentigen ammoniakalischen Lösung in Wasser wird eine kräftig orange gefärbte Bande eluiert. Dieser Vorgang wird bis zur völligen Farblosigkeit des Eluates fortgesetzt. Danach wird mit Wasser (1 Liter) und mit Methanol (1 Liter) umkonditioniert und Hypericin mit ammoniakalischem Methanol (0,5%) eluiert. Diese Lösung wird zur Umsetzung des Protohypericins 3 Stunden dem Tageslicht ausgesetzt. Nach dem Einrotieren bis zur Trockne erhält man so 82,1 mg Substanz mit einem Anteil von Hypericin an der Gesamtabsorption von 96,55%, gemessen bei 591 nm.

8.7.2 Hyperforin

-Isolierung durch präparative DC

Ausgangsmaterial: Experimenteller SFE Extrakt der Firma NateCO₂ der Charge L-2239 (a), methanol-lösliche Fraktion. Alternativ wurde auch ein Auszug aus blütenreicher Droge mit Chloroform verwandt.

Extrakterstellung: 2,3 g werden mit 30 ml Methanol im Ultraschallbad angelöst und filtriert (1,2 g) und auf 250 mg/ml eingestellt;

Stationäre Phase: Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, HPTLC (Glas 0,5 mm) 200 mm x 100 mm;

Mobile Phase: n-Hexan/Diethylether (80/20).

Es wurden dreimal 100 µl strichförmig unter Verwendung einer Hamiltonspritze mit einem Auftragegerät (Chromatocharger nach Firmenich, CAMAG, Schweiz) aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die Platten für etwa 40 Minuten bis zu einer Steighöhe von 15 cm entwickelt. Die dem Hyperforin entsprechende Bande mit einem Rf-Wert von 0,4 bis 0,5 wurde durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und teilweises Besprühen mit frisch zubereiteter Echtblausalzlösung B (0,5% in Wasser) detektiert, ausgekratzt und mit Chloroform eluiert.

Das Filtrat wurde wiederholt durch Einwegmembranfilter filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Je Platte wurden etwa 20 mg Hyperforin erhalten, das von klarer, ölig und gelblicher Beschaffenheit war sowie einen charakteristischen Geruch aufwies.

-Isolierung mittels präparativer HPLC

Ausgangsmaterial: Experimenteller SFE Extrakt der Firma NateCO₂ der Charge L-2239 (a), methanol-lösliche Fraktion .

Extrakterstellung: 2,3 g werden mit 30 ml Methanol im Ultraschallbad angelöst und filtriert (1,2 g) und auf 40 mg/ml eingestellt.

Geräte:

HPLC -Pumpe MS DS 600 E mit 500 µl Probenschleife, Photodiodenarraydetektor Waters 900 Auswertungssoftware Baseline 810 (Waters, Eschborn), Vierkanal-online-Degasser (Knauer, Berlin).

Säule: LiChrospher[®] RP 18 100 5 µm, 250 x 10 mm;

Fließmittel: H₂O 16,5; Acetonitril 20; Methanol 62,5; H₃PO₄;

Fluß: 14 ml/min;

Druck: 2700 PSI;

Injektionsvolumen: 500µl;

Temperatur: Raumtemperatur;

Detektion: 274 nm.

Aufarbeitung des Eluates: Das Eluat wird 1:1 mit Wasser verdünnt, das getrübbte Eluat wird an einem Rotationsverdampfer bei 40 °C vollständig von den organischen Lösungsmitteln befreit. Hyperforin setzt sich als wachsartige, farblose Substanz am Rundkolben ab. Die Substanz wird im Rundkolben unter mehrmaligem Anlösen mit Methanol und Einengen am Rotationsverdampfer mit Wasser gewaschen, bis die anwesende Phosphorsäure vollständig entfernt ist (Test des Waschwassers mit pH-Papier).

Ausbeute: ca. 5 mg je Lauf.

8.7.3 I3, I18-Biapigenin

Extrakterstellung:

20,5 g getrocknete Droge werden über 5 Stunden mit Dichlormethan mit einer Soxhletapparatur extrahiert und anschließend mit Aceton ausgezogen. Der so erhaltene Extrakt (3,3g) wird mit Ethylacetat gegen Wasser ausgeschüttelt. Die Oberphase wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, in Methanol aufgenommen und mit Polyamid (ICN, Eschwege) versetzt, bis die Rotfärbung verschwindet. Die Suspension wird filtriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt (0,3 g) und mit Methanol auf 20 mg/ml eingestellt.

Geräte:

HPLC-Pumpe MS DS 600 E mit 500 µl Probenschleife, Photodiodenarraydetektor Waters 900 Auswertungssoftware Baseline 810 (Waters, Eschborn), Vierkanal-online-Degasser (Knauer, Berlin).

Die chromatographischen Bedingungen lauteten wie folgt:

Säule: Lichrospher[®] 100 RP-18, 10 x 250 mm, 5 µm;

Eluent A: Methanol;

Eluent B: 10% Essigsäure in Wasser;

Lineares Eluentenzeitprogramm: Initial 45% Eluent A, nach 14 min. Eluent A 5%, nach 18 min 45% Eluent A;

Druck: 2200 PSI;

Injektionsvolumen: 500 µl;

Temperatur: Raumtemperatur;

Detektion: 254 nm;

Aufarbeitung des Eluates: Die vereinigten Fraktionen werden am Rotationsverdampfer zur Trockne und bis zum vollständigen Verschwinden des Geruches von Essigsäure eingeengt.

Ausbeute: ca. 1,7 mg je Trennung, 20 mg total.

8.7.4 Protohypericinfraktion

20 g Frischdroge werden vermahlen und 5 Stunden mit Dichlormethan nach Soxhlet extrahiert. Die Droge wird getrocknet und einer weiteren Extraktion mit Methanol über 8 Stunden unterworfen. Der gelöste Extrakt wird mit 3g Polyamid (ICN, Eschwege) versetzt und einige Stunden stehen gelassen. Die Hypericine werden mit ammoniakalischem (0,5%) Methanol eluiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt (410 mg). Die so hypericinangereicherte Fraktion wird wieder in Methanol gelöst und auf eine Polyamidsäule (mit Glasfritte der Porosität 4 versehen, Füllhöhe 20 cm, Durchmesser 4 cm) aufgegeben und mit einem Liter Methanol gewaschen. Danach wird mit ammoniakalischem Methanol (0,5%) unter Kontrolle der Fraktionen eluiert. Die Protoverbindungen erscheinen als dunkelviolett gefärbte Bande unterhalb der Hypericine. So werden insgesamt 23,2 mg eines Gemisches aus Protoseudohypericin und Protohypericin erhalten. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter Ausschluß von Tageslicht ausgeführt.

Überprüfung der Reinheit der Protohypericinfraktion mit HPLC

HPLC Pumpe Ms DS 600 mit Säulenofen 600S, UV- Vis- Detektor Lambdamax, Autosampler 712 WISP (Waters, Eschborn), Säule Eurospher[®] 100 RP 18, 3 x 250 mm, 5 µm, Vierkanal-online-Degasser (Knauer, Berlin), Integrator: Merck-Hitachi-Chromato-Integrator D 2500 (Merck, Darmstadt).

Eluent: Methanol, Ethylacetat, wäßriger 0,1 M NaH₂PO₄- Puffer, eingestellt auf pH 2,1 (67: 13: 20).

Fluß: 0,8 ml/min;

Druck: 2800 PSI;

Injektionsvolumen: 10 µl;

Temperatur: 40 °C;

Detektion: 254 nm.

Die Protohypericinfraction wurde mit einer Konzentration von 0,65 mg/ml in Methanol gelöst und vor sowie nach Belichtung in einem Weißglasvial chromatographiert.

Der Gehalt an Protohypericinen am Gesamthypericingehalt wird über die Zunahme des Hypericins und Protohypericins errechnet, abzüglich der Menge an Pseudohypericin und Hypericin, die vor der Umsetzung bereits vorlag.

9 Literaturverzeichnis

Analytical Validation, Validation of Analytical Procedures. Definition and Terminology
<http://www.ifpma.org/ich5.html>
Stand: 08 2000

Baureithel, K. H.; Buter, K.B.; Engesser, A.; Burkard, W.; Schaffner, W.:
Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various
species of *Hypericum*.
Pharm Acta Helv, **72**, 1997, 153-157

Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau:
Kulturanleitung für Johanniskraut.
Merkblätter für Pflanzenbau, Heil- und Gewürzpflanzen, **32**, 1986

Bennett, G. J.; Lee, H. H.:
Xanthones from Guttiferae.
Phytochem, **28**, 1989, 967-998

Berghöfer^A, R.:
Biflavonoids in *Hypericum perforatum* L.; Part. 1 Isolation of I3, II8-Biapigenin.
Planta Med, **53**, 1987, 216-217

Berghöfer^B, R.:
Analytik und Isolierung phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. aus
Anbau und Vergleich mit anderen *Hypericum*-Arten.
Dissertationes Botanicae, Bd. 106, Verlag J. Cramer, Berlin, 1987

Berghöfer, R.:
Isolation of I3', II8-Biapigenin (Amentoflavone) from *Hypericum perforatum* L.
Planta Med, **55**, 1989, 91

Biber, A.; Fischer, H.; Romer, A.; Chatterjee, S.S.:
Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human
volunteers.
Pharmacopsychiat., **31** (Supplement), 1998, 94-101

Bol'shakova, I.V.; Lozovskaya, Y.L.; Sapezhinskii, I.I.:
The photosensitizing and photoprotective properties of extracts of a group of medicinal
plants.
Biophysics, **42**, 1997, 939-944

Bomme, U.:
Produktionstechnologie von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.).
Z Arzn Gew pfl., **2**, 1997, 127-134

- Bourne, K. Z.; Bourne, N.; Reising, S. F.; Reising, L.; Stanberry, L. R.:
Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2.
Antiviral Research, **42**, 1999, 219-226
- Brockmann, H.:
Photodynamisch wirksame Pflanzenfarbstoffe.
Fortschritt d Chem Org Naturstoffe, **14**, 1957, 141-177
- Brockmann, H.; Pampus, G.:
Die Isolierung des Pseudohypericins.
Naturwiss, **41**, 1954, 86-87
- Brockmüller, J.; Reum, T.; Bauer, S.; Kerb, R.; Hubner W. D.; Roots, I.:
Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans.
Pharmacopsychiat, **30** (Supplement), 1997, 94-101
- Bundesanzeiger (BaZ) Nr. 228 vom 05. 12. 1984, i.d.F. vom 02. 03. 1989:
Monographie der Kommission E Johanniskraut, *Herba hyperici*, 1989
- Bundessortenamt:
Johanniskraut *Hypericum perforatum* L.
Beschreibende Sortenliste (Heilpflanzen), 1996
- Büter, B.; Orlacchio C.; Soldati, A. ; Berger, K.:
Significance of genetic an environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum* L.
Planta Med, **62**, 1996, 51-53
- Butterweck^A, V. ; Wall, A.; Liefländer-Wulf, U.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A.:
Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* L. in animal assays for antidepressant activity.
Pharmacopsychiat, **31** (Supplement), 1998, 36-43
- Butterweck^B, V.; Peterleit, F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A.:
Solubilized Hypericin an pseudohypericin from *Hypericum perforatum* L. exert antidepressant activity in the forced swimming test.
Planta Med, **64**, 1998, 291-294
- Butterweck, V.; Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A.; Winterhoff, H.:
Flavonoids from *Hypericum perforatum* L. show antidepressant activity in the forced swimming test.
Planta Med, **66**, 2000, 3-6

- Cakir A.; Duru, M. E.; Harmadanrar, M.; Ciriminna, R.; Passananti, S.; Piozzi, F.:
Comparison of the volatile oils of *Hypericum scrabrum* L. and *Hypericum perforatum* L.
from Turkey.
Flavour and Fragrance Journal, **4**, 1997, 285-287
- Chatterjee, S.; Bhattacharya, S.K.; Wonnemann, M.; Singer, A.; Muller, W.E.:
Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts.
Life Sci, **63**, 1998, 1223-1230
- Chatterjee, S.; Filippov, V.; Lishko, P.; Maximyuk, O.; Noldner, M.; Krishtal, O.:
Hyperforin Attenuates Various Ionic Conductance Mechanisms in the Isolated
Hippocampal Neurons of Rat.
Life Sci, **65**, 1999, 2395-2405
- Chizzola, R.:
Aufnahme und Verteilung von Cadmium in Sonnenblume, Kamille und Johanniskraut.
Z Arzn Gew pfl., **3**, 1998, 91-95
- Colosanti, A.; Kisslinger, A.; Luizzi, R.; Quarto, M.; Riccio, P.; Roberti, G.; Tramontano,
D; Villani, F.:
Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate.
J Photochem Photobio B **54**, 2000, 103-107
- Czekalla, J.; Gastpar M.; Hubner W. D.; Jager, D.:
The effect of hypericum extract on cardiac conduction as seen in the electrocardiogram
compared to that of imipramine.
Pharmacopsychiat, **30** (Supplement), 1997, 86-88
- Czygan, F.-C.:
Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes.
Zeitschrift für Phytotherapie **14**, 1993, 272-278
- de Smet, P. A. G.; Nolen, W. A.:
St. John's wort as an antidepressant.
BMJ, **313**, 1996, 241-242
- De Vry, J. ; Maurel, S.; Schreiber, R.; de Beun, R.; Jentzsch, K.R.:
Comparison of hypericum extracts with imipramine and fluoxetine in animal models of
depression and alcoholism.
European Neuropsychopharmacology, **9**, 1999, 461-468
- Deltito, J.; Beyer, D.:
The scientific, quasi-scientific and popular literature on the use of St. John's Wort in the
treatment of depression.
J Affect Disord , **51**, 1998, 345-351
- Demisch, L.; Nispel; J.; Sielaff, T.; Gebhart, P.; Köhler, C.; Pflug, B.:
Influences of nocturnal light pulses of different intensities on melatonin secretions
before and after subchronic administration of Hyperforat in healthy volunteers
Vth Colloq of EPSG, 1990, book of abstracts no. 138. Zitiert nach SPARRENBURG (1993)

- Eisenbrand, G.; Tang, W.:
Nutzen und Grenzen von Mutagenitäts- und Kanzerogenitätsstudien.
Phytopharmaka IV Forschung und klinische Anwendung Herausgeb. Loew, Steinkopff-
Verlag Darmstadt, 1998, 1-11
- Erdelmeier, C. A. J.:
Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L.
Pharmacopsychiat., **31** (Supplement), 1998, 2-6
- Ernst, E. E.:
Second thoughts about safety of St. John's wort.
The Lancet, **354**, 1999, 2014-2015
- Fernandez, J. M.; Bilgin, M. D.; Grossweiner, L. L.:
Singulet oxygen generation by photodynamic agents.
J Photochem Photobio B, **37**, 1997, 131-140
- Franklin, M.; Chi, J.; McGavin, C.; Hockney, R.; Reed, A.; Campling, G.; Whale, R.W.R.;
Cowen, P.J.:
Neuroendocrine evidence for dopaminergic actions of hypericum extract (LI 160)
in healthy volunteers - specific treatments.
Biol Psychiatry, **46**, 1999, 581-584
- Friede, M.; Wüstenberg, P.:
Johanniskraut zur Therapie von Angstsyndromen bei depressiven Verstimmungen.
Zeitschrift für Phytotherapie, **19**, 1998, 309-317
- Friedrich, M.; Stuhlfelder, C.; Theurer, C.:
Der Buchweizen – Arzneipflanze im Wandel der Zeit.
Zeitschrift für Phytotherapie, **21**, 2000, 106-114
- Fuchs, L
Kräuterbuch, Basel 1543, Kapitel CCCXXII
Nachdruck Verlag Konrad Kölbl, München, 1975
- Fugh-Berman, A.A.:
Herb-drug interactions.
The Lancet, **355**, 2000, 134-138
- Gaedcke, F.:
Johanniskraut und dessen Zubereitungen.
Dtsche Apoth Ztg, **137**, 1997, 117-121
- Gärber, U.:
Erste Ergebnisse von Untersuchungen zur Johanniskrautwelke.
Z Arzn Gew pfl, **4**, 1999, 181-186
- Gordon, M. H.; Roedig-Penman, A.:
Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes.
Chem and Phys Lipids, **97**, 1998, 79-85

- Gurevich, A. I.; Dobrynin, V. N.; Kolossov; M. N.; Popravko, S. A.; Ryabova, I.D.; Chernov, B. K.; Derbentseva, N. A.; Aizenman, B. E.; Garagulya, A. D.:
Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L.
Antibiotici,(Moskau), **16**, 1971, 510-513. Zitiert nach BERGHÖFER (1987)
- Häberlein, H.; Tschiersch, K. P.; Stock S.; Hölzl, J.:
Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.): Nachweis eines weiteren Naphthdianthrons.
Pharm Ztg Wiss, **5/137**, 1992, 169-164
- Hegi, G.:
Illustrierte Flora von Mitteleuropa Bd . V, 498-520
Carl Hanser Verlag, München, 1970
- Helgason, C.M.; Wieseler Frank, J.L.; Johnson, D.R.; Frank, M.G.; Hendricks, S.E:
The effects of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on NK cell activity in vitro.
Immunopharmacology, **46**, 2000, 247-251
- Hildebrand, P. D.; Jensen, K. I. N.:
Potential for the biological control of St. John´s wort (*Hypericum perforatum* L.) with
an endemic strain of C. T.
Canadian Journal of Plant Pathology, **13**, 1991, 60-70
- Hiller, K. O; Schmidt, A. H.:
Chargenkonformität von Phytopharmaka.
Dtsche Apoth Ztg, **140**, 2000, 2955-2961
- Hollmann, P. C. H.; van Trijp, J. M. P.; Mengelers, M. J. B.; de Vries, J. H. M.; Katan, M. B.:
Bioavailability of the dietary atioxidant flavonol quercetin in man.
Cancer Letters, **114**, 1997, 139-140
- Hölzl, J.; Ostrowski, E.:
Johanniskraut-HPLC-Analyse der wichtigen Inhaltsstoffe und deren Variabilität in
einer.Population.
Dtsche Apoth Ztg, **127**, 1987, 1227-1230
- Hölzl, J.; Sattler, S.; Schütt, H.:
Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva?
Pharm Ztg, **139**, 1997, 3959-3977
- Homepage der Veterinärmedizinischen Fakultät Zürich
http://www-vetpharm.unizh.ch/giftdb/pflanzen/0050_vet.html
Stand:08 /2000
- Hu, L.-H.; Khoo, C.-W.; Jagadse, J.; Sim, K.-Y.:
Phloroglucinol derivatives from *Hypericum kaponicum*.
Phytochemistry, **53**, 1999, 705-709
- Kartnig, T.; Gobel I.; Heydel, B.:
Production of hypericin, pseudohypericin and flavonoids in cell cultures of various
Hypericum species and their chemotypes.
Planta Med, **62**, 1996, 51-53

Kasper, S.:

Treatment of seasonal affective disorder (SAD) with hypericum extract.
Pharmacopsychiat., **30**, 1997, 89-93

Kaul, R.:

Johanniskraut -Mechanismen der antidepressiven Wirkung von Johanniskraut-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen.
Dtsche Apoth Ztg, **140**, 2000, 689-701

Kirakosyan, A.; Hayashi, H.; Inoue, K.; Charchoglyan, A.; Vardapetyan, H.:

Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* L. shoot Cultures.
Phytochemistry, **53**, 1999, 345-348

Kitanov, G.M.; Nedialkov, P.T.:

Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species.
Biochem Syst Ecol, **26**, 1998, 647-653

Kolkmann, R.:

Phytopharmaka: Qualität und Vergleich.
Pharm Ztg, **141**, 1996, 4424-4427

Koren H.; Schenk G. M.; Jindra R. H.; Alth, G.; Ebermann, R.; Kubin A.; Koderhold, G.; Kreitner, M.:

Hypericin in phototherapy.
J Photochem Photobio B, **36**, 1996, 113-119

Krämer, W.; Wiartalla, R.:

Bestimmung von Naphthodianthronen (Gesamthypericin) in Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.).
Pharm Ztg Wiss, 5/**137**, 1992, 202-207

Linde, K.; Ramirez, G.; Mulrow, C. D.; Pauls, A; Weidenhammer, W.; Melchart, D.:

St. John's wort for depression- an overview and meta-analysis of randomised clinical trials.
BMJ, **313**, 1996, 253-258

Lurtz, U.; Plescher, A.:

Einfluß von organischer und mineralischer Düngung auf Ertrag und Qualität von Johanniskraut.
Drogenreport, 18/**10**, 1997, 28-31

Maisenbacher, P.:

Untersuchungen zur Analytik von Johanniskrautöl.
Dissertation, Tübingen, 1991

Markowitz, J.S.; DeVane, C.L.; Boulton, D.W.; Carson, S.W.; Nahas, Z.; Risch, S. C.:

Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on Cytochrome P-450 2D6 and 3A4 Activity in Healthy Volunteers.
Life Sci, **66**, 2000, PL133-PL139

- Melikian, E.; Boroyan, R.; Karaguezian, A.; Charchoglian, A.; Gabrielian, E.; Panossian, A.:
Hypericin content in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) growing in Armenia.
Pharm Pharmacol, **8**, 1998, 101-102
- Melzer, R.:
Untersuchungen zur Analytik und kardiovaskulären Wirkung der oligomeren Procyanidine von *Hypericum perforatum* L.
Dissertation, Marburg, 1990
- Melzer, R.; Fricke, U.; Hölzl, J.:
Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries.
Arzneim-forsch/Drug Res., **41**, 1991, 481-483
- Melzer, M.; Fuhrken, D.; Kolkman, R.:
Hyperforin in Johanniskraut.
Dtsche Apoth Ztg, **138**, 1998, 4754-4761
- Metz^A, G.:
Flavonoide Strukturvielfalt aus Obst und Gemüse.
Pharm Ztg, **145**, 2000, 2116-2118
- Metz^B, G.:
Flavonoide Teil II Trotz Resorptionsschwächen gut wirksam.
Pharm Ztg, **145**, 2000, 2206-2208
- Micali, G.; Lanuzza, F.; Curro, P.:
High-performance liquid chromatographic determination of hypericin in phytotherapeutic vegetable extracts and alcoholic beverages.
J Chromatogr A, **731**, 1996, 336-339
- Müller, W. E.; Rolli, M.; Schafer C.; Hafner U.:
Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity.
Pharmacopsychiat., **30** (Supplement), 1997, 102-107
- Müller, W. E.; Singer, A.; Wonnemann, M.:
Johanniskraut -Vom Nerventee zum modernen Antidepressivum.
Dtsche Apoth Ztg, **139**, 1999, 1741-1750
- Orth^A, H. C.; Hauer, H.; Erdelmeier, C. A.; Schmidt, P. C.:
Orthoforin: The main degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* L.
Pharmazie, **54**, 1999, 76-77
- Orth^B, H. C.; Rentel, C.; Schmidt, P. C.:
Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L.
J Pharm Pharmacol, **51**, 1999, 193-200

Öztürk, Y.:

Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models.
Pharmacopsychiat., **30** (Supplement), 1997, 125-128

Pharm. Helv. VIII

Monographie Johanniskraut/*Hyperici herba* CH131.
1997, 299-300

Philipp, M.; Kohnen, R.; Hiller, K.-O.:

Hypericum extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression: randomised multicentre study of treatment for eight weeks.
BMJ, **319**, 1999, 1534-1538

Plescher, A.:

Effizienter und umweltgerechter Anbau von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.).
Drogenreport, **10**, 1997, 22-26

Robson, N. K. B. :

Studies in the genus *Hypericum* (Guttiferae).
Bulletin of the British Museum of natural History, **5**, 1977, 292-355. Zitiert nach SCHÜTT (1996)

Rocha, L.; Marston, A.; Potierat, O.; Kaplan, M.; Hostettmann, K.

More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*.
Phytochemistry, **42**, 1996, 185-188

Rote Liste:

Arzneimittelverzeichnis des BPI
<http://www.srz-berlin.de>, Stand 08/2000

Roots I.

Vorsicht bei Johanniskraut-Wechselwirkungen mit Digitoxin!
Dtsche Apoth Ztg, **139**, 1999, 4718-4719

Rücker, G.; Manns, D.; Hartman, R.; Bonsels, U.:

Peroxides as constituents of plants.
Arch Pharm, **328**, 1995, 725-730

Sachs, L.:

Angewandte Statistik.
8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1997

Sattler, S.:

Naphthodianthrone aus *Hypericum perforatum* L.: Isolierung, Pharmakokinetik, Löslichkeitsverbesserung und Adsorptionsstudien am Caco-2 Zellmodell.
Dissertation, Marburg, 1997

Schempp, C. M.; Pelz, K.; Wittmer, A.; Schopf, E.; Simon, J.C.:

Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria.
The Lancet, **353**, 1999, 2129

- Schmatz, R.; Dick, C.:
Erfahrungen zum Auftreten und zur Bekämpfung der Johanniskraut-Rotwelke (*Colletotrichum gloeosporioides*) in Thüringen.
Drogenreport, **11**, 1998, 16-19
- Schmidt, U.; Harrer, G.; Kuhn, U.; Biller, A.:
Äquivalenzvergleich: Johanniskrautextrakt LoHyp57 vs. Fluoxetin-HCl.
Zeitschrift für Phytotherapie, **20**, 1999, 89-90
- Schmitz-Kretschmer, H. J.; Schippmann, U.:
Johanniskraut: Anbauempfehlungen und Qualitätsanforderungen.
Z Arzn Gew pfl, **3**, 1998, 36-50
- Schneider, G.:
Arzneidrogen
Wissenschaftsverlag Mannheim, 1991
- Schneider, M.; Marquard, R.:
Aufnahme und Akkumulation von Cadmium und weiterer Schwermetalle bei *Hypericum perforatum* L. und *Linum usitatissimum* L.
Z Arzn Gew pfl, **1**, 1996, 111-116
- Schulte, J.; Schaffner, W.; Büter, B.; Berger Büter, K.:
Kreuzungsexperimente mit verschiedenen Arten der Gattung *Hypericum*.
Z Arzn Gew pfl, **4**, 1999, 126-133
- Schütt, H.; Schulz, V.:
Monographie *Hypericum*
Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis.
Hrsg. Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H.; Schneider, G.:
5. Auflage, Band 5, Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg-New York, 1993
- Schütt, H.:
Morphologische, phytochemische und botanische Untersuchungen zur Selektion Hypericin-, Pseudohypericin- und flavonoidreicher *Hypericum perforatum* L. Stämme.
Dissertation, Marburg, 1996
- Simmen, U.; Schweitzer, C.; Burkard, W.; Schaffner, W.; Lundstrom, K.:
Hypericum perforatum L. inhibits the binding of μ - and δ -opioid receptor expressed with the Semliki Forest virus system.
Pharm Acta Helv, **73**, 1998, 53-56
- Southwell, I. A.; Campbell, M. H.:
Hypericin Content Variation in *Hypericum perforatum* L. in Australia.
Phytochemistry, **30** (Supplement), 1990, 475-478
- Sparrenberg, B.:
MAO-inhibitorische Eigenschaften von Hypericuminhaltsstoffen und Untersuchungen zur Analytik und Isolierung von Xanthonen aus *Hypericum perforatum* L.
Dissertation, Marburg, 1993

Steinhoff, B.:

Pflanzenextrakte in Arzneimitteln: neue Trends.
Pharm Ztg **141**, 1996, 3032-3035

Steinhoff, B.:

Standardisierung der Qualität von Johanniskrautdroge und -zubereitungen
Z Arzn Gew pfl., **3**, 1998, 63-66

Stevinson, C.; Ernst, E.:

Hypericum for depression - An update of the clinical evidence.
Neuropsy, **9**, 1999, 501-505

Stock, S.:

¹⁴C- Markierung und Pharmakokinetik von Naphthodianthronen aus *Hypericum perforatum* L. sowie Untersuchungen zur Analytik von Oleum Hyperici.
Dissertation, Marburg, 1992

Suzuki, O.; Katsumata, Y.; Oya, M.; Bladt, S.; Wagner, H.:

Inhibition of monoamine oxidase by hypericin.
Planta Med **50**, 1984, 272-274

Teufel-Mayer, R.; Gleitz, J.:

Effects of Long-Term-Administration of Hypericum Extracts on the Affinity and Density of the Central Serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptors.
Pharmacopsychiat, **30** (Supplement), 1997, 113-116

Trifunovic, S.; Vajs, V.; Macura, S.; Juranic, N.; Djarmati, Z.; Jankov, R.; Milosavljevic, S.:

Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum* L.
Phytochemistry, **49**, 1998, 1305-1310

Tschierch, A.:

Handbuch der Pharmakognosie, 2. Auflage, Band 1.3, 1933, 1292

Vandenbogaerde, A.L.; Kamuhabwa, A.; Delaey, E.; Himpens, B.E.; Merlevede, W.J.; de Witte, P.A.:

Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin.
J Photochem Photobio B, **45**, 1998, 87-94

Verrotta, L.; Appendino, G.; Jakupovic, J.; Bombardelli, E.:

Hyperforin analogues from St. John's wort.
J Nat Prod, **63**, 2000, 412-415

Volz, H. P.:

Controlled clinical trials of hypericum extracts in depressed patients - an overview.
Pharmacopsychiat., **30** (Supplement), 1997, 72-76, Review

Vorbach, E. U.; Arnoldt, K. H.; Hubner, W. D.:

Efficacy and tolerability of St. John's wort extract LI 160 versus imipramine in patients with severe depressive episodes according to ICD-10.
Pharmacopsychiat., **30** (Supplement), 1997, 81-85

Wheatley, D.:

LI 160, an extract of St. John's wort, versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients-a controlled 6-week clinical trial.

Pharmacopsychiat., **30** (Supplement), 1997, 77-80

Wichtl, M

Teedrogen und Phytopharmaka

3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1997, 309-312

Yamashita, N.; Tanemura, H.; Kawanishi, S.:

Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II).

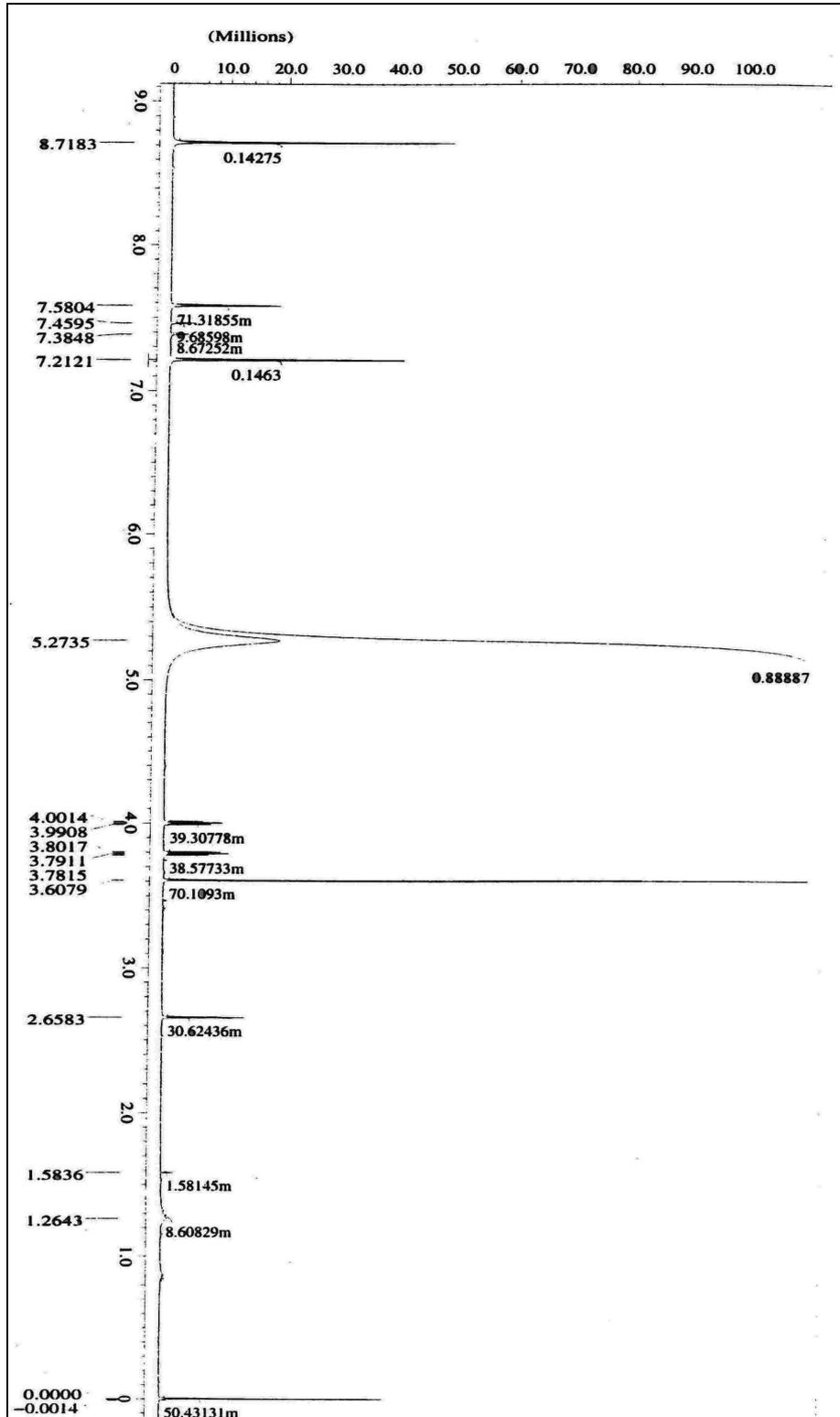
Mutation Research, **425**, 1999, 107-115

Zhang, W.; Law, R. E.; Hinton, D. R.; Couldwell, W. T.:

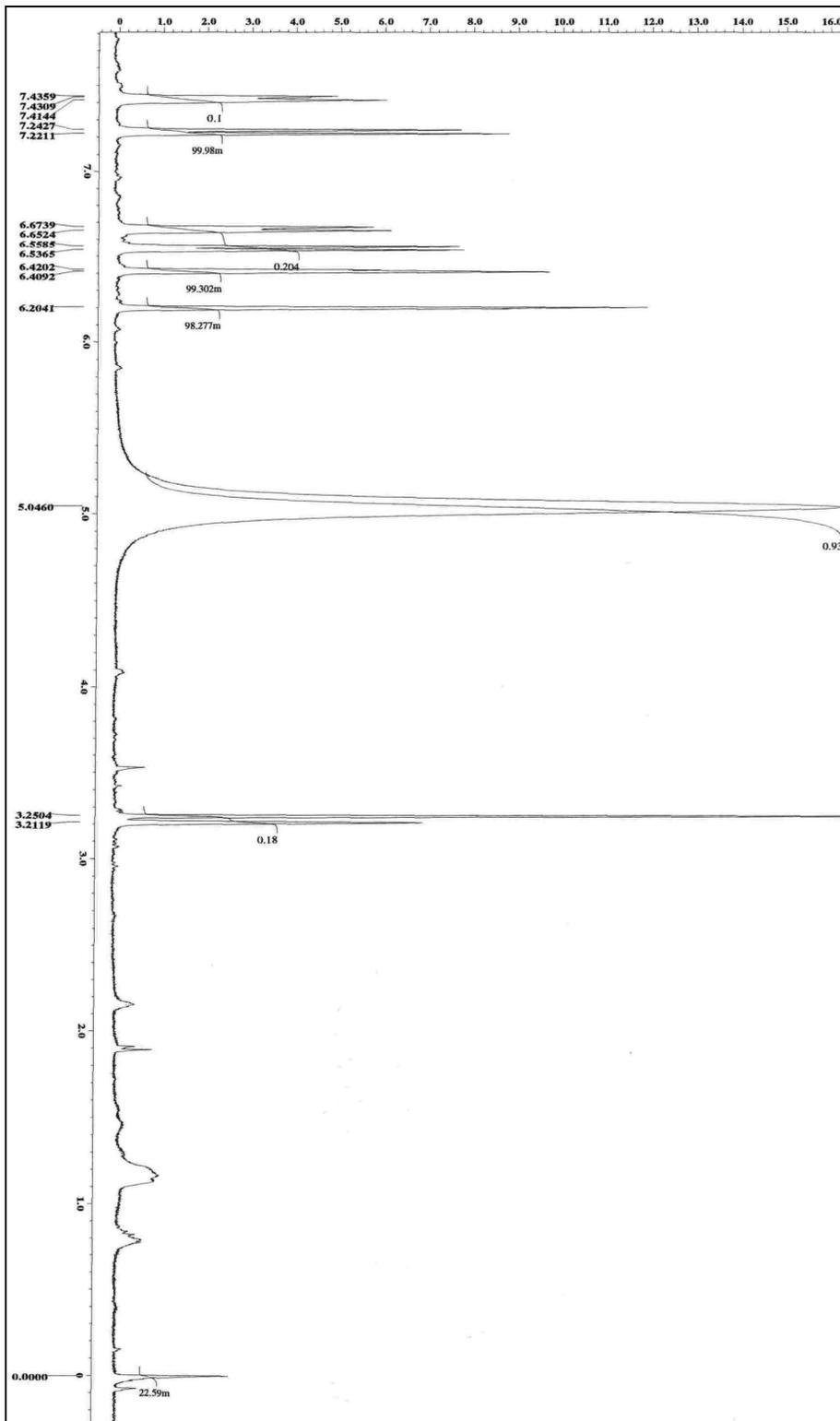
Inhibition of human malignant glioma cells motility and invasion in vitro by hypericin, a potent protein kinase C inhibitor

Cancer Letters 1, **20**, 1997, 31-38

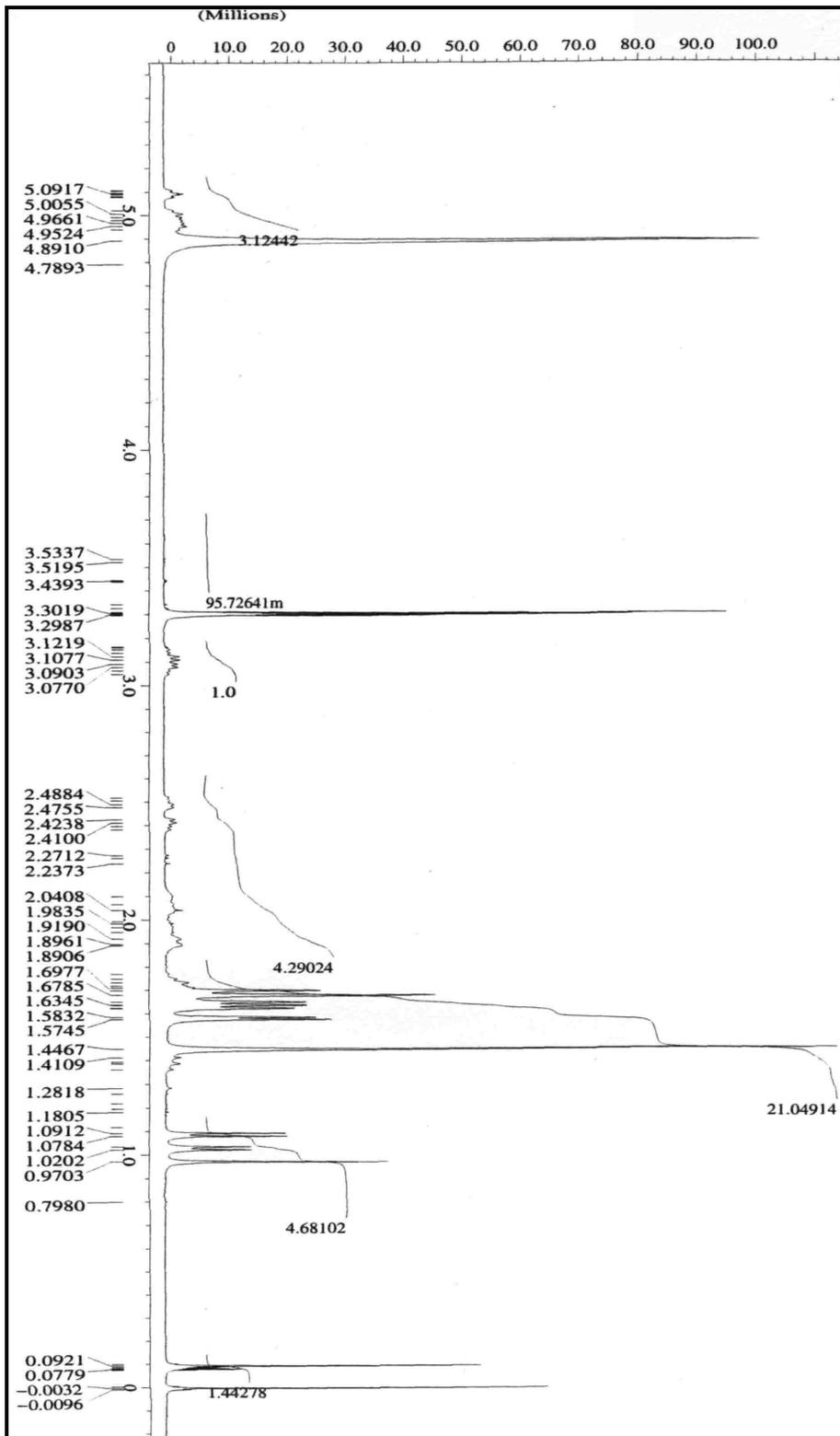
10 Anhang



Grafik 10-1 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Hypericin in Pyridin-d_5 , 500 MHz, δ -Skala in ppm (Eichung gegen TMS)



Grafik 10-2 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 13,118-Biapigenin in Methanol- d_4 , 400 MHz, δ -Skala in ppm (Eichung gegen TMS)



Grafik 10-3 ^1H -NMR-Spektrum von Hyperforin in $\text{Methanol-}d_4$, 400 MHz, δ -Skala in ppm (Eichung gegen TMS)

Ergebnisse der chemischen Bestimmungen des Anbaujahres 1998

Probe	Pseudohypericin [%]	Hypericin [%]	Hyperforin [%]	Verhältnis von Hypericin zu Pseudohypericin
001/98	0,144	0,083	1,849	0,579
002/98	0,152	0,088	1,904	0,578
003/98	0,066	0,065	0,982	0,985
004/98	0,102	0,063	1,488	0,625
005/98	0,106	0,054	1,312	0,510
007/98	0,134	0,069	1,472	0,516
008/98	0,131	0,048	1,709	0,364
010/98	0,048	0,017	0,870	0,348
011/98	0,077	0,015	0,068	0,197
012/98	0,032	0,015	0,335	0,481
013/98	0,034	0,020	0,421	0,601
014/98	0,063	0,055	0,294	0,871
015/98	0,036	0,023	0,506	0,638
016/98	0,057	0,047	0,415	0,825
018/98	0,016	0,013	0,326	0,808
019/98	0,026	0,010	0,364	0,408
021/98	0,049	0,030	1,126	0,612
026/98	0,029	0,025	1,160	0,839
029/98	0,088	0,049	1,602	0,562
032/98	0,128	0,061	2,273	0,475
034/98	0,143	0,054	1,051	0,382
035/98	0,097	0,053	0,756	0,542
036/98	0,167	0,044	0,084	0,266
037/98	0,119	0,067	0,829	0,565
039/98	0,142	0,026	0,373	0,180
040/98	0,097	0,025	0,000	0,252
041/98	0,140	0,025	0,034	0,181
053/98	0,112	0,041	1,458	0,370
056/98	0,050	0,022	0,695	0,434
058/98	0,097	0,032	1,339	0,327
059/98	0,068	0,014	0,000	0,210
060/98	0,085	0,011	0,186	0,126
061/98	0,125	0,058	1,345	0,459
062/98	0,171	0,122	0,903	0,714
063/98	0,193	0,042	0,161	0,216
064/98	0,156	0,091	1,247	0,585
065/98	0,130	0,075	1,087	0,580
066/98	0,122	0,040	1,626	0,325
067/98	0,079	0,029	1,237	0,367
068/98	0,104	0,057	1,040	0,547
069/98	0,069	0,038	0,787	0,553
070/98	0,163	0,106	1,725	0,653

Tabelle 10-1 Einzelergebnisse der chemischen Bestimmungen 1998

Probe	Pseudohypericin [%]	Hypericin [%]	Hyperforin [%]	Verhältnis von Hypericin zu Pseudohypericin
073/98	0,063	0,026	0,580	0,415
077/98	0,105	0,034	0,020	0,325
078/98	0,048	0,031	0,541	0,655
085/98	0,171	0,126	1,425	0,740
086/98	0,171	0,043	1,077	0,252
088/98	0,156	0,097	1,766	0,624
089/98	0,141	0,105	2,366	0,743
098/98	0,143	0,053	1,519	0,368
099/98	0,135	0,081	1,813	0,600
100/98	0,118	0,085	1,450	0,724
102/98	0,184	0,072	1,225	0,391
103/98	0,119	0,044	1,328	0,375
104/98	0,095	0,031	1,598	0,328
105/98	0,076	0,029	0,777	0,378
107/98	0,084	0,158	1,900	1,886
108/98	0,062	0,024	0,616	0,392
109/98	0,107	0,050	0,628	0,469

Fortsetzung Tabelle 10-1

Rutingehalte der Herkünfte in%, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	0	0	0,591		0	0
2	0	0	0,488		0	0
3	0	0			0	0
4	0	0			0	0
5	0	0			0	0
6	0	0			0	0
7	0	0			0	0
8	0	0			0	0,451
9	0	0			0	0,401
10	0	0	0,600		0	0
11	0	0	0,747		0	0
12	0	0		0,109	0	0
13	0	0		0,106	0	0
14	0	0		0,190	0	0
15	0	0	0,721	0,261	0	0
16	0	0	0,743	0,667	0	0,172
17	0	0	0,513	0,321	0	0,660
18	0	0	0,506		0	0,461
19	0	0	0,491	0,282	0	0
20	0	0		0,201	0	0
21	0	0			0	0
22	0	0	0,686	0,471	0	0
23	0	0		0,425	0	0
24	0	0	0,143	0,313	0	0
25	0	0	0,255	0,410	0	0
26	0	0		0,332	0	0
27	0	0	0,692	0,456	0	0,423
28	0	0		0,384	0	0
29	0	0	0,642	0,389	0	0
30	0	0	0,734		0	0,378
31	0	0		0,421	0	0
32	0	0		0,344	0	0
33	0	0	0,782	0,322	0	0
34	0	0		0,353	0	0,371
35	0	0		0,203	0	0
36	0	0		0,387	0	0
37	0	0		0,408	0	0
38	0	0		0,406	0	0,485

Tabelle 10-2 Rutingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

Hyperosidgehalte der Herkünfte in %, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	0,950	0,850	0,570		0,630	0,300
2		0,992	0,440		0,920	
3		1,222			0,610	0,370
4	1,250	1,091			0,460	
5		1,425			0,590	0,530
6	1,210	0,962			0,660	0,530
7		0,545			0,600	
8	0,920	0,913			0,840	0,380
9		0,909			0,840	0,380
10	0,980	0,969	0,560		0,720	0,250
11	0,980	1,083	0,740		0,700	0,240
12	1,060	1,058		0,22	0,910	0,450
13	1,020	0,971		0,22	1,030	0,490
14	1,040	1,108	0,600	0,53	0,740	0,480
15	0,630	1,000	0,710	0,49	0,690	0,490
16	1,060	0,986	0,750	1,28	0,420	0,340
17	0,860	0,966	0,600	0,48	0,900	0,390
18	0,960	0,662	0,570		0,930	0,260
19	0,810	1,146	0,580	0,51	0,850	0,330
20		0,920		0,49	0,910	0,410
21		1,061			0,860	0,500
22	0,820	0,870	0,910	0,88	0,740	0,540
23	0,770	0,780		0,88	0,840	0,540
24	0,460		0,140	0,69	0,810	0,360
25		0,905	0,330	0,82	0,360	0,270
26		0,998		0,62	0,860	0,690
27	1,050	0,985	0,890	0,97	0,820	0,260
28	1,050	0,954		0,89	0,680	0,520
29	0,900	0,936	0,790	0,89	0,710	0,450
30		0,739	1,000		0,760	0,250
31		1,112		0,93		0,430
32		1,029		0,88		
33	0,990	1,030	1,080	0,82		0,370
34	0,750	1,079		0,88		0,340
35	0,910	1,041		0,43		0,000
36	1,100	1,068		0,89		0,000
37	1,070	0,811		0,93		0,000
38	0,840	0,902		0,84		0,370

Tabelle 10-3 Hyperosidgehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

Isoquercitringehalte der Herkünfte in %, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	0,360	0,504	0,465		0,289	0,132
2		0,584	0,340		0,434	
3		0,663			0,288	0,171
4	0,528	0,632			0,487	
5		0,805			0,284	0,280
6	0,430	0,566			0,315	0,220
7		0,350			0,265	
8	0,364	0,477			0,379	0,182
9		0,465			0,425	0,150
10	0,366	0,510	0,466		0,384	0,140
11	0,361	0,537	0,609		0,395	0,116
12	0,357	0,605		0,119	0,430	0,218
13	0,490	0,518		0,152	0,537	0,236
14	0,443	0,591	0,772	0,264	0,373	0,230
15	0,215	0,562	0,545	0,245	0,330	0,212
16	0,670	0,616	0,590	0,628	0,228	0,172
17	0,480	0,580	0,494	0,193	0,473	0,160
18	0,454	0,482	0,469		0,514	0,114
19	0,603	0,606	0,475	0,229	0,450	0,158
20		0,618		0,228	0,446	0,165
21		0,665			0,422	0,227
22	0,566	0,615	0,751	0,410	0,374	0,287
23	0,600	0,560		0,451	0,387	0,242
24	0,374		0,130	0,290	0,377	0,156
25		0,509	0,308	0,579	0,187	0,121
26		0,523		0,295	0,407	0,364
27	0,401	0,529	0,718	0,458	0,391	0,107
28	0,403	0,508		0,512	0,323	0,256
29	0,321	0,514	0,679	0,427	0,333	0,225
30		0,442	0,825		0,395	0,116
31		0,743		0,473		0,225
32		0,701		0,433		
33	0,404	0,719	0,906	0,413		0,159
34	0,382	0,714		0,391		0,145
35	0,678	0,732		0,227		0,000
36	0,480	0,805		0,445		0,000
37	0,680	0,622		0,504		0,000
38	0,370	0,663		0,432		0,178

Tabelle 10-4 Isoquercitringehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

Quercitringehalte der Herkünfte in %, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	0,726	0,798	0,114		0,619	0,029
2		0,646	0,084		0,846	
3		0,904			0,506	0,042
4	0,507	0,989			0,447	
5		1,111			0,545	0,039
6	0,386	0,920			0,523	0,039
7		0,557			0,643	
8	0,328	0,850			0,796	0,114
9		0,838			0,659	0,107
10	0,341	0,853	0,098		0,695	0,020
11	0,566	0,995	0,132		0,651	0,015
12	0,100	0,823		0,116	0,745	0,032
13	0,749	0,834		0,341	0,694	0,028
14	0,107	1,059	0,100	0,291	0,676	0,031
15	0,229	0,896	0,126	0,358	0,567	0,028
16	0,424	0,972	0,121	0,864	0,341	0,059
17	0,430	0,957	0,121	0,865	0,332	0,060
18	1,010	0,691	0,100		0,784	0,131
19	0,569	0,966	0,107	0,379	0,709	0,015
20		0,786		0,350	0,783	0,022
21		1,200			0,741	0,020
22	0,414	0,872	0,151	0,595	0,553	0,023
23	0,122	0,699		0,546	0,673	0,027
24	0,234		0,023	0,431	0,685	0,026
25		0,796	0,073	0,531	0,264	0,012
26		1,019		0,469	0,762	0,034
27	0,401	0,971	0,160	0,695	0,709	0,097
28	0,458	0,907		0,666	0,565	0,046
29	0,321	0,910	0,160	0,524	0,565	0,043
30		0,667	0,178		0,641	0,133
31		1,047		0,633		0,027
32		0,972		0,467		
33	0,881	1,050	0,232	0,417		0,050
34	0,675	0,988		0,542		0,122
35	0,111	1,170		0,242		0,000
36	0,817	1,126		0,527		0,000
37	0,524	0,848		0,520		0,000
38	0,766	0,957		0,636		0,074

Tabelle 10-5 Quercitringehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

Quercetingehalte der Herkünfte in %, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	0,023	0,043	0,125		0,033	0,088
2		0,046	0,106		0,051	
3		0,049			0,038	0,124
4	0,042	0,052			0,033	
5		0,050			0,041	0,147
6	0,049	0,031			0,054	0,139
7		0,026			0,043	
8	0,041	0,047			0,052	0,084
9		0,044			0,072	0,095
10	0,034	0,055	0,091		0,044	0,056
11	0,049	0,051	0,099		0,055	0,073
12	0,021	0,046		0,024	0,068	0,127
13	0,037	0,047		0,080	0,094	0,090
14	0,037	0,047	0,184	0,060	0,054	0,098
15	0,024	0,057	0,125	0,049	0,057	0,126
16	0,056	0,049	0,122	0,106	0,024	0,098
17	0,022	0,050	0,145	0,087	0,050	0,077
18	0,022	0,035	0,136		0,064	0,066
19	0,032	0,055	0,139	0,045	0,057	0,050
20		0,060		0,085	0,047	0,062
21		0,044			0,048	0,062
22	0,033	0,050	0,047	0,098	0,030	0,070
23	0,032	0,035		0,129	0,043	0,113
24	0,015		0,029	0,048	0,053	0,109
25		0,040	0,112	0,090	0,027	0,042
26		0,034		0,058	0,053	0,102
27	0,051	0,040	0,068	0,103	0,050	0,096
28	0,043	0,045		0,198	0,046	0,118
29	0,037	0,042	0,071	0,098	0,047	0,124
30		0,037	0,134		0,053	0,085
31		0,056		0,117		0,092
32		0,050		0,179		
33	0,037	0,043	0,117	0,117		0,159
34	0,046	0,059		0,102		0,107
35	0,038	0,046		0,053		0,000
36	0,031	0,045		0,115		0,000
37	0,038	0,035		0,125		0,000
38	0,029	0,038		0,080		0,070

Tabelle 10-6 Quercetingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

I3, II8-Biapigeningehalte der Herkünfte in %, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	0,093	0,192	0,090		0,082	0,040
2		0,265	0,066		0,137	
3		0,264			0,096	0,066
4	0,149	0,275			0,088	
5		0,293			0,111	0,072
6	0,247	0,179			0,130	0,035
7		0,150			0,106	
8	0,229	0,214			0,121	0,109
9		0,212			0,181	0,086
10	0,100	0,264	0,063		0,153	0,029
11	0,079	0,212	0,084		0,123	0,025
12	0,054	0,244		0,049	0,143	0,038
13	0,184	0,241		0,233	0,206	0,031
14	0,184	0,240	0,133	0,218	0,141	0,058
15	0,123	0,269	0,072	0,131	0,145	0,055
16	0,031	0,163	0,084	0,335	0,093	0,084
17	0,259	0,168	0,059	0,200	0,180	0,110
18	0,033	0,149	0,108		0,217	0,103
19	0,138	0,238	0,110	0,121	0,195	0,035
20		0,211		0,186	0,146	0,038
21		0,193			0,144	0,044
22	0,127	0,235	0,189	0,224	0,116	0,043
23	0,116	0,213		0,271	0,123	0,050
24	0,115		0,024	0,206	0,108	0,042
25		0,209	0,094	0,262	0,059	0,018
26		0,205		0,191	0,132	0,055
27	0,198	0,206	0,181	0,317	0,122	0,094
28	0,203	0,202		0,300	0,101	0,059
29	0,138	0,210	0,163	0,239	0,094	0,045
30		0,158	0,242		0,109	0,125
31		0,279		0,265		0,047
32		0,220		0,254		
33	0,153	0,228	0,299	0,238		0,057
34	0,115	0,249		0,267		0,120
35	0,194	0,215		0,154		0,000
36	0,145	0,248		0,283		0,000
37	0,234	0,179		0,278		0,000
38	0,097	0,209		0,273		0,076

Tabelle 10-7 I3, II8-Biapigeningehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

Pseudohypericingehalte der Herkünfte in %, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	0,029	0,036	0,045		0,094	0,031
2		0,088	0,034		0,139	
3		0,078			0,088	0,035
4	0,068	0,059			0,069	
5		0,083			0,075	0,040
6	0,095	0,058			0,087	0,023
7		0,041			0,067	
8	0,112	0,038			0,095	0,054
9		0,035			0,124	0,074
10	0,091	0,042	0,039		0,103	0,028
11	0,030	0,044	0,047		0,086	0,021
12	0,055	0,048		0,023	0,095	0,036
13	0,064	0,096		0,053	0,116	0,031
14	0,084	0,084	0,048	0,088	0,126	0,036
15	0,059	0,083	0,034	0,039	0,095	0,033
16	0,156	0,071	0,036	0,092	0,214	0,041
17	0,079	0,064	0,045	0,058	0,199	0,087
18	0,037	0,069	0,042		0,209	0,080
19	0,050	0,080	0,043	0,034	0,201	0,024
20		0,062		0,061	0,159	0,040
21		0,082			0,170	0,034
22	0,107	0,084	0,062	0,053	0,121	0,038
23	0,076	0,080		0,073	0,141	0,037
24	0,069		0,037	0,070	0,138	0,033
25		0,091	0,082	0,065	0,077	0,021
26		0,081		0,058	0,162	0,052
27	0,106	0,079	0,160	0,082	0,149	0,066
28	0,159	0,081		0,069	0,115	0,051
29	0,053	0,083	0,154	0,075	0,127	0,039
30		0,046	0,169		0,133	0,086
31		0,082		0,075		0,037
32		0,083		0,072		
33	0,078	0,080	0,250	0,071		0,040
34	0,059	0,086		0,076		0,078
35	0,081	0,073		0,043		0,057
36	0,054	0,104		0,082		0,077
37	0,135	0,083		0,080		0,049
38	0,046	0,086		0,083		0,058

Tabelle 10-8 Pseudohypericingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

Hypericingehalte der der Herkünfte in %, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	0,036	0,046	0,051		0,074	0,007
2		0,111	0,033		0,111	
3		0,103			0,068	0,010
4	0,064	0,083			0,057	
5		0,108			0,065	0,019
6	0,084	0,075			0,077	0,010
7		0,053			0,056	
8	0,099	0,057			0,073	0,035
9		0,053			0,098	0,044
10	0,084	0,059	0,042		0,091	0,006
11	0,031	0,061	0,049		0,075	0,004
12	0,052	0,072		0,048	0,075	0,006
13	0,045	0,126		0,123	0,093	0,005
14	0,075	0,110	0,057	0,126	0,089	0,011
15	0,053	0,117	0,039	0,079	0,081	0,006
16	0,126	0,099	0,040	0,205	0,159	0,018
17	0,076	0,091	0,046	0,090	0,151	0,057
18	0,039	0,095	0,044		0,163	0,053
19	0,049	0,114	0,049	0,062	0,155	0,006
20		0,091		0,095	0,118	0,010
21		0,102			0,125	0,009
22	0,073	0,116	0,055	0,119	0,100	0,009
23	0,075	0,107		0,167	0,108	0,008
24	0,057		0,035	0,123	0,110	0,006
25		0,104	0,076	0,150	0,062	0,006
26		0,117		0,110	0,134	0,012
27	0,101	0,110	0,126	0,196	0,127	0,038
28	0,136	0,116		0,158	0,096	0,013
29	0,053	0,114	0,135	0,180	0,108	0,012
30		0,067	0,148		0,114	0,059
31		0,118		0,180		0,009
32		0,109		0,187		
33	0,074	0,112	0,212	0,179		0,007
34	0,049	0,116		0,175		0,048
35	0,087	0,100		0,114		0,013
36	0,052	0,130		0,196		0,044
37	0,116	0,097		0,197		0,013
38	0,046	0,107		0,188		0,036

Tabelle 10-9 Hypericingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

Hyperforingehalte der Herkünfte in %, bezogen auf die Trockenmasse

Pflanze Nr.	Herkunft 1 [%]	Herkunft 2 [%]	Herkunft 5 [%]	Herkunft 6 [%]	Herkunft 7 [%]	Herkunft 10 [%]
1	1,414	0,647	1,088		2,580	0,230
2		1,598	0,637		2,320	
3		2,114			2,600	0,320
4	1,445	1,848			1,070	
5		2,124			1,510	0,160
6	2,601	1,523			1,770	1,290
7		0,742			1,170	
8	1,526	1,576			1,910	0,160
9		1,509			2,200	1,000
10	1,486	1,525	1,055		1,600	0,160
11	2,318	1,456	1,109		1,860	0,160
12	1,210	1,448		2,250	2,530	0,130
13	1,779	1,731		2,250	3,050	0,150
14	1,222	1,817	0,988	2,380	2,530	0,260
15	0,867	1,901	1,203	1,480	2,320	0,120
16	2,391	1,991	1,123	2,590	0,750	0,690
17	1,253	1,815	1,705	1,780	1,900	1,690
18	1,658	1,274	1,634		2,360	1,470
19	1,645	2,095	1,860	1,850	2,120	0,110
20		2,114		1,630	2,220	0,230
21		1,616			2,380	0,160
22	2,273	1,363	0,906	2,490	1,860	0,130
23	1,155	1,417		2,990	2,310	0,240
24	0,982		0,306	1,520	2,770	0,140
25		1,452	1,812	2,850	1,240	0,090
26		1,528		1,290	2,650	0,260
27	2,281	1,599	1,567	1,520	2,740	0,150
28	2,238	1,683		3,110	2,460	0,230
29	1,844	1,679	0,974	3,590	3,050	0,160
30		1,200	1,514		2,780	1,270
31		1,732		3,200		0,150
32		1,802		3,640		
33	2,208	1,826	1,560	3,880		0,200
34	1,639	1,977		2,650		1,110
35	1,507	1,750		1,480		0,240
36	1,833	1,822		2,510		0,920
37	1,523	1,370		3,290		0,220
38	1,371	1,690		2,170		0,670

Tabelle 10-10 Hyperforingehalte der Einzelpflanzen sortiert nach Herkünften

Danke !!!

Mein Dank gilt all jenen, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht hätte entstehen können.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Biologie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit in der Betreuung der Praktika und Exkursionen.

Herrn Privatdozenten Dr Hanns Häberlein danke ich für die vielen fachliche Gespräche und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung und Planung der analytisch-präparativen Arbeiten.

Herrn Gartenmeister W. Rudl danke ich für die sorgfältige und bestimmt nicht immer einfache Anzucht und Pflege des Sortimentes.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich den Mitarbeitern der NMR-Abteilung Frau H. Lang und Herrn U. Grundey.

Frau Dr. G. Laufenberg, Frau N. Zitzer sowie Frau B. Reitz bin ich für die Aufnahmen der Massenspektren zu Dank verpflichtet.

Der Firma Bionorica Arzneimittel GmbH danke ich für die mir gewährte finanzielle Unterstützung und großzügige Hilfe, namentlich Frau Priv. Doz. Dr. Dr. Abel für ihr Engagement und Betreuung, Frau Dipl Agr. Ing. Irina Göhler für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Versuchsanbauten sowie der Beratung zu den statistischen Untersuchungen und Frau Barbara Lederer für die Durchführung der Bonitierungsarbeiten.

Frau Christa Lein vom Institut für Pflanzenernährung und Pflanzenphysiologie der Justus-Liebig Universität in Gießen danke ich für die praktische Einweisung zur Etablierung von Zellkulturen aus *Hypericum perforatum* L.

Frau Apothekerin Dr. Katharina Vogelsang sowie Herrn Apotheker Oliver Hegener danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und wohlmeinende Kritik.

Meiner Frau Anabel danke ich für ihre unendliche Geduld und Hilfe.