

Schlussbericht

zu Nr. 3.2 BNBest-BMBF 98

Zuwendungsempfänger: Hochschule Anhalt (FH) Kanzler Bernburger Str. 55 06366 Köthen	Förderkennzeichen: 03i0617C
---	------------------------------------

Vorhabensbezeichnung:

InnoRegio InnoPlanta – Verbundprojekt – Calendula – Teilprojekt 3
„Entwicklung von Analysenmethoden“

Projektleiter: Prof. Dr. rer. nat. I. Schellenberg	Bearbeiter: Dipl.-oec.troph. (FH) J. Richter Dipl.-oec.troph. (FH) D. Franz
---	---

Laufzeit des Vorhabens:

16.06.2002 bis 15.12.2002 sowie 01.06.2003 bis 31.12.2003

Berichtszeitraum:

16.06.2002 bis 15.12.2002 sowie 01.06.2003 bis 31.12.2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	3
1 Aufgabenstellung.....	4
2 Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens.....	4
3 Planung und Ablauf des Vorhabens.....	5
4 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde.....	5
5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	5
6 Ergebnisse.....	6
6.1 Bestimmung des Fettsäuremusters von Calendula-Samenölen.....	6
6.1.1 Aufgabenstellung.....	6
6.1.2 Material und Methoden.....	6
6.1.2.1 Material.....	6
6.1.2.1.1 Calendula-Samenöle.....	6
6.1.2.1.2 Referenzsubstanzen.....	6
6.1.2.2 Methoden.....	7
6.1.2.2.1 Vorgehensweise.....	7
6.1.2.2.2 Methode zur Fett-Verseifung.....	8
6.1.2.2.3 Gaschromatographische Bestimmung.....	8
6.1.2.2.4 Validierung.....	8
6.1.3 Ergebnisse und Auswertung.....	10
6.2 Bestimmung des Flavonoide von Calendula-Samenölen.....	18
6.2.1 Aufgabenstellung.....	18
6.2.2 Material und Methoden.....	18
6.2.2.1 Material.....	18
6.2.2.1.1 Calendula-Samenöle.....	18
6.2.2.1.2 Referenzsubstanzen.....	18
6.2.2.2 Methoden.....	18
6.2.2.2.1 Zugrundegelegte Erkenntnisse.....	18
6.2.2.2.2 Aufbau und Etablierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung der Flavonoide in Calendula-Samenöl.....	19
6.2.2.2.3 Aufbau und Etablierung einer LC/MS-Methode zur Bestimmung der Flavonoide in Calendula-Öl.....	20
6.2.2.2.4 Aufbau und Etablierung einer SPE-Methode zur Extraktion von Flavonoiden aus Öl.....	22
6.2.3 Ergebnisse und Auswertung.....	24
7 Voraussichtlicher Nutzen.....	27
8 Während der Laufzeit bekannt gewordener Fortschritt.....	27
9 Veröffentlichungen.....	27
Literatur.....	28
Anlagenverzeichnis.....	30

Abkürzungsverzeichnis

MW	Mittelwert
s	Standardabweichung
RSD	Relative Standardabweichung, Variationskoeffizient
GC	Gaschromatographie
SPE	Solid Phase Extraktion, Festphasenextraktion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
LC/MS	Liquid Chromatography / Mass Spectrometry Flüssigchromatographie / Massenspektrometrie
MG	Molekulargewicht

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Gehalte an Ölsäure, Linolsäure und Calendulasäure, sowie die Summe der drei Fettsäuren	13
Abb. 2:	Gegenüberstellung der Gehalte an Calendulasäure aus dem Jahr 2002...	13
Abb. 3:	Vergleich der ermittelten Calendulasäuregehalte der Calendula-Samenöle sofort und nach 1 Jahr Lagerung.....	15
Abb. 4:	Gegenüberstellung der Gehalte an Calendulasäure aus dem Jahr 2003...	17
Abb. 5:	HPLC-Trennung der Standardsubstanzen	20
Abb. 6:	LC/MS-Chromatogramm der Standardsubstanzen.....	21
Abb. 7:	Massenspektrum von Narcissin.....	21
Abb. 8:	Flavonidgehalte nach Standardaddition bei SPE mit bzw. ohne Waschen mit Hexan/Ethylacetat (9:1, v/v) (MW, n=3)	23
Abb. 9:	Chromatogramm einer Calendula-Blüte	25

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammensetzung Standardmix für 37 Fettsäuremethylester	6
Tab. 2:	Bestimmung der Relativen Standardabweichung (%) bei 8 GC-Analysen einer Calendula-Ölprobe	9
Tab. 3:	Bestimmung der Relativen Standardabweichung (%) bei 6 GC-Analysen einer Calendula-Ölprobe, GC-Analyse noch am Tag der Verseifung	9
Tab. 4:	Fettsäurezusammensetzung von Calendula-Ölen aus dem Anbaujahr 2002	10
Tab. 5:	Gegenüberstellung der Gehalte an Ölsäure, Linolsäure und Calendulasäure	12
Tab. 6:	Abweichung der Fettsäuregehalte nach 1 Jahr Lagerung (in %).....	14
Tab. 7:	Fettsäurezusammensetzung von Calendula-Ölen aus dem Anbaujahr 2003	15
Tab. 8:	Tune Parameter.....	20
Tab. 9:	Typische Fragmente der Flavonoide	22
Tab. 10:	Wiederfindungsraten von Standardsubstanzen verschiedener SPE-Phasen	23
Tab. 11:	Identifizierte Flavonoide der Calendula-Blüten	25
Tab. 12:	Ermittelte Flavonidgehalte in den Calendula-Blüten (in g/100g).....	26

1 Aufgabenstellung

Die Ringelblume ist eine von Alters her genutzte Arzneipflanze. Zur Anwendung kommen bisher die Extrakte bzw. Auszüge der Blütenblätter. (ISAAC, 1992)

Ziel dieses Verbundprojektes war es, erstmals sowohl eine technologische Kette als auch ein optimiertes Material für die Nutzung des fetten Samenöles zu erarbeiten. Die Hochschule Anhalt (FH) trat in diesem Verbundprojekt als Projektpartner auf und begleitete die Sortenauswahl bzw. die Ölherstellungsprozesse durch analytische Untersuchungen. Die eingesetzten Analysenmethoden mussten dazu aufgebaut und optimiert werden.

Im Rahmen des Forschungsprojektes waren folgende analytische Fragestellungen zu bearbeiten:

- Arbeitsschwerpunkt 1

Ermittlung der qualitativen und quantitativen Fettsäurezusammensetzung des Calendula-Samenöls

Die angewandte Analysenmethodik sollte weiterhin validiert werden.

Die hierbei ermittelten Daten sollten im Rahmen des Gesamtprojektes

- der Charakterisierung der Sorten,
- der Sortenauswahl,
- der Qualitätsprüfung technologischer Fragestellungen,
- der Beurteilung der Effektivität der Verarbeitung dienen.

- Arbeitsschwerpunkt 2

Bestimmung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der im Calendula-Samenöl enthaltenen Flavonoide

Hierzu war zunächst der Aufbau und die Etablierung einer Analysenmethodik erforderlich.

Schließlich sollten auch die hierbei ermittelten Daten für die Beurteilung der unter Arbeitsschwerpunkt 1 genannten Punkte herangezogen werden.

2 Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens

In der Arbeitsgruppe Bioanalytik der Hochschule Anhalt (FH) liegen umfangreiche Erfahrungen auf dem Gebiet der Charakterisierung pflanzlicher Wirkstoffe sowie die dafür erforderliche instrumentelle Ausrüstung vor.

3 Planung und Ablauf des Vorhabens

In der Laufzeit des Projektes im Kalenderjahr 2002 erfolgte an der Hochschule Anhalt (FH) der Aufbau und die Validierung der erforderlichen Analysemethodik zur Bestimmung der qualitativen und quantitativen Fettsäurezusammensetzung des Calendula-Öls.

Mit der etablierten Methode wurden die im Rahmen des Forschungsprojektes anfallenden Calendula-Samenöle charakterisiert. Die ermittelten Daten dienen – neben anbaucharakteristischen und technologischen Merkmalen - zur Sortencharakterisierung und einer ersten Sortenauswahl.

Im Kalenderjahr 2003 wurden mit dieser Methode anhand der Öle aus dem Kalenderjahr 2002 Stabilitätsprüfungen der Fettsäurezusammensetzung durchgeführt. Weitere Öle wurden charakterisiert.

Ebenfalls im Kalenderjahr 2003 erfolgte der Aufbau und die Etablierung der erforderlichen Analysemethodik zur Bestimmung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der in den Calendula-Samenölen enthaltenen Flavonoide.

Anschließend wurden die zur Verfügung stehenden Öle auf ihre Flavonidgehalte und –zusammensetzungen untersucht.

4 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Es existieren Monographien für die Ringelblume und speziell auch für ihre Blüten (Arzneibücher). Zur Einarbeitung in Salben oder als Tee ist die Verwendung wässriger oder alkoholischer Auszüge beschrieben. Als Ringelblumenöl wird bisher ein mit pflanzlichen Fetten hergestellter Auszug aus Ringelblumenblüten bezeichnet. Bisher gibt es aber keine Zulassung für das aus den Früchten (16,5-26% Ölgehalt) der Ringelblume gewonnene Öl. Den Hauptbestandteil des Calendula-Samenöls stellt die Calendulasäure dar (50-60%). Weiterhin ist der hohe Anteil ungesättigter Fettsäuren zu bemerken. (ISAAC, 1992)

Eine Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung des Ringelblumenöls (Auszug) im Vergleich zu Olivenöl ergab für beide Öle im Crotonöltest am Mäuseohr einen dosisabhängigen antiödematösen Effekt, das Calendulaöl erwies sich dabei als wirksamer als Olivenöl. (ZITTERL-EGLESEER et al., 1997)

Flavonoide wurden in Calendula-Samenöl bisher nicht untersucht. Die Blütendroge enthält 0,25 bis 0,88 % Flavonoide. Dabei werden Isorhamnetin und Quercetin als Aglykone beschrieben. (ISAAC, 1992; BOHM und STUESSY, 2001)

5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Hochschule Anhalt (FH) tritt in diesem Projekt als Projektpartner auf. Die Laufzeit des Projektes ist für die Hochschule Anhalt mit dem Kalenderjahr 2003 abgeschlossen, jedoch nicht die des Gesamtprojektes. Ausführliche Daten der Gesamtergebnisse sind deshalb in den Berichten der Dr. Junghanns GmbH und der Biro GbR zu finden. Ebenfalls wird für die entsprechende Wertung der hier dargestellten Analyseergebnisse auf die beiden genannten Projektpartner verwiesen.

6 Ergebnisse

6.1 Bestimmung des Fettsäuremusters von Calendula-Samenölen

6.1.1 Aufgabenstellung

Es sollte die qualitative sowie quantitative Fettsäurezusammensetzung verschiedener Calendula-Samenöle bestimmt werden.

Unter besonderer Berücksichtigung der Gehalte an Calendulasäure und ω -6-Fettsäuren sollte eine Sortencharakterisierung sowie eine statistische Beurteilung der Fettsäurezusammensetzung in Abhängigkeit von Anbauverfahren und technologischer Ölherstellung vorgenommen werden.

Außerdem stand die Validierung der Analysemethoden zur Bestimmung der qualitativen und quantitativen Fettsäurezusammensetzung der Calendula-Samenöle zum Ziel.

6.1.2 Material und Methoden

6.1.2.1 Material

6.1.2.1.1 Calendula-Samenöle

Es standen im Kalenderjahr 2002 fünfzehn Calendula-Samenöle und im Kalenderjahr 2003 neun Calendula-Samenöle zur Bestimmung der Fettsäuremuster zur Verfügung.

6.1.2.1.2 Referenzsubstanzen

Für die gaschromatographische Identifizierung der Fettsäuren in Calendula-Samenölen kamen neben einem Standardmix (Supelco) (siehe Tab. 1) zur genauen Zuordnung auch einige Einzelstandards (Sigma) zum Einsatz:

Tab. 1: Zusammensetzung Standardmix für 37 Fettsäuremethylester

Fettsäuren des Standardmix (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco)		auch Einzelstandard (Sigma)
C4:0	Butansäuremethylester	
C6:0	Capronsäuremethylester	
C8:0	Caprylsäuremethylester	
C10:0	Caprinsäuremethylester	
C11:0	Undecansäuremethylester	
C12:0	Laurinsäuremethylester	
C13:0	Tridecansäuremethylester	
C14:0	Myristinsäuremethylester	
C14:1	Myristoleinsäuremethylester	
C15:0	Pentadecansäuremethylester	
C15:1	Cis-10-Pentadecensäuremethylester	
C16:0	Palmitinsäuremethylester	
C16:1	Palmitoleinsäuremethylester	
C17:0	Heptadecansäuremethylester	
C17:1	Cis-10-Heptadecensäuremethylester	
C18:0	Stearinsäuremethylester	
C18:1n9t	Elaidinsäuremethylester	X
C18:1n9c	Ölsäuremethylester	

Tab. 1, fortgeführt: Zusammensetzung Standardmix für 37 Fettsäuremethylester

Fettsäuren des Standardmix (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco)		auch Einzel- standard (Sigma)
C18:2n6t	Linolaidinsäuremethylester	X
C18:2n6c	Linolsäuremethylester	X
C18:3n6	γ -Linolensäuremethylester	X
C18:3n3	α -Linolensäuremethylester	X
C20:0	Arachinsäuremethylester	
C20:1	Cis-11-Eicosensäuremethylester	X
C20:2	Cis-11,14-Eicosadiensäuremethylester	
C20:3n6	Cis-8,11,14-Eicosatriensäuremethylester	X
C20:3n3	Cis-11,14,17-Eicosatriensäuremethylester	X
C20:4n6	Arachidonsäuremethylester	
C20:5n3	Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäuremethylester	X
C21:0	Heneicosansäuremethylester	X
C22:0	Behensäuremethylester	
C22:1n9	Erucasäuremethylester	
C22:2	Cis-13,16-Docosadiensäuremethylester	
C22:6n3	Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäuremethylester	X
C23:0	Tricosansäuremethylester	X
C24:0	Lignocerinsäuremethylester	
C24:1	Nervonsäuremethylester	X

6.1.2.2 Methoden

6.1.2.2.1 Vorgehensweise

Eine Fettextraktion war für die Calendula-Samenöle nicht notwendig, da es sich schon um eine reine Fettphase handelt. Vor der gaschromatographischen Bestimmung der Fettsäuren wurden die Öle jedoch verseift, um die Fettsäuren aus den im Öl vorliegenden Triglyzeriden abzuspalten und in ihre Methylester zu überführen. Diese Methylester besitzen gegenüber den freien Säuren eine für die Gaschromatographie erforderliche höhere Flüchtigkeit und Stabilität.

Die Identifizierung erfolgte dann gaschromatographisch mit Flammenionisationsdetektor. Quantifiziert wurde über die Area%-Methode, so konnte die relative Fettsäurezusammensetzung bestimmt werden.

6.1.2.2.2 Methode zur Fett-Verseifung

Es kam eine Kaltverseifung mit methanolischer Kalilauge zum Einsatz.

0,1g des Calendula-Samenöles wurden dazu in 10ml n-Heptan gelöst. Die Probelösung wurde mit 0,5ml methanolischer Kaliumhydroxidlösung (2mol/l) versetzt und 20s geschüttelt. Nach etwa 30 bis 60min hatte sich das Glycerin abgesetzt und die obere Phase wurde in ein Reagenzglas mit 2g Natriumsulfat überführt, geschüttelt und nochmals 30min stehen gelassen. Die überstehende Lösung wurde in ein Probengefäß überführt und bis zur gaschromatographischen Bestimmung bei -18°C verschlossen aufbewahrt.

Chemikalien: n-Heptan, p.A. (Carl Roth)
Methanol, p.A. (Carl Roth)
Kaliumhydroxid, p.A. (Carl Roth)
Natriumsulfat, p.A. (Carl Roth)

6.1.2.2.3 Gaschromatographische Bestimmung

Die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuremethylester erfolgte am HRGC 5300 Mega Series der Firma Carlo Erba Instruments mit Flammenionisationsdetektor an einer DB-23 Kapillarsäule der Firma J&W. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet.

Die Bedingungen zur Trennung der Fettsäuremethylester C6:0 bis C24:0 wurden wie folgt optimiert:

Temperaturprogramm: $40^{\circ}\text{C} \rightarrow 160^{\circ}\text{C}$ ($20^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
 $160^{\circ}\text{C} \rightarrow 170^{\circ}\text{C}$ ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
 $170^{\circ}\text{C} \rightarrow 220^{\circ}\text{C}$ ($2^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
Trägergas: Wasserstoff, 72 kPa Vordruck
Injektor: $1\mu\text{l}$, Split, 1:100
 260°C
Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)
 260°C

6.1.2.2.4 Validierung

Da mit der beschriebenen Methode eine Area%-Auswertung stattfindet, ist eine Kalibrierkurve nicht erforderlich. Dementsprechend sind auch Validierungsparameter, die sich auf die Auswertung der Kalibration beziehen, nicht direkt möglich (z.B. Bestimmung der Nachweisgrenze).

Die Validierung der Methode zur gaschromatographischen Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Calendula-Samenöle beschränkte sich daher auf die Ermittlung des Variationskoeffizienten bzw. der Relativen Standardabweichung (RSD, in %). Dies ist auch für die Aufgabenstellung völlig ausreichend.

Dazu wurde das Calendula-Samenöl der Kontrollprobe 0 des Anbaujahres 2002 insgesamt vier Mal aufgearbeitet, d.h. verseift. Von jeder dieser vier Verseifungslösungen (a, b, c, d) wurden wiederum jeweils zwei gaschromatographische Bestimmungen (a1, a2, b1, b2, c1, c2, d1, d2) der Fettsäurezusammensetzung durchgeführt.

Die Verseifungen wurden außerdem an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Die analytische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung erfolgte dann sechs Mal noch am Tag der Aufarbeitung und bei 2 Proben zusätzlich noch nach 2 Monaten Lagerung bei -18°C .

Aus den Werten dieser insgesamt 8 GC-Analysen ein und der selben Calendula-Ölprobe wurden dann für jede der detektierbaren Fettsäuren die Relativen Standardabweichungen bestimmt. Die Ergebnisse der Ermittlung dieses Validierungsparameters sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 2).

Tab. 2: Bestimmung der Relativen Standardabweichung (%) bei 8 GC-Analysen einer Calendula-Ölprobe

Probe		Fettsäureanteil in %								
		C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3c	C20:0	C20:1n9c	C18:3 8t10t12c	C22 :1n9c
0	a1	2,828	1,517	2,661	26,076	0,639	0,344	0,229	63,835	1,871
	a2	2,882	1,552	2,572	26,190	0,640	0,350	0,227	62,878	2,710
	b1	2,824	1,520	2,713	26,099	0,626	0,343	0,229	63,873	1,808
	b2	2,867	1,556	2,570	26,244	0,647	0,314	0,232	62,860	2,710
	c1	2,852	1,526	2,632	26,116	0,632	0,340	0,227	63,493	2,182
	c2	2,867	1,555	2,655	26,197	0,636	0,353	0,232	63,540	1,965
	d1	2,860	1,546	2,510	26,086	0,633	0,341	0,234	63,740	2,050
	d2	2,833	1,519	2,389	25,913	0,626	0,346	0,229	64,175	1,972
	MW	2,852	1,536	2,588	26,115	0,635	0,341	0,230	63,549	2,159
	s	0,021	0,017	0,103	0,102	0,007	0,012	0,003	0,470	0,358
	RSD	0,742	1,133	3,964	0,389	1,131	3,487	1,101	0,739	16,597

Die Variationskoeffizienten (RSD, in %) bewegen sich für alle detektierbaren Fettsäuren in einem Bereich zwischen 0,3% und 16,6%.

Der höchste Variationskoeffizient wurde mit 16,6% für die Erucasäure (C22:1n9c) ermittelt. Die hohen Schwankungen sind hierbei jedoch vor allem auf die 2 Messungen nach 2 Monaten Lagerung (a2 und b2) zurückzuführen, bei denen der Erucasäuregehalt gegenüber den Messungen sofort nach der Aufbereitung (a1 und b1) angestiegen war und der Calendulasäuregehalt gleichzeitig sank. Es scheinen also Änderungen in der Fettsäurezusammensetzung der verseiften Lösungen bei längerer Lagerzeit aufzutreten.

Aus diesem Grund wurden die Variationskoeffizienten noch einmal berechnet, diesmal aber nur anhand der 6 GC-Analysen, die sofort nach der Aufbereitung durchgeführt wurden. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 3 zu finden.

Tab. 3: Bestimmung der Relativen Standardabweichung (%) bei 6 GC-Analysen einer Calendula-Ölprobe, GC-Analyse noch am Tag der Verseifung

Probe		Fettsäureanteil in %								
		C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3c	C20:0	C20:1n9c	C18:3 8t10t12c	C22 :1n9c
0	a1	2,828	1,517	2,661	26,076	0,639	0,344	0,229	63,835	1,871
	b1	2,824	1,520	2,713	26,099	0,626	0,343	0,229	63,873	1,808
	c1	2,852	1,526	2,632	26,116	0,632	0,340	0,227	63,493	2,182
	c2	2,867	1,555	2,655	26,197	0,636	0,353	0,232	63,540	1,965
	d1	2,860	1,546	2,510	26,086	0,633	0,341	0,234	63,740	2,050
	d2	2,833	1,519	2,389	25,913	0,626	0,346	0,229	64,175	1,972
	MW	2,844	1,531	2,593	26,081	0,632	0,345	0,230	63,776	1,975
	s	0,018	0,016	0,121	0,093	0,005	0,005	0,003	0,249	0,132
	RSD	0,634	1,048	4,656	0,357	0,831	1,358	1,100	0,390	6,691

Die so ermittelten Variationskoeffizienten bewegen sich zwischen 0,3% und nur noch 6,7%.

Bei den innerhalb des Forschungsthemas zu untersuchenden Calendula-Samenölen erfolgte daher die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung noch am Tag der Aufarbeitung.

Für die im Sinne der Aufgabenstellung des Forschungsthemas relevanten Fettsäuren Calendulasäure und Linolsäure wurden sehr gute Variationskoeffizienten von 0,39% und 0,36% ermittelt.

Insgesamt handelt es sich bei den ermittelten Variationskoeffizienten für pflanzliche Proben um durchaus akzeptable Abweichungen.

Die Analysenmethode ist damit als geeignet für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Calendula-Ölproben einzuschätzen. Es ist mit der etablierten Methode möglich, Änderungen der Fettsäurezusammensetzung, insbesondere der Gehalte an Calendulasäure und Linolsäure, zu erfassen, und somit eventuelle Sortenunterschiede der Calendulapflanzen sowie Anbaubedingungen oder die Technologie der Ölherstellung zu beurteilen.

6.1.3 Ergebnisse und Auswertung

Die Calendula-Samenöle wurden jeweils doppelt verseift und ihre Fettsäurezusammensetzung anschließend gaschromatographisch bestimmt.

Aus den Ergebnissen der Doppelbestimmungen für jede Ölprobe wurden jeweils die Mittelwerte (MW) und die Relativen Standardabweichungen (RSD) für jede der identifizierten Fettsäuren bestimmt.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 4) sind die Ergebnisse der Fettsäurebestimmungen der Calendula-Samenöle aus dem Anbaujahr 2002 dargestellt. Es sind jeweils die Anteile aller identifizierbaren Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt der Ölproben in % für jeweils zwei Bestimmungen pro Ölprobe sowie die berechneten Mittelwerte und Relativen Standardabweichungen angegeben.

Tab. 4: Fettsäurezusammensetzung von Calendula-Ölen aus dem Anbaujahr 2002

Probe	Fettsäureanteil in %									
	C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3c	C20:0	C20:1n9c	C18:3 8t10t12c	C22:1n9c	
0	a	2,852	1,526	2,632	26,116	0,632	0,340	0,227	63,493	2,182
	b	2,860	1,546	2,510	26,086	0,633	0,341	0,234	63,740	2,050
	MW	2,856	1,536	2,571	26,101	0,633	0,341	0,231	63,617	2,116
	RSD	0,198	0,921	3,355	0,081	0,112	0,208	2,147	0,275	4,411
1	a	3,192	1,391	3,912	27,384	0,629	0,306	0,249	61,884	1,053
	b	3,200	1,385	3,894	27,396	0,627	0,312	0,264	61,896	1,025
	MW	3,196	1,388	3,903	27,390	0,628	0,309	0,257	61,890	1,039
	RSD	0,177	0,306	0,326	0,031	0,225	1,373	4,135	0,014	1,906
2	a	3,155	1,290	3,078	26,129	0,546	0,295	0,239	64,367	0,900
	b	3,143	1,277	3,078	26,174	0,546	0,285	0,238	64,369	0,889
	MW	3,149	1,284	3,078	26,152	0,546	0,290	0,239	64,368	0,895
	RSD	0,269	0,716	0,000	0,122	0,000	2,438	0,296	0,002	0,870

Tab. 4, fortgeführt: Fettsäurezusammensetzung von Calendula-Ölen (2002)

Probe	Fettsäureanteil in %									
	C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3c	C20:0	C20:1n9c	C18:3 8t10t12c	C22:1n9c	
3	a	3,227	1,449	3,497	27,804	0,548	0,321	0,256	61,999	0,900
	b	3,242	1,457	3,533	27,810	0,543	0,319	0,268	61,920	0,906
	MW	3,235	1,453	3,515	27,807	0,546	0,320	0,262	61,960	0,903
	RSD	0,328	0,389	0,724	0,015	0,648	0,442	3,239	0,090	0,470
4	a	3,399	1,485	4,136	27,828	0,608	0,335	0,279	61,119	0,812
	b	3,413	1,502	4,091	27,867	0,586	0,319	0,271	61,164	0,787
	MW	3,406	1,494	4,114	27,848	0,597	0,327	0,275	61,142	0,800
	RSD	0,291	0,805	0,774	0,099	2,606	3,460	2,057	0,052	2,211
5	a	3,444	1,544	4,406	28,484	0,583	0,296	0,275	59,749	1,219
	b	3,459	1,573	4,391	28,442	0,580	0,337	0,265	59,728	1,225
	MW	3,452	1,559	4,399	28,463	0,582	0,317	0,270	59,739	1,222
	RSD	0,307	1,316	0,241	0,104	0,365	9,160	2,619	0,025	0,347
6	a	3,876	1,360	4,611	28,788	0,646	0,331	0,259	59,406	0,722
	b	3,852	1,374	4,607	29,019	0,655	0,324	0,251	59,211	0,706
	MW	3,864	1,367	4,609	28,904	0,651	0,328	0,255	59,309	0,714
	RSD	0,439	0,724	0,061	0,565	0,978	1,511	2,218	0,232	1,585
7	a	3,473	1,404	4,074	28,446	0,627	0,315	0,241	60,906	0,513
	b	3,417	1,423	4,183	28,540	0,628	0,307	0,258	60,734	0,502
	MW	3,445	1,414	4,129	28,493	0,628	0,311	0,250	60,820	0,508
	RSD	1,149	0,950	1,867	0,233	0,113	1,819	4,818	0,200	1,533
8	a	3,578	1,510	6,163	31,033	0,619	0,338	0,287	56,042	0,429
	b	3,582	1,491	6,084	30,972	0,619	0,371	0,285	56,155	0,441
	MW	3,580	1,501	6,124	31,003	0,619	0,355	0,286	56,099	0,435
	RSD	0,079	0,895	0,912	0,139	0,000	6,582	0,494	0,142	1,951
9	a	3,642	1,596	5,015	29,680	0,572	0,358	0,246	58,191	0,699
	b	3,665	1,650	5,257	29,796	0,570	0,349	0,246	57,795	0,672
	MW	3,654	1,623	5,136	29,738	0,571	0,354	0,246	57,993	0,686
	RSD	0,445	2,353	3,332	0,276	0,248	1,800	0,000	0,483	2,785
10	a	2,940	1,658	3,449	27,229	0,540	0,351	0,250	62,425	1,159
	b	2,947	1,623	3,070	27,030	0,546	0,331	0,245	63,425	0,783
	MW	2,944	1,641	3,260	27,130	0,543	0,341	0,248	62,925	0,971
	RSD	0,168	1,509	8,222	0,519	0,781	4,147	1,428	1,124	27,381
11	a	3,002	1,713	3,689	26,595	0,567	0,326	0,261	63,135	0,711
	b	3,006	1,628	3,622	26,369	0,583	0,335	0,258	63,486	0,713
	MW	3,004	1,671	3,656	26,482	0,575	0,331	0,260	63,311	0,712
	RSD	0,094	3,598	1,296	0,603	1,968	1,926	0,817	0,392	0,199

Tab. 4, fortgeführt: Fettsäurezusammensetzung von Calendula-Ölen (2002)

Probe	Fettsäureanteil in %									
	C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3c	C20:0	C20:1n9c	C18:3 8t10t12c	C22:1n9c	
12	a	3,214	1,575	3,617	28,014	0,697	0,292	0,280	58,290	4,022
	b	3,178	1,575	3,626	28,083	0,699	0,353	0,274	58,436	3,821
	MW	3,196	1,575	3,622	28,049	0,698	0,323	0,277	58,363	3,922
	RSD	0,796	0,000	0,176	0,174	0,203	13,375	1,532	0,177	3,624
13	a	3,420	1,732	3,881	27,945	0,729	0,352	0,286	60,123	1,532
	b	3,405	1,750	3,768	27,864	0,743	0,341	0,295	60,287	1,547
	MW	3,413	1,741	3,825	27,905	0,736	0,347	0,291	60,205	1,540
	RSD	0,311	0,731	2,089	0,205	1,345	2,245	2,191	0,193	0,689
14	a	3,313	1,505	3,457	28,957	0,706	0,317	0,268	59,319	2,158
	b	3,316	1,510	3,572	28,852	0,700	0,312	0,270	59,307	2,159
	MW	3,315	1,508	3,515	28,905	0,703	0,315	0,269	59,313	2,159
	RSD	0,064	0,235	2,314	0,257	0,604	1,124	0,526	0,014	0,033

Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Calendula-Samenölen sind vor allem bei den Fettsäuren 18:1n9c (Ölsäure), 18:2n6c (Linolsäure) und 18:3, 8t, 10t, 12t (Calendulasäure) zu erkennen. Stellt man nur die Werte dieser drei Fettsäuren gegenüber, lässt sich feststellen, dass die Summe der drei Fettsäuren bei allen Proben annähernd gleich groß ist (MW=92,7%; RSD=1,0%). (Tab. 5, Abb. 1)

Tab. 5: Gegenüberstellung der Gehalte an Ölsäure, Linolsäure und Calendulasäure

Probe	Fettsäure			Summe
	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3 8t,10t,12c	
0	2,59	26,08	63,78	92,45
1	3,90	27,39	61,89	93,18
2	3,08	26,15	64,37	93,60
3	3,52	27,81	61,96	93,28
4	4,11	27,85	61,14	93,10
5	4,40	28,46	59,74	92,60
6	4,61	28,90	59,31	92,82
7	4,13	28,49	60,82	93,44
8	6,12	31,00	56,10	93,22
9	5,14	29,74	57,99	92,87
10	3,26	27,13	62,93	93,31
11	3,66	26,48	63,31	93,45
12	3,62	28,05	58,36	90,03
13	3,82	27,90	60,21	91,93
14	3,51	28,90	59,31	91,73
MW	4,04	27,96	61,11	92,74
RSD	23,68	5,27	4,05	1,00

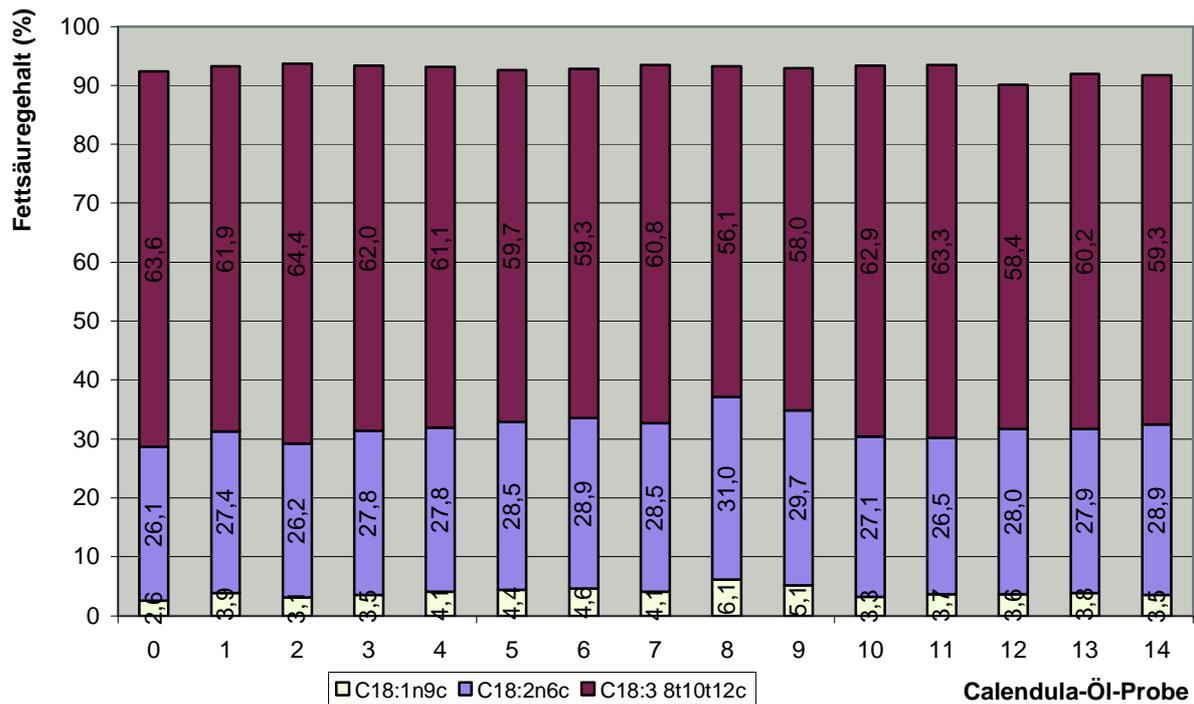


Abb. 1: Gehalte an Ölsäure, Linolsäure und Calendulasäure, sowie die Summe der drei Fettsäuren

Innerhalb des Forschungsprojektes wurden möglichst hohe Calendulasäuregehalte angestrebt. Die ermittelten Gehalte der Calendulasäure in den Ölen sind daher in Abb. 2 noch einmal separat gegenübergestellt.

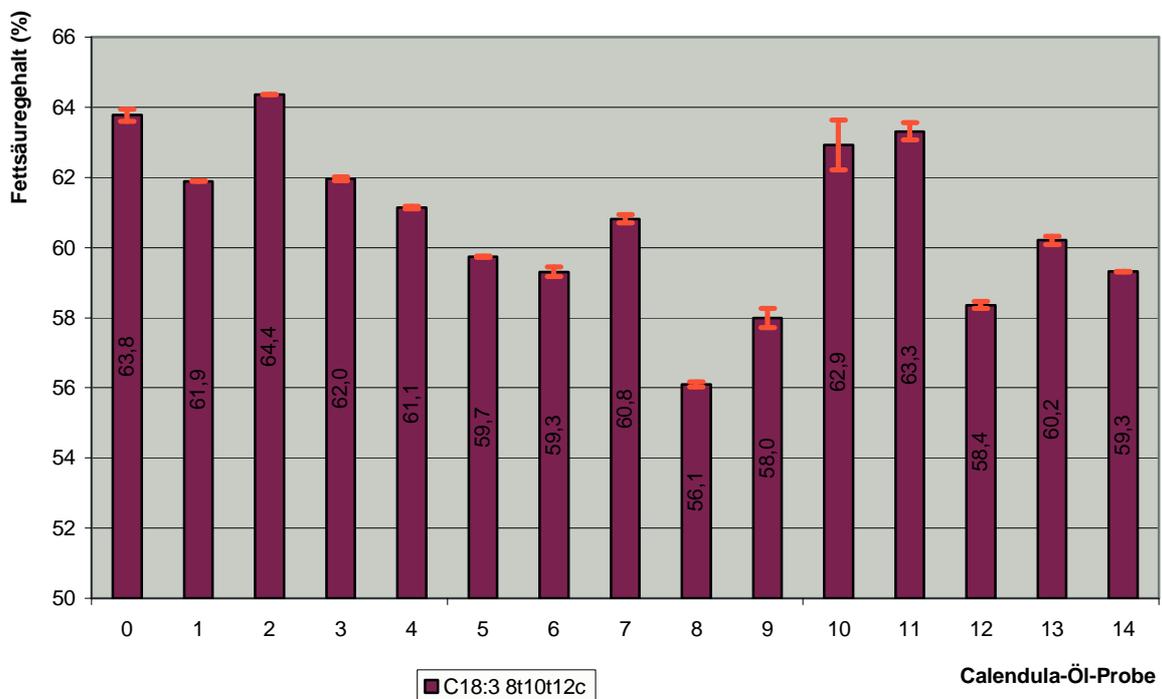


Abb. 2: Gegenüberstellung der Gehalte an Calendulasäure aus dem Jahr 2002

Ein erhöhter Gehalt an Calendulasäure gegenüber der Vergleichsprobe 0 ist allerdings nur bei Probe 2 festzustellen. Ähnlich hohe Gehalte wie in der Vergleichsprobe wurden aber auch bei den Proben 10 und 11 gefunden.

Grundsätzlich ist jedoch zu bemerken, dass die Schwankungen der Calendulasäuregehalte innerhalb der 15 untersuchten Proben nur gering ausfallen. Die Gehalte bewegen sich bei allen Proben zwischen 56,1 und 64,37 % des Gesamtfettsäuregehaltes der Calendula-Samenöle.

Durch die Projektpartner Dr. Junghanns GmbH und Biro GbR erfolgte anhand dieser ermittelten Daten eine erste Selektion der Calendulapflanzen für die Calendula-Samenöl-Herstellung.

Nach einem Jahr Lagerung der Calendula-Samenöle bei 5°C unter Ausschluss von Lichteinflüssen (im Kühlschrank) wurden die Fettsäurezusammensetzungen dieser 15 Öle erneut bestimmt, um Aussagen zur Stabilität der Fettsäurezusammensetzung treffen zu können. Die Tabelle 6 beinhaltet die dabei ermittelten prozentualen Abweichungen der Fettsäuregehalte für die gelagerten Öle von den Fettsäuregehalten für die frischen Öle für die Hauptkomponenten.

Die ermittelten Gehalte der frischen Öle bzw. der ein Jahr gelagerten Öle sind der Anlage 1 zu entnehmen.

Tab. 6: Abweichung der Fettsäuregehalte nach 1 Jahr Lagerung (in %)

Probe	Ölsäure	Linolsäure	Calendulasäure
0	-1,3	0,6	-0,4
1	-5,9	-0,2	0,3
2	-2,8	0,0	-0,1
3	-2,5	-0,1	0,0
4	-4,1	0,3	-0,2
5	-0,5	1,5	-1,4
6	0,8	0,8	-1,0
7	-2,6	0,1	0,1
8	-1,6	-0,3	0,2
9	-4,2	-0,3	0,5
10	8,0	3,9	-3,1
11	-5,3	0,0	0,2
12	-1,3	0,6	-0,4
13	-2,6	0,5	-0,3
14	0,9	-0,2	0,0
durchschnittliche Abweichung	-1,7	0,5	-0,4
Verfahrensstandardabweichung	4,7	0,4	0,4

Die durchschnittlichen Abweichungen liegen dabei für Ölsäure und Calendulasäure innerhalb der Verfahrensstandardabweichung, für Linolsäure nur leicht darüber. Die Fettsäurezusammensetzung der Calendula-Öle ist damit bei dunkler Lagerung bei 5°C über 1 Jahr stabil.

Da insbesondere der Gehalt an Calendulasäure von Interesse für die Verwertbarkeit der Calendula-Samenöle ist, ist zusätzlich in Abb. 3 eine graphische Gegenüberstellung der Calendulasäuregehalte der Samenöle sofort bzw. nach 1 Jahr Lagerung zu finden. Auch diese Abbildung macht die nahezu konstanten Gehalte nach 1 Jahr Lagerung deutlich.

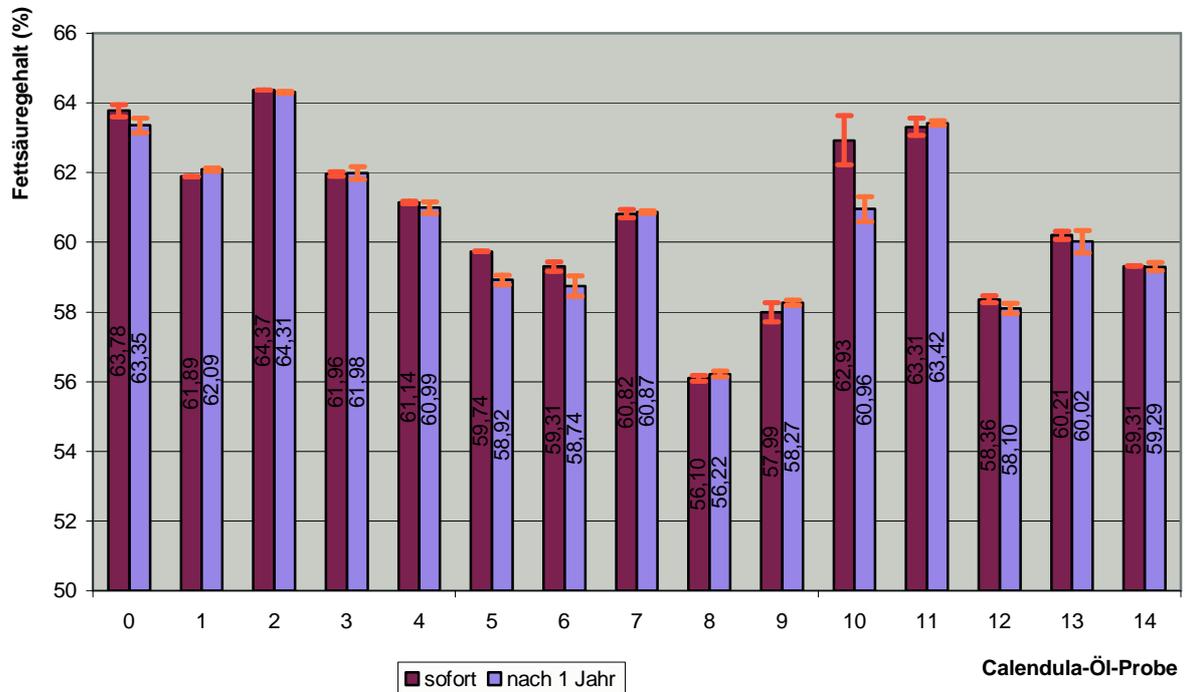


Abb. 3: Vergleich der ermittelten Calendulasäuregehalte der Calendula-Samenöle sofort und nach 1 Jahr Lagerung

Nach einer ersten Selektion aufgrund der Ergebnisse der Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Calendula-Samenöle von 2002 waren aus dem Anbaujahr 2003 neun Calendula-Samenöle zu charakterisieren. Die Ergebnisse der Fettsäurebestimmung für das Anbaujahr 2003 sind in Tab. 7 zu finden.

Tab. 7: Fettsäurezusammensetzung von Calendula-Ölen aus dem Anbaujahr 2003

Probe		C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n6c	C18:3n3c	C20:0	C20:1n9c	C20:5n3c	C18:3+8t10t12c	unbekannt
F/2003	a	3,51	1,33	3,83	27,57	0,34	1,00	0,31	0,27	0,31	60,51	1,02
	b	3,47	1,30	3,74	27,51	0,45	0,98	0,30	0,30	0,29	60,48	1,18
	MW	3,50	1,32	3,78	27,55	0,43	0,99	0,31	0,28	0,32	60,37	1,14
	RSD	0,65	0,90	1,35	0,23	27,78	1,15	2,39	5,07	14,47	0,25	7,16
O/2003	a	3,00	1,65	4,37	28,10	0,40	0,76	0,30	0,29	<0,1	60,74	0,40
	b	2,97	1,67	4,28	28,10	0,40	0,79	0,30	0,30	<0,1	60,83	0,37
	MW	2,98	1,66	4,33	28,11	0,39	0,78	0,30	0,29	<0,1	60,77	0,38
	RSD	0,35	0,42	0,88	0,13	1,39	1,49	0,98	1,38		0,11	4,06

Tab. 7, fortgeführt: Fettsäurezusammensetzung von Calendula-Ölen (2003)

1/2003	a	3,16	1,61	3,73	26,83	0,42	0,63	0,34	0,27	<0,1	62,68	0,33
	b	3,16	1,61	3,75	26,90	0,40	0,62	0,34	0,31	<0,1	62,49	0,41
	MW	3,16	1,62	3,74	26,88	0,41	0,62	0,33	0,30	<0,1	62,56	0,38
	RSD	0,13	0,21	0,24	0,14	2,12	1,16	2,40	6,08		0,15	12,51
2/2003	a	3,10	1,66	3,75	26,25	0,40	0,63	0,33	0,30	<0,1	63,12	0,45
	b	3,11	1,68	3,77	26,31	0,40	0,63	0,34	0,29	<0,1	62,98	0,51
	MW	3,11	1,66	3,78	26,28	0,40	0,63	0,35	0,30	<0,1	63,01	0,49
	RSD	0,18	0,58	0,62	0,09	1,93	1,32	3,20	2,08		0,12	5,75
3/2003	a	3,04	1,35	3,55	27,59	0,35	0,71	0,28	0,31	<0,1	62,17	0,63
	b	3,00	1,35	3,60	27,38	0,36	0,71	0,27	0,31	<0,1	62,61	0,42
	MW	3,01	1,36	3,59	27,48	0,35	0,70	0,28	0,31	<0,1	62,41	0,51
	RSD	0,73	0,62	0,75	0,33	3,35	1,09	3,63	1,29		0,31	25,65
4/2003	a	3,20	1,37	3,73	28,62	0,36	0,77	0,28	0,30	<0,1	60,74	0,64
	b	3,22	1,38	3,78	28,77	0,36	0,77	0,28	0,26	<0,1	59,59	1,59
	MW	3,21	1,38	3,77	28,69	0,36	0,77	0,29	0,28	<0,1	60,12	1,13
	RSD	0,70	0,43	0,73	0,45	1,35	0,74	2,68	6,12		1,05	42,53
5/2003	a	2,99	1,52	3,75	27,51	0,31	1,10	0,30	0,33	<0,1	61,22	0,98
	b	3,02	1,55	3,64	27,55	0,32	1,09	0,32	0,33	<0,1	61,18	1,00
	MW	3,00	1,53	3,70	27,50	0,31	1,09	0,31	0,32	<0,1	61,24	0,99
	RSD	0,60	1,04	1,23	0,13	1,78	0,73	3,38	4,60		0,09	1,11
6/2003	a	2,83	1,49	3,33	26,63	0,65	0,69	0,33	0,28	0,50	61,21	2,06
	b	2,88	1,53	3,52	26,54	0,39	0,72	0,34	0,32	0,51	61,55	1,71
	MW	2,89	1,51	3,44	26,66	0,52	0,70	0,32	0,31	0,51	61,14	1,99
	RSD	3,35	2,54	3,47	0,51	29,94	1,94	4,82	6,34	4,81	0,66	9,67
Std. 2002	a	2,82	1,54	2,91	25,69	0,56	0,68	0,32	0,29	<0,1	64,74	0,46
	b	2,87	1,59	2,93	25,76	0,39	0,68	0,35	0,29	<0,1	63,62	1,52
	MW	2,84	1,57	2,94	25,71	0,47	0,68	0,34	0,28	<0,1	64,18	0,99
	RSD	0,98	1,54	2,24	0,15	19,65	0,42	5,57	1,23		1,00	60,33

Die Fettsäurezusammensetzung zeigt bei den Calendula-Samenölen aus dem Jahr 2003 noch geringere Unterschiede als bei den Ölen von 2002.

Dies zeigt auch die graphische Darstellung der ermittelten Calendulasäuregehalte in Abb. 4.

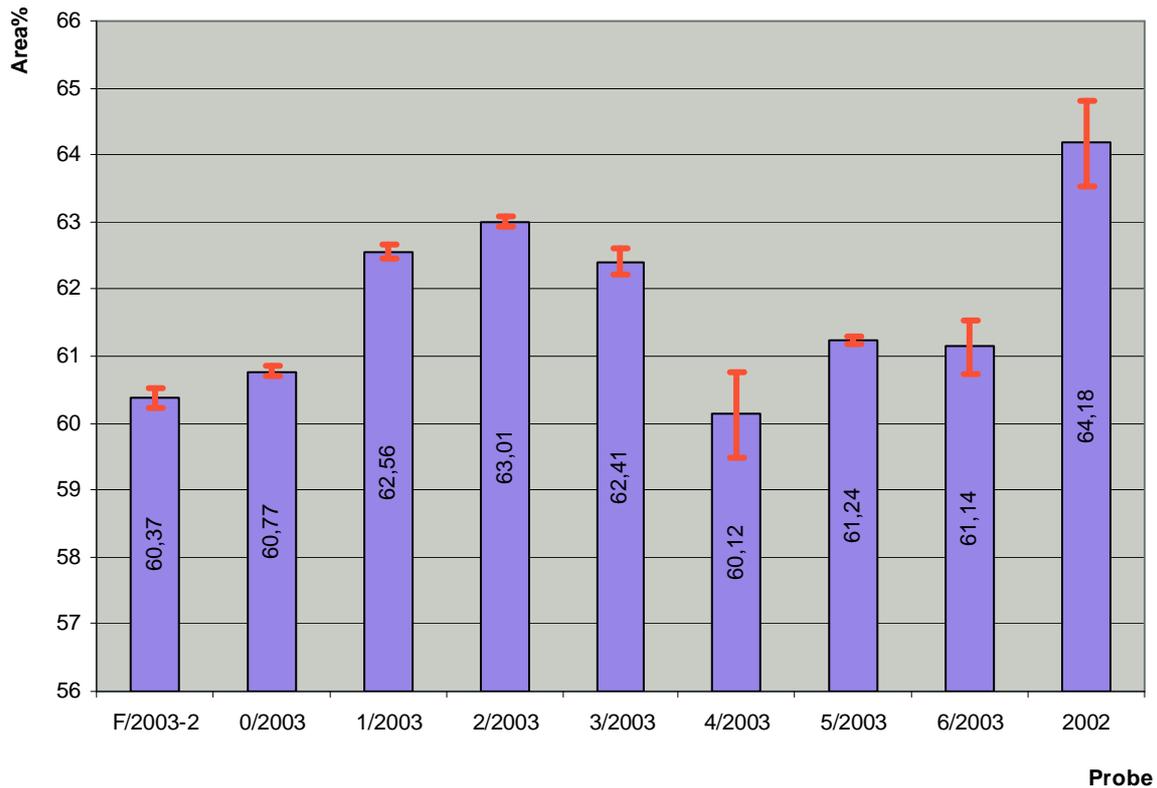


Abb. 4: Gegenüberstellung der Gehalte an Calendulasäure aus dem Jahr 2003

Die Calendulasäuregehalte schwanken 2003 nur noch zwischen 60 und 64%. Der mitgeführte Standard aus dem Jahr 2002 zeigt jedoch, dass die höchsten Gehalte an Calendulasäure bei Pressung der Samenkontrolle aus dem Jahr 2002 ermittelt wurden. Diese geringen Unterschiede können aber auch in den jeweiligen Witterungsbedingungen begründet liegen. Im Jahr 2002 schwankten die Calendulasäuregehalte noch zwischen 56 und 64 %. Dass dieser Schwankungsbereich im Jahr 2003 auf den oberen Bereich von 60 bis 64% begrenzt werden konnte, beweist die Erfolge der ersten Sortenauswahl. Da die Unterschiede nun aber nur noch sehr gering ausfallen, können andere Entscheidungskriterien für die endgültige Sortenauswahl herangezogen werden (z.B. ernte- und verarbeitungstechnische Charakteristika der Sorten, siehe Berichte der Dr. Junghanns GmbH und der Biro GbR).

6.2 Bestimmung des Flavonoide von Calendula-Samenölen

6.2.1 Aufgabenstellung

Es sollte die qualitative sowie quantitative Flavonoidzusammensetzung der Calendula-Samenöle bestimmt werden.

Hierzu musste zunächst eine Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Flavonoide in Calendula-Samenölen etabliert werden.

Die mit der etablierten Methode ermittelten Flavonoidgehalte sollten ebenfalls zur Sortencharakterisierung herangezogen werden.

6.2.2 Material und Methoden

6.2.2.1 Material

6.2.2.1.1 Calendula-Samenöle

Für die Flavonoid-Bestimmung standen wie für die Bestimmung der Fettsäuren aus dem Kalenderjahr 2002 fünfzehn Calendula-Samenöle und aus dem Kalenderjahr 2003 neun Calendula-Samenöle zur Verfügung.

6.2.2.1.2 Referenzsubstanzen

Als Referenzsubstanzen kamen folgende Flavonoide zum Einsatz (Extrasynthese, Genay, Frankreich):

- Homoorientin (=Luteolin-6-C-Glukosid)
- Rutin (=Quercetin-3- β -O-Rutinosid)
- Vitexin (=Apigenin-8-C-Glukosid)
- Isovitexin (=Apigenin-6-C-Glukosid)
- Isoquercitrin (=Quercetin-3- β -O-Glukosid)
- Taxifolin
- Narcissin (=Isorhamnetin-3- β -O-Rutinosid)
- Isorhamnetin-3- β -O-Glukosid
- Luteolin
- Quercetin
- Naringenin
- Apigenin
- Kaempferol
- Hesperetin
- Isorhamnetin
- Rhamnetin

6.2.2.2 Methoden

6.2.2.2.1 Zugrundegelegte Erkenntnisse

Die Flavonoide der Calendula-Blüten wurden in der Literatur mehrfach beschrieben. Die Blüten enthalten Flavonoidglukoside mit Isorhamnetin oder Quercetin als Aglykon. Der Gesamtflavonoidgehalt der Blüten liegt zwischen 0,25 und 0,88%. (STEINEGGER und HÄNSEL, 1988; KOMISSARENKO et al., 1989; ISAAC, 1992; BOHM, 2001; PIC-CAGLIA et al., 1997; BILIA et al., 2001; FRAUEN, 2001)

Die analytische Bestimmung von Flavonoiden in Pflanzenmaterialien erfolgt entweder nach Hydrolyse in Form der Aglykone (MENGHINELLO et al., 1999; JUSTESEN et al.,

1998; HÄKKINEN et al., 1998; JUSTESEN, 2000; PICCAGLIA et al., 1997) oder in Form der Flavonoidglukoside (JUSTESEN et al., 1998; HÄKKINEN et al., 1998; JUSTESEN et al., 2001; PICCAGLIA et al., 1997) mittels HPLC/DAD bzw. HPLC/MS.

Flavonoide in Calendula-Samenöl wurden bisher nicht beschrieben. In Olivenöl dagegen sind die Flavonoide gut charakterisiert (CINQUANTA et al., 1997; TSIMIDOU, 1998; SERVILI et al., 1999; GÓMEZ-ALONSO et al., 2002; SERVILI et al., 2003; GÓMEZ-ALONSO et al., 2003). Der hohe Gehalt an Oleuropein des Olivenöls wird für die antioxidative Wirkung des Olivenöls verantwortlich gemacht (VISIOLI et al., 1997; MANNA et al., 1998). Zur Extraktion der Flavonoide aus der öligen Matrix wird neben aufwendigen Mehrfachextraktionen auch die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) beschrieben (SERVILI et al., 1999; MATEOS et al., 2001; GÓMEZ-ALONSO et al., 2002 und 2003).

Diese SPE sollte als schnelles und einfaches Verfahren auch für die Extraktion der Flavonoide aus Calendula-Samenölen eingesetzt werden.

6.2.2.2.2 Aufbau und Etablierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung der Flavonoide in Calendula-Samenöl

Für die Bestimmung der Flavonoidglukoside erfolgte der Aufbau einer HPLC-Methode in Anlehnung an JUSTESEN et al. (1998).

Die analytische Bestimmung erfolgte an der HPLC 1100 (Agilent).

Die Trennung fand an einer RP18 Säule (Phenomenex, Luna Su C18(2) 250x4,6mm, 5µm) mit einer mobilen Phase bestehend aus 1% Ameisensäure (A) und Acetonitril (B). Eine optimale Trennung der Standardsubstanzen konnte nach mehreren Variationen bei einem Fluss von 1ml/ml innerhalb von 60min mit folgendem Gradienten erzielt werden:

Zeit (min)	% A	% B
0	95	5
45	55	45
55	55	45
60	0	100

Mittels Diodenarraydetektor (DAD) wurden Spektren bei 210-500nm aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte bei 270nm.

Die folgende Abbildung zeigt ein mit dieser Methode erhaltenes Standardchromatogramm (Abb. 5).

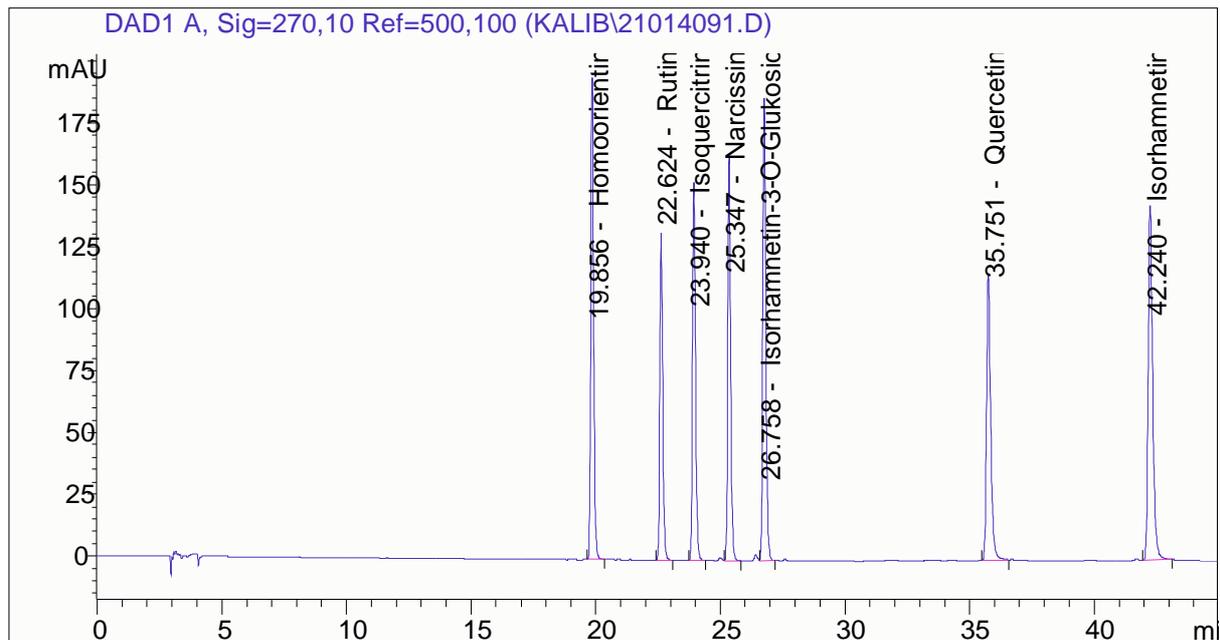


Abb. 5: HPLC-Trennung der Standardsubstanzen

Chemikalien: Acetonitril, HPLC Gradient Grade (Carl Roth)
 Ameisensäure, p.A. (Carl Roth)
 Wasser, reinst

Verbrauchsmaterial: SPARTAN Filtereinheiten, 13/0,2µm RC (Schleicher & Schuell)
 Geräte: HPLC 1100 (Agilent)

6.2.2.2.3 Aufbau und Etablierung einer LC/MS-Methode zur Bestimmung der Flavonoide in Calendula-Öl

Da für Calendula-Blüten auch andere, nicht als Referenzsubstanzen verfügbare, Flavonoidglukoside beschrieben werden (z.B. BILIA et al., 2001), sollte zur Charakterisierung unbekannter Substanzen auch eine HPLC-Methode mit massenspektrometrischer Detektion etabliert werden. Hierfür stand eine Waters HPLC (Waters 2695) mit Quadrupol Massenspektrometer (Micromass Quattro LC) zur Verfügung.

Die HPLC-Bedingungen gestalteten sich hierbei wie oben beschrieben. Zur Überführung der Probensubstanzen in das Massenspektrometer wurde eine Electrospray-Quelle eingesetzt. Um optimale Bedingungen für die Massenspektrometrie zu erhalten, wurde das Massenspektrometer anhand der Standardsubstanzen Narcissin und Isorhamnetin getunt. Zur Aufnahme der Massenspektren war eine positive Ionisierung demnach besser geeignet. Die optimierten Full Scan-Parameter sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Tune Parameter

	Full Scan
Quelle (ES+)	
Kapillarspannung (kv)	3,9
Conespannung (V)	20
Extraktorspannung (V)	5
Quellentemperatur (°C)	135
Desolvation Temp. (°C)	350

Die folgenden Abbildungen zeigen ein Chromatogramm eines Standardgemisches (Abb. 6) und beispielhaft das Massenspektrum für Narcissin (Abb. 7).

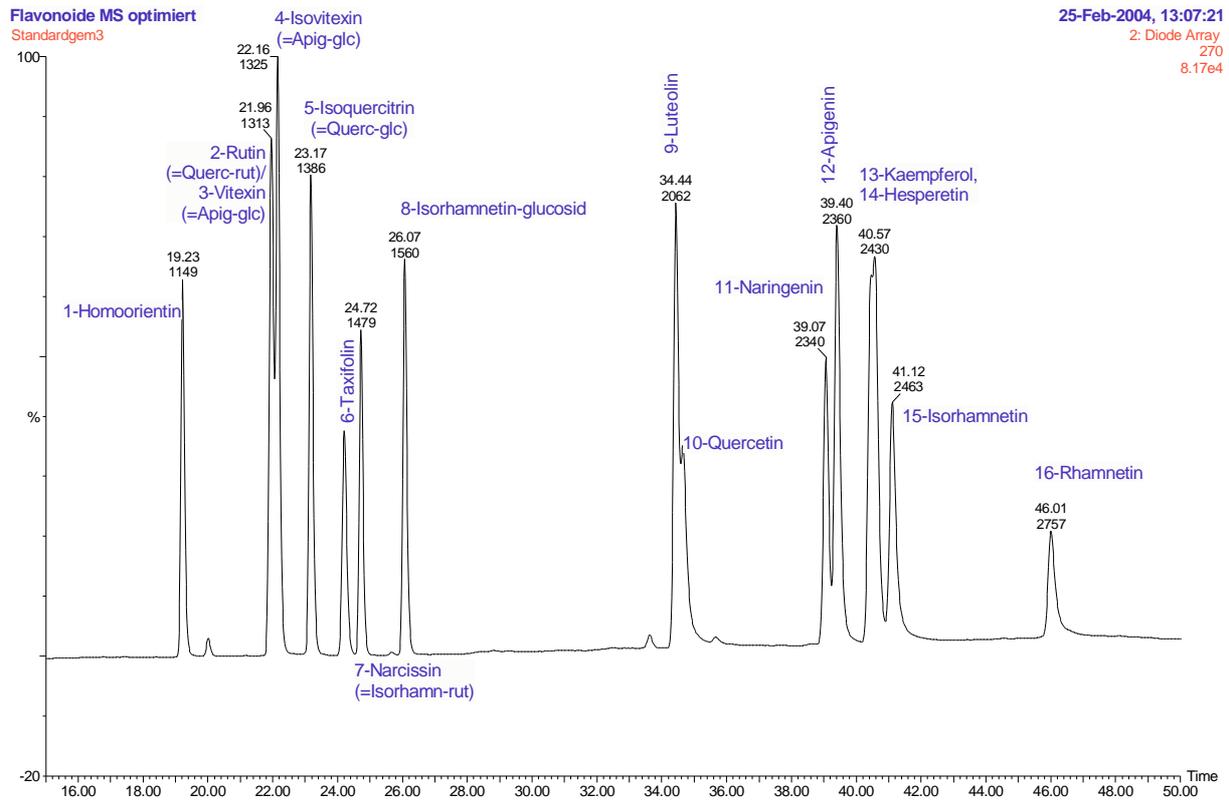


Abb. 6: LC/MS-Chromatogramm der Standardsubstanzen

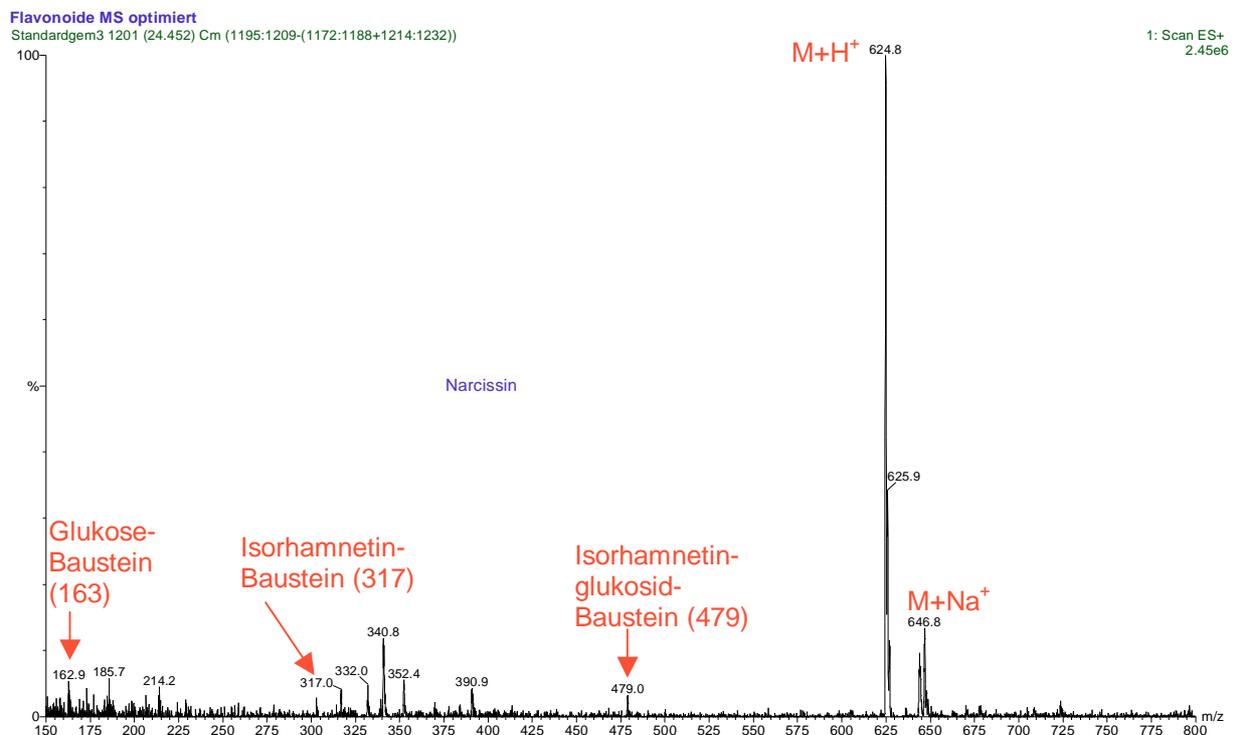


Abb. 7: Massenspektrum von Narcissin

Die Massenspektren aller Standardsubstanzen enthält Anlage 2. In der folgenden Tabelle sind für alle Standardsubstanzen die Retentionszeiten und die typischen Fragmente angegeben (Tab. 9).

Tab. 9: Typische Fragmente der Flavonoide

Standardsubstanz	MG	M+H ⁺	M+Na ⁺	Typische Fragmente		
Homoorientin (Luteolin-6-C-Glukosid)	448	449	441	407		
Rutin (Quercetin-3-β-O-Rutinosid)	610	611	633	495		
Vitexin (Apigenin-8-C-Glukosid)	432	433	455			
Isovitexin (Apigenin-6-C-Glukosid)	432	433	455			
Isoquercitrin (Quercetin-3-β-O-Glukosid)	464	465	487	303		
Taxifolin	304	305		186		
Narcissin (Isorhamnetin-3-β-O-Rutinosid)	624	625	647	479	317	163
Isorhamnetin-3-β-O-Glukosid	478	479	501	317	279	
Luteolin	286	287				
Quercetin	302	303				
Naringenin	272	273				
Apigenin	270	271				
Kaempferol	286	287				
Hesperetin	302	303				
Isorhamnetin	316	317				
Rhamnetin	316	317				

6.2.2.2.4 Aufbau und Etablierung einer SPE-Methode zur Extraktion von Flavonoiden aus Öl

Zur Extraktion der Flavonoide aus Calendula-Samenöl sollte die von MATEOS et al. (2001) beschriebene Festphasenextraktion als einfache und schnelle Methode etabliert werden. Für die Extraktion der polaren Flavonoide kommt nur eine polare SPE-Phase in Frage. Nach Aufnahme des Öles in einem unpolaren Lösungsmittel wird diese Lösung über die SPE-Säule gegeben, wobei die polaren Komponenten auf der Säule retardieren. Durch Waschen mit einem unpolaren Lösungsmittel werden Triglyzeride, Kohlenwasserstoffe, Wachse oder fettlösliche Vitamine entfernt. Bei der anschließenden Elution mit einem polaren Lösungsmittel können schließlich die polaren Flavonoide aufgefangen werden.

Neben der von MATEOS et al. (2001) beschriebenen DIOL-Phase wurden für die SPE im Rahmen des Forschungsprojektes ebenfalls die HR-P sowie die Florisil-Phase (Supelco) geprüft. Die Wiederfindungsraten bei Standardaddition während der SPExtraktion des Calendula-Öls und anschließender HPLC-Bestimmung der Flavonoide zeigen jedoch deutlich, dass mit der HR-P und der Florisil-Phase kaum Substanzen wiedergefunden werden (Tab. 10). Da die DIOL-Phase außerdem den Vorteil einer geringeren Aktivität gegenüber labilen Estern hat (MATEOS et al., 2001), wurde diese DIOL-Phase auch für die Extraktionen im Rahmen des Projektes eingesetzt.

Tab. 10: Wiederfindungsraten von Standardsubstanzen verschiedener SPE-Phasen

Standardsubstanz	theoretische Konzentration (µg/ml)	ermittelte Konzentration (µg/ml), MW (n=3)			Wiederfindungsrate (%)		
		OH	Florisil	HRP	OH	Florisil	HRP
Homorientin	25	17,94	2,02	0,99	71,7	8,1	4,0
Rutin	37,5	28,58	2,43	0,79	76,2	6,5	2,1
Quercetin-3-β-D-Glukosid	37,5	27,60	2,49	2,03	73,6	6,6	5,4
Isorhamnetin-3-Rutinosid	37,5	29,99	2,42	1,54	80,0	6,5	4,1
Isorhamnetin-3-Glukosid	37,5	29,86	2,52	3,29	79,6	6,7	8,8
Quercetin	25	19,92	2,42	n.b.	79,7	9,7	n.b.
Isorhamnetin	37,5	28,57	3,31	11,63	76,2	8,8	31,0

n.b. = nicht bestimmt

MATEOS et al. (2001) beschreibt nach einem unpolaren Waschschrift mit n-Hexan von der DIOL-SPE-Kartusche einen weiteren Waschvorgang mit Hexan / Ethylacetat (9:1, v/v). Da das hierbei entstehende Eluat aber eine leichte Gelbfärbung aufwies, wurden auch Versuche ohne diesen Waschschrift durchgeführt. Ein Vergleich der ermittelten Gehalte nach Standardaddition zeigt dabei höhere Gehalte der Standardsubstanzen ohne Waschen mit Hexan / Ethylacetat (9:1, v/v) (Abb. 8). Im Rahmen der Untersuchungen des Forschungsprojektes wurde daher ohne diesen Waschschrift extrahiert.

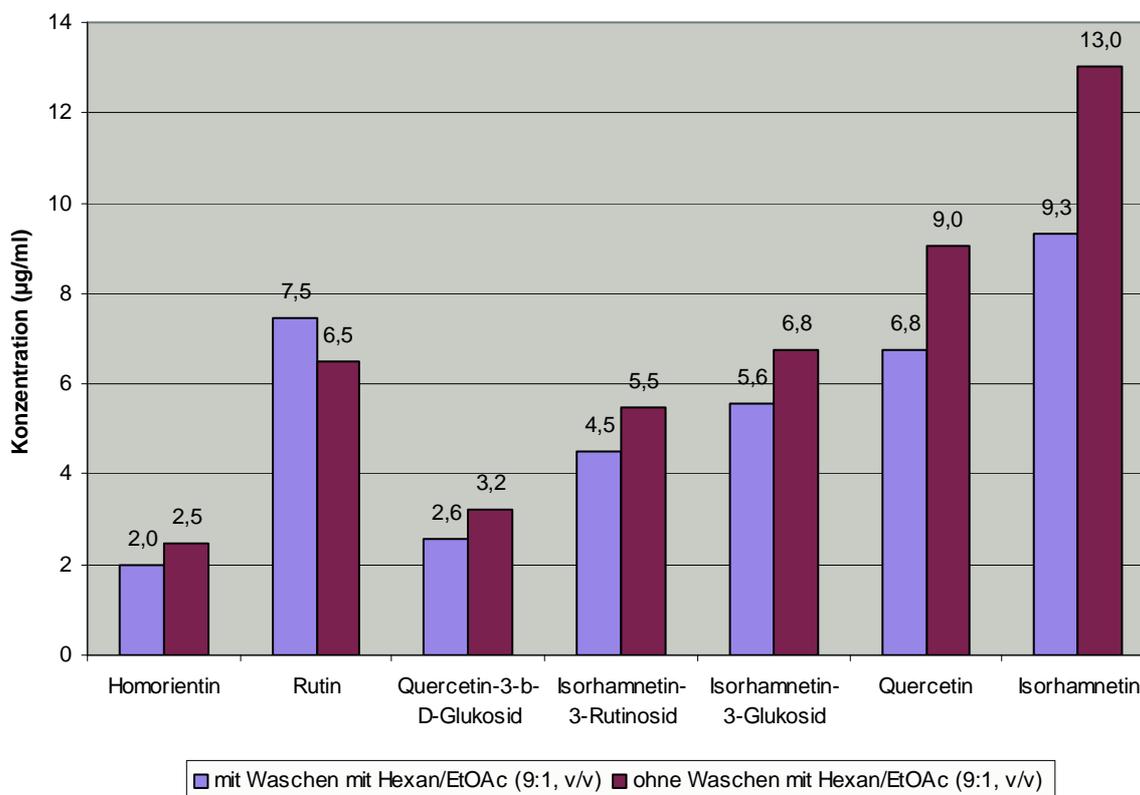


Abb. 8: Flavonoidgehalte nach Standardaddition bei SPE mit bzw. ohne Waschen mit Hexan/Ethylacetat (9:1, v/v) (MW, n=3)

Aufgrund von Schwebstoffen im Calendula-Samenöl gestaltete sich die SPE schwierig. Die Elution ging trotz Einsatz einer Vakuumpumpe nur langsam oder gar nicht voran. Das Öl sollte daher vor der Extraktion zentrifugiert und anschließend zusätzlich auch filtriert werden. Um auszuschließen, dass durch diese Vorgänge bereits Flavonoide verloren gehen, wurden die Rückstände nach Filtration und Zentrifugation über Nacht mit Methanol extrahiert und analysiert. In den Rückständen konnten keine Flavonoide nachgewiesen werden. Die Zentrifugation und Filtration konnten also ohne Bedenken eingesetzt werden.

Der Ablauf der optimierten Extraktionsmethode gestaltete sich schließlich wie folgt: Das Calendula-Öl wurde zentrifugiert (5.000 RPM, 5min) und anschließend filtriert. 2,5g filtriertes Öl wurden dann mit 6ml n-Hexan gelöst. Die Festphasenextraktion erfolgte an einer SPE-Vakuumkammer bei -5psi. Es wurden LV-Kartuschen (15ml) mit 500mg OH-Trennmittel verwendet. Die Säulen wurden zunächst konditioniert mit 6ml Methanol und anschließend 6ml n-Hexan. Anschließend wurde die Öllösung auf die Kartusche gegeben. Unpolare Verbindungen wurden durch zweimaliges Waschen mit n-Hexan von der Säule entfernt. Die Flavonoide konnten dann mit 10ml Methanol eluiert werden. Das Eluat wurde anschließend schonend unter Vakuum bei 35°C eingeeengt (IR Dancer) und der Rückstand in 1ml Methanol aufgenommen und für die HPLC vorbereitet.

Chemikalien:	n-Hexan, p.A. (Carl Roth) Methanol, p.A. (Carl Roth)
Verbrauchsmaterial:	3180 Rundfilter, 110mm (Schleicher&Schuell) Chromabond LV-OH 15ml, 500mg (Macherey&Nagel)
Geräte:	Zentrifuge eppendorf 5403 (Eppendorf) SPE-Vakuumkammer (Macherey&Nagel) IR Dancer 360 H (Hettlab AG, Schweiz)

6.2.3 Ergebnisse und Auswertung

Die im Rahmen des Forschungsprojektes anfallenden Calendula-Samenöle sollten auf Gehalte und Zusammensetzung der Flavonoide untersucht werden. Mit Hilfe des anhand der Standardsubstanzen bzw. durch Standardaufstockung etablierten Methodenrepertoires konnten jedoch keine Flavonoide in den Calendula-Samenölen nachgewiesen werden.

Zur Prüfung der HPLC-Methode und der LC/MS-Methode wurden daher in einem Versuch auch die Flavonoide der Calendula-Blüten untersucht. Da in den Ölen gleiche oder ähnliche Flavonoide zu erwarten waren wie in den Calendula-Blüten, deren Flavonoide zu einem großen Teil bereits bekannt sind, sollten die Methoden hierdurch zunächst auf ihre grundsätzliche Eignung geprüft werden.

Die Extraktion von 1g gemahlener, getrockneter Calendula-Blütenblätter erfolgte dazu mit 50ml Methanol über Nacht (16 Std.). Der Extrakt wurde anschließend filtriert, 1:100 verdünnt und mittels HPLC analysiert.

Ein Chromatogramm der Calendula-Blüte zeigt die folgende Abbildung (Abb. 9).

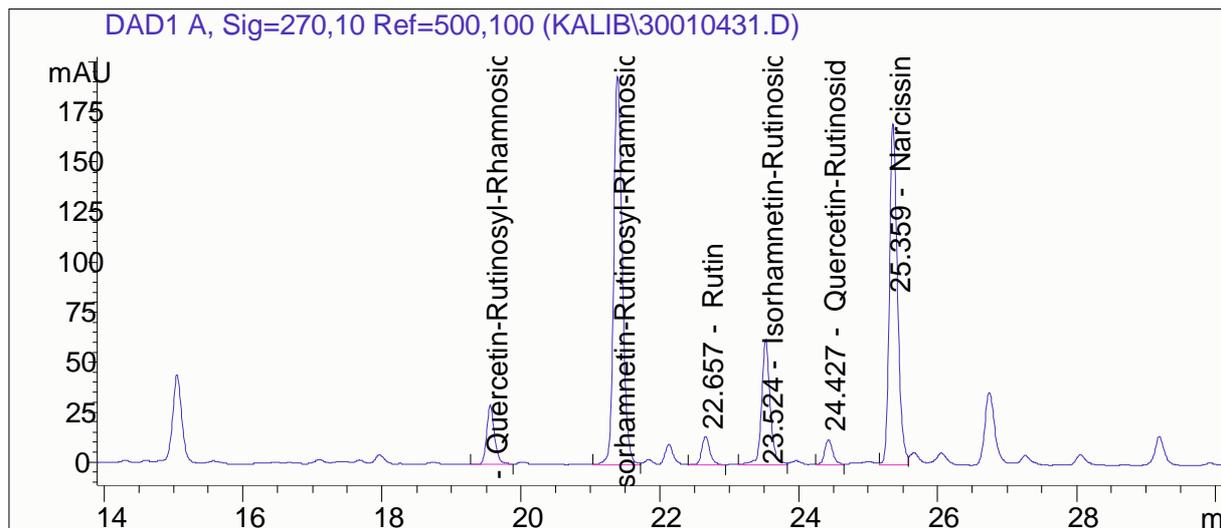


Abb. 9: Chromatogramm einer Calendula-Blüte

Durch Interpretation der ermittelten Massenspektren konnten unter Berücksichtigung von Literaturangaben in den Extrakten der Calendula-Blütenblätter weitere, nicht als Standardsubstanzen verfügbare, Flavonoide identifiziert werden. In Tabelle 11 sind die identifizierten Flavonoide der Calendula-Blüte mit den zugehörigen Retentionszeiten und den typischen Fragmenten zusammengefasst. Die Anlage 3 enthält die aufgezeichneten Massenspektren für diese 6 Flavonoidverbindungen der Calendula-Blüte.

Tab. 11: Identifizierte Flavonoide der Calendula-Blüten

Flavonoid der Calendula-Blüte	MG	Rt (min)	M+H ⁺	M+Na ⁺	Typische Fragmente			
Quercetin-Rutinosyl-Rhamnosid *	756	18,6	757	779	611	465	303	
Isorhamnetin-Rutinosyl-Rhamnosid *	770	20,5	771	793	625	569	317	
Rutin (Quercetin-3-β-O-Rutinosid)	610	21,6	611		495	473	391	
Isorhamnetin-Rutinosid *	624	22,5	625	647	479	391	341	317
Quercetin-Rutinosid *	611	23,6	611		391	362		
Narcissin (Isorhamnetin-3-β-O-Rutinosid)	624	24,6	625	647	479	391	341	317

*keine Standardsubstanzen verfügbar, Art der Verknüpfung unbekannt

Die Quantifizierung der Flavonoide ergab in den Calendula-Blüten-Extrakten mit Literaturangaben vergleichbare Flavonoidgehalte (Tab. 12).

Tab. 12: Ermittelte Flavonoidgehalte in den Calendula-Blüten (in g/100g)

Flavonoid	Flavonoidgehalt der Blüten (g/100g)
Quercetin-Rutinosyl-Rhamnosid *	0,07
Isorhamnetin-Rutinosyl-Rhamnosid*	0,48
Rutin	0,04
Isorhamnetin-Rutinosid*	0,16
Quercetin-Rutinosid*	0,03
Narcissin	0,40
Gesamtflavonoide	1,18

*quantifiziert über Narcissin-Kalibration

Die analytischen Bestimmungsmethoden stellten sich damit als durchaus geeignet für die Bestimmung der Flavonoide heraus.

Dass auch die Extraktionsmethode mittels SPE an der DIOL-Phase geeignet für die Bestimmung der Flavonoide aus Calendula-Ölen sein muss, zeigte bereits die Bestimmung der Wiederfindungsraten bei Standardaddition zu den zu extrahierenden Calendula-Ölen (siehe Tab. 10, Kap. 6.2.2.2.4).

Zusätzlich wurde schließlich auch ein Extraktionsversuch mit Olivenöl durchgeführt, von welchem der Flavonoidgehalt schon beschrieben ist. Auch hier konnten die Flavonoide mit den etablierten Methoden gefunden werden.

Weiterhin wurden die hydrolysierten Extrakte analysiert. Die Hydrolyse erfolgte dazu anhand 0,8ml Extrakt mit 0,2ml Salzsäure (25%) bei 80°C für 3 Stunden. Auch nach Hydrolyse der Extrakte der Calendula-Blüten wurden mit Literaturangaben vergleichbare Ergebnisse für die Aglykone erhalten. Es konnten Gehalte von 0,06% Quercetin und 0,36% Isorhamnetin in den getrockneten Calendula-Blüten ermittelt werden. In den Calendula-Samenölen waren aber auch Flavonoid-Aglykone nach Hydrolyse nicht nachweisbar.

Damit konnte eindeutig belegt werden, dass das aus den Früchten der Calendula gepresste Calendula-Samenöl keine Flavonoide enthält.

Da die in der Literatur beschriebenen Flavonoidgehalte der Blütenblätter aber auch im Rahmen des Forschungsthemas bestätigt werden konnten, sollte abschließend noch geprüft werden, ob die Flavonoide eventuell in den Presskuchen bei der Ölgewinnung zurückbleiben oder ob sich überhaupt Flavonoide in den Calendulasamen befinden. Bei diesen Untersuchungen konnten weder in den Presskuchen noch in den Calendulasamen Flavonoide nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass die in den Calendula-Blüten enthaltenen Flavonoide nach der Reife zu einem Teil in die Früchte übergehen und bei der Ölpressung in das Calendula-Samenöl gelangen können, konnte damit endgültig widerlegt werden. Um flavonoidhaltige Calendula-Samenöle herzustellen, müssen daher die Blütenblätter in den Herstellungsprozess einbezogen werden. Dies kann, wie bisher üblich, in Form von Öl-Auszügen der Blütenblätter geschehen oder aber durch ein Mitpressen der Blütenblätter bei der Ölherstellung. Der Vollständigkeit halber wurde ein Versuch hierzu von der Büro GbR bereits durchgeführt. Für die Pressung von 70g Sonnenblumenkernen wurden 30g getrocknete Calendula-Blüten eingesetzt. In dem so gewonnenen Öl konnten nur durch Aufarbeitung sehr großer Mengen des Sonnenblumen-Calendula-Öls sehr geringe Gehalte der Flavonoide Isorhamnetin-Rutinosyl-Rhamnosid, Isorhamnetin-Rutinosid und Narcissin nachgewiesen werden.

Der Großteil der Flavonoide verblieb aber in dem bei der Ölpressung zurückbleibenden Filterkuchen, der die mitgepressten Calendula-Blüten noch enthält. Die verhältnismäßig kurze Kontaktdauer der Calendula-Blüten mit dem bei der Sonnenblumenkern-Pressung entstehenden Öl reicht also nicht aus, um die polaren Flavonoide zu befriedigenden Anteilen der Blütenblätter in das Öl zu überführen. Um wirksame Gehalte der Calendula-Flavonoide in das Sonnenblumenöl einzubringen, bietet sich damit nur die Herstellung von öligen Auszügen aus Calendula-Blüten.

Das im Rahmen des Forschungsthemas aus den Früchten der Ringelblume gepresste fette Öl enthält also keine nachweisbaren Gehalte der Calendula-Flavonoide. Dagegen ist das Calendula-Öl reich an wertgebenden Fettsäuren, wie der Calendulasäure, der Ölsäure und der mehrfach ungesättigten ω -6-Fettsäure Linolsäure.

7 Voraussichtlicher Nutzen

Die entwickelten und validierten Analysenmethoden waren Voraussetzung zur Charakterisierung der Calendula-Öle. Sie ermöglichen aber auch in Zukunft eine enge Zusammenarbeit mit der Biro GbR und der Dr. Junghanns GmbH sowie mit anderen Unternehmen der Region als kompetenter Partner.

Der voraussichtliche Nutzen der Ergebnisse des Gesamtprojektes ist den Berichten der Biro GbR und der Dr. Junghanns GmbH zu entnehmen.

8 Während der Laufzeit bekannt gewordener Fortschritt

Während der Projektlaufzeit ist kein Fortschritt bezüglich der Aufgaben- und Zielstellungen des Projektpartners Hochschule Anhalt (FH) bekannt geworden. Bezüglich des Gesamtprojektes sind Angaben hierzu den Berichten der Biro GbR und der Dr. Junghanns GmbH zu entnehmen.

9 Veröffentlichungen

Veröffentlichungen zu Inhalten des Projektes wurden von der Hochschule Anhalt (FH) nicht getätigt. Bezüglich des Gesamtprojektes sind Angaben hierzu den Berichten der Biro GbR und der Dr. Junghanns GmbH zu entnehmen.

Literatur

Bilia, A.R. et al. (2001): Characterization of Calendula Flower, Milk-Thistle Fruit, and Passion Flower Tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Chromatographia* 53, 210-215

Bohm, A.B.; Stuessy, T.F. (2001): Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae). Springer-Verlag, Wien, New York

Cinquanta, L. et al. (1997): Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *JAOCS* 74, 1259-1264

Dressel, Haus, Schroebler (1968): Alkalische Umesterung. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 4, 143ff.

Frauen, M. (2001): Analytik kosmetisch wirksamer Pflanzenextrakte mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS). Dissertation Hamburg

Gómez-Alonso, S. et al. (2002): Phenolic compounds profile of cornicabra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6812-6817

Gómez-Alonso, S. et al. (2003): Changes in Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Virgin Olive Oil during Frying. 51, 667-672

Häkkinen, S.; Auriola, S. (1998): High performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *J. Chr. A* 829, 91-100

Isaac, O. (1992): Die Ringelblume. Botanik, Chemie, Pharmakologie, Toxikologie, Pharmazie und therapeutische Verwendung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Justesen, U. et al. (1998): Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavonones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chr. A* 799, 101-110

Justesen, U. (2000): Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J. Chr. A* 902, 369-379

Justesen, U.; Knuthsen, P. (2001): Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry* 73, 245-250

Komissarenko, N.F. et al. (1989): Flavonoids of inflorescences of *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds* 88, 675-680

Manna, C. et al. (1997): The protective effect of olive oil polyphenol (3,4-Dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 127, 286-292

Mateos, R. et al. (2001): Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2185-2192

Menghinello, P. et al. (1999): Simultaneous analysis of flavonoid aglycones in natural products using an RP-HPLC method. *J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL.* 22, 3007-3018

Piccaglia, R. (1997): Effects of harvesting date and climate on the flavonoid and carotenoid contents of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour and Fragrance Journal* 12, 85-90

Servili, M. (1999): High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance characterization. *JAOCS* 76, 873-882

Servili, M. et al. (2003): Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time of exposure of olive pastes to air contact during the mechanical extraction process. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7980-7988

Steinegger, E.; Hänsel, R. (1988) *Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie*. Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage

Tsimidou, M. (1998): Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. Review. *Ital. J. Food Sci.* 2, 99-116

Visioli, F.; Galli, C. (1998): The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New findings. *Nutr. Rev.* 56, 412-147

Zitterl-Eglseer, K. et al. (1997): Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology* 57, 139-144

Anlagenverzeichnis

Anlage 1: Ermittelte Fettsäurezusammensetzung sofort bzw. nach einem Jahr Lagerung und durchschnittliche prozentuale Abweichungen.....	31
Anlage 2: Massenspektren der Standardsubstanzen	32
Anlage 3: Massenspektren der Flavonoide der Calendula-Blüten.....	39

Anlage 1: Ermittelte Fettsäurezusammensetzung sofort bzw. nach einem Jahr Lagerung und durchschnittliche prozentuale Abweichungen

Probe		Fettsäureanteil in %								
		C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3c	C20:0	C20:1n9c	C18:3 8t10t12c	C22:1n9c
0	sofort	2,86	1,54	2,57	26,10	0,63	0,34	0,23	63,62	2,12
	nach 1 Jahr	2,88	1,51	2,54	26,26	0,63	0,30	0,22	63,35	2,31
	Abweichung (%)	0,74	-1,40	-1,25	0,60	-0,97	-11,08	-2,56	-0,41	8,98
1	sofort	3,20	1,39	3,90	27,39	0,63	0,31	0,26	61,89	1,04
	nach 1 Jahr	3,21	1,36	3,67	27,33	0,62	0,28	0,26	62,09	1,18
	Abweichung (%)	0,43	-1,89	-5,94	-0,24	-0,60	-9,63	-0,27	0,33	13,51
2	sofort	3,15	1,28	3,08	26,15	0,55	0,29	0,24	64,37	0,89
	nach 1 Jahr	3,19	1,26	2,99	26,15	0,55	0,27	0,24	64,31	1,04
	Abweichung (%)	1,20	-1,63	-2,80	0,00	-0,13	-7,25	2,05	-0,09	16,37
3	sofort	3,23	1,45	3,52	27,81	0,55	0,32	0,26	61,96	0,90
	nach 1 Jahr	3,26	1,40	3,43	27,77	0,55	0,29	0,26	61,98	1,06
	Abweichung (%)	0,70	-3,45	-2,46	-0,12	0,40	-10,26	-2,13	0,04	17,81
4	sofort	3,41	1,49	4,11	27,85	0,60	0,33	0,28	61,14	0,80
	nach 1 Jahr	3,48	1,48	3,95	27,93	0,59	0,30	0,28	60,99	1,01
	Abweichung (%)	2,13	-1,08	-4,05	0,29	-1,94	-8,76	1,61	-0,24	26,82
5	sofort	3,45	1,56	4,40	28,46	0,58	0,32	0,27	59,74	1,22
	nach 1 Jahr	3,59	1,60	4,38	28,88	0,58	0,31	0,27	58,92	1,47
	Abweichung (%)	3,95	2,86	-0,51	1,45	0,07	-2,51	1,36	-1,37	20,33
6	sofort	3,86	1,37	4,61	28,90	0,65	0,33	0,26	59,31	0,71
	nach 1 Jahr	4,01	1,41	4,65	29,12	0,66	0,30	0,26	58,74	0,84
	Abweichung (%)	3,70	2,98	0,83	0,76	1,80	-6,96	2,92	-0,95	18,00
7	sofort	3,45	1,41	4,13	28,49	0,63	0,31	0,25	60,82	0,51
	nach 1 Jahr	3,49	1,37	4,02	28,53	0,63	0,29	0,25	60,87	0,56
	Abweichung (%)	1,23	-3,16	-2,58	0,14	0,41	-7,49	-1,79	0,08	9,98
8	sofort	3,58	1,50	6,12	31,00	0,62	0,35	0,29	56,10	0,44
	nach 1 Jahr	3,63	1,46	6,02	30,92	0,61	0,32	0,28	56,22	0,54
	Abweichung (%)	1,29	-2,49	-1,65	-0,27	-1,29	-8,76	-3,29	0,22	23,91
9	sofort	3,65	1,62	5,14	29,74	0,57	0,35	0,25	57,99	0,69
	nach 1 Jahr	3,64	1,58	4,92	29,66	0,58	0,32	0,25	58,27	0,78
	Abweichung (%)	-0,38	-2,39	-4,24	-0,27	0,94	-10,05	2,60	0,48	13,80
10	sofort	2,94	1,64	3,26	27,13	0,54	0,34	0,25	62,93	0,97
	nach 1 Jahr	3,24	1,79	3,52	28,19	0,58	0,32	0,29	60,96	1,11
	Abweichung (%)	9,96	8,93	7,95	3,93	6,30	-5,49	18,34	-3,13	14,55
11	sofort	3,00	1,67	3,66	26,48	0,58	0,33	0,26	63,31	0,71
	nach 1 Jahr	3,02	1,63	3,46	26,49	0,58	0,28	0,26	63,42	0,86
	Abweichung (%)	0,38	-2,60	-5,28	0,01	0,70	-15,17	1,94	0,18	21,26
12	sofort	3,20	1,58	3,62	28,05	0,70	0,32	0,28	58,36	3,92
	nach 1 Jahr	3,23	1,57	3,58	28,21	0,69	0,30	0,28	58,10	4,04
	Abweichung (%)	1,15	-0,34	-1,26	0,59	-0,70	-8,34	1,98	-0,45	2,94
13	sofort	3,41	1,74	3,82	27,90	0,74	0,35	0,29	60,21	1,54
	nach 1 Jahr	3,43	1,73	3,73	28,04	0,73	0,30	0,30	60,02	1,74
	Abweichung (%)	0,42	-0,72	-2,59	0,48	-1,04	-14,17	1,60	-0,31	13,21
14	sofort	3,31	1,51	3,51	28,90	0,70	0,31	0,27	59,31	2,16
	nach 1 Jahr	3,31	1,48	3,55	28,86	0,69	0,28	0,28	59,29	2,27
	Abweichung (%)	-0,27	-1,77	0,92	-0,16	-1,89	-11,55	3,61	-0,03	5,09
durchschnittliche Abweichung (%)		1,77	-0,54	-1,66	0,48	0,14	-9,16	1,87	-0,38	15,10

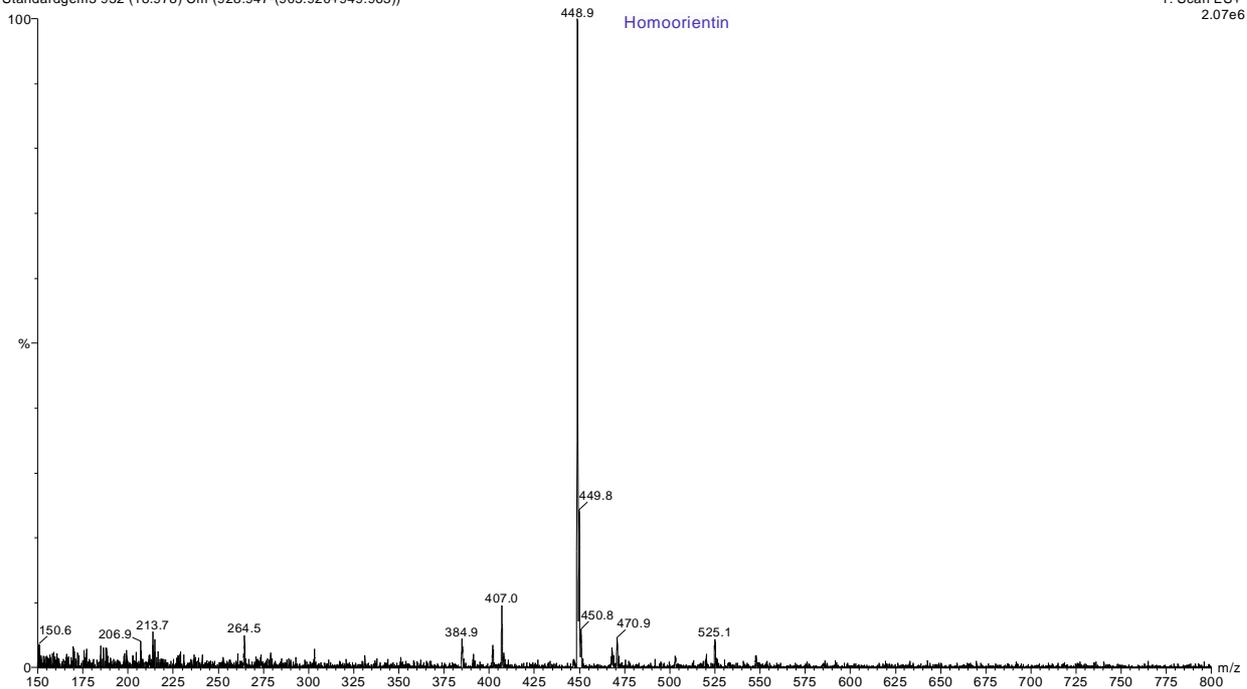
Anlage 2: Massenspektren der Standardsubstanzen

Homorientin (Luteolin-6-C-Glukosid)

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 932 (18.978) Cm (928:947-(905:920+949:963))

1: Scan ES+
2.07e6

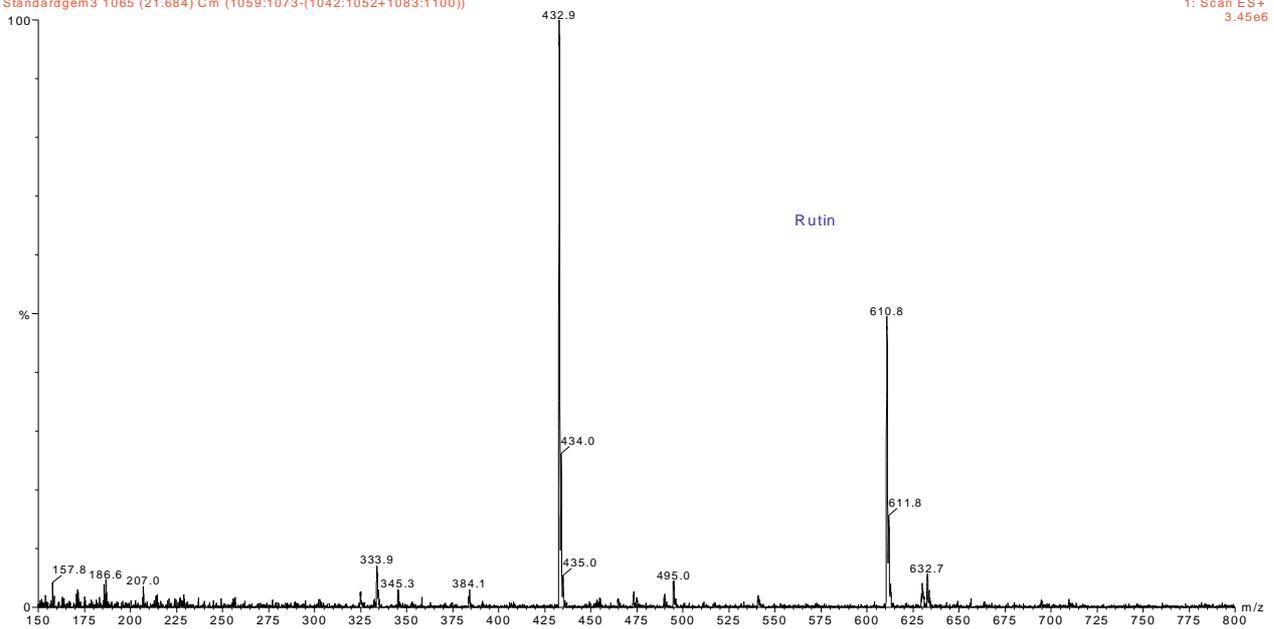


Rutin (Quercetin-3-β-O-Rutinosid)

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1065 (21.684) Cm (1059:1073-(1042:1052+1083:1100))

1: Scan ES+
3.45e6



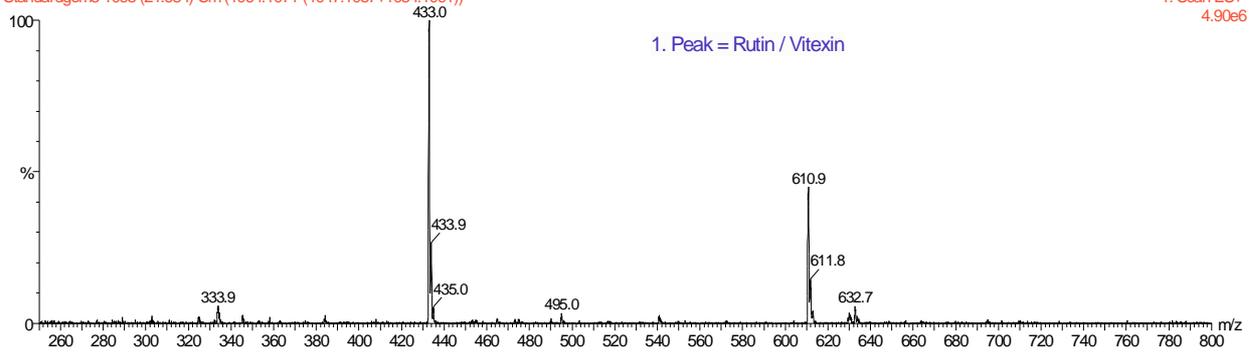
Spektrum verunreinigt durch gleichzeitig eluierendes Vitexin

Vitexin (Apigenin-8-C-Glukosid)

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1065 (21.684) Cm (1064:1071-(1047:1057+1084:1091))

1: Scan ES+
4.90e6

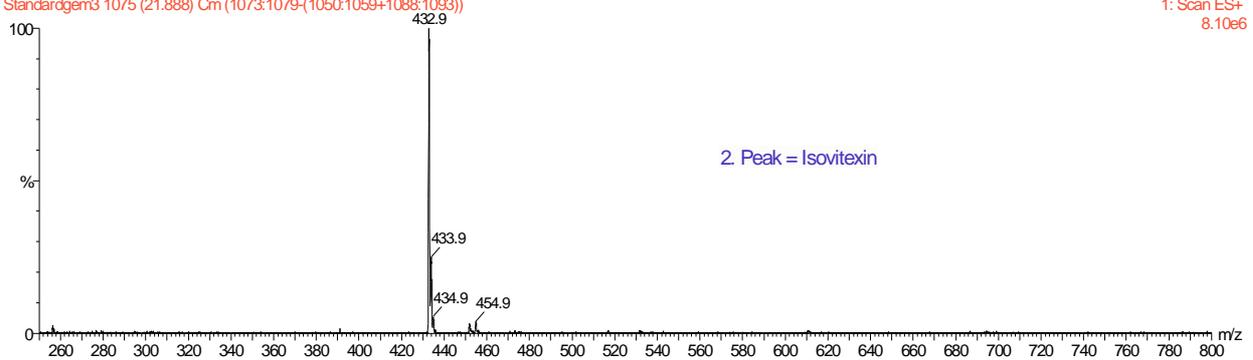


Isovitexin (Apigenin-6-C-Glukosid)

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1075 (21.888) Cm (1073:1079-(1050:1059+1088:1093))

1: Scan ES+
8.10e6

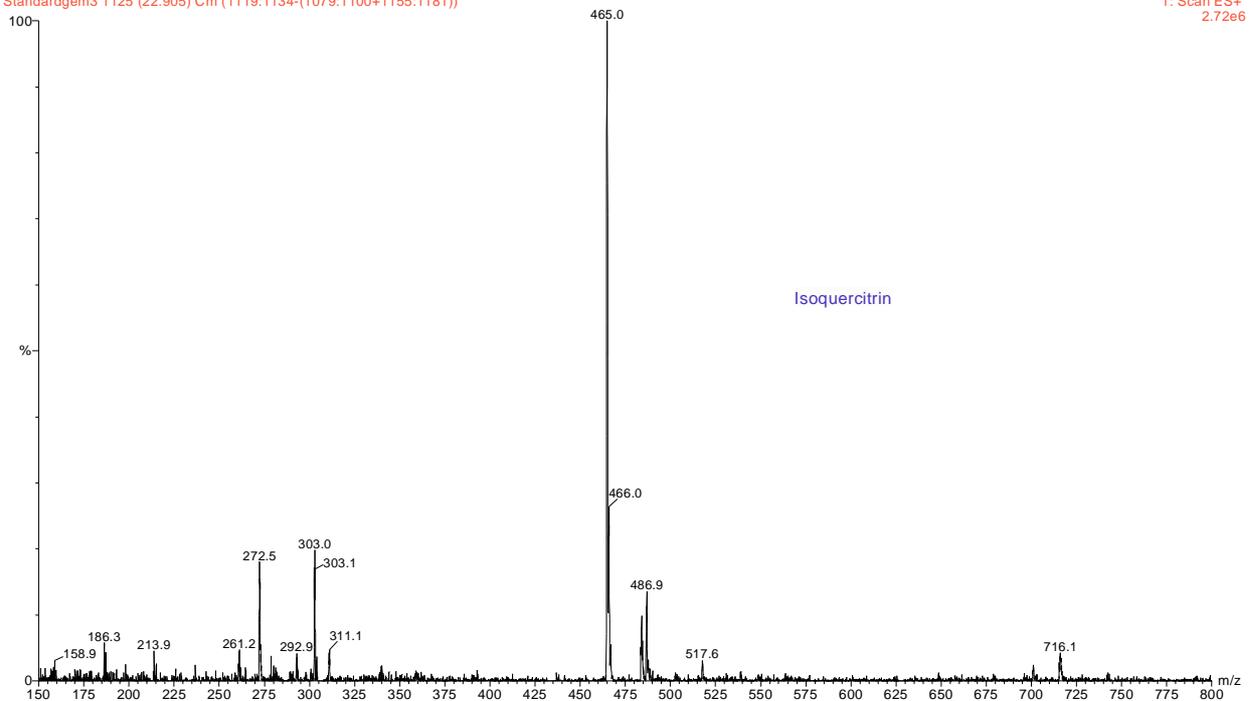


Isoquercitrin (Quercetin-3-b-O-Glukosid)

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1125 (22.905) Cm (1119:1134-(1079:1100+1155:1181))

1: Scan ES+
2.72e6

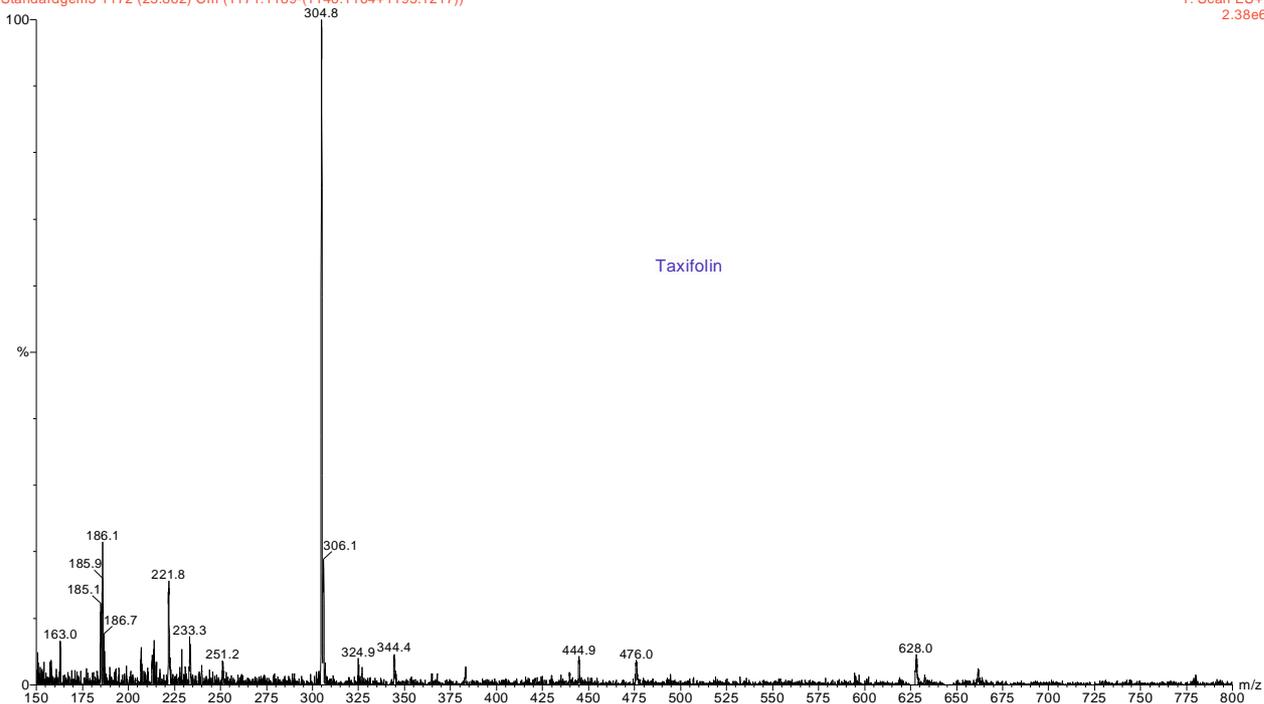


Taxifolin

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1172 (23.862) Cm (1171:1189-(1146:1164+1195:1217))

1: Scan ES+
2.38e6

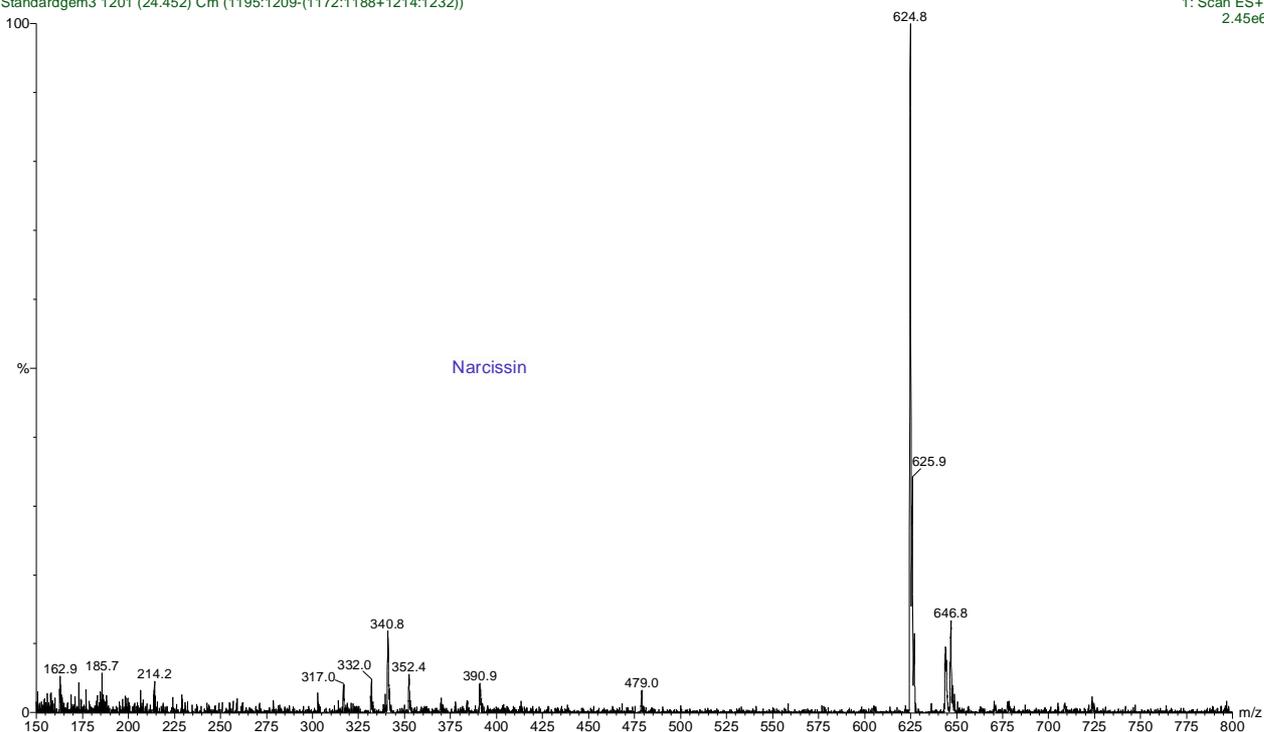


Narcissin (Isorhamnetin-3-β-O-Rutinosid)

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1201 (24.452) Cm (1195:1209-(1172:1188+1214:1232))

1: Scan ES+
2.45e6

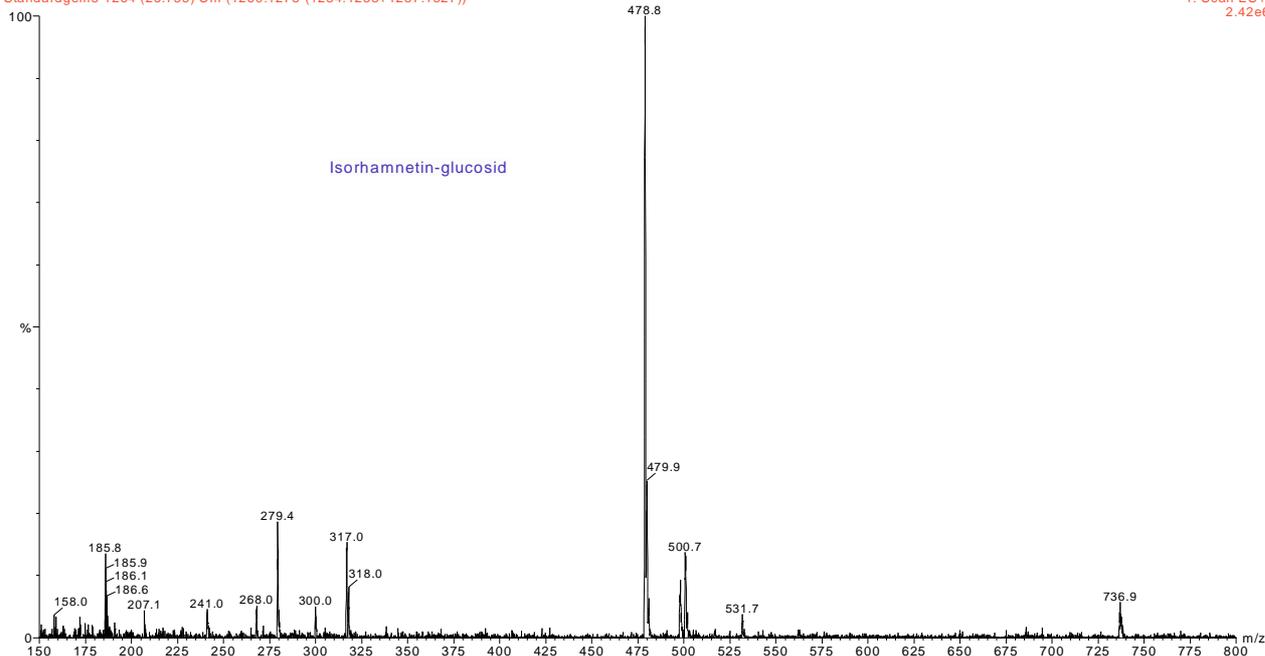


Isorhamnetin-3-β-O-Glukosid

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1264 (25.735) Cm (1260:1278-(1234:1253+1287:1327))

1: Scan ES+
2.42e6

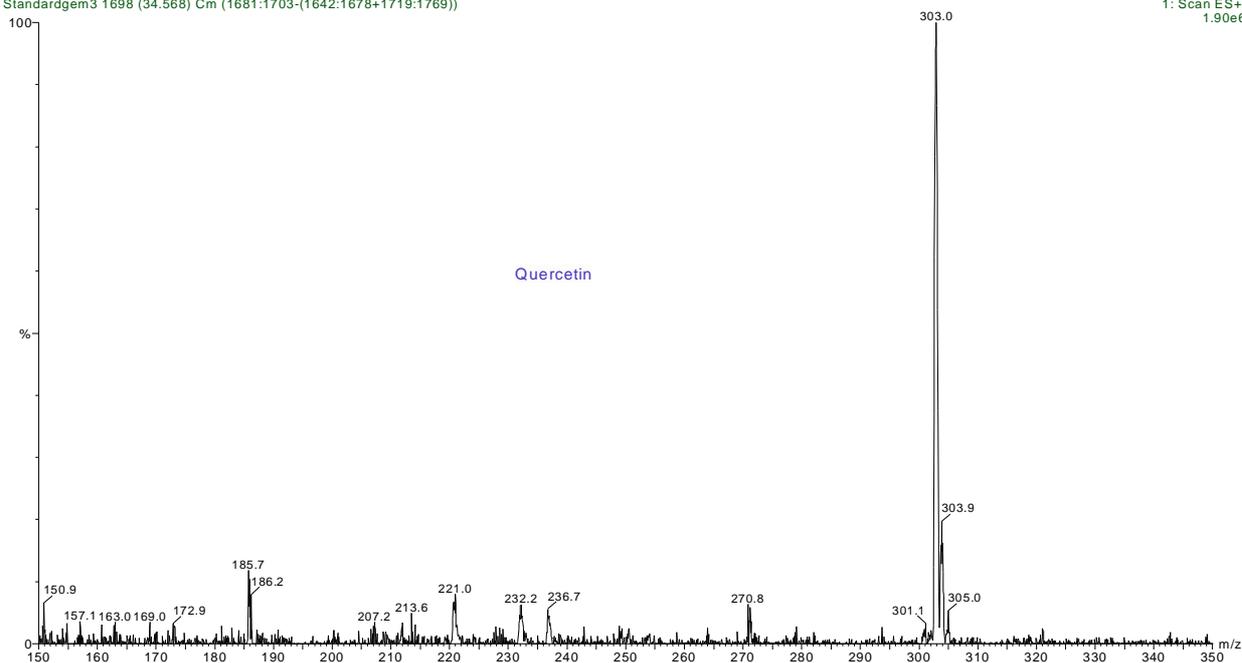


Quercetin

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1698 (34.568) Cm (1681:1703-(1642:1678+1719:1769))

1: Scan ES+
1.90e6

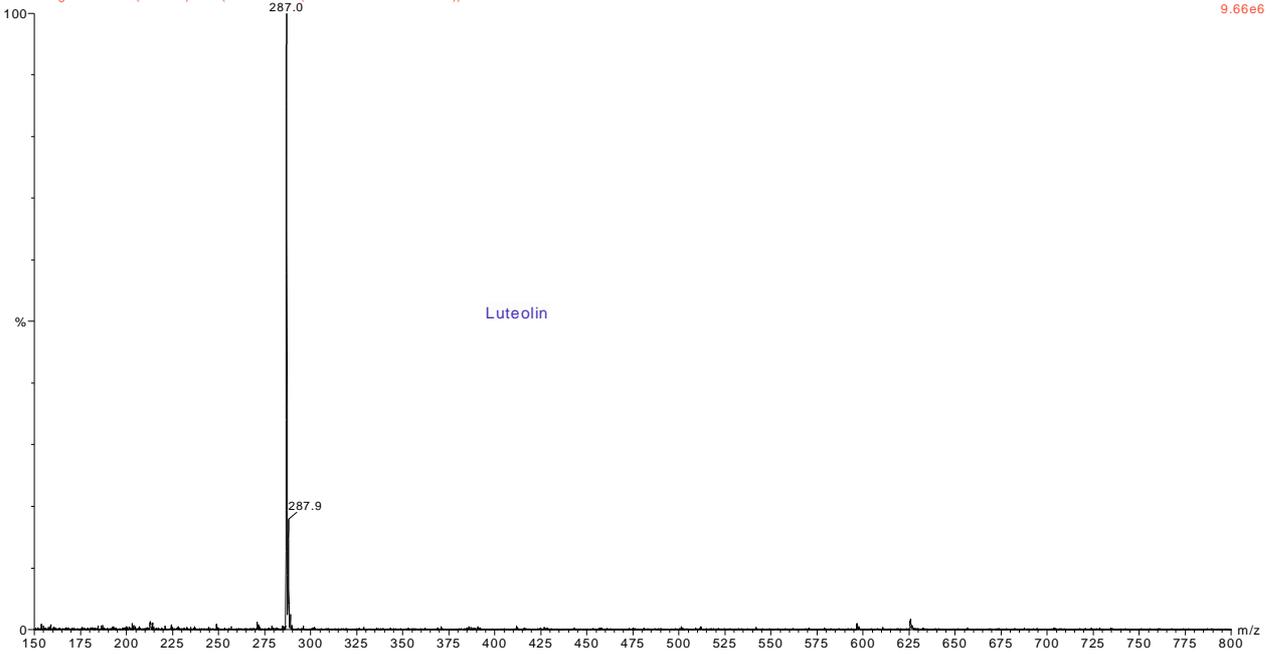


Luteolin

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1671 (34.018) Cm (1666:1679-(1634:1665+1711:1732))

1: Scan ES+
9.66e6

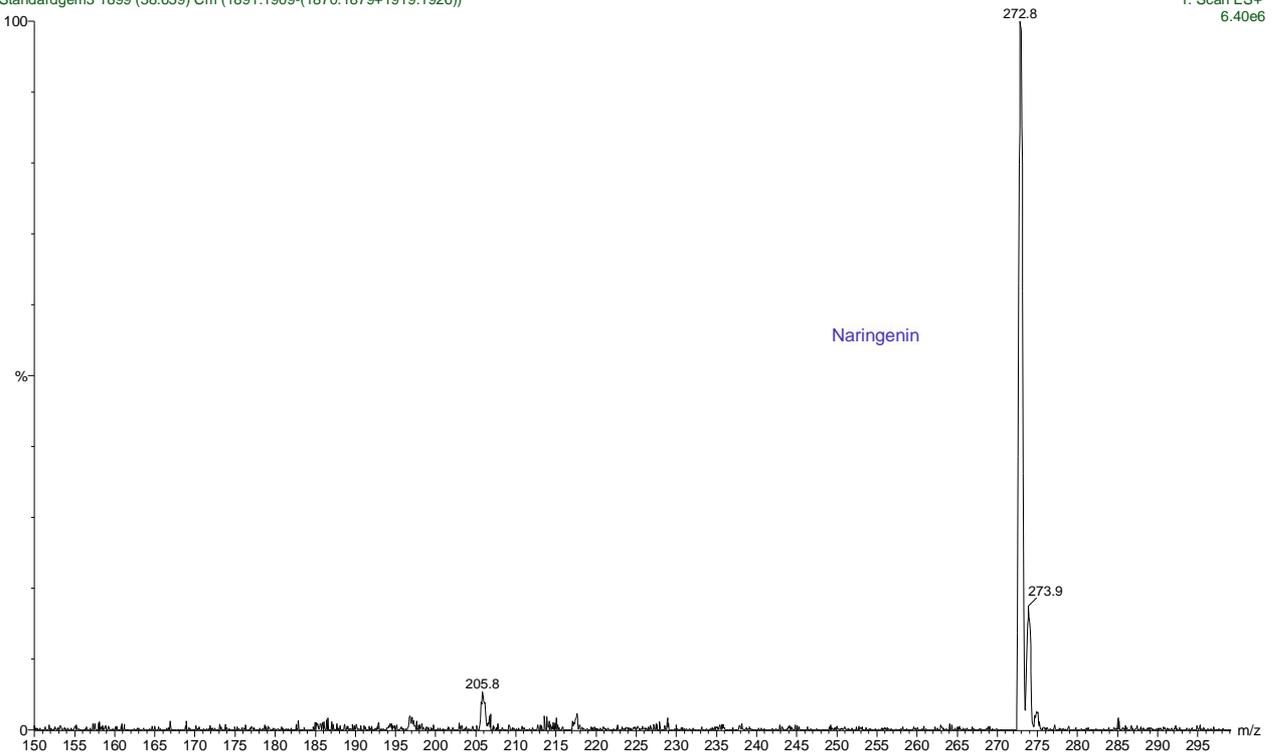


Naringenin

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1899 (38.659) Cm (1891:1909-(1870:1879+1919:1926))

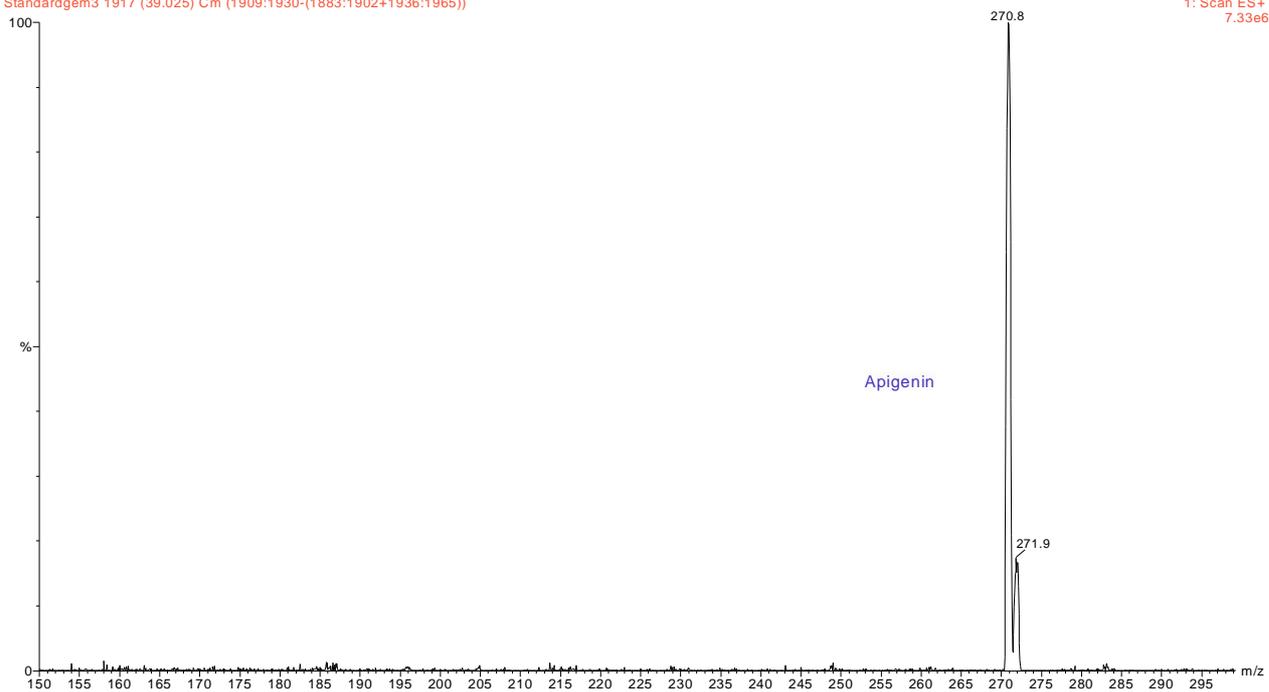
1: Scan ES+
6.40e6



Apigenin

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1917 (39.025) Cm (1909:1930-(1883:1902+1936:1965))



Kaempferol

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1974 (40.185) Cm (1956:1978-(1923:1935+1987:2018))

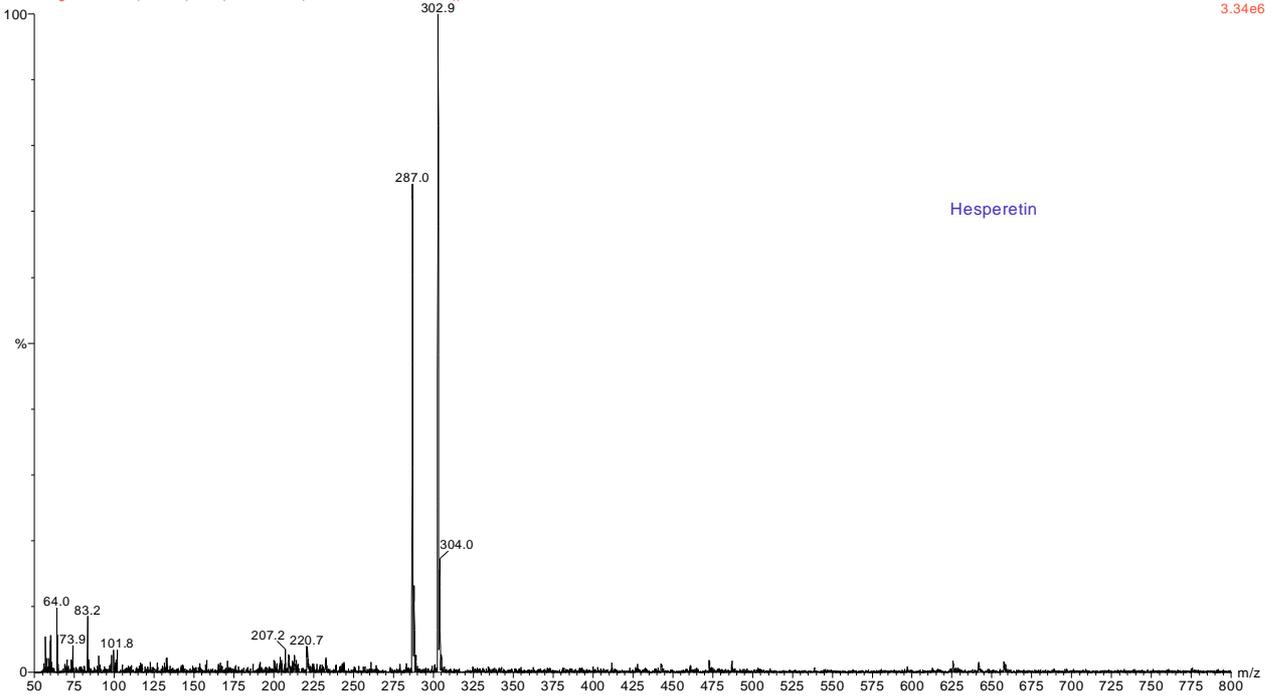


Hesperetin

Flavonoide MS optimiert

Standardgem3 1974 (40.185) Cm (1961:1995-(1928:1962+1993:2002))

1: Scan ES+
3.34e6

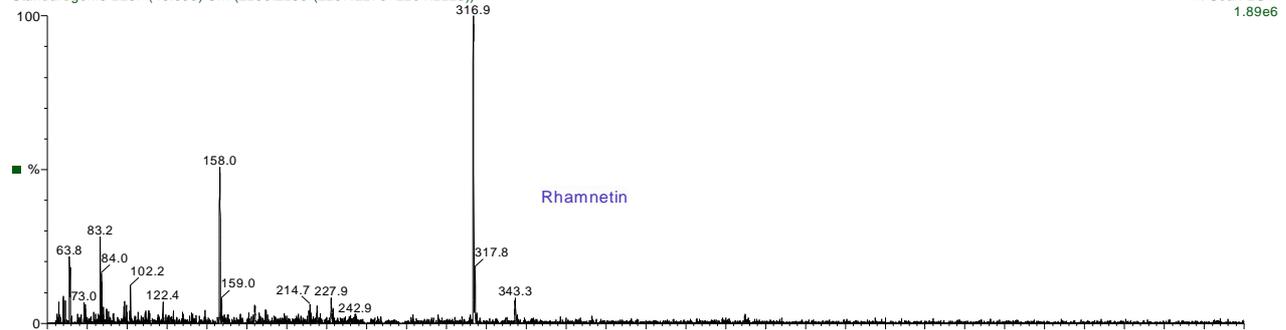


Rhamnetin, Isorhamnetin

Flavonoide MS optimiert

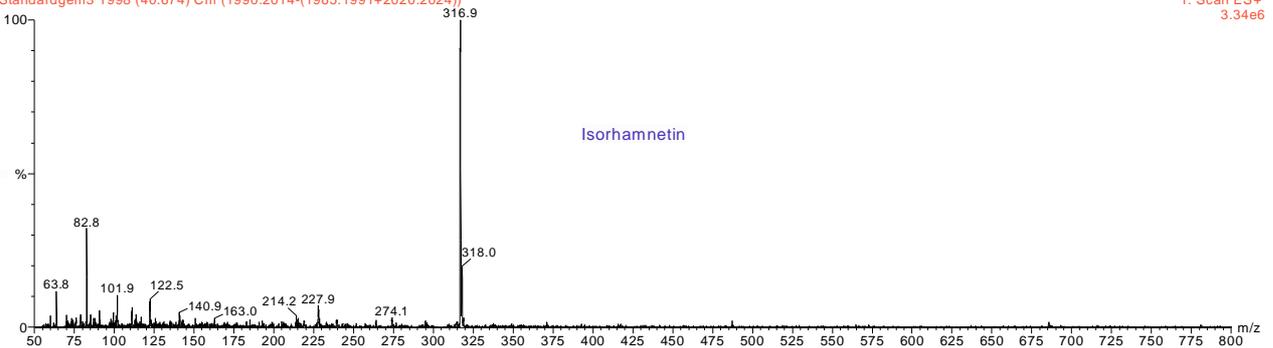
Standardgem3 2237 (45.538) Cm (2230:2253-(2257:2278+2204:2223))

1: Scan ES+
1.89e6



Standardgem3 1998 (40.674) Cm (1990:2014-(1965:1991+2020:2024))

1: Scan ES+
3.34e6



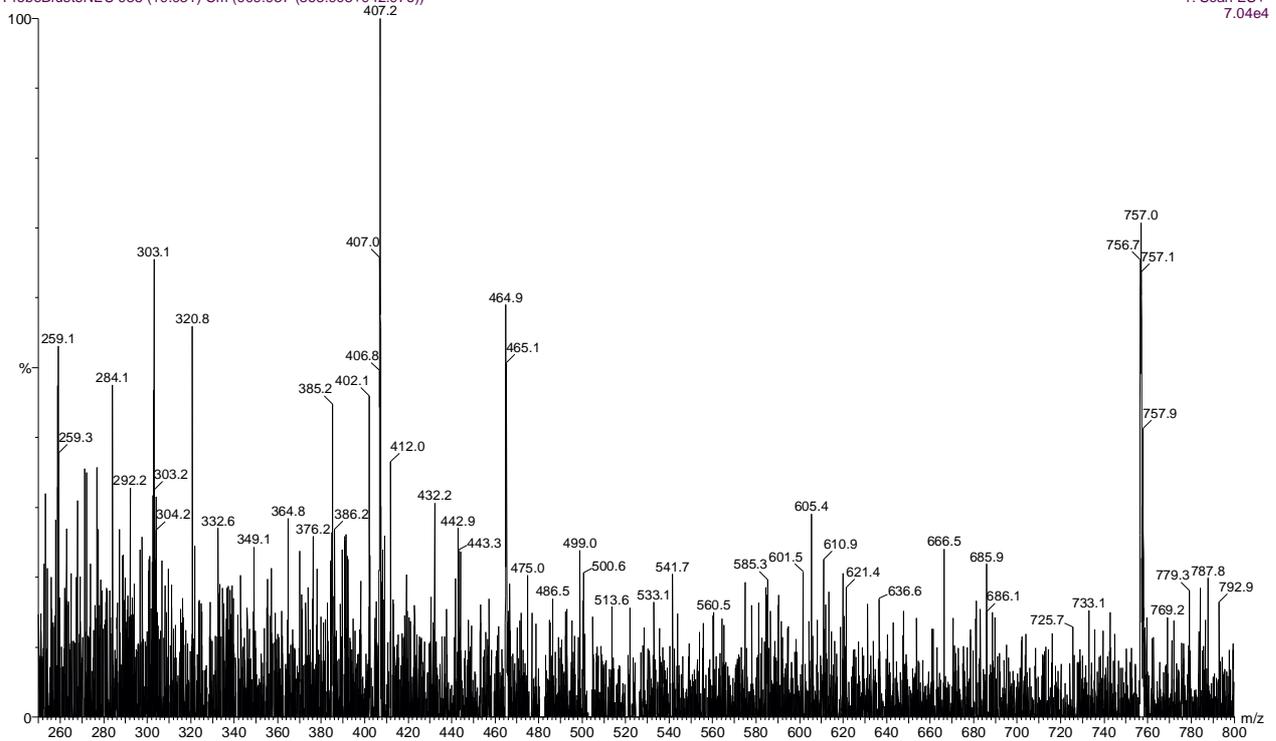
Anlage 3: Massenspektren der Flavonoide der Calendula-Blüten

Quercetin-Rutinosyl-Rhamnosid

Flavonoide MS optimiert

ProbeBlueteNEU 935 (19.031) Cm (909:937-(868:903+942:976))

1: Scan ES+
7.04e4

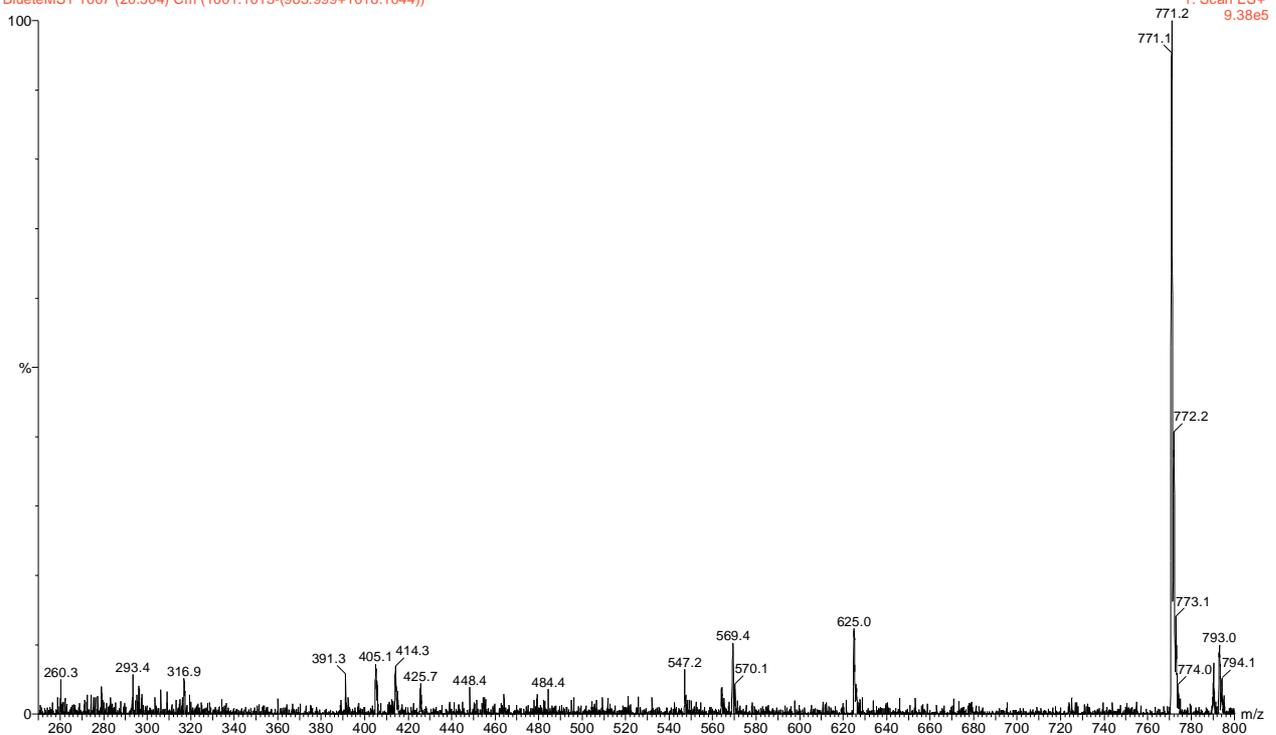


Isorhamnetin-Rutinosyl-Rhamnosid

MS Full Scan

BlueteMS1 1007 (20.504) Cm (1001:1013-(983:999+1018:1044))

1: Scan ES+
9.38e5

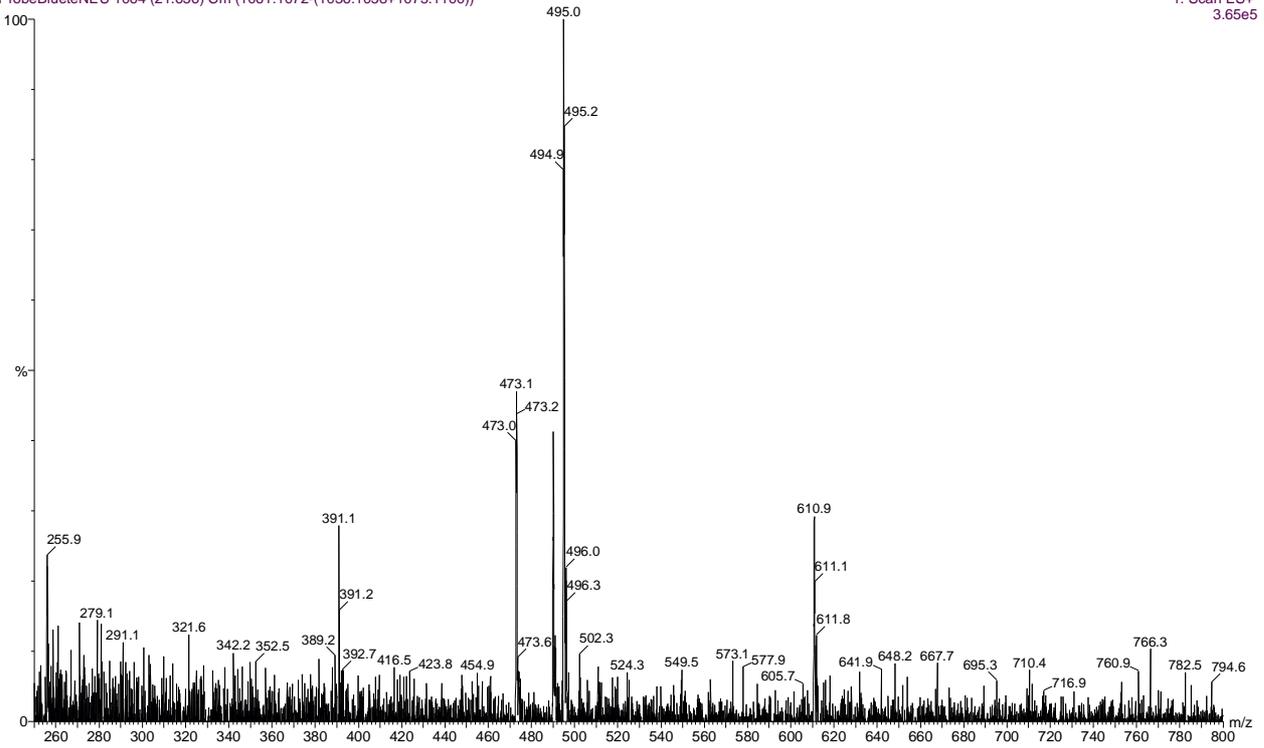


Rutin

Flavonoide MS optimiert

ProbeBlueteNEU 1064 (21.656) Cm (1061:1072-(1036:1058+1075:1100))

1: Scan ES+
3.65e5

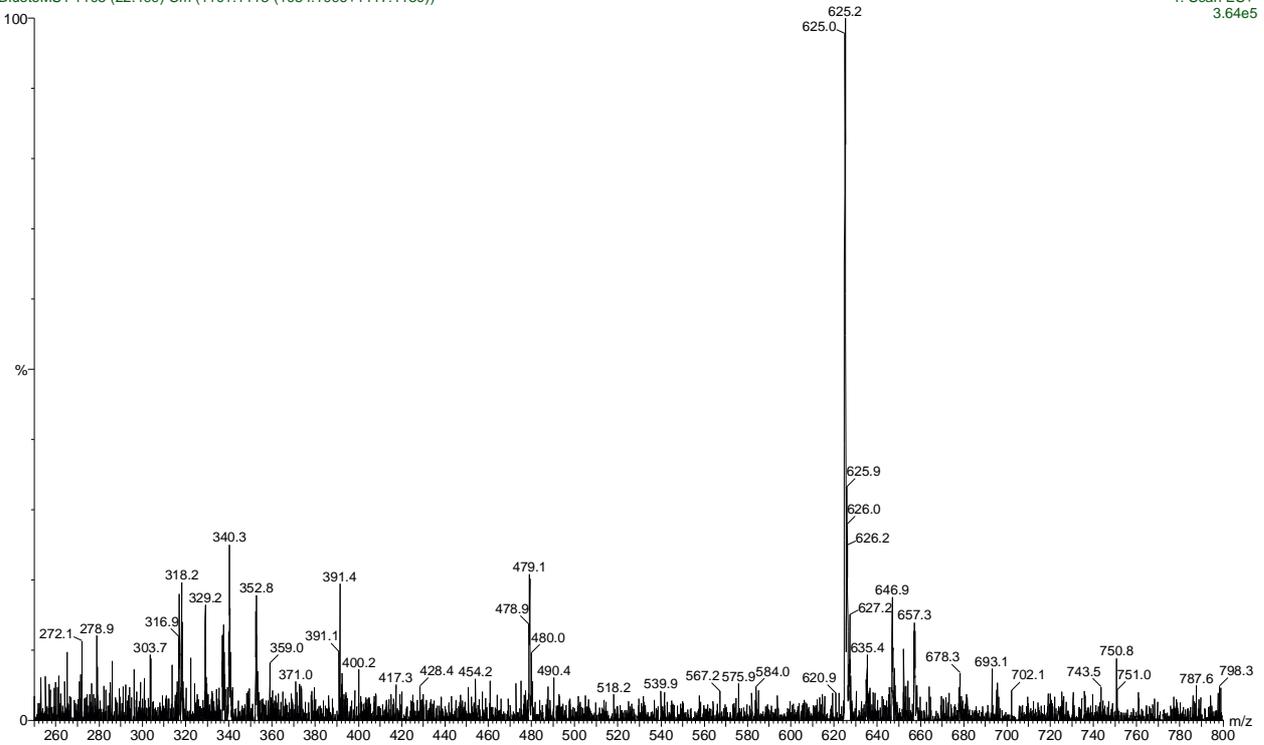


Isorhamnetin-Rutinosid

MS Full Scan

BlueteMS1 1105 (22.499) Cm (1101:1113-(1084:1096+1117:1130))

1: Scan ES+
3.64e5

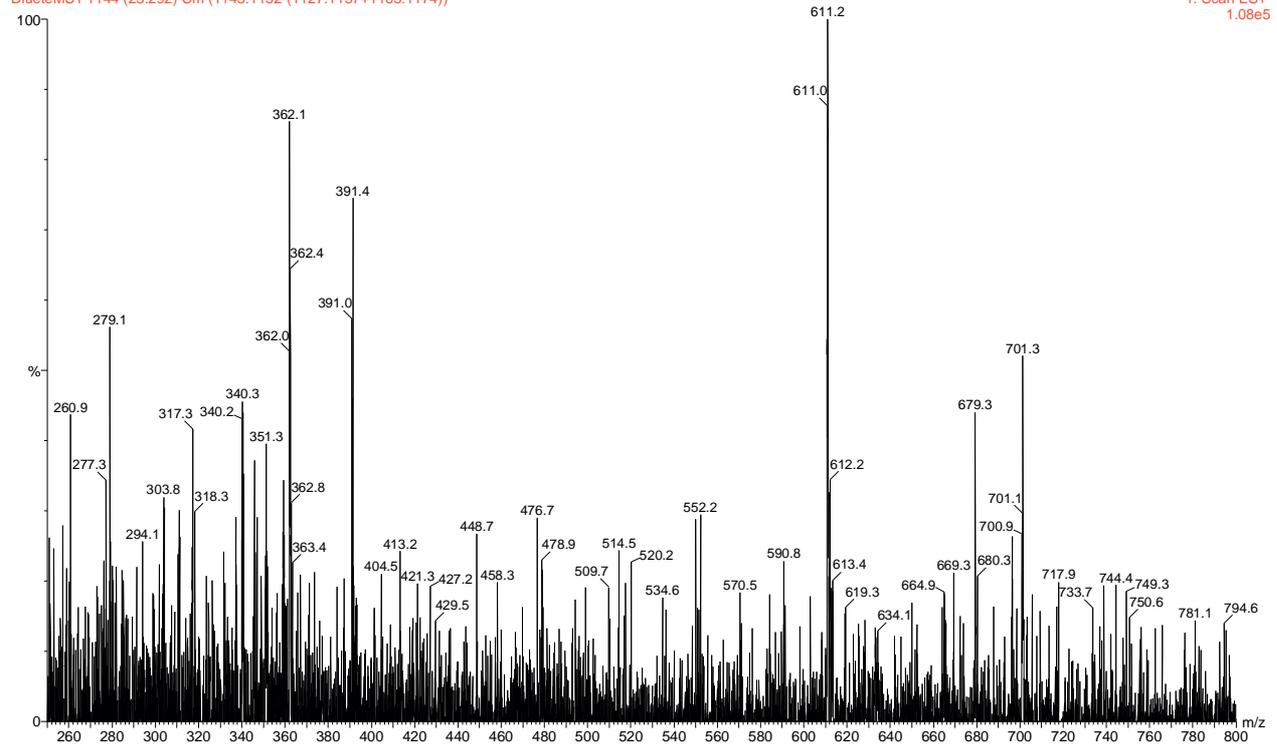


Quercetin-Rutinosid

MS Full Scan

BlueteMS1 1144 (23.292) Cm (1143:1152-(1127:1137+1163:1174))

1: Scan ES+
1.08e5



Narcissin

MS Full Scan

BlueteMS1 1197 (24.371) Cm (1191:1205-(1173:1192+1205:1227))

1: Scan ES+
1.14e6

