

Schlussbericht zu Nr. 3.1 BNBEST-BMBF 98

Zuwendungsempfänger:
Hochschule Anhalt (FH)
Kanzler
Bernburger Str. 55
06366 Köthen

Förderkennzeichen:
03i0636C

Vorhabensbezeichnung:
InnoRegio InnoPlanta – Verbundprojekt – Entwicklung und Optimierung von neuen
Natürlichen Aromen; Teilprojekt 3

Laufzeit des Vorhabens:
01.03.2004 bis 30.06.2006

Berichtszeitraum:
01.03.2004 bis 30.06.2006

Bernburg, den 25.10.2006

.....

Unterschrift (Prof.Schellenberg/Wolff)

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

I Aufgabenstellung

II Voraussetzungen

III Planung und Ablauf des Vorhabens

IV Wissenschaftlicher und technischer Stand

V Zusammenarbeit mit anderen Stellen

VI Ergebnisse

1 Methodenentwicklung/ Methodenoptimierung

1.1 Aromastoffe

1.1.1 Extraktionsmethoden

1.1.1.1 Wasserdampfdestillation

1.1.1.2 Microdestillation

1.1.1.3 Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME)

0.0.0.4 Headspace Solid Phase Dynamic Extraction (HS-SPDE)

1.1.2 Gaschromatographische Methoden

1.1.3 Identifizierung

1.2 Fettsäuremethylester-Bestimmung

1.2.1 Fettextraktion des Pflanzenmaterials

1.2.2 Verseifung des extrahierten Pflanzenmaterials und der Öle

1.2.3 Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuremethylester

0.3 Bestimmung der Flavonoide

1.3.1 Extraktion

1.3.2 Chromatographischer Nachweis (HPLC)

1.3.3 Identifizierung

1.4 Herstellung von Standardsubstanzen zur NIR-Kalibrierung

2 Analytische Ergebnisse

1.1 Aromastoffe

1.1.1 Ätherische Ölgehalte

1.1.2 Aromakomponenten

1.2 Fettsäuren

1.3 Flavonoide

1.4 Ergebnisse der Isolierung von Standardsubstanzen für die NIR-Kalibrierung

VII Voraussichtlicher Nutzen

VIII Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

IX geplante Veröffentlichungen

literaturgröibis

Alagengröibis



Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Darstellung Wasserdampfdestillationsanlage
- Abb. 2: Darstellung eines Microdestillers
- Abb. 3: GC-Methode D
- Abb. 4: GC-Methode C
- Abb. 5: GC-Methode B
- Abb. 6: GC-Methode A
- Abb. 7: Vergleich der Verfahren zur Verseifung der Fettsäuremethylester
- Abb. 8: Äthersiche Ölgehalte Basilikum- Züchtungsjahr 2005 (Pflanzen und Öle)
- Abb.9: Äthersiche Ölgehalte Oregano- Züchtungsjahr 2005 (Pflanzen und Öle)
- Abb. 10: Reproduzierbarkeit von SPME-Fasern
- Abb. 11: Reproduzierbarkeit von SPDE-Kanülen
- Abb. 12: Balkendiagramm Basilikum-Pflanzen Bas54_05 mit prozentualen Anteilen der Aromakomponenten
- Abb. 13: Chromatogramm Basilikum-Pflanzenprobe Bas15_05
- Abb. 14: Balkendiagramm Oregano-Pflanzen Ori1A_05 mit prozentualen Anteilen der Aromakomponenten
- Abb. 15: Chromatogramm Oregano-Pflanzenprobe Ori4A_05
- Abb. 16: Chromatogramm Oregano-Probe (Ori19_04)
- Abb. 17: Chromatogramm Oregano-Probe (Ori19_04) nach dem präparativen Sammeln



Tabellenverzeichnis

- Tab.1: Gaschromatographische Methoden
- Tab.2: Vergleich der RT der Standardsubstanzen mit den RT der Probenkomponenten
- Tab.3: Vergleich der RI aus Literaturangaben mit den RI der Probenkomponenten, sowie Spektrenvergleich mit Datenbanken (MassFinder 3.0)
- Tab.4: Gaschromatographische Ergebnisse der FAME's-Bestimmung mittels Fettverseifung mit TMSH (n=10) von Basilikumöl
- Tab.5: Gaschromatographische Ergebnisse der FAME's-Bestimmung mittels Fettverseifung mit KOH (n=10) von Basilikumöl
- Tab.6: Standardsubstanzen für die gaschromatographische Fettsäuremethylester-Bestimmung
- Tab.7: HPLC-Gradient
- Tab.8: HPLC-Anlage-Parameter (DIONEX)
- Tab.9: Flavonoidstandardsubstanzen
- Tab.10: Verdünnungsreihe Flavonoidstandards
- Tab.11: Identifizierte Komponenten der Basilikum-Pflanzen
- Tab.12: Basilikum-Proben mit Estargolgehalten ermittelt mit HS-SPDE (n=2)
- Tab.13: Identifizierte Komponenten der Oregano-Pflanzen (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*)
- Tab.14: Proben-Nr. Oregano-Pflanzen der Züchtungsjahre 2004 und 2005 mit keinen oder sehr geringen Carvacrol-gehalten
- Tab.15: Proben der Oregano-Öle (2005) mit sensorischer Bewertung in Punkten
- Tab.16: Proben der Basilikum-Öle (2005) mit sensorischer Bewertung in Punkten
- Tab.17: zur weiteren Züchtung empfohlene Oregano- und Basilikum-Proben
- Tab.18: zur weiteren Züchtung nicht empfohlene Oregano- und Basilikum-Proben
- Tab.19: Fettsäuremethylesterzusammensetzung mit Area% -Anteilen von Basilikum-Ölen
- Tab.20: Fettsäuremethylesterzusammensetzung mit Area% -Anteilen von Oregano-Ölen
- Tab.21: Oregano-Proben und Basilikum-Proben zur Flavonoidanalytik mit Bewertung der ätherischen Ölgehalte
- Tab.22: Flavonoidgehalte in % - Oregano-Pflanzen (n=2)
- Tab.23: Flavonoidgehalte in % - Oregano-Öle (n=2)
- Tab.24: Flavonoidgehalte in % - Basilikum-Pflanzen (n=2)
- Tab.25: Flavonoidgehalte in % - Basilikum-Öle (n=2)
- Tab.26: Flavonoidgehalte in mg/g Basilikum (n=2)
- Tab.27: Flavonoidgehalte in mg/g Oregano (n=2)

I Aufgabenstellung

Ziel dieses Forschungsvorhabens war es neue, bisher nicht verfügbare sensorisch hochaktive natürliche Aromen der Gewürzpflanzen Basilikum und Oregano für die verarbeitende Industrie, insbesondere für die Lebensmittelindustrie zu entwickeln und erzeugen.

Hierbei soll vor allem mit einem patentierten Verfahren, mit dem auf einem völlig neuartigen Weg aromatisierte Gewürz- und Salatöle hergestellt werden können, der großen Nachfrage nach natürlich erzeugten Aromen für die Verarbeitung u.a. in Fertigsuppen, Dressings, Pasta usw. entsprochen werden. Voraussetzung für eine größere und wirtschaftlichere Produktion ist jedoch die Verfügbarkeit über entsprechend hochwertige Aromen liefernden Gewürzpflanzen sowie eine Optimierung der Verfahrensparameter zur Herstellung hochangereicherter Aromaöle. Die konkrete Zielstellung der Arbeitsgruppe für Bioanalytische Wissenschaften der Hochschule Anhalt war in diesem Zusammenhang die Etablierung und Validierung der erforderlichen Analysemethoden zur Untersuchung sowohl der Pflanzen bezüglich ihrer Aromainhaltsstoffe, als auch der daraus hergestellten Öle unabdingbar.

II Voraussetzungen

Die Voraussetzung für die Durchführung dieses Forschungsvorhabens besteht vor allem in der Kompetenz der Projektpartner auf dem Forschungsgebiet. So konnte innerhalb des Projektes durch den Projektpartner I (Dr. Junghanns GmbH) bereits auf umfangreiche Erkenntnisse im Bereich der Pflanzenzüchtung, Pflanzenproduktion, Pflanzenbearbeitung und deren Handel zurückgegriffen werden. Durch das bereits patentierte Verfahren der Speiseölgewinnung durch die Firmen Biro GbR (Projektpartner II) und Dr. Junghanns GmbH ist bereits der „Grundstein“ für die Weiterentwicklungen und Vermarktung der erzeugten Produkte gelegt worden. Umfangreiches Know-How auf dem Gebiet der Entwicklung und Herstellung von NIR- Und IR- Analysegeräten für unterschiedlichste Einsatzgebiete war durch den Projektpartner IV gegeben. Dies war Grundvoraussetzung für die Entwicklung eines



NIR/IR Messgerätes zur Bestimmung der Aromagehalte in Pflanzen und Öl innerhalb diese Projektes.

Die Arbeitsgruppe für Bioanalytische Wissenschaften (IBAS) der Hochschule Anhalt zeichnete sich selbst durch ihre Kompetenz auf dem Gebiet der analytischen Wissenschaft aus. Innerhalb der Arbeitsgruppe besteht ein umfangreiches Know – How im Bereich der:

- Isolierung, Charakterisierung und Verwertung pflanzlicher Inhaltsstoffe
- Entwicklung spezifischer Extraktionsmethoden
- Entwicklung und Validierung von Analysenmethoden
- Inhaltsstoffanalytik pflanzlicher Rohstoffe sowie von Lebensmitteln

Zur klaren Regelung der Aufgabenbereiche wurden Kooperationsverträge zwischen den Projektpartnern abgeschlossen.

III Planung und Ablauf des Vorhabens

Für die Durchführung des Forschungsprojektes wurde im vorhinein eine Aufteilung der jeweiligen Arbeitsbereiche der einzelnen Projektpartner in Teilprojekte vorgenommen. Jedes Teilprojekt wurde in Arbeitsschritte gegliedert.

Innerhalb der Arbeitsgruppe für Bioanalytische Wissenschaften wurden zur Durchführung des Projektes folgende Arbeitsschritte im Rahmen der kontinuierlichen analytischen Untersuchungen der zur Beurteilung der Teilergebnisse erforderlichen Inhaltsstoffe während des gesamten Züchtungsprozesses und der Verfahrensoptimierung der Ölgewinnung festgelegt.

- Aufbau und Validierung der erforderlichen Analysenmethoden
- Screening des vorhandenen Probenmaterials hinsichtlich der Aromagehalte und Flavonoidgehalte
- Stabilitätsuntersuchung der Öle

Die Aufgaben der Arbeitsschwerpunkte konnten im vorgegebenen Zeitraum realisiert werden. Die Ergebnisse sind Gliederungspunkt VI ausführlich erläutert.

IV Wissenschaftlicher und technischer Stand

Nachfolgend soll der Stand der Wissenschaft auf dem Gebiet der Inhaltsstoffanalytik für die in diesem Projekt untersuchten Inhaltsstoffe erläutert werden.

Aromastoffe

Die im Ph.Eur., DAC und von der LUFA beschriebene übliche analytische Charakterisierung der wertgebenden Inhaltsstoffe erlaubt häufig nur die summarische Erfassung, sie sind somit für die Fragestellungen im Fo-Thema nur bedingt geeignet.

Die Methodensammlungen des Ph.Eur., der DAC und der LUFA geben für die Gehaltsbestimmung der jeweiligen ätherischen Öle eine Wasserdampfdestillation vor. Die dabei angewandten erhöhten Temperaturen bergen das Risiko in sich, zu chemischen Veränderungen der nativ in den Pflanzen vorliegenden Verbindungen zu führen. Insbesondere zur Stoffklasse der Terpene wurde dazu publiziert (Koedam und Looman, 1980, Fischer et al., 1988).

Die Bestimmung der ätherische Öle und ihrer Zusammensetzung ist somit abhängig von der Isolierungsart (Fischer et al., 1987).

Daher sollte für die vorliegende Aufgabenstellung als Probenvorbereitung nicht die übliche Wasserdampfdestillation eingesetzt werden, sondern geeigneteres Verfahren zur schonenden und quantitativen Gewinnung von Oregano und Basilikum - Inhaltsstoffen gefunden und etabliert werden.

Der analytische Nachweis der für Oregano und Basilikum typischen Aromainhaltsstoffe erfolgt mittels Gaschromatographie (GC) in Form eines chromatographischen Profils.

Die GC ist in Kopplung als GC/ FID und GC/MS/MS für die Gehaltsbestimmung ätherischer Öle die z.Zt. geeignetste Methode, da damit alle Komponenten eines Öles gleichzeitig quantitativ erfasst werden können. Weiterhin ist diese Methode vor allem bezüglich der Einzelkomponenten validierfähig.

Zur GC- Analyse sind in den Monografien für ätherische Öle Kapillarsäulen mit Macrogol 20 000 (Polyethylenglycol 20 000) als stationäre Phase vorgeschrieben, wobei die Qualität der Säule durch Anforderungen an die Zahl der theoretischen Böden (> 30 000) und an die Auflösung kritischer Substanzpaare festgelegt ist (Stahl-Biskup, E., 1998).

Bislang existieren solche Monografien jedoch nur für Thymian- und Salbeiöl. Gaschromatografische Untersuchungen für Melisse und Majoran sind schon beschrieben (Fischer et al., 1987, Fischer et al., 1988, Zänglein, A. et al., 1995), allerdings findet man auch für diese Pflanzen z.T. recht unterschiedliche Ergebnisse (Schultze, W. et al., 1989), was sich mit den o.a. Untersuchungen zum Majoran deckt.

In diesem Zusammenhang galt es hier, gut validierte Analysenmethoden zu etablieren, da von der Qualität dieser Methoden die Beschreibung der Qualität der Produkte abhängt.

Fettsäuren

Zur Bestimmung der Fettsäuren wurde das Pflanzenmaterial mit n-Hexan kalt extrahiert.

Die analytische Prüfung des Fettsäuremusters erfolgte mittels ebenfalls Gaschromatographie, im konkreten Fall als GC/FID-Kopplung. Bei der quantitativen Bestimmung wird insbesondere der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren von Interesse sein, die auf Grund ihrer spezifischen protektiven Wirkungen intensiv diskutiert werden.

Flavonoide

Zur Ermittlung der Flavonoidgehalte und -zusammensetzung erfolgte die Extraktion des Pflanzenmaterials nach Ph. Eur. mit Wasser/Lösungsmittelgemisch bei 70 °C am Rückflußkühler. Beim DAC - Verfahren wird die Droge zur Chlorophyllabtrennung mit Methylenchlorid, anschließend mit Aceton extrahiert. Andere Autoren (Krämer, W. u. Wiartalla, R., 1992) setzen die Extraktion am Soxhlet für 5h mit Methanol ein.



Beschrieben sind bei diesen Verfahren negative Einflüsse auf die Inhaltsstoffzusammensetzung durch Lichteinfluss sowie Sauerstoff (Krämer, W. u. Wiartalla, R., 1992, Hänsel, R. et al., 1999).

Aus diesem Grund sollte im Forschungsvorhaben zur Ermittlung der Flavonoidgehalte die beschleunigte Lösemittelextraktion ASE (Accelerated Solvent Extraktion) als Extraktionsmethode eingesetzt werden, weil bei dieser Technik eine Licht- bzw. Sauerstoffbeeinflussung der Pflanzenmaterialien ausgeschlossen werden kann. Weiterhin ist durch den hohen Automatisierungsgrad dieser Technik eine gute Reproduzierbarkeit im Extraktionsschritt gegeben (Morf, S. et al., 1998); die Vielzahl der zu bearbeitenden Proben kann realisiert werden. Die Analytik der Flavonoide erfolgte mittels HPLC/DAD-Kopplung. Diese Methodik ist hierfür sehr geeignet, da durch entsprechende chromatographische Trennbedingungen die bei der Quantifizierung störend wirkenden anderen Inhaltsstoffe abgetrennt werden können.

Festzuhalten ist, dass es eine anspruchsvolle Aufgabe war, für die Realisierung erforderliche gut validierte Analysenmethoden zu etablieren, da von der Qualität dieser Methoden die Beschreibung die Qualität der Ausgangspflanzen, die Effektivität der Optimierung der Verfahrensparameter, der Erfolg der NIRS als Schnellmethode sowie die Qualität der hochangereicherten natürlichen Aromakonzentrate abhing.

Literaturverzeichnis

Fischer, N. N. S. D. F.: *Qualitative and quantitative analysis of essential oils of Myrranabrisensis*. *Flav. and Frag. J.*, 12, 5561, 1987

Fischer, N. N. S. D. F.: *Qualitative analysis of myrranabrisensis and its essential oils*. *J. Food Sci.* 36, 9981003, 1988

Hänsel, R. G. O. S. E.: *Pharmacognosie*. Springer Verlag 1999

Krömer, J. B. K.: *Pharm. Bot.* Springer Verlag 1995

Koedon, A. B.: *Analysis of essential oils: distillation and the volatile oil from piperis sabina*. *Pharm. J.* 2228, 1980

Conner, C.: *Mechanism of resistance in irradiated plants*. In: Biley A. Dorell, B. Ed. *The plant of host defense*. 123490, Academic Press, 1983

Wagner, W. Ziegler, A. Klose, R. Kuba, K.-H. D. M.: *Chromatographische Methoden der Pflanzenanalyse*. 129. J. M., 155163, 1989

Wagner, W. Ziegler, A. Klose, R. Kuba, K.-H. D. M.: *Chromatographische Methoden der Pflanzenanalyse*. 7/1998

Wagner, W. Ziegler, A. Klose, R. Kuba, K.-H. D. M.: *Chromatographische Methoden der Pflanzenanalyse*. 6. Jg., 1999

Ziegler, A. Wagner, W. Ziegler, A. Klose, R. Kuba, K.-H. D. M.: *Chromatographische Methoden der Pflanzenanalyse*. 135. J. M., 46234639, 1995

V Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Für die erfolgreiche Durchführung der Forschungskooperation war vor allem eine enge Zusammenarbeit mit allen Projektpartnern notwendig. Um abgeschlossene Untersuchungen, erzielte Ergebnisse und folgende Arbeitsschritte abzustimmen wurden mehrmals im Jahr Projektbesprechungen bei jeweils einem der Kooperationspartner durchgeführt.

VI Ergebnisse

1 Methodenentwicklung/ Methodenoptimierung

Als Grundlage des Teilprojektes der Arbeitsgruppe für Bioanalytische Wissenschaften (IBAS) der Hochschule Anhalt galt es zunächst Methoden zu entwickeln, die der Analytik der Aromastoffe, Fettsäuren und Flavonoide dienen. Nachfolgend werden alle entwickelten und optimierten Methoden zur Analytik erläutert.

1.1 Aromastoffe

1.1.1 Extraktionsmethoden

Zur Extraktion von Aromaverbindungen und ätherischen Ölen dienten 4 verschiedene Verfahren. Zur Bestimmung der ätherischen Ölgehalte wurde das Verfahren der Wasserdampfdestillation verwendet. Die Microdestillation ermöglicht eine Destillation im kleinen Maßstab und mit weniger Probenvorbereitungsaufwand im Vergleich zur Wasserdampfdestillation. Auch mit diesem Verfahren können die ätherischen Öle extrahiert werden. Allerdings ist eine genaue Bestimmung des ätherischen Ölgehaltes nicht möglich. Eingesetzt wurde dieses Verfahren dennoch um schnell und vollautomatisiert Destillate von Öl- und Pflanzenproben zu gewinnen.

Zur Ermittlung der Aromabestandteile wurden sowohl die Produkte der beiden Destillationsverfahren verwendet, deren Nachteil allerdings die hohen Temperaturen sind, als auch die Verfahren der Headspace Solid Phase Microextraktion und Headspace Solid Phase Dynamicextraktion. Ihr Vorteil ist die schonende

Produktbehandlung um Konzentrationsveränderungen oder Umwandlungen in der nativen Zusammensetzung flüchtiger Aromaverbindungen zu vermeiden.

1.1.1.1 Wasserdampfdestillation

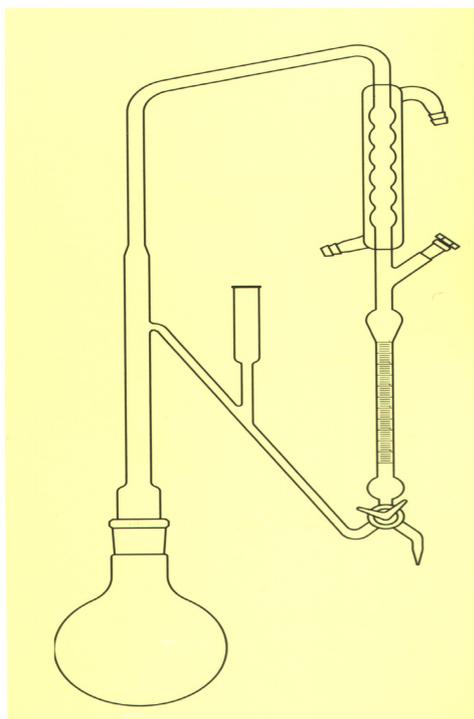
Die Wasserdampfdestillation ist nach dem §35 des LMBG (DAB 10; LMBG §35, 1995)¹ die übliche Methode zur Extraktion der ätherischen Öle.

Innerhalb der Untersuchungen im Forschungsprojekt wurde die nach DAB 10 vorgeschriebene Methodik für die Wasserdampfdestillation der Pflanzen etabliert und das Verfahren wie folgt durchgeführt.

Zunächst wurde das getrocknete Pflanzenmaterial unter gekühlten Bedingungen gemahlen um hohe Verluste an ätherischem Öl zu vermeiden. Anschließend sind 20 g der gemahlenden Pflanzenprobe mit 500 ml bidestilliertem Wasser in einen 1l Rundkolben überführt worden. Dazu wurden 10 Siedesteine gegeben der Kolben in die Heizapparatur und die Glasapparatur auf den Kolben gesetzt (siehe Abb. 1).

Nach Beginn der Destillation wurde die Heizapparatur in ihrer Temperatur so geregelt, dass maximal 2 bis 3 ml/min vom Überlaufrohr in den Kolben zurückflossen.

Abb.1: Darstellung Wasserdampfdestillationsanlage



Kühlung

Belüftungsventil

Druckausgleichsrohr

Überlaufrohr

Ableserrohr

3-Wege-Hahn

Destillationskolben

LMBG § 35: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren. L 53.00-5: Untersuchung von Lebensmitteln. Untersuchung von Gewürzen und würzenden Zutaten. Bestimmung des ätherischen Ölgehaltes. Destillationsverfahren. (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10228, Ausg. Dez. 1995)

Nach einer Destillationszeit von 2 Stunden wurde zunächst die Kühlung ausgeschaltet, bei Wasserdampf am unteren Kühlerende erschien, um restliche Ölsuren aus den Destillationsrohren in das Ableserrohr zu überführen. Abschließend wurde die Kühlung wieder eingeschaltet und die Heizapparatur abgestellt.

Nach einer Standzeit von 10 min wurde das ätherische Öl durch langsames Ablesen der wässrigen Phase in den skalierten Bereich des Ableserohres überführt. Nach nochmaliger Standzeit von 10 min konnte das Volumen des ätherischen Öls abgelesen werden.

Nun wurden über das seitliche Belüftungsventil der Destillationsapparatur zunächst 1ml Hexan (GC-rein), 1ml Wasser (bidest), dann wieder 1ml Hexan und abschließend 1ml Wasser (bidest) zugegeben und alles über das geöffnete Ablassventil in einem Reagenzglas aufgefangen. Durch schütteln des Reagenzglases und kurzzeitiges Warten kam es zur Phasentrennung. Für die anschließende gaschromatographische Trennung wurde die obere Hexanphase noch gegebenenfalls verdünnt.

Um den Gehalt an ätherischem Öl zu berechnen wurde folgende Formel verwendet.

$$\text{ätherischer Ölgehalt (ml/100g)} = \frac{\text{abgelesenes Volumen ätherisches Öl (ml)} \cdot 100}{\text{Pflanzeneinwaage (g)}}$$

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und anschließend die Mittelwerte berechnet.

Verwendete Geräte: Labormixer (Waring Commercial, Torrington, USA)
 WM-Heizhaube
 (MOHR & Co. Laborhandelsgesellschaft mbH, Leimen)
 Destillationsapparatur nach DAB (10. Aufl.)
 (Klaus Hofmann GmbH, Staudt)

Chemikalien: Wasser (bidest)
 n-Hexan, GC-rein (Carl Roth, Karlsruhe)

1.0.0.2 Microdestillation

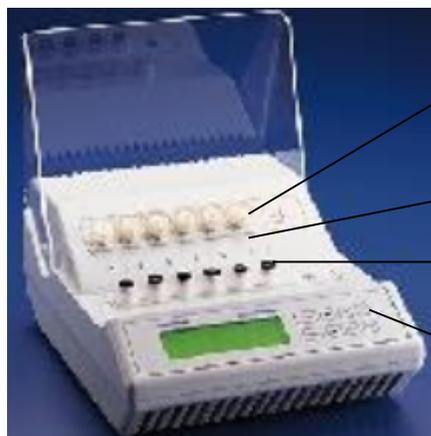
Der MicroDistiller erlaubt Destillation im Mikromaßstab. Aufgrund eines vollständig programmgesteuerten Prozesses gelingt die Abtrennung flüchtiger Inhaltsstoffe aus komplexen Stoffgemischen. Durch die Zugabe von Siedehilfen in Form von Fritten aus Borosilikatglas zur Probe ins Heizgefäß ist eine quantitative Anreicherung von flüchtigen Verbindungen möglich, denn dadurch entsteht beim Sieden eine kontinuierliche und stetige Entwicklung von Dampfblasen über die gesamte Fläche der Probe.

Die Handhabung gestaltet sich wie folgt (siehe dazu Abb. 2).

Nach der Einwaage von 100 mg Probe und der Zugabe von 10 ml Wasser (bidest), sowie der Zugabe von jeweils einer Fritte in bis zu sechs 20 ml Probengefäße (1), werden diese verschlossen und in die Heizpositionen (2) gestellt. Zusätzlich werden eine entsprechende Anzahl mit 0,5 ml n-Hexan (GC rein) befüllter und verschlossener Auffangflaschen (3) in die Kühlpositionen (4) gesteckt. Die Probenflaschen und die Auffangflaschen sind über jeweils eine Kapillare (5) miteinander verbunden. Anschließend wird das temperatur- und zeitgesteuerte Destillationsprogramm aufgerufen und gestartet (6).

Abb.2: Darstellung eines Microdistillers

<u>Destillationsprogramm:</u>			
Prozessdauer		129 min	
Heizer	1 2 3 4 5 6	A	K B
	°C/min	10	20



(1), (2)

(5)

(3), (4)

(6)

Nach Ende der Destillation wird die obere Phase des Auffanggefäßes in ein GC- Vial überführt und steht zur anschließenden gaschromatographischen Untersuchung bereit.

Verwendete Geräte: MicroDistiller
 (Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH, Hamburg)

Chemikalien: Wasser (bidest)
 n-Hexan, GC-rein (Carl Roth, Karlsruhe)

1.0.0.3 Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME)

Bei der Solid Phase Microextraction (SPME, Festphasenmikroextraktion) handelt es sich um eine lösungsmittelfreie, voll automatisierbare Probenvorbereitungsmethode für die routinemäßige Laboranalytik organischer Verbindungen. Eine beschichtete Kieselgelfaser wird dabei in die Probe oder in den Headspaceraum über der Probe geführt, wobei organische Analyten an der jeweiligen Faserbeschichtung adsorbiert werden. Bei der anschließenden Gaschromatographie werden die Analyten durch das beheizte Injektionssystem desorbiert und gelangen so auf die Trennsäule. (SUPELCO, 1999 und 2000)

Für die flüchtigen Terpene ist eine Extraktion im Dampfraum über der Probe (Head Space SPME) der direkten Extraktion aus der Probe vorzuziehen. Die PDMS 100µm Faser (Polydimethylsiloxan, 100µm) ist für die Extraktion ätherischer Öle gut geeignet und zeichnet sich weiterhin durch eine hohe Stabilität aus (BICCHI et al., 2000; ROHLOFF, 1999; ROHLOFF et al., 2000; COLEMAN and LAWRENCE, 2000;



NAMIESNIK and GORECKI, 2000; JORGENSEN, 2000; SCHÄFER et al., 1995; LIGOR et al., 2000; CORNU et al., 2001; CZERWINSKY, 1996; MINDRUP, 2000).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Anwendungen der SPME-GC zur Bestimmung ätherischer Öle wurde zunächst folgende Ausgangsmethode verwendet:

Es wurden 50mg getrocknete und bei 8°C gemahlene Pflanzen in ein 20ml HS-SPME Vial eingewogen. Die SPME erfolgte vollautomatisiert mit Hilfe des Combi PAL (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz).

Faser:	PDMS 100µm
SPME-Modus:	Head Space (Extraktion im Dampfraum)
Vorinkubation:	5 min
Temperatur:	40°C
Schütteln:	500 U/min
Extraktionszeit:	10 min (Adsorption der Analyten an die Faser)
Desorbtion:	GC-Injektor, PTV, konst. Temp., splitlos
Injektortemperatur:	200°C
Desorbtionszeit:	1 min
Faserkonditionierung:	15 min

Um die Extraktion mit Hilfe der HS-SPME zu optimieren wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt und abschließend die oben beschriebene Methode folgendermaßen modifiziert.

Faser:	PDMS 100µm
SPME-Modus:	Head Space (Extraktion im Dampfraum)
Vorinkubation:	5 min
Temperatur:	40°C
Schütteln:	500 U/min
Extraktionszeit:	10 min (Adsorption der Analyten an die Faser)
Desorbtion:	GC-Injektor, PTV, konst. Temp., splitlos
Injektortemperatur:	220°C
Desorbtionszeit:	1 min
Faserkonditionierung:	8 min



1.0.0.4 Headspace Solid Phase Dynamic Extraction (HS-SPDE)

Die SPDE- Option ermöglicht die vollautomatische dynamische Probenextraktion und Analytik. Eine gasdichte Spritze ist mit einer speziellen innen belegten Kanüle ausgerüstet. Wird durch diese Nadel eine flüssige oder dampfförmige Probe aufgezogen, adsorbieren die Analyten an der stationären Phase (PDMS). Zwischen flüssiger Probenmatrix und dem Film stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht ein. Zur Anreicherung des Analyten in der stationären Phase der Nadel wird die Probe wiederholt durch die Nadel gespült.

Zur Desorption wird die Spritzenadel in den heißen Injektor eines GC-Systems eingeführt. Die verdampfenden Analyten werden mit Hilfe einer Trägergasspülung durch Spritze und Spritzenadel ins Injektionssystem und letztlich auf die GC-Trennsäule transferiert. Abschließend erfolgt die gaschromatographische Analyse.

Angewendete SPDE- Methode

Beschichtung:	PDMS
SPDE-Modus:	Head Space (Extraktion im Dampfraum)
Vorinkubation:	5 min
Temperatur:	40°C
Schütteln:	500 U/min
Extraktionszeit:	10 min (Adsorption der Analyten an die Faser)
Desorbtion:	GC-Injektor, PTV, konst. Temp., splitlos
Injektortemperatur:	200°C
Desorbtiionszeit:	1 min
Konditionierung:	1 min

1.1.1 Gaschromatographische Methoden

Für eine optimale Trennung der flüchtigen zuvor extrahierten Komponenten der Basilikum- und Oreganoproben wurden diese zunächst mit den in Tab.1 aufgeführten in der Literatur beschriebenen Methoden (A,B,C) gaschromatographisch untersucht.

Tab.1: Gaschromatographische Methoden



GC-Methode	A	B	C	D
In Anlehnung an ff. Quelle	ADAMS (1995)	KÖNIG (2001)	Novak (2003)	Eigene Methode
Injektor	PTV	PTV	PTV	PTV
Modus	konst. Temp.	konst. Temp.	konst. Temp.	konst. Temp.
Temperatur	220°C	280°C	220°C	220°C
Injektionsvolumen	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Trägergas verwendet	Helium	Helium	Sickstoff Helium	Helium
Fluss	1ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min
Split	1:100	1:100	1:100	1:20
GC-Säule laut Literaturangabe	DB-5 (J&W)	CP Sil 5 CB ¹⁾ / CP Sil 19 CB ²⁾ (Chrompack)	SE-30 ³⁾ (CS)	-
verwendete GC-Säule	DB-5 MS	DB-5 MS	DB-5 MS	DB-5 MS
Temperaturprogramm	60°C (0min) 3°C/min à 240°C (40min)	80°C (2min) 10°C/min à 270°C (10min)	90°C (3min) 6°C/min à 180°C (5min)	90°C (3min) 10°C/min à 120°C 6°C/min à 180°C (2min)
GC-Methode	A	B	C	D
Laufzeit	100 min	31 min	min	18 min
Detektor	FID	FID	FID	FID
Temperatur	350°C	280°C	250°C	250°C

¹⁾ CP Sil 5 CB (Chrompack) entspricht DB-1: 5% Phenyl – 95% Dimethylpolysiloxan

²⁾ CP Sil 19 CB (Chrompack): 14% Cyanopropyl-Phenyl – 86% Dimethylpolysiloxan

³⁾ SE-30 (Chromatographie Service GmbH) entspricht DB-1: 5% Phenyl – 95% Dimethylpolysiloxan

Kriterium für die Eignung der gaschromatographischen Methode war eine kurze Laufzeit bei gleichzeitiger idealer Trennung der Einzelkomponenten des ätherischen Öls der Wasserdampfdestillate.

Wie die Abb. 5 und 6 zeigen, erfüllen die Methoden nach KÖNIG und ADAMS das Kriterium einer optimalen kurzen Laufzeit nicht, da die Elution der Komponenten bereits nach etwa 16min bzw. 40min abgeschlossen ist, die Methodendauer jedoch weit über dies hinausgeht. Auch die Trennung der Komponenten, vor allem der Minorkomponenten, war zur Identifikation nicht ausreichend, was auch für die Methode nach NOVAK (Abb. 4) galt. Daraufhin wurden die Trennbedingungen so optimiert, dass sowohl für die Analyse der Basilikumproben, als für die Analyse der

Oreganoproben eine Methode eingeführt werden konnte, die sich durch eine optimale Auflösung der Peaks und eine kurze Analysenzeit auszeichnet (Abb. 3). Mit dieser optimierten Methode ist es nun möglich, den zu erwartenden großen Probenumfang zu untersuchen.

Abb. 3: GC-Methode D (optimierte Methode)

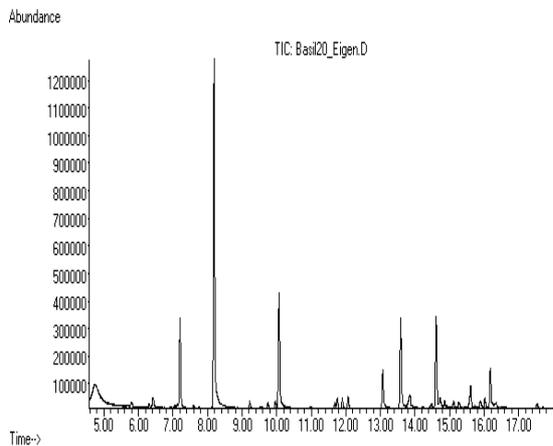


Abb. 4: GC- Methode C (Methode nach NOVAK)

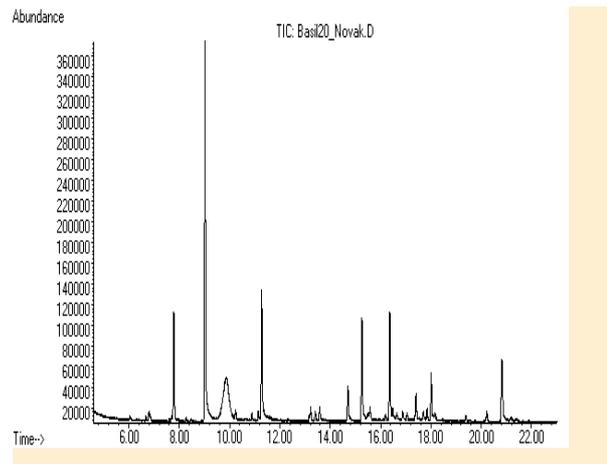


Abb. 5: GC- Methode B (Methode nach KÖNIG)

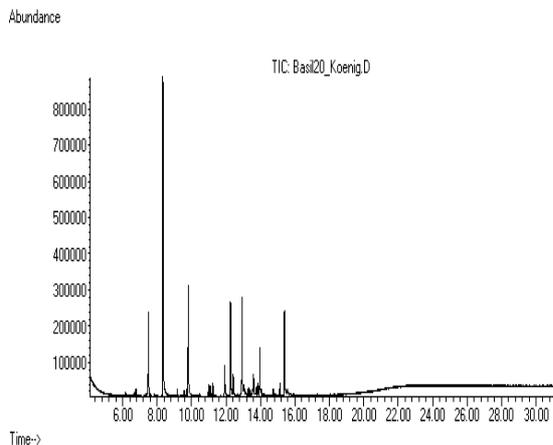
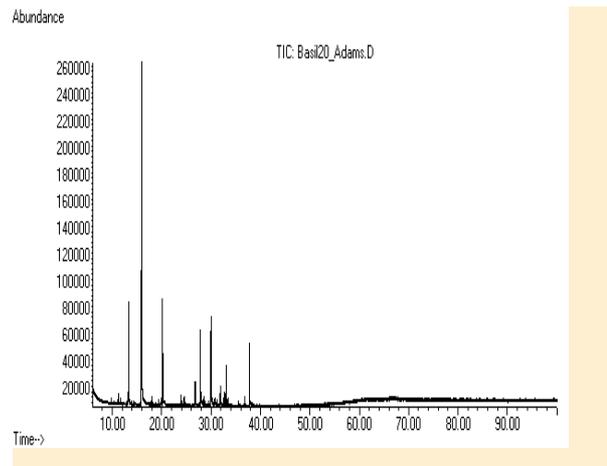


Abb. 6: GC- Methode A (Methode nach ADAMS)



1.1.2 Identifizierung

Die Identifizierung der ätherischen Öl- Komponenten wurde anhand des Retentionszeiten(RT)-Vergleiches Probenkomponente/Standardsubstanz durchgeführt (Tab.2). Des weiteren erfolgt ein Vergleich der Massenspektren der ätherischen Öl-Komponenten (Tab.3) mit Datenbanken (MassFinder 3.0); die Retentionsindices (RI) wurden mit Literaturangaben (ADAMS,1995) verglichen.

Dafür wurde die bereits beschriebene optimierte GC- Methode verwendet (ergänzt mit den massenspektrometrischen Daten).



GC/MS- Bedingungen für die massenspektrometrische Überprüfung:

Injektor:	Split/Splitless-Injektor (SSL)
Modus:	Split
Temperatur:	220°C
Injektionsvolumen:	1,0 µl
Trägergas:	Helium
konst. Flussgeschwindigkeit:	35 cm/sec (0,9 ml/min) Average Velocity
Split:	1:20
GC-Säule:	DB-5 MS (30m, 0,25mm ID, 0,25µm Film)
Temperatur-Programm:	90°C (3min), 10°C/min → 120°C ,6°C/min → 180°C (2min)
Laufzeit:	18 min
MS:	Quadrupol- Massenspektrometer
Aufnahmerate:	5.27 scan/s
Temperatur Ionenquelle:	250°C
Temperatur Transfer Line:	280°C
Scan Modus:	Full Scan 35-300 D

Tab.2: Vergleich der RT der Standardsubstanzen mit den RT der Proben- Komponenten

Standard	RT-Standard (min)	RT-Basilikum (min)	RT-Oregano (min)
-Pinen	5.81	5.83	5.83
Camphen	6.09	-	6.07
1- Octen- 3-ol	6.29	-	6.26
-Pinen	6.44	6.45	6.47
-3-Caren	6.90	-	6.84
-Terpinen	6.97	-	6.97
-Terpinen	7.62	7.63	7.63
Sabinenhydrat	7.82	-	7.78
Linalool	8.24	8.23	8.24
Camphor	9.23	9.25	-
Borneol	9.58	9.58	9.61
-Terpineol	10.02	10.00	-
Methylchavicol (Estragol)	10.13	10.10	10.15
Thymol	11.69	11.72	11.74
Carvacrol	11.97	11.93	12.02
Eugenol	13.15	13.11	-
Eugenolmethylether	13.92	13.88	-



- Caraphyllen	14.53	-	14.51
- Humulen	15.15	15.15	15.15

Tab.3: Vergleich der RI aus Literaturangaben mit den RI der Proben- Komponenten, sowie Spektrenvergleich mit Datenbank (MassFinder3.0)

Substanz	RI DB5		
	Adams (1995)	Basilikum	Oregano
-3 Caren	1011	-	1015
-Terpinen	1018	-	1023
p-Cymen	1026	-	1031
1,8-Cineol	1033	1040	-
-Terpinen	1062	1064	1064
cis-Sabinenhydrat	1068	-	1073
Linalool	1098	1101	1102
Camphor	1143	1158	-
Borneol	1165	-	1178
Terpinen-4-ol	1177	1188	1188
Estragol	1195	1205	-
Thymol	1290	1291	1293
Carvacrol	1298	1303	1308
Eugenol	1356	1365	-
(Z)-o-Methoxycinnamaldehyd	-	1392	-
-Acoradin	1466	1447	-
-Himachalen	1447	1452	-
(Z,Z) -Farnesen	-	1459	-
-Caraphyllen	1418	-	1439



Substanz	RI DB5		
	Adams (1995)	Basilikum	Oregano
-Humulen	1454	1473	1473
Germacren D	1480	1482	-
-Amorphen	-	1499	-
- Bisabolen	1509	1515	1516
-Cadinen	1513	1528	-

1.2 Fettsäuremethylester-Bestimmung

Für die Bestimmung der Fettsäuremethylester aus Pflanzenmaterial war zunächst eine Fettextraktion der Proben notwendig, wodurch der Gesamtfettgehalt der Proben berechnet werden konnte.

Anschließend wurden die extrahierten Fette bzw. Öle verseift, um die Fettsäuren aus dem im Öl vorliegenden Triglyzeriden abspalten zu können. Die dabei entstehenden Methylester besitzen gegenüber den freien Säuren eine für die Gaschromatographie erforderliche höhere Flüchtigkeit und Stabilität.

Für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Pflanzenöle war keine Fettextraktion notwendig. Die Öle konnten direkt für die Verseifung verwendet werden.

Die gaschromatographische Überprüfung der Fettsäuremethylester erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor. Quantifiziert wurde über die Area%- Methode, wodurch Aussagen zur relativen Fettsäurezusammensetzung möglich sind.

1.2.1 Fettextraktion des Pflanzenmaterials

Zur Extraktion der Triglyzeride aus den Basilikum- bzw. Oreganopflanzen fand eine Kaltzentrifugation mit n-Hexan (in Anlehnung an § 35 LMBG L 00.00 – 38/2 6.4.6.1.) statt. Um Verluste oder Veränderungen an der Fettsäurezusammensetzung während der Extraktion zu vermeiden wurde wenn möglich unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff gearbeitet.



Für die Extraktion wurden jeweils 5 g getrocknetes und bei 8°C gemahlene Pflanzenmaterial in ein Zentrifugenglas eingewogen und sowohl 2 g Natriumsulfat als auch 50 ml n-Hexan zugegeben. Diese Lösung wurde am Ultra-Turrax für 5 min bei 13.500 U/min homogenisiert und anschließend bei 5.000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand ist in einen Rundkolben (Leergewicht zuvor bestimmt) filtriert worden. Anschließend wurde die Extraktion wiederholt und der Überstand wiederum im Rundkolben aufgefangen. Der Extrakt ist abschließend am Rotationsverdampfer bei 35°C unter Vakuum eingengt worden und stand somit für den nachfolgenden Schritt der Verseifung der Triglyceride bereit.

Verwendete Geräte: Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen)
 Megafuge 2.0 (Heraeus Sepatech, Osterode)
 Rotationsverdampfer Rotavapor 114 (BÜCHI, Konstanz)

Chemikalien: Natriumsulfat, p.A. (Carl Roth, Karlsruhe)
 n-Hexan, p. A. Carl Roth Karlsruhe

1.2.2 Verseifung des extrahierten Pflanzenmaterials und der Öle

Methode 1: Kaltverseifung mit methanolischer Kalilauge

Für die Methode der Fettverseifung wurden in Anlehnung an DRESSEL et al. 0,1 g Fett in 10 ml n-Heptan gelöst. Anschließend ist diese Probelösung mit 0,5 ml methanolischer KOH (2mol/l) versetzt und für 30s geschüttelt worden. Innerhalb von 30 min bis 60 min erfolgte die Phasentrennung, wobei sich Glycerin in der oberen Phase absetzte und so in ein weiteres Reagenzglas überführt werden konnte. Um der Probe das restliche Wasser zu entziehen wurden nun 2 g Natriumsulfat zugegeben, das Reagenzglas nochmals geschüttelt und für weitere 30 min stehen gelassen. Der klare Überstand konnte nun in ein Probenvial überführt werden und wurde bis zur gaschromatographischen Untersuchung bei -18°C gelagert.

Chemikalien: n-Heptan, p.a. (Carl Roth, Karlsruhe)
 Methanol, p.a. (Carl Roth, Karlsruhe)
 Kaliumhydroxid, p.a. (Carl Roth, Karlsruhe)



Natriumsulfat, p.a. (Carl Roth, Karlsruhe)

Methode 2: Verseifung mit TMSH

Ein weiteres Verfahren der Fettverseifung ist die Verseifung mittels TMSH (DGF-Einheitsmethoden C-VI 11e). Hierfür wurden 10 mg Fett direkt in ein GC-Vial eingewogen in 500 µl tert. Butylmethylether gelöst, mit 250 µl TMSH versetzt und für 30 s geschüttelt. Nach einer Wartezeit von 30 min stand die Probe zur gaschromatographischen Untersuchung bereit.

Chemikalien: tert. Butylmethylether, zur Synthese (Carl Roth, Karlsruhe)
Trimethylsulfoniumhydroxid in Methanol, 0,2mol/l
(Macherey- Nagel)

Aufgrund des zu erwartenden großen Probenumfangs innerhalb dieses Forschungsvorhabens wurde die Eignung des deutlich schnelleren Verfahrens der Verseifung mittels TMSH überprüft. Hierfür wurden Vorversuche durchgeführt, welche die gaschromatographischen Ergebnisse der beiden Verfahren der Verseifung miteinander vergleichen sollten (siehe dazu Tab.4 und 5, sowie Abb.7).

Tab.4: gaschromatographische Ergebnisse der FAME's- Bestimmung mittels Fettverseifung mit TMSH (n=10) von Basilikumöl

Fettsäuremethylester	C16:0 ¹	C18:0 ²	C18:1c ³	C18:2c ⁴
Mittelwert in Area%	6,33	3,86	29,91	59,91
Standardabweichung	0,02	0,02	0,01	0,02
Variationskoeff. in %	0,29	0,39	0,03	0,03

¹ C16:0: Palmitinsäure, ² C18:0: Stearinsäure, ³ C18:1c: Ölsäure, ⁴ C18:2c: Linolsäure

Tab.5: gaschromatographische Ergebnisse der FAME's- Bestimmung mittels Fettverseifung mit KOH (n=10) von Basilikumöl

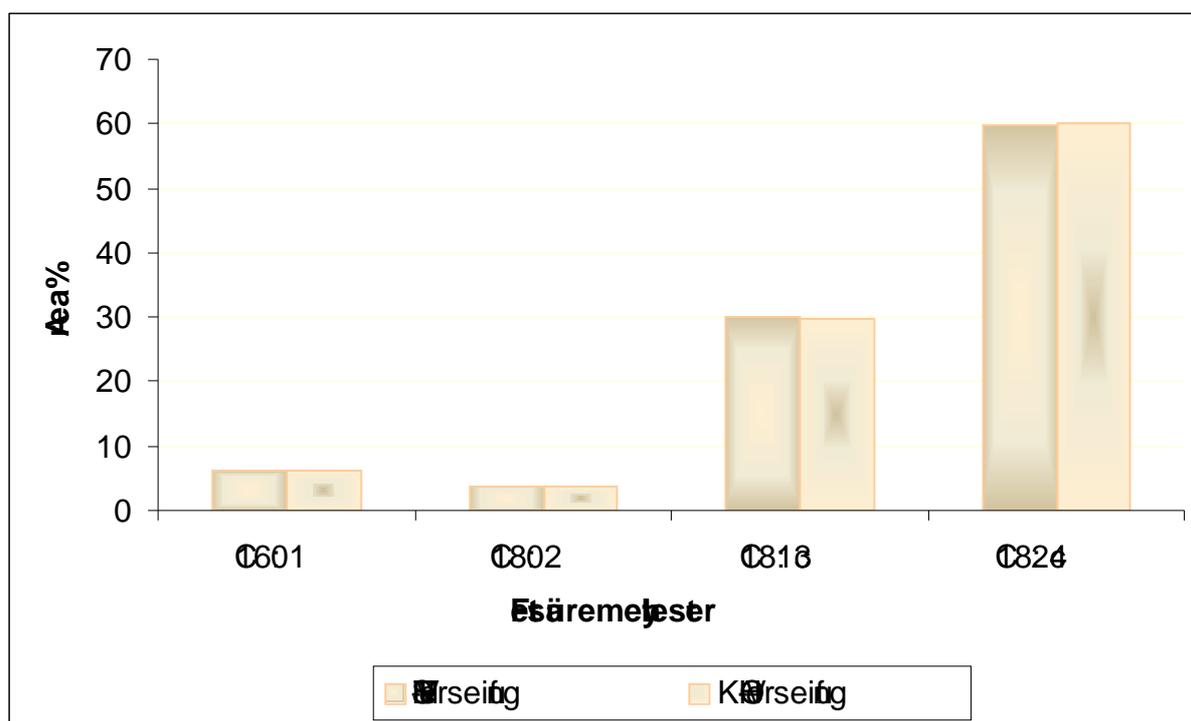
Fettsäuremethylester	C16:0 ¹	C18:0 ²	C18:1c ³	C18:2c ⁴
----------------------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------



Mittelwert in Area%	6,17	3,84	29,81	60,18
Standardabweichung	0,02	0,02	0,04	0,04
Variationskoeff. in %	0,25	0,40	0,13	0,07

¹ C16:0: Palmitinsäure, ² C18:0: Stearinsäure, ³ C18:1c: Ölsäure, ⁴ C18:2c: Linolsäure

Abb. 7: Vergleich der Verfahren zur Verseifung der Fettsäuremethylester



Beide Verfahren der Verseifung sind aufgrund ihrer geringen Variationskoeffizienten (< 0,4%) sehr gut für die Bestimmung der Fettsäuremethylester geeignet.

Das Verfahren der Verseifung mittels TMSH liefert gleiche Ergebnisse (die durchschnittliche Abweichung zur KOH-Verseifung liegt bei 1,4%) und ist zudem auch noch erheblich schneller (Zeitersparnis von bis zu zwei Stunden).

Somit wird für alle nachfolgenden Verseifungen der Fette das Verfahren der Verseifung mittels TMSH angewendet.

1.2.3 Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuremethylester



Die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuremethylester (FAMES) 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.

Folgende Methode wurde zur gaschromatographischen Trennung der Fettsäuremethylester und der Ermittlung der Standardsubstanzretentionszeiten verwendet.

Injektor:	Split/Splitless-Injektor (SSL)
Modus:	Split
Temperatur:	260°C
Injektionsvolumen:	1,0 µl
Trägergas:	Wasserstoff, 63 kPa Vordruck
Fluß:	1,5 ml/min
Split:	1:150
GC-Säule:	DB-23 (30m, 0,25mm ID, 0,25µm Film)
Temperatur-Programm:	40°C , 20°C/min è 160°C , 1°C/min è 170°C, 2°C/min è 220°C(5 min)
Laufzeit:	40 min
Detektor (FID):	260°C

Mit Hilfe von Standardsubstanzen wurden die Fettsäuremethylester aufgrund von RT-Vergleichen identifiziert. Als Standardmix ist der Supelco 37 Component FAME Mix (Supelco) verwendet worden (siehe Tab. 6).

Tab.6: Standardsubstanzen für die gaschromatographische Fettsäuremethylester- Bestimmung

Fettsäure (37 Component Fame Mix, Supelco)	
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	Pentdecansäuremethylester
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
C18:1n9c	Ölsäuremethylester
C18:2n6t	Linolaidinsäuremethylester
C18:2n6c	Linolsäuremethylester
C18:3n6	γ -Linolensäuremethylester
C18:3n3	Linolensäuremethylester
C20:0	Arachinsäuremethylester
C20:1	Cis-11-Eicosensäuremethylester
C20:2	Cis-11,14-Eicosadiensäuremethylester
C20:3n6	Cis-8,11,14-Eicosatriensäuremethylester
C20:3n3	Cis-11,14,17-Eicosatriensäuremethylester
C20:4n6	Arachidonsäuremethylester
C20:5n3	Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäuremethylester
C21:0	Heneicosensäuremethylester
C22:0	Behensäuremethylester
C22:1n9	Erucasäuremethylester
C22:2	Cis-13,16-Docosadiensäuremethylester
C22:6n3	Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäuremethylester
C23:0	Tricosensäuremethylester
C24:0	Lignocerinsäuremethylester
C24:1	Nervonsäuremethylester

1.3 Bestimmung der Flavonoide

Teilziel dieses Forschungsvorhabens ist es eine Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Flavonoide aus Pflanzenmaterial sowie Basilikumöl und Oreganoöl zu entwickeln.

1.3.1 Extraktion

Die analytische Bestimmung der Flavonoide in Pflanzenmaterialien und Ölen erfolgte nach Hydrolyse in Form der Aglykone (MENGHINELLO et al., 1999; JUSTESEN et al., 1998; HÄKKINEN et al., 1998; JUSTESEN, 2000) mittels HPLC. Zur Extraktion der Flavonoide aus Pflanzen und Ölen wurde das Verfahren nach JUSTESEN et al., 1998 mittels Wasserbad verwendet.

Hierfür wurden 0,5 g getrocknetes Pflanzenmaterial bzw. 0,5 g Öl in 40 ml 62,5% wässrige Methanollösung + PHA (2 g/l) und 10 ml 6M HCl gelöst. Zur Extraktion der Flavonoide wurde diese Lösung anschließend 2 Stunden bei 90 °C im Wasserbad erhitzt, nach 2 Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt und 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Aus dem Überstand wurden anschließend 3ml durch einen 0,45µm Filter filtriert. Somit stand die Probenlösung zur analytischen Bestimmung mittels HPLC bereit.

1.3.2 Chromatographischer Nachweis (HPLC)

Zur Bestimmung der Flavonoide aus Oregano und Basilikum erfolgt der Aufbau einer HPLC- Methode in Anlehnung an JUSTESEN et al. (1998). Die Trennung wird an einer RP 18 Säule (Phenomenex, Luna Su C18(2) 250x4,6mm, 5µm) mit einer mobilen Phase bestehend aus Methanol/Wasser 30:70 (v/v) und 1% Ameisensäure (A) und 100% Methanol (B) bei einem Fluß von 1 ml/min und einer Analysenzeit von 50 min durchgeführt (Tab. 7). Pro Probe wurden 20 µl injiziert.

Gradient:

Tab.7: HPLC-Gradient

Zeit (min)	% A	% B
0	75	25
50	14	86

Folgende Anlagenkomponenten der Firma DIONEX wurden verwendet (Tab. 8).

Tab.8: HPLC-Anlagen-Parameter (DIONEX)

Anlagen- Komponente	Spezifikation
Detektor	PDA 100
Autosampler	AS 50
Software	Chromeleon
Pumpe	GP 50

1.3.3 Identifizierung

Die Identifizierung der Flavonoide erfolgt mittels Vergleich mit Standardsubstanzen. Folgende Standardsubstanzen werden für Basilikum und Oregano in der Literatur beschrieben (VIEIRA et. al,2003),(Grayer et. al, 1996), (Skerget et. al, 2005), Regnault- Roger et. al, 2004), Kulevanova et. al, 2001), (Bendini et. al, 2002), Vekiari et. al, 1993) (Tab. 9).

Tab.9: Flavonoidstandardsubstanzen

Standardsubstanz	Oregano	Basilikum
Apigenin	X	
Luteolin	X	
Chrysoeriol	X	
Quercetin	X	
Nevadensin		X
Kaempferol	X	
Salvigenin		X
Myricetin	X	
Eriodicytol	X	
Dihydroquercetin (Taxifolin)	X	
Acacetin	X	

Für die Standardlösung wurde eine Konzentration von 0,1 g Standard in 1l DMSO (Dimethylsulfoxid) hergestellt. Von dieser Stammlösung wurden dann frisch 0,5 ml in

10 ml 62,5 % wässriger Methanollösung + BHA (2 g/l) und 2,5 ml 6 M HCl gelöst. Zur Kalibrierung wurde die in Tab. 10 dargestellte Verdünnungsreihe hergestellt.

Tab.10: Verdünnungsreihe Flavonoidstandards

Verdünnungsstufe	Konzentration in µg/l
1	1,25
2	2,5
3	3,0
4	5,0
5	6,0
6	7,0
7	8,0

1.4 Herstellung von Standardsubstanzen zur NIR-Kalibrierung

Die Herstellung von Standardsubstanzen aus Originalpflanzenproben ist zur Kalibrierung des NIR-Messgerätes des Projektpartners IV notwendig. Nur dadurch lassen sich die Ergebnisse auf spätere Routinemessungen während des Züchtungsprozesses beziehen.

Das Verfahren zur Gewinnung von Standardsubstanzen beruht auf der gaschromatographischen Trennung von ätherischen Ölgemischen gewonnen durch Wasserdampfdestillation mit paralleler präparativer Sammlung von Einzelkomponenten aus diesem Probengemisch (GC-PFC). Hierbei können während der gaschromatographischen Trennung gezielt reine Einzelkomponenten in Kühlfallen gesammelt werden und in diesen durch vielfaches Trennen des Probengemisches angereichert werden. Die so gewonnen Reinsubstanzen können dann zur Kalibrierung des NIR- Messgerätes verwendet werden. Auf diese Art und Weise lassen sich alle notwendigen Komponenten gewinnen.

Hiermit sind auch die Substanzen zu gewinnen, die nicht käuflich zu erwerben sind, so dass mit diesem Verfahren auch grundsätzliche Identifizierungen von Komponenten möglich sind.

Nachfolgend ist das optimierte Verfahren zu Gewinnung der Standardsubstanzen aufgeführt.



GC-Parameter:

Injektor:	PTV
Modus:	Splitless
Temperatur:	260°C
Injektionsvolumen:	50 µl
Trägergas:	Helium
GC-Säule:	DB-5 MS (25m, 0,53mm ID, 5µm Film)
Temperatur-Programm:	70°C (4min), 10°C/min è 200°C ,40°C/min è 250°C
Laufzeit:	18 min

PFC-Parameter:

Transferline:	280°C
Switching Devices:	280°C
Fallen:	10°C
RT-Fenster:	11.95 - 12.96



2 Analytische Ergebnisse

2.1 Aromastoffe

2.1.1 Ätherische Ölgehalte

Die Bestimmung der ätherischen Ölgehalte sowohl der Pflanzen als auch der daraus hergestellten Speiseöle erfolgte mittels Wasserdampfdestillation. Eine genaue Beschreibung zur Durchführung ist im Punkt 1.1.1.1 beschrieben.

Hierfür wurden jeweils 10 g Pflanzenmaterial bzw. 30 ml Öl eingesetzt.

Die Öle des ersten Züchtungsjahres (2004) wurden nicht auf ihrer ätherischen Ölgehalt untersucht (Für die Pflanzen sind die Ergebnisse in der Anlage 1 zusammengestellt.). Auf Grund des großen Probenumfangs wurde die Aromastoffanalytik mittels HS-SPME bevorzugt. Sie zeichnet sich durch eine leichte Probenvorbereitung (nur das Einwiegen der Proben ist notwendig) und schnelle Analyse aus. Diese Ergebnisse werden unter 2.1.2 erläutert. Allerdings war es für das Probenmaterial (Pflanzen und Öle) des Züchtungsjahres 2005 dann notwendig Wasserdampfdestillation zur Ermittlung der ätherischen Ölgehalte durchzuführen. Grund hierfür war die schlechte Korrelation der HS-SPME – Ergebnisse mit den NIR/IR- Daten beim Projektpartner IV (M+ R Regelungstechnik). Versuche zeigen aber, dass eine Korrelation der Ergebnisse mit den ätherischen Ölgehalten besser möglich war, so dass zur Kalibrierung des NIR/IR Messgerätes nachfolgend die Ergebnisse der Wasserdampfdestillationen verwendet wurden.

Die Ergebnisse sind in Anlage 2, 3 (Basilikum) 4 und 5 (Oregano) zusammengestellt. Insgesamt wurden 2004 81 Pflanzenproben (51 Basilikum und 30 Oregano), sowie vom Züchtungsjahr 2005 62 Pflanzenproben und 62 daraus hergestellte Öle der Pflanze Basilikum (*Ocimum basilicum* var. *basilicum*) und 55 Pflanzenproben und 50 daraus hergestellte Öle der Pflanze Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) untersucht. Hierbei stand nicht von allen Pflanzen ausreichend Material zur Verfügung, so dass nicht aus allen Oreganoproben Speiseöle durch den Projektpartner Biro GbR hergestellt werden und nicht allen Pflanzenproben Ölproben zuzuordnen sind.

Die ätherischen Ölgehalte der Oregano- Pflanzen für das Züchtungsjahr 2004 lagen zwischen 3,2 ml/100 g (Ori3_04) und 0,1 ml/100 g Pflanzenmaterial (Ori1_04).

Die ätherischen Ölgehalte der Oregano- Pflanzen für das Züchtungsjahr 2005 lagen zwischen 3,8 ml/100 g und 0,01 ml/100 g Pflanzenmaterial - die der Oregano- Öle zwischen 1,3 ml/100ml Öl und 0,03 ml/100ml.

Wie auch in der Literatur beschrieben, konnte gezeigt werden, dass Oregano zu den Pflanzen mit sehr hohen ätherischen Ölgehalten zählt. Selbst in den  len konnten teilweise noch sehr hohe Gehalte erzielt werden. Ein wirkungsvoller Einsatz als natürliches Konservierungsmittel auf grund der antioxidativen und antimikrobiellen Wirkung der hohen ätherischen Ölgehalte der Öle ist somit auch in der Lebensmittel-, Futtermittel- und Kosmetikindustrie möglich.

Beim Basilikum konnten für das Züchtungsjahr 2004 ätherische Ölgehalte bei den Pflanzen zwischen 0,6 ml/100g (Bas8_04 bzw. Bas44_04) und 0,03 ml/100g (Bas3_04) nachgewiesen werden.

Und für das Züchtungsjahr 2005 konnten ätherische Ölgehalte bei den Pflanzen zwischen 1,8 ml/100g (Bas2_04) und 0,2 ml/100g (Bas5_04 bzw. Bas25_04) nachgewiesen werden. Bei den  len hingegen wurden maximale ätherische Ölgehalte von 1,7 ml/100ml Öl (Bas39_04) analysiert. Somit sind die ätherischen Ölgehalte der Basilikum-Pflanzen um ein vielfaches kleiner, als die der Oregano-Pflanzen. Eine Verwendung der Pflanzen z.B. als natürlicher Antioxidat in Kosmetika, Lebensmittel oder Futtermittel auf grund der ätherischen Ölgehalte ist daher vor allem für die Oregano-Pflanzen zu empfehlen. Dabei eignen sich vor allem die Pflanzen mit den Probennummern Ori2_04, Ori3_04, Ori14_04, Ori15_04, Ori22_04, Ori24_04 und Ori27_04 des Züchtungsjahres 2004 und die Proben mit den Nummern Ori42_05 und Ori3A_05 des Züchtungsjahres 2005.

Die geringeren Werte der Speiseöle erklären sich durch den Herstellungsprozess der Öle, bei dem den Pflanzen Sonnenblumenkerne beigemischt werden. Sie bieten die  lbasis des späteren Speise ls. Hierbei wird ein Mischungsverhältnis von Sonnenblumenkernen zu Pflanzenmaterial von 3:1 eingesetzt. Ein höherer Pflanzeneinsatz ist aufgrund verfahrenstechnischer Parameter nicht realisierbar. Dieser dann somit wahrscheinliche Anteil von 30% ätherischem Öl im Speiseöl im Vergleich zum reinen Pflanzenmaterial der dazugehörigen Pflanzenproben konnte für Oregano und Basilikum auch nachgewiesen werden. Bei Oregano lag dieser durchschnittlich bei 25% und bei Basilikum bei 27%.



Grundsätzlich sind Korrelationen zwischen den ätherischen Ölgehalten der Pflanzen und denen der dazugehörigen Öle nachweisbar. Wenn Pflanzenproben hohe ätherische Ölgehalte aufwiesen, dann war auch bei dem daraus hergestellten Öl ein hoher ätherischer Ölgehalt nachweisbar (siehe Abb. 8 und Abb. 9). Allerdings sind immer wieder auftretende Abweichungen wahrscheinlich durch den Herstellungsprozess der Öle bedingt. Da die Verbindungen mitunter sehr leicht flüchtig sind, können schon kleinste Veränderungen in der Produktion und Lagerung (z.B. Temperatur) zu Abweichungen führen.

Abb.8: Ätherische Ölgehalte Basilikum - Züchtungsjahr 2005 (Pflanzen und Öle)

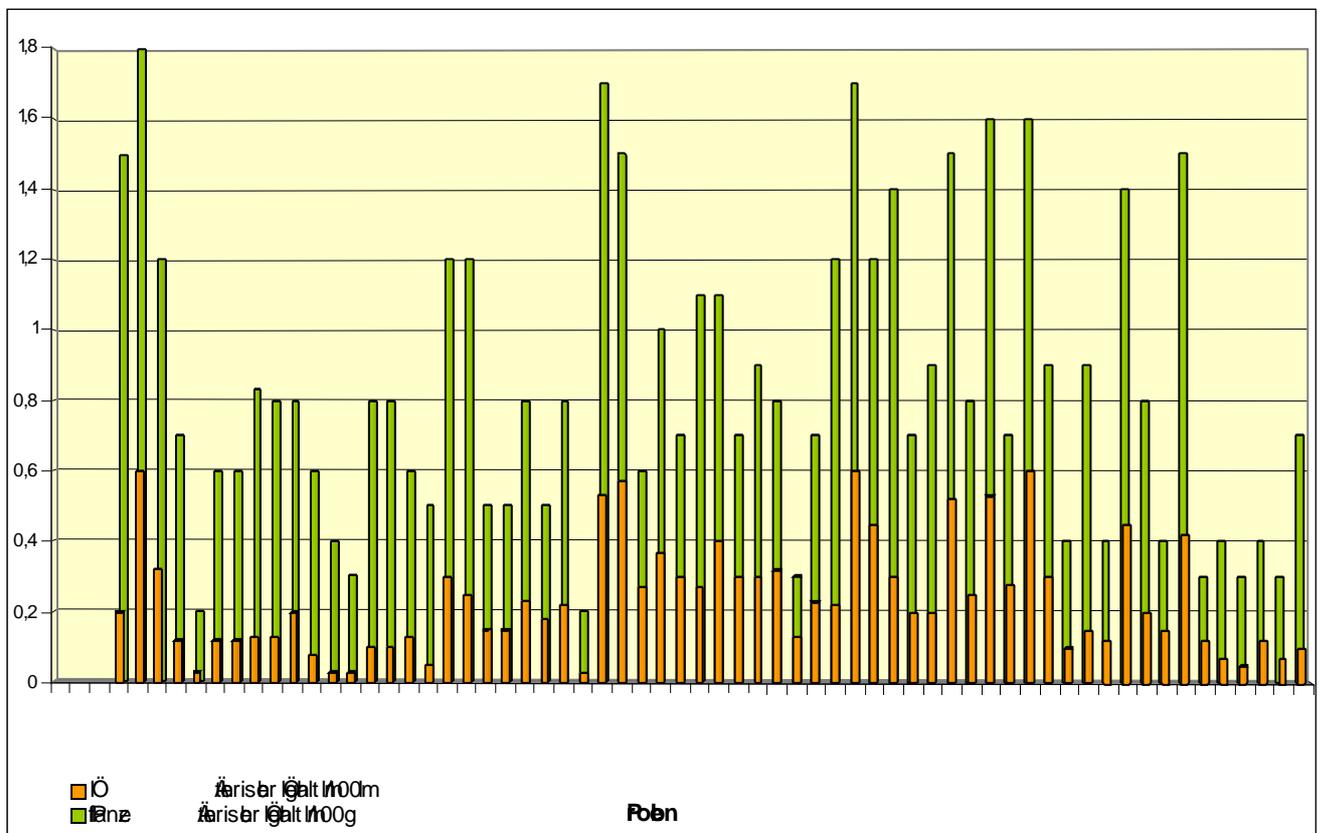
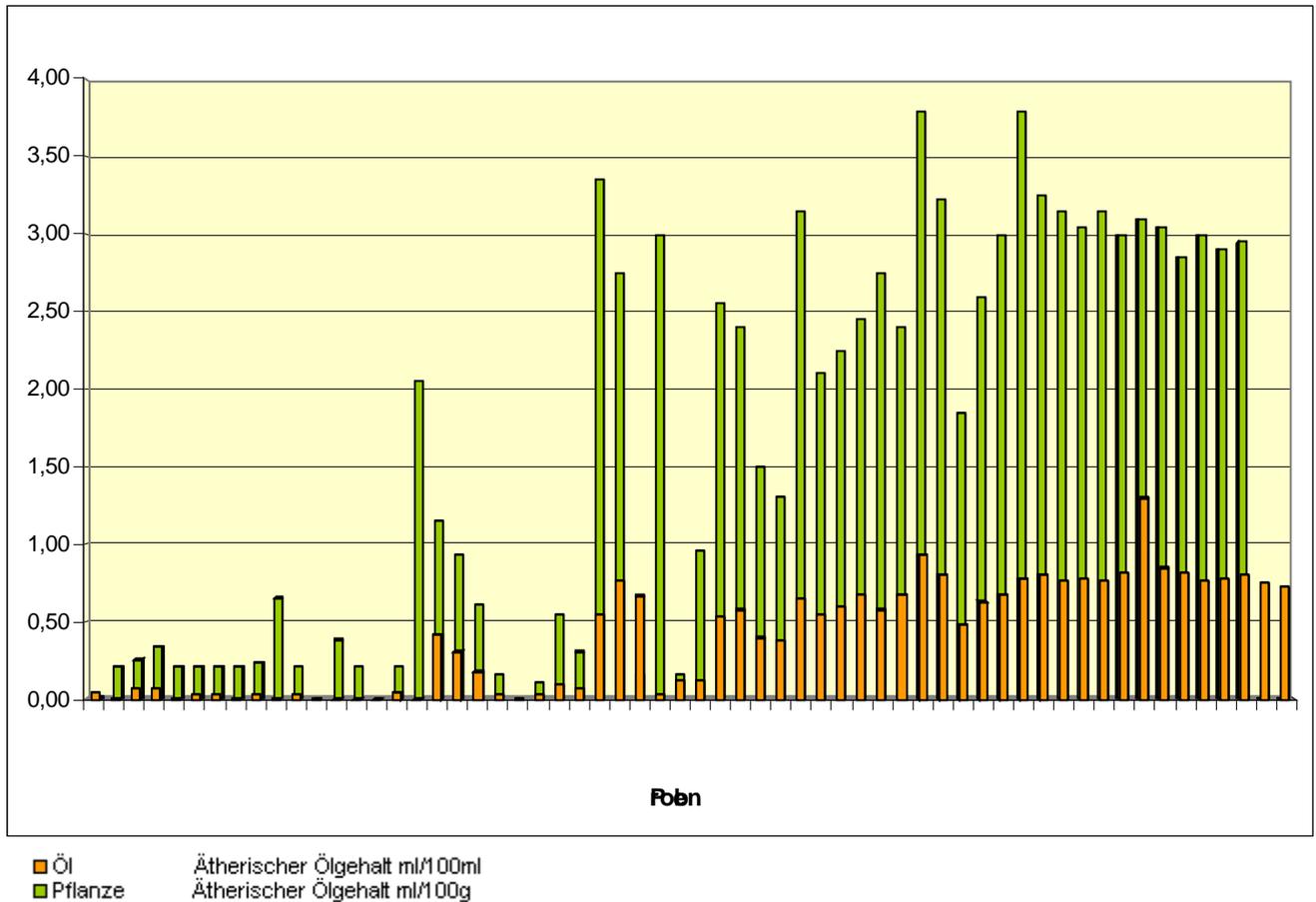


Abb.9: Ätherische Ölgehalte Oregano – Züchtungsjahr 2005 (Pflanzen und Öle)



1.0.2 Aromakomponenten

Zum Nachweis der Aromakomponenten sowohl in den Pflanzen als auch in den Speiseölen wurden die Proben zunächst mittels HS-SPME (Headspace Solid Phase Microextraction) extrahiert. Während der Analyse der Proben des Züchtungsjahres 2004 zeigten sich jedoch Nachteile des Verfahrens. Bei der automatisierten Analytik der Proben kam es immer wieder zu Defekten der feinen Faser der SPME-Spritze, bei nicht vermeidbarer mechanischer Belastung dieser. Die Faser musste daraufhin während einer Sequenz mehrfach gewechselt werden. Wodurch vor allem der zügige Ablauf der großen Probenanzahl verzögert wurde. Bei der Auswertung der Daten konnte auch eine erhöhte Standardabweichung nachgewiesen werden, die mit dem häufigen Kanülenwechsel im Zusammenhang stand.

Daraufhin wurde ein alternatives Verfahren eingesetzt. Die HS-SPDE (Solid Phase Dynamic Extraction). Mit diesem Extraktionsverfahren war es nun möglich die Proben ohne Unterbrechungen zu analysieren. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist ihre höhere Beladungskapazität auf Grund größerer Mengen an Polymervolumen. Somit ist es auch möglich Minorkomponenten zu detektieren. Auch konnte eine verbesserte Standardabweichung im Vergleich zur HS-SPME erzielt werden. Dieser Vergleich der Area%-Werte ist in den Abb. 10 und 11 anhand von zwei Aromakomponenten (Carvacrol, p-Cymen) des Oregano dargestellt.

Abbildung 10: Vergleich der Extraktionseffizienz von p-Cymen in Fasern

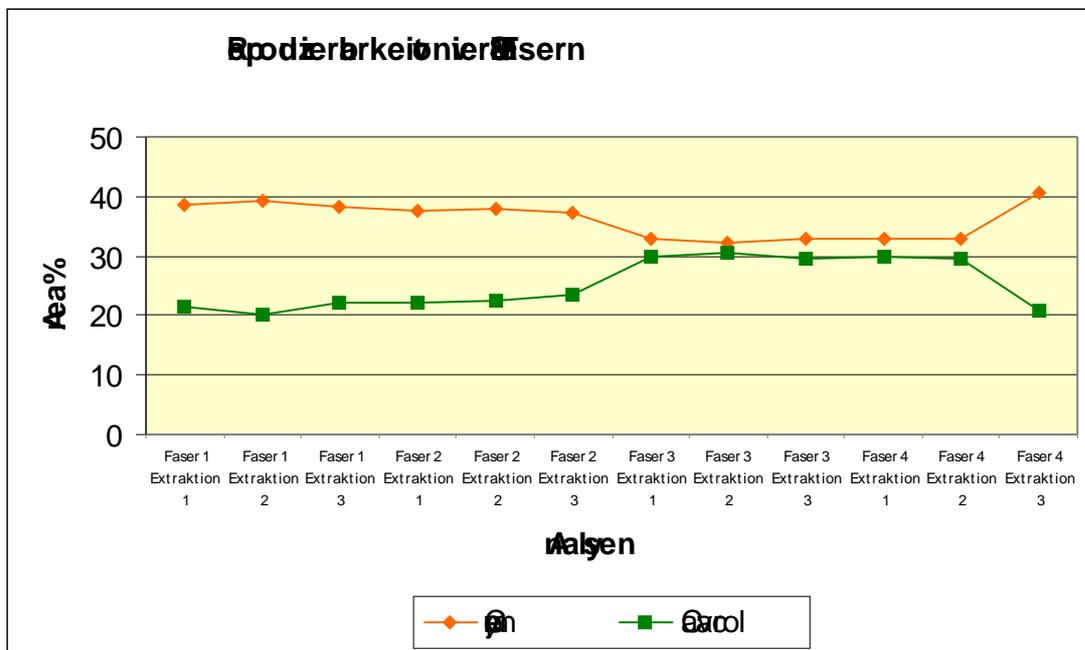
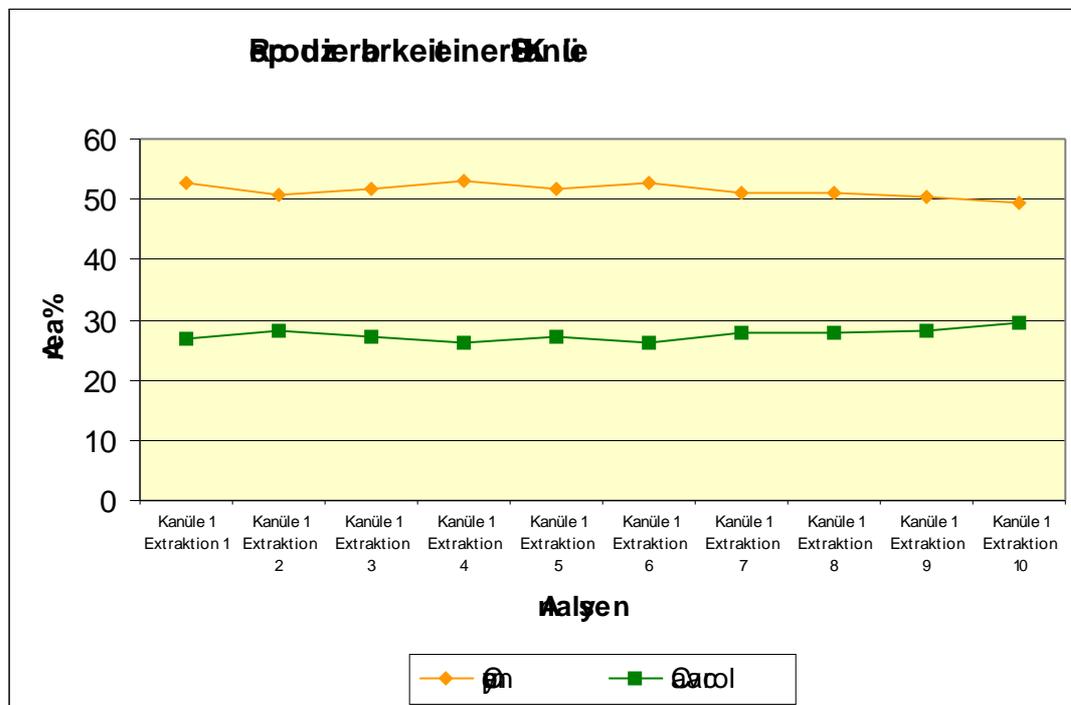


Abbildung 11: Vergleich der Extraktionseffizienz von Carvacrol in Kanülen



Die Abb.10 zeigt den doch sehr großen Schwankungsbereich der Analysenergebnisse bei Verwendung von mehreren SPME-Fasern. Hierbei konnten Variationskoeffizienten von bis zu 20 % nachgewiesen werden. Die Abb. 11 hingegen zeigt die sehr stabilen Werte bei Analyse der Aromakomponenten mit dem HS-SPDE -Verfahren. Durch die nicht notwendige Verwendung von mehreren Kanülen auf Grund der größeren Belastbarkeit sind die Variationskoeffizienten für Naturstoffproben sehr klein (maximal 4%). Daraufhin wurden die Proben des Züchtungsjahr 2005 mittels HS-SPDE-Verfahren analysiert.

Die Daten der Analysen der Proben des Züchtungsjahres 2004 und 2005 sind in den Anlagen 6-13 zusammengestellt. Mit Hilfe der HS-SPME wurden somit im Jahr 2005 (Züchtung 2004) 81 Pflanzen (30 Oregano-Proben und 51 Basilikum- Proben) und 81 Öle (30 Oregano-Proben und 51 Basilikum- Proben) analysiert und im Jahr 2006 (Züchtung 2005) mittels HS-SPDE 117 Pflanzen (55 Oregano-Proben und 62 Basilikum- Proben) und 112 Öle (50 Oregano-Proben und 62 Basilikum- Proben).

BASILIKUM

Aufgrund des Retentionszeitenvergleichs mit Standardsubstanzen, sowie des Vergleiches mit den Retentionsindices aus Literaturquellen (ADAMS,1995) und zusätzlicher massenspektrometrischer Überprüfung aller Peaks konnten für Basilikum



folgende ätherische Öl- Komponenten identifiziert werden (siehe Tab. 11 und Abb. 12 und 13). In der Tabelle sind sie nach ihrer Retentionszeit sortiert.

Tab.11: Identifizierte Komponenten der Basilikum-Pflanzen (*Ocimum basilicum*)

Identifizierte Komponente	Einteilung nach Flächenanteil (Ø)
-Pinen	MK
Camphen	MK
Sabinen	MK
-Pinen	MK
p-Cymen	MK
Limonen	MK
1,8-Cineol	HPK
Identifizierte Komponente	Einteilung nach Flächenanteil (Ø)
b-Ocimen	MK
-Terpinen	MK
Terpinolen	MK
cis- Sabinenhydrat	MK
trans-Linalool oxid	MK
cis Linalool oxid	MK
Linalool	HPK
Camphor	MK
Borneol	MK
Terpinen-4-ol	MK
-Terpineol	MK
-Terpineol	MK
Estragol	HPK
Peak 4 (nicht identifiziert)	MK
Isobornyl format	MK
Peak 5 (nicht identifiziert)	MK
Thymol	MK



Bornyl acetat	MK
Carvacrol	MK
(Z)-Methylcinnamat	MK
Peak 6 (nicht identifiziert)	MK
Peak 1 (nicht identifiziert)	MK
4bH,10aH-Guaia-1(5),6-dien	MK
Eugenol	MK
-Cubeben	MK
(E)-Methylcinnamat	MK
-Bourbonen	MK
-Elemen	MK
Methyleugenol	MK
Identifizierte Komponente	Einteilung nach Flächenanteil (Ø)
(Z)-o-Methoxycinnamaldehyd	MK
Sesquiterpen	MK
-Caryophyllen	MK
trans- -Bergamoten	MK
-Humulen	MK
cis-Muurolo-4(14),5-dien	MK
Valencen	MK
-Patchoulen	MK
-Longipinen	MK
-Maalien	MK
(Z,Z)- -Farnesen	MK
-Cadinen	MK
Muurolo-4,10(14)-dien-8a-ol	MK
Peak 3 (nicht identifiziert)	MK
Spathulenol	MK
Cubenol	MK
T-Cadinol	MK

Insgesamt konnten 55 ätherische Ölkomponenten sowohl in den Pflanzenproben Die identifizierten Komponenten der ätherischen Öle konnten durch Literaturangaben (BLUM,1999; SCHULZ et al.,2003; TEUSCHER, 2003; KRÜGER et al., 2002; ECKELMANN, 2002) bestätigt werden. Insgesamt konnten für die Züchtungsjahre 2004 und 2005 55 Aromakomponenten für die Pflanzen- und Öl-Proben nachgewiesen werden.

Beim Screening aller zu untersuchenden Pflanzen unterschiedlichster Herkünfte der Spezies *Ocimum basilicum* konnten Abweichungen der Flächenprozentanteile der einzelnen Aromakomponenten nachgewiesen werden.

Betrachtet man den Querschnitt aller untersuchter Pflanzenproben (untersucht mit HS-SPDE) gibt es drei wesentliche Hauptkomponenten im Basilikum (*Ocimum basilicum* var. *basilicum*). Diese sind, in der Tabelle mit HPK gekennzeichnet, 1,8-Cineol, Linalool und Estragol. Wobei ein zu hoher Gehalt an Estragol durchaus kritisch zu betrachten ist. In verschiedenen Studien wurde eine kanzerogene Wirkung bei Tieren bereits nachgewiesen (CLASSEN,1994; WESTENDORF,1994). Allerdings bezieht sich diese Aussagen auf den Gehalt an Estragol im ätherischen Öl. Also galt es zu überprüfen, ob im ätherischen Öl, gewonnen durch Wasserdampfdestillation, ähnlich hohe Estragol-Gehalte nachweisbar sind.



Hierfür wurden die ätherischen Öle der „kritischen Proben“ gaschromatographisch auf ihren Gehalt an Estragol untersucht. Auch bei diesen Proben ließ sich der teilweise sehr hohe Gehalt an Estragol nachweisen. Somit ist zu überlegen, ob diese Spezien von Basilikum weiter für die Züchtung verwendet werden sollten. Ihre gesundheitsschädigende Wirkung ist nicht auszuschließen. Folgende Basilikum-Proben hatten einen erhöhten Estragolgehalt:

Tab.12: Basilikum-Proben mit Estragol-Gehalten ermittelt mit HS-SPDE (n=2)

Basilikum-Probe	Estragol-Gehalt in %
Bas2_05	59,01
Bas3_05	64,34
Bas5_05	27,57
Bas10_05	19,17
Bas11_05	14,62
Basilikum-Probe	Estragol-Gehalt in %
Bas20_05	40,03
Bas22_05	24,38
Bas23_05	18,22
Bas24_05	24,83
Bas29_05	81,14
Bas30_05	88,39
Bas31_05	5,67
Bas32_05	5,58
Bas33_05	22,09
Bas35_05	67,52
Bas37_05	18,38
Bas39_05	85,17
Bas42_05	84,31
Bas43_05	35,52
Bas44_05	91,95
Bas46_05	89,82
Bas47_05	88,65



Bas48_05	15,69
Bas54_05	8,48
Bas55_05	14,38

OREGANO

Aufgrund auch für Oregano durchgeführter Retentionszeitenvergleiche mit Standardsubstanzen, sowie des Vergleichs mit den Retentionsindices aus Literaturquellen (ADAMS,1995) und zusätzlicher massenspektrometrischer Überprüfung aller Peaks, konnten folgende ätherische Öl- Komponenten identifiziert werden (siehe Tab.13). In der Tabelle sind sie, ebenfalls nach ihrer Retentionszeit sortiert, zusammengefasst.

Tab.13:Identifizierte Komponenten der Oregano-Pflanzen (*Origanum vulgare ssp.hirtum*)

Identifizierte Komponenten	Einteilung nach Flächenanteil (%)
Tricyclen	MK
-Pinen	MK
Camphen	MK
1-Octen-3-ol	MK
Sabinen	MK
-Pinen	MK
-Phellandren	MK
-3-Caren	MK
-Terpinen	MK
p-Cymen	HPK
m-Cymen	MK
-Terpinen	MK
Terpinolen	MK
cis- Linalool oxid	MK



trans-Sabinenhydrat	MK
Linalool	MK
Borneol	MK
Terpinen-4-ol	MK
-Terpineol	MK
-Terpineol	MK
Estragol	MK
Thymol methyl ether	MK
Carvacrol methyl ether	MK
Tymoquinon	MK
Thymol	MK
Carvacrol	HPK
-Ylangen	MK
Isolden	MK
Identifizierte Komponenten	Einteilung nach Flächenanteil (∅)
- Bourbonen	MK
(E)- -Caryophyllen	MK
-Elemen	MK
-Patchoulen	MK
-Humulen	MK
Valencen	MK
trans- -Bergamoten	MK
(Z,Z) -Farnesen	MK
-Cadinen	MK
cis-Calamenen	MK
Spathulenol	MK
- Bisabolen	MK

HPK = Hauptkomponente (durchschnittlicher Gehalt > 10%)

MK = Minorkomponente (durchschnittlicher Gehalt < 10%)



14 aufgeführten Probennummern der Züchtungsjahre 2004 und 2005 konnten diese Komponenten nicht als Hauptbestandteile der flüchtigen Verbindungen nachgewiesen werden. Sie wiesen dagegen einen höheren Gehalt anderer flüchtigen Komponenten auf. Diese Komponenten sind 1-Octen-3-ol, Sabinen, -Pinen, -Terpinen, Linalool und -Caryophyllen. Diese Sorten mit teilweise keinen oder nur sehr geringen Gehalten an Carvacrol sollten für die Verwendung als natürliches Konservierungsmittel in der Lebensmittel-, Futtermittel oder kosmetischen Industrie ausgeschlossen werden, da Carvacrol hauptverantwortlich für die antioxidative und antimikrobielle Wirkung des ätherischen Öls ist.

Tab.14: Proben-Nr. Oregano-Pflanzen der Züchtungsjahre 2004 und 2005 mit keinen oder sehr geringen Carvacrol- Gehalten

Proben-Nr.	Kein Carvacrol	Geringer Carvacrolgehalt
Ori1_04		+
Ori6_04		+
Ori26_04		+
Ori29_04		+
Ori1_05	+	
Ori3_05	+	
Ori4_05	+	
Ori5_05	+	
Ori9_05	+	
Ori14_05	+	
Ori16_05	+	
Ori20_05	+	
Ori21_05	+	

Ori21_05	+	
Ori23_05	+	
Ori7_05		+
Ori8_05		+
Ori10_05		+
Ori11_05		+
Ori13_05		+
Ori18_05		+
Ori19_05		+
Ori24_05		+
Ori27_05		+
Ori28_05		+
Ori35_05		+

SENSORIK

Durch den Projektpartner Dr. Junghanns GmbH wurden sensorische Untersuchungen der Basilikum- und Oregano -Öle durchgeführt (vollständige Daten sind dem Abschlußbericht des Projektpartners Dr. Junghanns GmbH zu entnehmen) . Diese dienen der Ermittlung der Proben, die auf Grund ihrer sensorischen Eigenschaften für die weitere Züchtung und somit Verwendung (auch als Öl) in der Lebensmittelindustrie geeignet sind. Hierbei wurde die Farbe, der Geschmack und Geruch mittels einer Punkte- Skala bewertet. Maximal war eine Gesamtpunktzahl von 20 Punkten für jede Probe erreichbar. Ölproben mit einer Gesamtpunktzahl von mindestens 16 Punkten wurden als sensorisch besonders wertvoll eingestuft und mit einer Gesamtpunktzahl von weniger als 6 Punkten als sensorisch nicht akzeptabel. Ihr Aroma wurde als nicht arttypisch, parfümartig oder kampferartig (Basilikum) beschrieben. In den Tabellen 15 und 16 sind für die Oregano-Öle und Basilikum-Öle die Sorten mit den sehr guten und schlechten sensorischen Eigenschaften zusammengefasst.

Tab.15: Proben der Oregano-Öle (2005) mit sensorischer Bewertung in Punkten

Proben-Nr.	gute Sensorik	inakzeptable Sensorik
Ori11_05	-	5,5



Ori14_05	20	-
Ori23_05	-	5
Ori26_05	18,5	-
Ori42_05	-	5,5
Ori44_05	18,5	-
Ori4A_05	20	-
Ori6A_05	19,5	-
Ori8A_05	18,5	-
Ori9A_05	18	-
Ori12A_05	20	-
Ori16A_05	20	-

Tab.16: Proben der Basilikum-Öle (2005) mit sensorischer Bewertung in Punkten

Proben-Nr.	gute Sensorik	inakzeptable Sensorik
Bas4_05	16	-
Bas9_05	-	5
Bas13_05	-	5,5
Bas17_05	16	-
Bas21_05	19,5	-
Bas26_05	-	5
Bas27_05	-	5
Bas28_05	-	5
Bas32_05	-	5,5
Bas34_05	-	5
Bas40_05	-	5,5
Bas41_05	-	5,5
Bas43_05	-	5
Bas44_05	-	5
Bas47_05	-	5



Bas60_05	19,5	-
----------	------	---

Es galt nun zu ermitteln ob Zusammenhänge zwischen der sensorischen Bewertung der Sorten und der Zusammensetzungen der flüchtigen Aromaverbindungen bestehen.

Dabei konnte festgestellt werden, dass alle Basilikum-Proben mit sehr guten sensorischen Eigenschaften einen hohen Gehalt an Linalool von mindestens 70 % und einen sehr kleinen Gehalt an Estragol von kleiner 4 % hatten. Bei den sensorisch nicht akzeptablen Proben waren keine besonderen Auffälligkeiten in ihrer Zusammensetzung an flüchtigen Verbindungen erkennbar.

Bei dem Vergleich der sensorischen Daten mit den analytischen Daten konnte eine Gruppe von Proben identifiziert werden, die für eine weitere Züchtung besonders geeignet sind. Diese Proben zeichnen sich durch gute sensorische Eigenschaften (Gesamtpunktzahl mindestens 16 Punkt) und niedrige Estragolgehalte, die, wie schon oben beschrieben, bei der weitem Züchtung nicht außer Betracht gelassen werden sollten. Zu dieser Gruppe zählen folgende Proben: Bas4_05, Bas17_05, Bas21_05 und Bas60_05.

Des weiteren konnten auch Proben ermittelt werden, die sowohl hohe Estragolgehalte, als auch ungenügende sensorische Eigenschaften (Gesamtpunktzahl <10) besaßen (Bas43_05, Bas30_05, Bas35_05, Bas37_05 und Bas55_05). Ihre weitere Züchtung ist nicht zu empfehlen.

Betrachten man die Oregano-Proben ist erkennbar, dass die sensorisch wertvollen Sorten sowohl ein Mindestgehalt an p-Cymen von 40 % aufweisen als auch einen verhältnismässig hohen Gehalt an Carvacrol von mindestens 6 %. !!!

Die Sorten mit sehr schlechten sensorischen Ergebnissen hatten erhöhte 1-Octen-3-ol- und p-Cymen-Gehalte.

Des weiteren konnte festgestellt, dass einige Oregano-Öle sowohl sehr gute sensorische Bewertungen als auch hohe ätherische Ölgehalte aufwiesen (Ori4A_05, Ori6A_05, Ori8A_05 und Ori9A_05). Diese Sorten eignen sich besonders gut für die Verwendung in der Lebensmittelindustrie, da sie eine „Doppelrolle“ einnehmen könnten. Durch ihren Einsatz kann sowohl eine sensorisch Aufwertung des Produktes, als auch eine natürliche Konservierung erreicht werden.



Andere Proben (Ori42_05) erhielten eine schlechte bzw. ungenügende sensorische Beurteilung, wiesen aber sehr hohe Carvacrolgehalte auf. Pflanzen dieser Sorten würden sich nach weiterer Züchtung z. B. für die Verwendung in Kosmetika oder Lebensmittel aufgrund ihrer antimikrobilen Wirkung eignen.

Und dann konnte noch eine Gruppe von Proben identifiziert werden, für die sowohl schlechte sensorischen Eigenschaften (Gesamtpunktzahl < 10), als auch sehr niedrige Carvacrol- und ätherischen Ölgehalten beschrieben wurden. Zu dieser Gruppe zählen Ori23_05, Ori11_05, Ori18_05, Ori20_05, Ori9_05 und Ori1_05. Diese Pflanzen sind für eine weitere Züchtung mit dem Ziel des Einsatzes in der Lebensmittelindustrie, pharmazeutischen und kosmetischen Industrie, unter Berücksichtigung der beschriebenen Aspekte, nicht geeignet.

Schlussfolgernd lässt sich als feststellen, dass auf grund der sensorischen Eigenschaften und analytischen Daten folgende Basilikum- und Oregano- Proben zur weiteren Züchtung empfohlen werden können (Tab. 17).

Tab.17: zur weiteren Züchtung empfohlene Oregano- und Basilikum-Proben

Oregano-Proben	Basilikum-Proben
Ori4A_05	Bas4_05
Ori6A_05	Bas17_05
Ori8A_05	Bas21_05
Ori9A_05	Bas60_05
Ori42_05	

Alle in der nachfolgenden Tabelle 18 aufgeführten Proben sollten, aufgrund der sensorischen und analytischen Ergebnisse von der weiteren Züchtung ausgeschlossen werden.

Tab.18: zur weiteren Züchtung nicht empfohlene Oregano- und Basilikum-Proben

Oregano-Proben	Basilikum-Proben
Ori1_05	Bas5_05
Ori9_05	Bas10_05
Ori11_05	Bas24_05

Ori18_05	Bas30_05
Ori20_05	Bas35_05
Ori23_05	Bas37_05
	Bas43_05
	Bas44_05
	Bas47_05
	Bas55_05

1.1 Fettsäuren

Fettsäuremethylester der Basilikum- Öle

Wie bereits im Zwischenbericht 2004 erläutert, entspricht die Fettsäuremethylesterzusammensetzung der Speiseöle dem Fettsäurespektrum von Sonnenblumenöl. Dies erklärt sich durch das Herstellungsverfahren der Basilikumöle, da beim Pressvorgang der Pflanzen zur Herstellung der Öle eine erhebliche Menge (ca. 70%) an Sonnenblumenkernen beigemischt wird. Da die Fettsäuremethylester des Pflanzenanteils von Basilikum im Öl unter der Nachweisgrenze für dieses Verfahren liegen, sind somit nur die Fettsäuremethylester des Sonnenblumenöls nachweisbar. Die nachfolgende Tabelle 19 zeigt die Zusammensetzung des Fetts der Basilikumöle.

Tab. 19: Fettsäuremethylesterzusammensetzung mit Area%- Anteilen von Basilikumölen

Fettsäuremethylester	Area %	Standardabweichung
Cis-10-Pentadecensäuremethylester (C15:1)	1,49	0,01
Palmitinsäuremethylester (C16:0)	5,84	0,01
Stearinsäuremethylester (C18:0)	3,75	0,03
Ölsäuremethylester (C18:1c)	28,54	0,02
Linolsäuremethylester (C18:2c)	59,17	0,03
Linolensäuremethylester (C18:3n3)	0,66	0,02

(doppelte Verseifung der Probe und jeweils Doppelbesimmung)

Da sich mit Mehrfachuntersuchungen verschiedener Basilikumspeiseöle keine entscheidenden Abweichungen in der Fettsäuremethylesterzusammensetzung nachweisen ließen, wurde auch keine routinemäßige Untersuchung der Öle auf ihr Fettsäurespektrum durchgeführt.

Um Aussagen zu möglichen Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung während der Lagerung treffen zu können, wurden die Basilikumöle über einen Zeitraum von 12 Monaten hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung untersucht.

Hierfür wurde monatlich das Öl gaschromatographisch analysiert und die Fettsäurezusammensetzung verglichen. Zu analysieren waren zwei Basilikumöle, die in Weißglasgefäßen gelagert wurden. Dabei wurden sowohl Idealbedingungen (lichtgeschützt und kühl) als auch schlechte Lagerbedingungen angenommen (nicht lichtgeschützt und bei Raumtemperatur) um die ungünstigsten Bedingungen zu simulieren. Denn oftmals sind die Speiseöle gerade diesen Bedingungen während ihrer Zeit vor dem Kauf durch den Verbraucher, also vor allem im Einzelhandel, ausgesetzt. Dabei ist anzunehmen, dass die Fette oxidieren und eine Veränderung in der Fettsäurezusammensetzung nachweisbar ist. Denn, je höher der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist, desto schneller kommt es zu Oxidationsprozessen bzw. zum Ranzigwerden des Öls. Die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren (C18:1c und C18:2c) werden aufgespaltet, Sauerstoff lagert sich an und das Verhältnis ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren verschiebt sich zu Gunsten der gesättigten Fettsäuren. Somit kommt es zu Qualitätsverlusten, da der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in den ernährungsphysiologisch hochwertigeren Ölen sinkt.

Die Untersuchungen der über 12 Monate gelagerten Basilikum-Öle konnten jedoch zeigen, dass sowohl bei den ideal als auch bei den ungünstig gelagerten Ölen kaum Fettsäurezusammensetzungsveränderungen und somit Qualitätsverluste nachweisbar waren. Wie die Anlage 14 zeigt, kam es nur zu sehr geringen Veränderungen in der Fettsäuremethylesterzusammensetzung der beiden Basilikumöle.

So nahm der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren der kühl und lichtgeschützt gelagerten Öle bei Öl 1 (Bas8_04) nur um 1,43 % ab. Bei Öl 2 (Bas7_04) beträgt die prozentuale Abnahme der ungesättigten Fettsäuren bei einer 12 monatigen Lagerung 0,6 %. Im gleichen Maße nahm der Anteil der gesättigten Fettsäuren zu.

Bei den nicht optimal gelagerten Ölen nahmen die Gehalte an ungesättigten Fettsäuren um 1,52 % (Bas8_04) bzw. 1,2 % (Bas7_04) ab.

Diese Daten zeigen jedoch nur sehr geringe Schwankungen in den Gehalten der einzelnen Fettsäuremethylester am Gesamtfettsäuremethylestergehalt. Dies spricht für keine qualitative Verschlechterung der Öle aufgrund ihrer Fettsäuren-Zusammensetzung. Liegt der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren allerdings noch höher, wie z.B. bei Rapsöl, ist auch mit einer deutlicheren Oxidation der Fette und damit mit einem größeren Verlust an ungesättigten Fettsäuren zu rechnen.

Ein weiterer Grund für die geringen Verluste an ungesättigten Fettsäuren kann auch auf die protektive Wirkung des Basilikums zurückzuführen sein. Den im Basilikum enthaltenen phenolische ätherische Ölkomponenten wird eine antioxidative Wirkung zugeschrieben. Sie schützen die Fette indem sie sowohl Autoxidations-, als auch Lipidperoxidationprozesse verhindern. Somit kommt es nicht zur Umwandlung von ungesättigten Fettsäuren zu gesättigten Fettsäuren durch Doppelbindungsverlust.

Die Basilikumöle sind aufgrund ihrer Fettsäurezusammensetzung als ausreichend stabil einzuschätzen. Eine Lagerung von 12 Monaten beeinflusst die günstige Fettsäurezusammensetzung der Basilikumöle nicht. Nicht untersucht und betrachtet wurden hierbei allerdings die sensorischen Eigenschaften.

Fettsäuremethylester der Oregano- Öle

Auch hier entspricht die Fettsäuremethylesterzusammensetzung der Speiseöle dem Fettsäurespektrum von Sonnenblumenöl. Die nachfolgende Tabelle 20 zeigt die Zusammensetzung des Fetts der Oreganoöle.

Tab.20: Fettsäuremethylesterzusammensetzung mit Area%- Anteilen von Oreganoölen

Fettsäuremethylester	Area %	Standardabweichung
Palmitinsäuremethylester (C16:0)	6,35	0,01
Stearinsäuremethylester (C18:0)	3,74	0,00
Ölsäuremethylester (C18:1c)	29,51	0,02
Linolsäuremethylester (C18:2c)	60,41	0,02

(doppelte Verseifung der Probe und jeweils Doppelbesimmung)



Bei der Fettsäuremethylesterbestimmung aus Oreganoöl hingegen wurden folgende FAME's identifiziert: Palmitinsäuremethylester, Stearinsäuremethylester, Ölsäuremethylester, Linolsäuremethylester.

Da auch bei den Oreganoöluntersuchungen verschiedener Proben keine Abweichungen in der Fettsäurezusammensetzung nachweisbar waren und dies auch kein bedeutendes Auswahlkriterium zur Herstellung der Pflanzenöle bzw. der Produktion der Oreganopflanzen darstellt, wurden die Oreganoöle nicht routinemäßige hinsichtlich ihres Fettsäurespektrum untersucht.

Allerdings wurde das Oreganoöl zweier Proben analog der Basilikumöle hinsichtlich eventueller Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung bei der Lagerung analysiert. Hierfür wurden die in Weißglas gelagerten Öle ebenfalls 12 mal einmal im Monat gaschromatographisch überprüft und die Fettsäurezusammensetzung verglichen.

Wie bereits schon beschrieben, wurden hierbei die Öle unter zwei verschiedenen Bedingungen gelagert. Zum einen gekühlt und lichtgeschützt und zum anderen bei Raumtemperatur und nicht lichtgeschützt um eine schlechte Lagerung zu simulieren. Die Ergebnisse sind in Anlage 15 zusammengefasst.

Der prozentuale Verlust an ungesättigten Fettsäuren bei den ideal gelagerten Ölen betrug 2,7 % (Ori1_04) bzw. 0,83 % (Ori19_04). Deutlichere Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung waren dann bei den nicht optimal gelagerten Ölen nachweisbar. Hierbei war ein prozentualer Verlust an ungesättigten Fettsäuren von 7,61 % (Ori19_04) und sogar bei der zweiten Probe von 22,65 % belegbar. Diese doch erheblichen Veränderungen sind mit den ätherischen Ölgehalten der Öle zu erklären. Der ätherische Ölgehalt der Ori1_04-Probe beträgt nur 0,03 %. Aufgrund dieses sehr geringen Gehaltes an antioxidativ wirkenden phenolischen Verbindungen aus dem ätherischen Öl kann nicht mehr von einer protektiven Wirkung durch diese Verbindungen ausgegangen werden. An dieser Öl-Probe ist eindeutig die Lipidperoxidation aufgrund von intensiver Sonneneinstrahlung und Wärme nachweisbar. Denn im Vergleich dazu konnte an der ideal gelagerten Probe nur ein Verlust von 2,7 % an ungesättigten Fettsäuren festgestellt werden.

Auch bei der zweiten Organo- Ölprobe (Ori19_04) konnte immerhin noch eine Erhöhung des Verlustes an ungesättigten Fettsäuren von 6,78 % von der ideal zu der nicht ideal gelagerter Probe nachgewiesen werden. Betrachtet man hierbei den ätherischen Ölgehalt der Pflanze aus der das Öl hergestellt wurde, ist der ätherische Ölgehalt von 2,7 ml/100g Pflanzenmaterial



sehr hoch. Betrachten man dann jedoch den ätherischen Ölgehalt des Öls stellt man fest, dass der nur bei 0,7% liegt. Nur ca. 1/3 des ätherischen Ölgehaltes der Pflanze sind letztendlich im Öl nachweisbar. Der Grund hierfür liegt im Prozess des Ölpressens begründet. Denn hierbei werden nur etwa 30 % Pflanzenmaterial und 70 % Sonnenblumenkerne verwendet. Ein höherer Einsatz und somit auch ein höherer Anteil an ätherischen Ölen und damit auch ein höherer Anteil an antioxidativ wirksamen phenolischen Verbindungen (Thymol und Carvacrol) ist allerdings technologisch nicht realisierbar. Bei den ideal gelagerte Ölen sind jedoch hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung keine entscheidenden Veränderungen nachweisbar. Somit ist die Lagerung dieser Speiseöle über 1 Jahr als unbedenklich einzustufen. Auch hier lagen keine sensorischen Eigenschaften zur Beurteilung der Lagerstabilität vor.

1.2 Flavonoide

Die Analytik der Flavonoide wurde auf grund der großen Probenmengen und bereits in Vorversuchen erwarteter niedriger Mengen an Flavonoiden (unter der Nachweisgrenze) an ausgewählten Pflanzen und Ölen der beiden Kräuter Basilikum und Oregano durchgeführt. Hierfür wurden Proben mit sehr hohen ätherischen Ölgehalten, mit sehr niedrigen ätherischen Ölgehalten und auch zum Vergleich mit durchschnittlichen ätherischen Ölgehalten ausgewählt (Tab.21). Analysiert wurden die Speiseöle und die für diese verwendeten dazugehörigen Pflanzen.

Tab.21: Oregano-Proben und Basilikum-Proben zur Flavonoidanalytik mit Bewertung der ätherischen Ölgehalte

Probe	Ätherischer Ölgehalt	Probe	Ätherischer Ölgehalt
Ori1_05	+	Bas1_05	+++
Ori17_05	++	Bas25_05	+
Ori26_05	+++	Bas26_05	+++
Ori27_05	+++	Bas27_05	+++
Ori30_05	+	Bas28_05	++
Ori36_05	++	Bas44_05	+++

Ori42_05	+++	Bas46_05	+++
Ori3A_05	+++	Bas48_05	+++
Ori4A_05	+++	Bas56_05	+++
Ori7A_05	+++	Bas61_05	+

+++ hoher ätherischer Öleghalt
 ++ mittlerer ätherischer Öleghalt
 + niedriger ätherischer Öleghalt

OREGANO

Für die ausgewählten Oregano-Pflanzen konnten Gesamtflavonoidgehalte zwischen 0,2% (Ori42_05) und 1,16% (Ori3A_05) nachgewiesen werden. Bei den dazugehörigen Speiseölen waren die Werte deutlich kleiner. Hier betrug der Flavonoidgehalt 0,01 % bis maximal 0,06% (Tabellen 22 und 23). Grundsätzlich ist die Ursache für die noch geringeren Gehalte in den Ölen bei der Herstellung der Öle begründet, denn hier wurden 2/3 weniger Flavonoid lieferndes Pflanzenmaterial eingesetzt. Bei der Analyse reines Sonnenblumenöls konnten keine Flavonoide nachgewiesen werden.

Tab.22: Flavonoidgehalte in % -Oregano-Pflanzen (n=2)

Flavonoid %	0105	01705	02605	02705	03005	03605	04205	0305	0405	0705
Apigenin	0,36	0,06	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00	0,15	0,17	0,17
Chrysin	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eriodiol	0,48	0,29	0,28	0,47	0,33	0,35	0,00	0,71	0,52	0,44
Genistein	0,00	0,02	0,02	0,03	0,00	0,00	0,03	0,05	0,04	0,04
Galangin	0,16	0,10	0,05	0,09	0,07	0,14	0,12	0,20	0,18	0,18
Quercetin	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaempferol	0,00	0,00	0,00	0,07	0,05	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04
Epigallocatechin gallate	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Resveratrol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Anthranol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Summe	0									

0105 niedriger Gehalt
 01705 mittlerer Gehalt
 02605 hoher Gehalt

Tab.23: Flavonoidgehalte in % -Oregano-Öle (n=2)

Flavonoid %	0105	01705	02605	02705	03005	03605	04205	0305	0405	0705
Apigenin	0,01	na.	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Chrysin	0,00	na.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eriodiol	0,00	na.	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Genistein	0,00	na.	0,00	0,05	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,02
Galangin	0,00	na.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Quercetin	0,00	na.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kaempferol	0,00	na.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Epigallocatechin gallate	0,00	na.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ergebnisse

Quercetin	0,00	na.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Chkanin	0,00	na.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Summe	0									

niedrigster Gehalt	na. nicht analysiert
mittlerer Gehalt	
höchster Gehalt	

Die für Oregano in der Literatur beschriebenen Flavonoide konnten in den Oregano-Pflanzenproben teilweise nachgewiesen werden. Dabei war Eriodicytol bei allen Pflanzenproben (außer bei Ori42_05) immer die Hauptkomponente. Der Gehalt lag bei der Pflanze zwischen 0% (Ori42_05) und 0,71% (Ori3A_05). In den Ölen waren dann viele Flavonoide nicht mehr nachweisbar. Hier konnten bei den einzelnen Flavonoiden nur noch Maximalwerte von 0,05% erreicht werden.

BASILIKUM

Beim Basilikum konnten sechs Flavonoide nachgewiesen werden. Dabei konnten für die Pflanzen Gesamtgehalte zwischen 0,09% (Bas26_05) und 0,29% (Bas25_05) analysiert werden. Die Gesamtflavonoidgehalte der Öle sind wiederum sehr gering. Hier konnten maximale Gehalte von 0,05% ermittelt werden (Tabellen 24 und 25). Hauptkomponente aller Basilikum-Proben ist das Quercetin.

Tab.24: Flavonoidgehalte in % -Basilikum-Pflanze (n=2)

Flavonoid %	Bas105	Bas2505	Bas2605	Bas2705	Bas2805	Bas4405	Bas4605	Bas4805	Bas5605	Bas6105
Quercetin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Chkanin	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Eriodicytol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Quercetin	0,10	0,19	0,06	0,07	0,04	0,07	0,07	0,13	0,06	0,07
Chkanin	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00
Eriodicytol	0,04	0,08	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,05	0,02
Chkanin	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
Quercetin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Chkanin	0,00	0,02	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00
Summe	0									

niedrigster Gehalt	
mittlerer Gehalt	
höchster Gehalt	

Tab.25: Flavonoidgehalte in % -Basilikum-Öle (n=2)

Flavonoid %	Bas105	Bas2505	Bas2605	Bas2705	Bas2805	Bas4405	Bas4605	Bas4805	Bas5605	Bas6105
Quercetin	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Chkanin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eriodicytol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Quercetin	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



Egebnisse

leolin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Goeriol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kärol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eptorin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aetin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Chkanin	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Smme	0									

	niedgr Ertöalt
	mlerer Ertöalt
	ober Ertöalt

Die farbigen Markierungen sollen nochmals den Unterschied der ausgewählten Proben hinsichtlich ihres ätherischen Ölgehaltes darstellen. Zu erkennen ist jedoch, dass offensichtlich keine Korrelation zwischen ätherischem Ölgehalt und Flavonoidgehalt herzustellen ist.

Auf Grund von zahlreichen Studien werden den Flavonoiden verschiedenste protektive Wirkungen zugeschrieben. So sollen sie antioxidativ wirksam sein, da sie u.a. Enzyme hemmen können, die an der Bildung von ROS wie z.B. die Xanthin-Oxidase, Proteinkinase C, aber auch NADH-Oxidase, Cyclooxygenase und Lipoxygenase beteiligt sind (Pietta, 2000). Auch wird ihnen eine antikanzerogen Wirkung zugeschrieben, weil sie u. a. in der Lage sind, aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit den Nukleotiden, sich an die DNA zu binden und Kanzerogene zu verdrängen und darüber hinaus direkt mit den elektrophilen Kanzerogenen reagieren und dadurch biologisch inaktive Produkte bilden (Watzl & Leitzmann, 1999).

Auch sind für Flavonoide antiinflammatorische Wirkungen beschrieben, dadurch können chronisch entzündliche Prozesse der Darmschleimhaut (z.B. Morbus Crohn) positiv beeinflusst werden (Watzl & Rechkemmer, 2001).

Weitere nachgewiesene pharmakologische Wirkungen von Flavonoiden ergeben sich aus ihren antimikrobiellen und antiviralen Eigenschaften. In vitro wurde für einige Flavonoide antivirale Aktivität gegenüber unterschiedlichen Virustypen, beispielsweise gegen Rhinoviren, Polioviren, Herpesviren oder Parainfluenzaviren, nachgewiesen. Ihre Fähigkeit beruht darauf, virale Proteine zu binden sowie die virale Nukleinsäuresynthese zu beeinträchtigen (Watzl & Leitzmann, 1999).

Eine Querschnittsstudie an Japanerinnen ergab, dass die Gesamtaufuhr der Flavonoide (Flavonole, Flavone und Isoflavonoide) umgekehrt mit der Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma und der LDL-Cholesterin-Konzentration im

Plasma korreliert. Das bedeutet, die Flavonoidzufuhr kann präventiv gegenüber koronaren Herzerkrankungen wirken (Arai et al., 2000). Zudem deuten neuere Untersuchungen auf inverse Korrelationen zwischen der Flavonidaufnahme und der Inzidenz ischämischer Herzerkrankungen hin. Knekt (2002) (Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey) beobachtete an Personen mit hoher Quercetinzufuhr ($\bar{x} 3,3 \pm 2,4$ mg/d), die hauptsächlich durch die Aufnahme von Äpfeln und Zwiebeln erreicht wurde, eine signifikante Abnahme der ischämischen Erkrankungsmortalität.

Innerhalb dieses Forschungsprojektes konnten bei den ausgewählten Proben Quercetingehalte im Basilikum von bis zu 1,85 mg/g (Bas25_05) nachgewiesen werden (Tabelle 26). Um die beschriebene hohe Quercetinaufnahme von ca. 5 mg/d zu erreichen, müssten somit täglich ca. 3g Basilikum zugeführt werden. In Form von z.B. Salat oder Pesto ist dies durchaus zu erreichen, jedoch ist die regelmäßige tägliche Zufuhr auszuschließen.

Tab.26: Flavonoidgehalte in mg/g Basilikum (n=2)

Flavonoid g	Bs105	Bs2505	Bs2605	Bs2705	Bs2805	Bs4405	Bs4605	Bs4805	Bs5605	Bs6105
Quercetin (mg)	1,02	1,85	0,59	0,65	0,43	0,67	0,67	1,28	0,60	0,71
Quercetin (µg)	0,00	0,00	0,33	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Auf Grund der geringeren nachgewiesenen Quercetingehalte im Oregano würde die tägliche Verzehrsmenge bei ca. 10 g Oregano liegen (Tabelle 27).

Tab.27: Flavonoidgehalte in mg/g Oregano (n=2)

Flavonoid g	O105	O1705	O2605	O2705	O3005	O3605	O4205	O305	O405	O705
Quercetin (mg)	0,00	0,18	0,21	0,26	0,00	0,00	0,35	0,51	0,41	0,43
Quercetin (µg)	0,00	0,00	0,00	0,48	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00	0,24

n.a. nicht analysiert

Für die beiden Speiseöle würden sich tägliche Verzehrsmengen von mindestens 10 g Öl ergeben. Von solch einer täglichen Menge an Ölfetten allein durch Gewürzöle ist jedoch abzuraten, da zusätzliche Fette noch durch andere Lebensmittel (u.a. Käse, Fleisch) aufgenommen werden und die empfohlene tägliche Fettzufuhr von 60-80 g/d (DGE-Empfehlung) somit schnell überschritten werden kann.

Des Weiteren sind die Ergebnisse der vorgestellten epidemiologischen Studien auch eher kontrovers zu beurteilen. Da epidemiologische Studien sowie Untersuchungen an Tieren bzw. in vitro möglicherweise nur Hinweise aber keine sicheren Fakten auf die Wirkung der Flavonoide geben, sind groß angelegte Humaninterventionsstudien, die randomisiert, doppelt blind und placebokontrolliert durchgeführt werden, erforderlich, um den wissenschaftlichen Einfluss von Flavonoiden auf die Gesundheit beim Menschen eindeutig klären zu können.

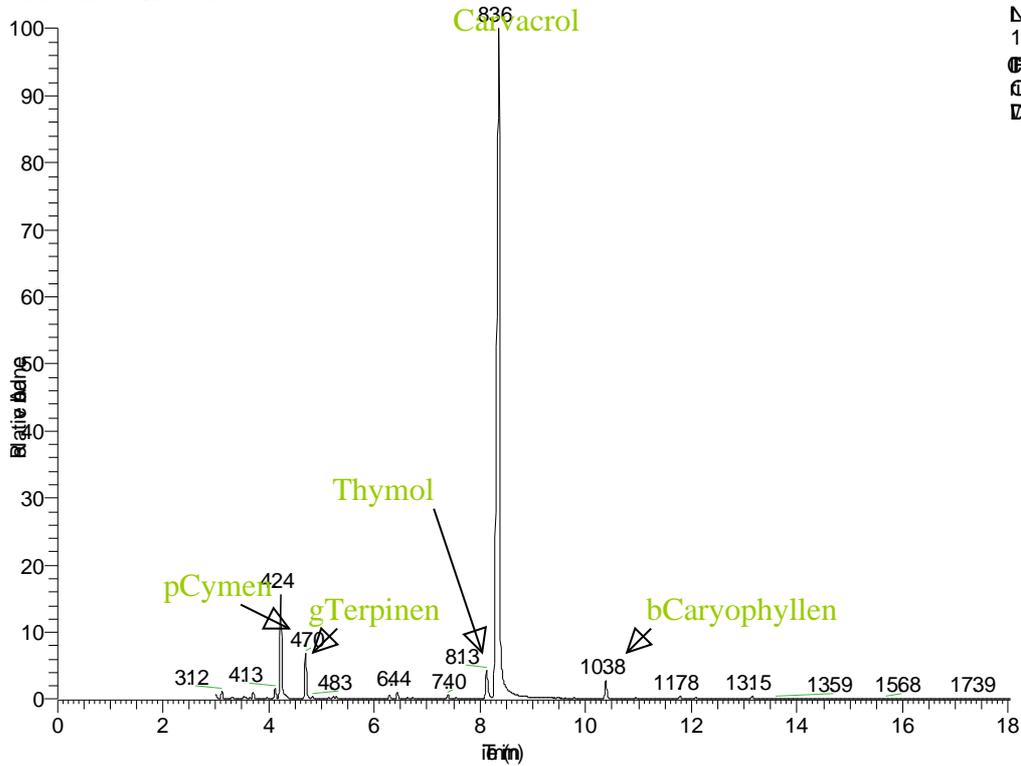
Aber dennoch ist nach bisherigem Erkenntnisstand anzunehmen, dass die aufgenommene Menge an Flavonoiden im Körper biologisch wirksam ist und sich auf die Gesundheit positiv auswirkt. Daher findet in der Humanernährung die allgemeine Empfehlung eines täglich hohen, abwechslungsreichen Verzehrs an Obst und Gemüse, zu denen auch die hier untersuchten Kräuter Basilikum und Oregano zählen, Unterstützung.

1.3 Ergebnisse der Isolierung von Standardsubstanzen für die NIR-Kalibrierung

Die Abbildung 16 zeigt die Analyse des Wasserdampfdestillats der Oreganoprobe, die zur Gewinnung einer Einzelsubstanzen (in diesem Fall Carvacrol) verwendet wurde. Hierbei ist deutlich zur erkennen, daß diese Probe aus einem Gemisch von fünf Einzelkomponenten besteht.

Abb.16: Chromatogram Oregano-Probe (Ori19_04)

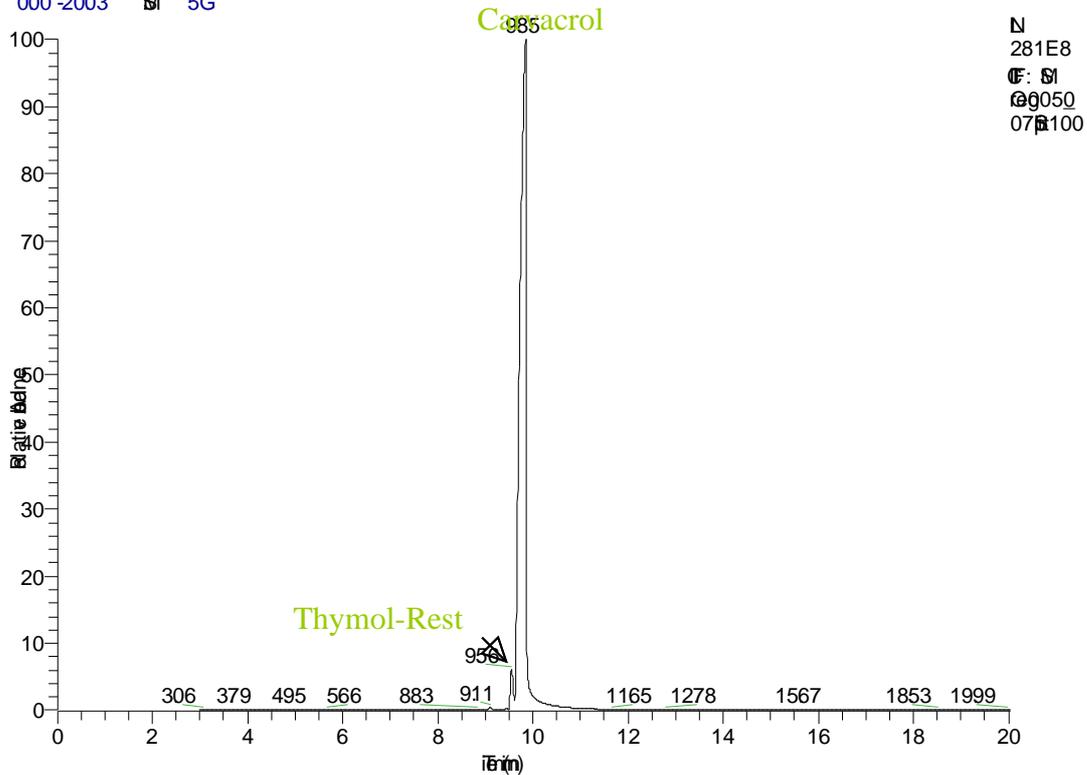
R 000-1803 S 5G



Die Abbildung 17 zeigt die gewonnene Einzelsubstanz nach gaschromatographischer Trennung mit parallelem präparativem Sammeln.

Abb.17: Chromatogram Oregano-Probe (Ori19_04) nach dem präparativen Sammeln

R 000-2003 5G



Die Abbildungen 16 und 17 veranschaulichen die außerordentliche gute Möglichkeit zur Isolierung von Einzelkomponenten aus einem Probengemisch um unabhängig aus verschiedensten Ausgangsmaterialien eigene Standards herstellen zu können. Die in dieser Form gewonnenen Komponenten wurden anschließend Projektpartner IV zur Kalibrierung zur Verfügung gestellt.

Die bereits unter Punkt 2.1.1. beschriebenen teilweise sehr hohen ätherischen Ölgehalte der Oreganoöle sind auch der Grund warum eine Kalibrierung des NIR-Messgerätes mit Oreganoölen besser möglich ist, als mit Basilikumölen.

VII Voraussichtlicher Nutzen

Die entwickelten und validierten Analysemethoden waren Voraussetzung zur Charakterisierung der qualitätsrelevanten Inhaltsstoffe und Parameter zur Entwicklung und Optimierung von neuen Natürlichen Aromen der Heil- und



Gewürzpflanzen Basilikum und Oregano. Die im Institut für Bioanalytische Wissenschaften (IBAS) der Hochschule Anhalt etablierten Untersuchungsmethoden sowie das während Aufbau und Optimierung der Methoden entstandene Know-How der Arbeitsgruppe ermöglichen auch in Zukunft eine enge Zusammenarbeit mit den Projektpartnern, wie auch mit anderen Unternehmen der Region als kompetenter Partner.

Aufbauend auf den im Rahmen des Forschungsprojektes an der Hochschule Anhalt ermittelten Ergebnissen ist weiterhin die Anfertigung einer Promotionsarbeit vorgesehen.

Der voraussichtliche wirtschaftliche Nutzen der Ergebnisse des Gesamtprojektes ist den Berichten der Projektpartner zu entnehmen.

VIII Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit ist kein Fortschritt bei anderen Stellen bezüglich der Aufgaben- und Zielstellungen des Projektpartners Hochschule Anhalt bekannt geworden.

Bezüglich des Gesamtprojektes sind Angaben hierzu den Berichten der Projektpartner zu entnehmen.

IX Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Wolff, A.-Chr.; Schellenberg, I.: Investigations of the suitability of Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE) to determine the composition of aroma active components in herbs. Poster 36th International Symposium on Essential Oils (ISEO), September 2005, Budapest, Hungary

Wolff, A.-Chr.; Schellenberg, I.: HS-SPDE-Verfahren zur inhaltsstofforientierten Aromapflanzen-züchtung- Untersuchung der Eignung der Headspace Dynamic Extraction (HS-SPDE) zum Nachweis von aromaaktiven Komponenten in Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). Lecture Tag der Forschung, May 2006, Köthen, Germany

Wolff, A.-Chr.; Schellenberg, I.: Comparison of automated headspace solid phase dynamic extraction (HS-SPDE), headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and headspace sorptive extraction (HSSE) to analyse volatile fraction of aroma active compounds in basil and oregano. Lecture 12th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology (NAROSSA), June 2006, Magdeburg, Germany



Wolff, A.-Chr.; Schellenberg, I.: Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME), Headspace Solid Phase Dynamic Extraction (HS-SPDE) and Headspace Sorptive Extraction (HSSE) applied to the analysis of volatile fraction and aroma active components in herbs. Poster 37th International Symposium on essential oils (ISEO), September 2006, Grasse, France

Wolff, A.-Chr.; Schellenberg, I.: Investigations of the suitability of Headspace Solid Phase Dynamic Extraction (HS-SPDE) to determine the composition of aroma active components in herbs. Poster 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, September 2006, Dresden, Germany

Wolff, A.-Chr.; Schellenberg, I.: Solid Phase Microextraction (SPME), Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE) and Headspace Sorptive Extraction (HSSE) - Applied to the analysis the volatile fraction of aroma active components in herbs. geplant

Literaturverzeichnis

Adams, Robert, P. (1995): Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation Carol Stream, Illinois USA



Arai, Y.; Watanabe, S.; Kimira, M.; Shimoi, K.; Mochizuki, R.; Kinae, N. (2000): Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese Women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.* 130, 2243-2250

Bendini, A; Toschi, T.G.; Lercker, G. (2002): Antioxidant activity of Oregano (*Origanum Vulgare* L.) Leaves. *Ital.J. Food Sci.n.* 1, vol.14, 17-24

Bicchi, C.; Drigo, S.; Rubiolo, P. (2000): Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatography analysis of aromatic and medicinal plants. *J. Chr. A* 892, 469-485

Classen, H.G. (1994): Lebensmitteltoxikologie. In: Marquardt, H.; Schäfer, S.G. (Hrsg.). *Lehrbuch der Toxikologie*. Mannheim Leipzig Wien Zürich: BI-Wiss-Verl 6. Aufl. 758-779

Grayer, R.J.; Bryan, S.E.; Veitch, N.C.; Goldstone, F.J.; Paton, A.; Wollenweber, E. (1996): External Flavones in Sweet Basil, *Ocimum Basilikum*, And Related Taxa. *Phytochemistry* 43(5), 1041-1047

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

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 activities mass spectrometry for characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J. Chr. A* 902, 369- 379

Justesen, U.; Knuthesen, 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

Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T. (2002): Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 560-568

Kulevanova, S.; Stefova, M.; Stefkov, G.; Stafilov, T. (2001): Identification, isolation, and determination of flavones in *Origanum vulgare* from Macedonian flora. *J.Liq. Chrom. Rel. Technol.* 24(4), 589-600

LMBG § 35 (1995): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren. L 53.00-5: Untersuchung von Lebensmitteln. Untersuchung von Gewürzen und würzenden Zutaten. Bestimmung des ätherischen Ölgehaltes. Destillationsverfahren. (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10228, Ausg. Dez. 1995)

LMBG § 35 (1995): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren. LMBG L 00.00 – 38/2 6.4.6.1 Untersuchung von Lebensmitteln. Fettreiche Lebensmittel. Bestimmung von Pestiziden und polychlorierten Biphenylen (PCB). Teil 2: Extraktion des Fettes, der Pestizide und PCB und Bestimmung des Fettgehaltes. (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN 1528 Teil 2, Ausg. Jan. 1997)

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

Pietta, P. (2000): Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. 63, 1035-1042

Regnault-Roger, C.; Ribodeau, M.; Hamraoui, A.; Bateau, I.; Blanchard, P. et al (2004): Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). Journal of Stored Products Research 40, 395-408

Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.R.; Simonic, M.; Knez, Z. (2005): Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry 89, 191-198

Vekiari, S.A.; Oreopoulou, V.; Tzia, C.; Thomopoulos, C.D. (1993): Oregano Flavonoids as Lipid Antioxidants. JAOCS, 70 (5), 483-487

Vieira, R.; Grayer, R.J., Paton, A.J. (2003): Chemical profiling of *Ocimum americanum* using external flavonoids. Phytochemistry 63, 555-567

Watzl, B.; Leitzmann, C. (1999): Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. 2. Aufl., Hippokrates Verlag

Watzl, B.; Rechkemmer G. (2001): Flavonoide. Ernährungsumschau 48 (12), 498-502

Westendorf, J. (1994): Naturstoffe. In: Marquardt, H.; Schäfer, S.G. (Hrsg.). Lehrbuch der Toxikologie. Mannheim Leipzig Wien Zürich: BI-Wiss-Verl 6. Aufl. 650-691

Anlagenverzeichnis

Anlage 1: Ätherische Ölgehalte Züchtungsjahr 2004 – Basilikum und Oregano

Anlage 2: Ätherische Ölgehalte Züchtungsjahr 2005 – Basilikum

Anlage 3: Graphische Darstellung der ätherische Ölgehalte Züchtungsjahr 2005 – Basilikum

Anlage 4: Ätherische Ölgehalte Züchtungsjahr 2005 – Oregano



- Anlage 5: Graphische Darstellung der ätherische Ölgehalte Züchtungsjahr 2005 – Oregano
- Anlage 6: Prozentualer Anteil der Aromakomponenten – Basilikum-Öl (Ernte 2004)
- Anlage 7: Prozentualer Anteil der Aromakomponenten – Basilikum-Pflanzen (Ernte 2004)
- Anlage 8: Prozentualer Anteil der Aromakomponenten – Oregano-Pflanzen (Ernte 2004)
- Anlage 9: Prozentualer Anteil der Aromakomponenten – Oregano-Öl (Ernte 2004)
- Anlage 10: Prozentualer Anteil der Aromakomponenten – Basilikum-Pflanzen (Ernte 2005)
- Anlage 11: Prozentualer Anteil der Aromakomponenten – Basilikum-Öl (Ernte 2005)
- Anlage 12: Prozentualer Anteil der Aromakomponenten – Oregano-Pflanzen (Ernte 2005)
- Anlage 13: Prozentualer Anteil der Aromakomponenten – Oregano-Öl (Ernte 2005)
- Anlage 14: Fettsäuremethylester-Verhältnisse Basilikum-Öle
- Anlage 15: Fettsäuremethylester-Verhältnisse Oregano-Öle