



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Nachweis von Terpenen und deren Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten

Verfasserin:

Jasna Hadžić

Angestrebter akademischer Grad Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im April 2011

Studienkennzahl: A 449

Studienrichtung: Pharmazie

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Mag. Gerhard Buchbauer

Bez vas moj uspjeh ne bi imao smisla...

*Hvala vam, dragi moji roditelji,
za beskrajnu ljubav, motivaciju i podršku svih ovih godina...*

Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Mag. Gerhard Buchbauer , der die Durchführung meiner Diplomarbeit ermöglichte und meine Arbeit fachlich beurteilte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Mag. Dr. Iris Stappen für ihre kompetente und wissenschaftliche Betreuung, für ihre nützlichen Ratschläge und dafür, dass sie mich mit großer Geduld durch die ganze Arbeit begleitet hat.

Abstract

In the overview at hand to a little extent the monoterpenes and sesquiterpenes application have been compiled in reference their demeanor in the body after the oral or dermal application. At the same time the question arises whether their presence in the body can be proved at all. If so, then, to which extent? Do they exist as pure substance in the body or transform they into metabolites? How long do they stay in body? How fast can they be eliminated? These are the questions to be discussed and answered in this work. The most important methods used to prove the presence of and metabolites in body fluids (blood and urine) were shown. The most common method used to prove these substance classes are gas chromatography (GC) and its linking with mass spectrometry (GC-MS), followed by Hight Performance Lipid Chromatographie (HPLC). An important aspect of this work was also sample preparation and extraction method from the complex matrices whereby the method of solid phase micro-extraction had been used as the method of choice in many studies. This work focused on studies that had been conducted on humans and related to mono- and sesquiterpene. Although the essential oils are becoming more widely used and the pharmacokinetics of terpenes gains in importance, there are simply not enough studies on humans that prove the presence of terpenes and their metabolities in blood or urine or determine their concentration at the particular points in time.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Übersichtsarbeit wurden die Publikationen über Monoterpene und in kleinerem Ausmaß die Sesquiterpene auf ihr Verhalten im Körper nach oraler oder dermalen Applikation zusammengefasst. Die Frage stellte sich, ob sie überhaupt im Körper nachgewiesen werden können. Wenn ja, in welchem Ausmaß? Liegen sie als reine Substanz im Körper vor oder werden sie ganz schnell zu Metaboliten? Wie lange verweilen diese im Körper? Wie schnell werden diese ausgeschieden? Diese Fragen wurden in dieser Arbeit behandelt und beantwortet. Die wichtigsten Methoden, die den Nachweis von bestimmten Terpenen und deren Metaboliten in Körperflüssigkeiten (Blut und Harn) ermöglichen, wurden dargestellt. Als die häufigsten Methoden, mit welchen man diese Stoffklasse nachweisen kann, gelten die Gaschromatographie (GC) und ihre Kopplung mit der Massenspektrometrie (GC-MS), gefolgt von der Hochleistungschromatographie (HPLC). Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war auch die Probenvorbereitung und die Extraktionsmethode aus den komplizierten Matrizen, wobei die Festphasenmikroextraktion als Methode der Wahl in vielen Studien gilt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die Studien verwendet, die in vitro oder in vivo am Menschen durchgeführt wurden und die sich auf Mono- und Sesquiterpene beziehen.

Obwohl die Anwendung von ätherischen Ölen immer mehr zunimmt und daher die Pharmakokinetik von Terpenen an Bedeutung gewinnt, gibt es doch noch nicht ausreichend viele Studien am Menschen, die die Terpene und ihre Metaboliten im Blut oder Urin nachweisen beziehungsweise ihre Konzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmen.

INHALTVERZEICHNIS

ABSTRACT	4
ZUSAMMENFASSUNG	5
PROBLEMSTELLUNG	8
1. EINLEITUNG	10
1.1. Terpene	10
1.1.1. Monoterpene	10
1.1.2. Sesquiterpene	10
1.2. Möglichkeiten von Terpenen und Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten	11
1.2.1. Die Chromatographie	11
1.2.2. Gaschromatographie	11
1.2.3. Probevorbereitung und Probenaufgabesysteme bei GC	13
1.2.4. Massenspektrometrie	15
1.2.5. Flüssigchromatographie(HPLC)	16
2. NACHWEIS VON TERPENEN UND DEREN METABOLITEN IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN	19
2.1. Monoterpene.....	19
2.1.1. Campher.....	19
2.1.2. (+)- Carvon	25
2.1.3. (-)-Carvon	30
2.1.4. 1,8 Cineol	33
2.1.5. (-)-Fenchon.....	39
2.1.6. (+)- Limonen	41

2.1.7. Linalool	50
2.1.8. Menthol.....	52
2.1.9. Thujon.....	60
2.1.10. Thymol.....	62
2.1.11. (-)-Verbenon	65
2.2. Sesquiterpene	68
2.2.1. α -(-)-Bisabolol	68
2.2.2. Artemisinin.....	72
3. DISKUSSION	75
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	77
LITERATURVERZEICHNIS	80
CURICULUM VITAE	88

PROBLEMSTELLUNG

Damit man überhaupt über die Wirkung oder mögliche Anwendung einer Substanz sprechen kann, muss diese Substanz nach einer oralen, topischen, intravenösen oder einer anderen Applikationsart zuerst die Blutbahn erreichen, um dort ihre Wirkung zu entfalten. Wenn sich die Substanz im Blut befindet, ist es im weiteren wichtig, wie viel der reinen Substanz tatsächlich im Blut vorliegt, wie viel von der Substanz gleich metabolisiert wird oder wie viel durch den First-Pass-Effekt verloren gegangen ist. In der Pharmakologie und klinischen Pharmazie ist die Pharmakokinetik von Arzneistoffen und ihre Bestimmung im Blut ein wichtiges Thema, weil davon der Einsatz von Medikamenten, die Einstellung der richtigen Dosis und schließlich die Bekämpfung von Krankheiten abhängt.

Da ätherische Öle immer mehr als Zusatz zur Standardtherapie oder als eigenständige Therapie in verschiedenen Bereichen eingesetzt werden, sind diese pharmakokinetischen Fragen und Analysemethoden für die Bestimmung dieser Stoffe in biologischen Flüssigkeiten von Menschen (Blut, Harn, Plasma) von größter Bedeutung. Fragen der Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination (ADME) von ätherischen Ölen bzw. deren Hauptbestandteile von ätherischen Ölen, Monoterpenen und Sesquiterpenen gewinnen immer mehr an Bedeutung. Da die Mono- und Sesquiterpene flüchtig sind, eignet sich am besten die Gaschromatographie (GC) zu ihre Bestimmung. Damit man die richtige Konzentration findet bzw. damit die Konzentration des bestimmenden Mono- oder Sesquiterpens oberhalb der Nachweisgrenze liegt, ist die Optimierung der GC-Analyse notwendig. Optimierung der GC kann vieles bedeuten, wie z.B. Änderung der Temperatur der Säule, des Detektors oder Injektors, Einsatz von verschiedenen Detektoren und Säulen und vieles weitere. In welcher Dosis und Form die Terpene eingenommen werden, ob eine orale oder topische Applikation erfolgt, wie diese im Blut oder Urin des Menschen verarbeitet werden. Das sind alles die Faktoren, die die Konzentration des Terpens oder seiner Metaboliten bestimmen bzw. ändern können. Viele Terpene wie z.B. Menthol werden sehr schnell metabolisiert und liegen gleich als Metaboliten im Blut, was den Einsatz des Menthols als Prodrug

beschleunigt. Wenn man also über eine Wirkung spricht, muss man sich zuerst fragen, ob diese Wirksubstanz überhaupt im Blut oder Harn der Menschen nachgewiesen werden kann, und wenn ja, in welcher Konzentration, und was die optimale Methode dafür ist. In dieser Arbeit wird versucht, an ausgewählten Terpenen die wichtigste Methode zum Nachweis von Terpenen im menschlichen Körperflüssigkeiten darzustellen.

1. EINLEITUNG

1.1. Terpene

Terpene sind chemische Verbindungen, deren Grundkörper eine Isopreneinheit bzw. (2-Methylbutan dien-1,3) darstellt (Abb.1.1).

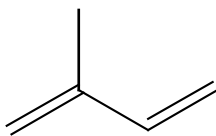


Abb. 1.1 Isopreneinheit¹

In Abhängigkeit von der Isoprenzahl unterscheidet man: Hemiterpene (C₅), Monoterpene (C₁₀), Sesquiterpene (C₁₅), Diterpene (C₂₀), Triterpene (C₃₀), Tetraterpene (C₄₀). C₁₀ und C₁₅ Terpene kommen vor allem in ätherischen Ölen und Harzen vor.

1.1.1. Monoterpene

Die häufigsten Monoterpene sind azyklisch, monozyklisch und bityklisch und sind jeweils aus 2 Isopreneinheiten aufgebaut.

Einige wichtige Beispiele für Monoterpene, die Anwendung in der Pharmaindustrie und Therapie finden und einen wichtigen Punkt der Forschung darstellen, sind: Linalool, Menthol, Limonen, Pinen und Campher.

1.1.2. Sesquiterpene

Sesquiterpene bestehen aus 3 Isopreneinheiten und sind in monozyklische, bityklische und polyzyklische unterteilt. Obwohl 500 Sesquiterpene in Aromen gefunden werden, finden nur 20 Anwendung als Aromastoffe.

¹ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro

Einige Beispiele für Sesquiterpene sind: Farnesol, Bisabolen, Germacran, Caryophyllen (Breitmaier, 2006).

1.2. Möglichkeiten von Terpenen und Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten

Die analytischen Methoden, die sich zur Identifizierung von Terpenen eignen, sind die NMR-Spektroskopie und seltener die Kristallstrukturanalyse. Die Anwendung von Terpenen als potenzielle Wirkstoffe hat die Entwicklung von hoch sensitiven und spezifischen Quantifizierungsmethoden zur Folge. Diese Methoden dienen zur Messung von Terpenen und deren Metaboliten in Körperflüssigkeiten wie Harn und Blut, wobei verschiedene Isolierungs- und Aufarbeitungsmethoden verwendet werden.

Die am häufigsten verwendeten Trennmethoden sind die Gaschromatographie, deren Kombination mit Massenspektrometrie und die Hochleistungsflüssigchromatographie (Chan, 2001).

1.2.1. Die Chromatographie

Die Chromatographie ist eine analytische Trennmethode, mit der man qualitative und quantitative Ergebnisse eines Stoffgemisches erzielen kann. Die Registrierung von einzelnen Analyten erfolgt in Peakform, wobei durch die Peakhöhe die Konzentration eines Stoffes bestimmt werden kann. Das Substanzgemisch wird in dem Trennverfahren immer zwischen einer stationären (Hilfsphase) und einer mobilen Phase verteilt (Gey, 2008).

1.2.2. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) ist eine Trennmethode, bei der sich gasförmige Stoffe oder Stoffe, die unzersetzt in den gasförmigen Zustand übergehen können, zwischen mobile und stationäre Phasen verteilen. Das Trägergas, das die mobile Phase des Trennsystems darstellt, dient dazu, die eingespritzte Probe durch das GC-System zu transportieren, und beeinflusst die

Trennleistung des Trennsystems. Folgende Trägergase kommen zur Anwendung: Wasserstoff, Helium, Stickstoff und Argon; ihre Auswahl ist abhängig vom verwendeten Detektor. Die stationäre Phase stellt die Säule dar, die aus Quarz oder Glas hergestellt ist. In Abhängigkeit davon, ob die Trennsäule Trennflüssigkeit oder eine feste Trennschicht als stationäre Phase enthält, unterscheidet man Verteilungs- oder Adsorptionschromatographie.

Die wichtigsten Bestandteile eines Gaschromatogramms sind: Gasanschluss, Druckregler, Injektor, Trennsäule, Detektor und Aufzeichnungsgerät (Abb.2.2).

Die durch den Injektor eingebrachte Probe wird mithilfe des Trägergases in die Säule transportiert, und zwar werden in Abhängigkeit von der Art der stationären Phase, der Länge der Säule, des Durchmessers der Säule, der Temperatur, sowie der Art und Geschwindigkeit des Trägergases unterschiedliche Retentionszeiten erreicht. Die Substanz erreicht dann den Detektor, der die Signale, die proportional zu der Stoffmasse oder Stoffkonzentration sind, registriert. Die häufigsten Detektoren sind: Flammenionisations-, Wärmeleitfähigkeits- und Massenspektrometrischer Detektor (Gey, 2008).

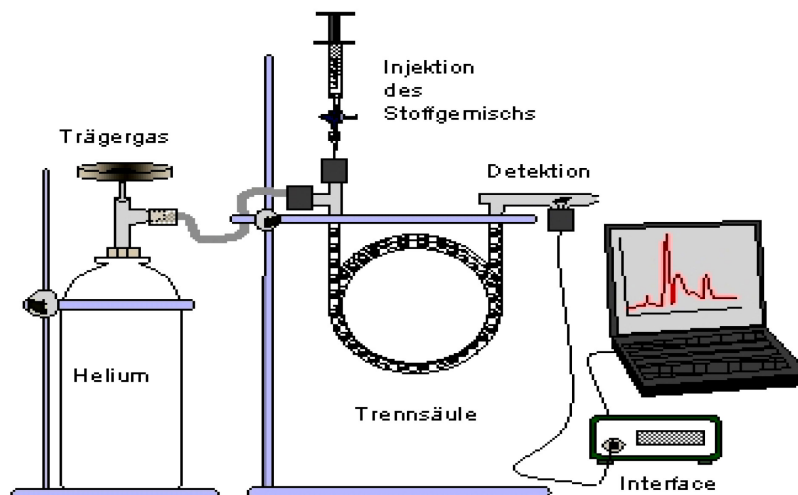


Abb. 1.2 Aufbau eines Gaschromatographen²

1.2.3. Probenvorbereitung und Probenaufgabesysteme bei GC

Die Hauptziele der Probenvorbereitung sind die Isolierung und Aufkonzentrierung von Komponenten aus komplexer Matrix und Entfernung der Verunreinigungen. Das ganze System der Probenvorbereitung hat großen Einfluss auf die Ergebnisse der GC oder anderer analytischen Methoden (Kataoka, 2005). Das Probenaufgabesystem ist ein ganz wichtiger Punkt für die Qualität eines Chromatogramms, denn wenn die Dosierung der Probe am Anfang nicht stimmt, kann trotz des guten Detektors keine gute Qualität des Chromatogramms erreicht werden. Die wichtigsten Probenaufgabesysteme sind: Split-Injektion, Splitlose Injektion-Totalaufgabe, Head Space Technik (Dampfphaseanalyse) und Solid Phase Micro Extraktion- (Festphasenmikroextraktion) (Hübschmann, 2009).

Split-Injektion

Durch den Injektor gelangt die Probe in den Verdampfungsraum, verdampft durch hohe Temperaturen und gelangt mittels Trägergas in die Säule. Die

² Siehe (<http://www.schule-bw.de/unterricht/faecher/chemie/material/unter/trenn/gc.html>)

Probe teilt sich bei der Probenaufgabe in zwei Teile, der größere Teil wird verworfen und der kleinere Teil gelangt auf die Säule, häufig in einem Splitverhältnis 1:10 bis 1:100. Um das zu ermöglichen, wird das Splitventil während der Probenaufgabe geöffnet. Das Ganze ermöglicht eine Anpassung von konzentrierten Proben an Säulen und Detektoren.

Totalaufgabe-Splitlose Injektion

Durch die splitlose Injektion gelangt die gesamte verdampfte Probe auf die Säule. Für diesen Injektor sind besondere Insert-Liner (Verdampferrohre) notwendig, damit einerseits die Kontamination bei zu kleinen Inserts, andererseits Verluste der Probe bei zu langen Inserts vermieden werden. Um die Bandverbreiterung zu verhindern, ist es eine Regel, die Säulenofen-Temperatur 10-15 °C unterhalb des Siedepunktes des verwendeten Lösungsmittels zu halten (Hübschmann, 2009).

Head Space Technik (Dampfraumanalyse)

Die Head Space Technik ist vor allem für jene Substanzen geeignet, die neben flüchtigen auch nichtflüchtige Stoffe enthalten. Das Ziel der Methode liegt darin, die flüchtigen Stoffe zu extrahieren. Die Probe wird in einem bestimmten Gefäß erwärmt, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Gas und fester oder flüssiger Phase eingestellt hat. Sobald ein Gleichgewicht besteht, werden die in der gasförmigen Phase befindliche Analyten mit einer Kanüle in den GC überführt und analysiert (Gey, 2008).

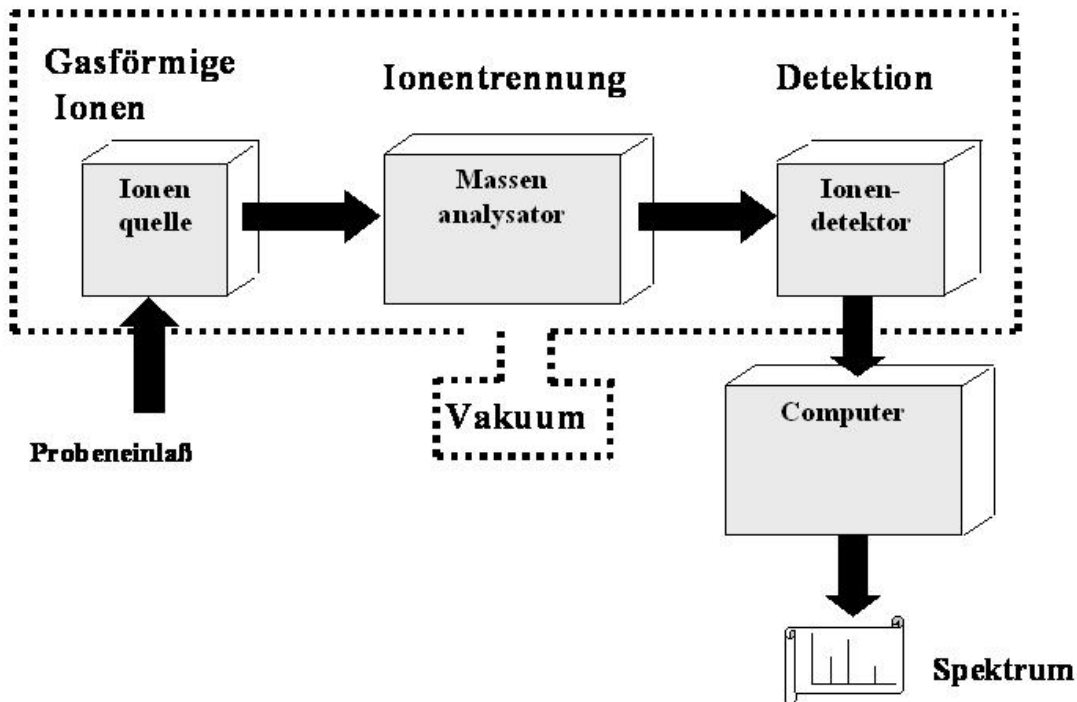
Solid Phase Micro Extraction-Festphasenmikroextraktion (SPME)

Die Festphasenmikroextraktion (SPME) ist eine lösungsmittelfreie Extraktionstechnik, die die Gewinnung von Analyten aus flüssigen, festen oder gasförmigen Matrices ermöglicht. Bei der Technik werden die Analyten auf „Fused Silica“ Fasern, die mit geeigneten stationären Phasen beschichtet sind, bis zur Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei Phasen angereichert, und dann werden die Analyten im Injektor thermisch desorbiert und im GC oder eventuell HPLC analysiert. Diese Methode bietet eine Menge von Vorteilen. Es sind nur ein kleines Probenvolumen und keine organischen Lösungsmittel notwendig, was sowohl viel Geld erspart als auch die Umweltbelastung

verringert. Die mögliche Automatisierung der Methode erspart Zeit und Kosten (Hübschmann, 2009).

1.2.4. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein Verfahren, bei dem die Molekülonen bzw. Fragmente entstehen, die dann im entsprechenden Analysator nach ihrem Masse/Ladung - Verhältnis (m/z) aufgetrennt werden. Die häufig eingesetzte Kupplungsmethode GC-MS ist eine von drei Möglichkeiten, die Probe in gasförmigem Zustand in das Einlasssystem einzubringen. Wie aus einem Molekül ein Ion entstehen wird und welche Ionisierungsmethode verwendet wird, hängt vom Analyt ab und davon, wie schonend er analysiert werden soll. Man unterscheidet mehrere Methoden: Elektronenstossionisation, Chemische Ionisation, Feldionisation und Photoionisation. Die entstandenen Ionen werden in einem der drei Analysatoren Magnetfeld-Sektorfeldgerät, Quadrupolmassenspektrometer und Flugzeitspektrometer nach m/z Verhältnis aufgetrennt, und zwar mit dem Ziel, die minimalen Massen unterscheiden zu können. Nach der Auftrennung werden die Ionenströme in ein auswertbares Signal umgewandelt. Schematischer Aufbau und Funktionsweise der MS ist aus Abb.2.3 ersichtlich (Otto 2006,; Schwedt, 2007). Die GC-MS-Chromatographie stellt die am weitesten verbreitete Methode zur Untersuchung von Metabolismus und Quantifizierung von verschiedenen Substanzen dar, da sie hohe chromatographische Auflösung, hohe Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit bietet. Die häufigsten biologischen Matrizen, die die Analyse von Metaboliten, Interaktionen zwischen Metaboliten und alle andere Änderungen ermöglichen, sind Blut und Harn (Kishore et al., 2008).

Abb. 1.3 Aufbau eines Massenspektrometers³

1.2.5. Flüssigchromatographie(HPLC)

Grundlage der Flüssigchromatographie stellt die flüssige mobile Phase dar, die durch die auf einer Säule aufgebrachte flüssige oder feste stationäre Phase fließt und die Analyte unterschiedlich schnell mitnimmt. Mit der Verkleinerung der Korngröße des Trägermaterials auf 3-10 µm, mit der Verringerung der Säulenlänge auf 5-30 cm und mit dem damit einhergehenden Einsatz von höherem Druck bis zu 15MPa hat sich aus der klassischen Flüssigchromatographie die HPLC entwickelt. Das ermöglicht eine viel schnellere und bessere Trennung von Stoffen. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bzw. Hochleistungsflüssigchromatographie stellt eine sehr leistungsfähige chromatographische Methode dar. Im Unterschied zu GC kann man mit dieser Methode neben den flüchtigen Stoffen auch nicht flüchtige Substanzen identifizieren und quantifizieren. Die Quantifizierung verläuft analog zur GC, was heißt, dass die Fläche unter den Peaks proportional zu der Konzentration des Stoffes ist. Von vier Möglichkeiten zur Trennung von Stoffen

³ Siehe (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/proteomics/neueseite.html>)

(Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch und Ausschluss) ist die Verteilungsmethode die am häufigsten eingesetzt. Dabei kann man zwischen Normal- und Umkehrphasenchromatographie unterscheiden.

Polare stationäre und unpolare mobile Phasen beschreiben die Normalphasen-Chromatographie, werden die Phasen vertauscht spricht man von Umkehrphasen-Chromatographie.

Die wichtigsten Bestandteile der HPLC sind aus Abb. 1.4 gut ersichtlich.

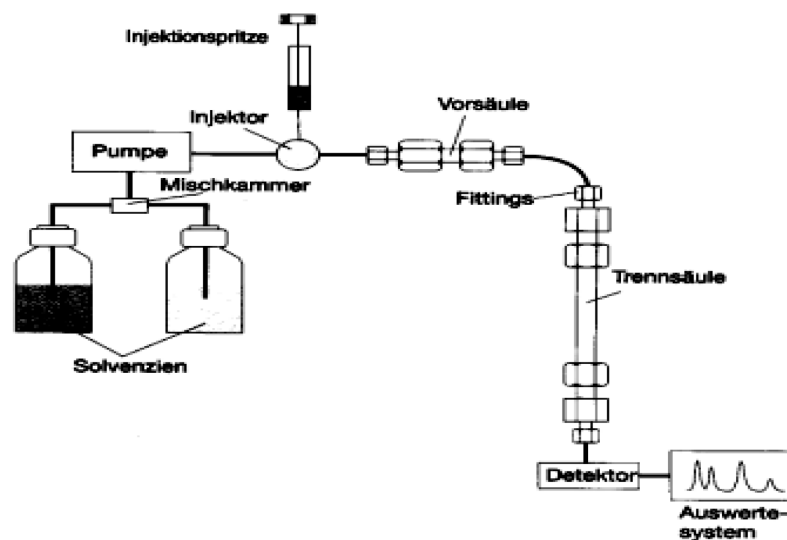


Abb. 1.4 Aufbau einer HPLC-Anlage⁴

Bei dem Lösungsmittel, das die mobile Phase darstellt, unterscheidet man isokratische, wobei nur ein Lösungsmittel während der Messung verwendet wird, und Gradientenelution, wobei man die Polarität des Lösungsmittels ändert um eine bessere Trennung zu erreichen. Damit das Elutionsmittel konstant durchfließen kann und der Proben-transport ermöglicht wird, sind Hochdruckpumpen notwendig (Longhub- und Kurzhubkolbenpumpen). Die Probe wird zuerst drucklos in die Dosierschleife injiziert, dann wird mithilfe des Sechs-Wege-Ventils zuerst der Eluent in die Säule befördert. Erst dann wird durch Umschalten des Ventils die Probe mithilfe des Eluenten in die Säule transportiert. Nach dem Transport durch die Säule erreicht die Probe den Detektor, wo man Qualität und Quantität bestimmen kann. Diese Bestimmung ist aber nur unter Verwendung eines internen oder externen Standards möglich

⁴ (Otto, 2006)

bzw. unter Verwendung einer Substanz mit bekannter Konzentration, die man entweder vor der Probe oder gemeinsam mit der Probe eluieren lässt.

Die Detektoren, die zum Einsatz kommen können, sind folgende: Photometrische Detektoren, (Retentionsindex)-RI-Detektor, Photodiodenarray Detektor, Amerometrische Detektoren und Chemischer Reaktionsdetektor (Otto, 2006; Schwedt, 2007).

2. NACHWEIS VON TERPENEN UND DEREN METABOLITEN IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN

2.1. Monoterpene

2.1.1. Campher

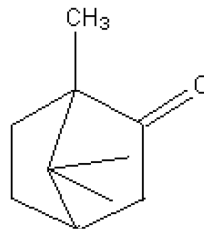


Abb. 2.1 (-)-Campher⁵

Vorkommen:

Campher ist ein bizyklisches Terpen-Keton und ist in der größten Menge in *Cinnamomum Campora* L. (Lauraceae) enthalten (Abb.3.2.).



Abb. 2.2 *Cinnamomum Camphora* L. (Lauraceae)⁶

⁵ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro

⁶ Siehe (<http://www.feenkraut.de/herbs/Kampher.html>)

Wirkung und Anwendung:

Campher hat eine lokalanästhetische und analgetische Wirkung. Die Anwendung des Camphers sollte maximal viermal täglich erfolgen, weil es sonst zu Reizungen der Haut kommen kann. Bei folgenden Indikationen kann Campher angewendet werden: Myalgie, Neuralgie und rheumatischen Schmerzen (Hänsel et al., 2010). Nach der Verwendung der campherhaltigen „Korodin“-Herz-Kreislauf-Tropfen wurde bei Hyopotonie-Probanden blutdruckerhöhende Wirkung sowie Verbesserung der kognitiven Leistung und Aufmerksamkeit festgestellt (Schandry et al., 2008).

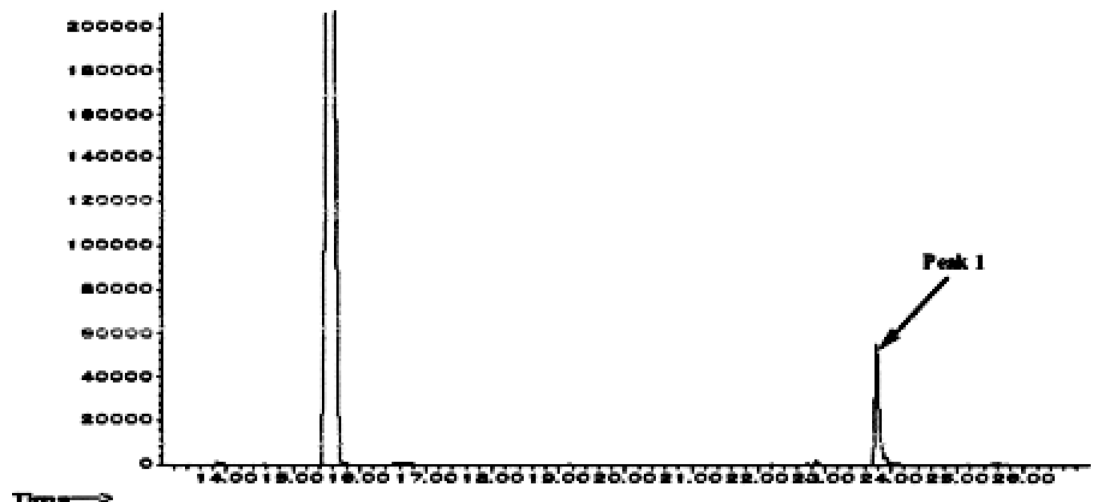
Nachweis von (-)- Campher

Cytochrom P450 ist für die Biotransformation von Stoffen beziehungsweise für die Hydroxylierung von hydrophoben Substanzen verantwortlich, um diese polarer zu machen. In der Studie von Gyoubu et al. (Gyobu et al., 2007) wird die Frage gestellt, wie Campher polarer wird und wie seine Metaboliten geprüft und identifiziert werden können.

Die Metabolisierung wird durch Cytochrom (CYP) P450 in den menschlichen Lebermikrosomen ermöglicht. Die Reaktionsmischung aus menschlichen Lebermikrosomen oder rekombinanten P450-Enzymen und Kaliumphosphat, die das NADPH-System beinhaltet, wurde mit in Methanol gelöstem Campher versetzt und inkubiert. Die Inkubation wurde bei 37 °C durchgeführt und dauerte 30 min. Nach der abschließenden Zugabe von Dichlormethan wurde die Mischung zentrifugiert, womit die organische Phase für die GC-MS-Analyse bereit war. Die Analyse erfolgte mit einem Hewlett-Packard 5890 A Gaschromatograph, der einen Splitinjektor hatte und mit einem Hewlett-Packard 5972 Massenspektrometer gekoppelt war. Während die Säulentemperatur von 65 °C auf 240 °C mit einer Erhöhungsrate von 4 °C erhöht wurde, wurde die Injektortemperatur konstant auf 240°C gehalten. Die Temperatur des Detektors betrug 280 °C.

Ergebnisse:

Nach der GC-MS-Analyse wurde 5-exo-Hydroxycampher als Hauptmetabolit festgestellt. Die Retentionszeit des Metaboliten war 23.8 Min (Abb. 2.3).

Abb. 2.3 GC Chromatogramm von Campher Metaboliten im Menschen⁷

Die Konzentration des Metaboliten 5-exo-Hydroxycampher steigt mit der Inkubationszeit. Von den 11 getesteten P-450-Enzymen spielt nur Cyp2A6 eine wichtige Rolle bei der Hydroxylierung des Camphers. Die pharmakokinetische Parameter-Michaeliskonstante (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) für die Metabolitenbildung durch die Cyp2A6- Werte betrugen 23 mM, und 4.9 nmol/min/nmol P450. Da in anderen Spezies weitere Metaboliten nachgewiesen werden konnten und bei Menschen nur 5-exo-Hydroxycampher, wurde ein spezies-spezifischer Unterschied in der Metabolisierung angenommen (Gyoubu et al., 2007).

Obwohl Campher ein breites Anwendungsgebiet hat, findet man kaum Studien über seine Pharmakokinetik und systemische Bioverfügbarkeit nach dermalen Applikation.

Deswegen hatte die Studie von Martin et al. (Martin et al., 2004) das Ziel, die systemische Absorption, Distribution von Campher und den Einfluss der Dosis auf das Konzentrationszeitprofil nach einer dermalen Applikation in Pflasterform zu untersuchen. Die Plasmaproben wurden durch selektive und sensitive GC-MS mit einem Flammenionisationsdetektor analysiert. An der Studie nahmen 24 Probanden teil, die abhängig von der Dosis und Anzahl der applizierten Pflaster in drei Gruppen eingeteilt waren. Alle drei Gruppen erhielten gleiche Pflaster mit

⁷ (Gyoubu et al., 2007)

einer Menge von 46.80 mg Campher, wobei die erste Gruppe nur zwei, die zweite vier und die dritte acht Pflaster bekam. Die Pflaster blieben acht Stunden lang auf der Haut kleben. Den Probanden wurde nach 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 und nach 24 Stunden Blut entnommen, mit Natrium-Heparin versetzt und zentrifugiert, um Plasma zu erhalten, das auf -12°C bis zur Analyse aufbewahrt wurde. Die untere Nachweisgrenze war 1 ng/mL und die Quantifizierungsgrenze war 5 ng/mL.

Ergebnisse:

Die 2-Pflaster-Gruppe zeigte eine kleine Plasmakonzentration, die unter der Quantifizierungsgrenze lag und nach 8-12 Stunden überhaupt keinen Campher mehr aufwies. Die mittlere Maximal-Plasmakonzentration ($C_{\max}$) betrug 13.5 ± 4.8 ng/mL. In der 4- und 8-Pflastergruppe ergaben sich die messbaren Werte von 26.8 ± 7.2 ng/mL und 41.0 ± 5.8 ng/mL. Einerseits ergab die Anwendung von 2 Pflastern sehr kleine Werte nahe der Quantifizierungsgrenze, andererseits ergab die Anwendung von 4 oder 8 Pflastern zwar bessere Werte, ist aber ungewöhnlich und unmöglich in der Praxis. Eine Akkumulation von der Substanz im Körper ist jedoch eigentlich schwer möglich, sogar bei der Anwendung mehrmals täglich und bei größerer Pflasterzahl, und zwar wegen der kurzen Halbwertszeit (Martin et al., 2004).

Das Campherderivat 3-(4-Methylbenzyliden)-Campher (4-MBC) stellt ein wichtiges Thema in mehreren Studien über mögliche schädliche Nebenwirkungen für den Menschen bei seiner Verwendung in kosmetischen Präparaten als UV-Filter dar. Es hat sich in mehreren Studien an Ratten gezeigt, dass diese Verbindung eine kleine Affinität zu den Estrogenrezeptoren Alpha und Beta hat (Durrer et al., 2005 ; Henever et al., 2005)

Aus diesem Grund wurde in der Studie von Schauer und seinen Mitarbeitern (Schauer et al., 2006) die Pharmakokinetik und Toxikokinetik von 4-MBC nach dermalen Applikation am Menschen untersucht. An drei weiblichen und drei männlichen Probanden wurden 4% einer 4-MBC (22mg/kg KG) - Zubereitung aufgetragen und die resultierende Plasmakonzentration und renale Exkretion gemessen. Zur Quantifizierung verwendete man Plasma und Urin, die resultierende Methode der Quantifizierung war die Liquidchromatographie/-

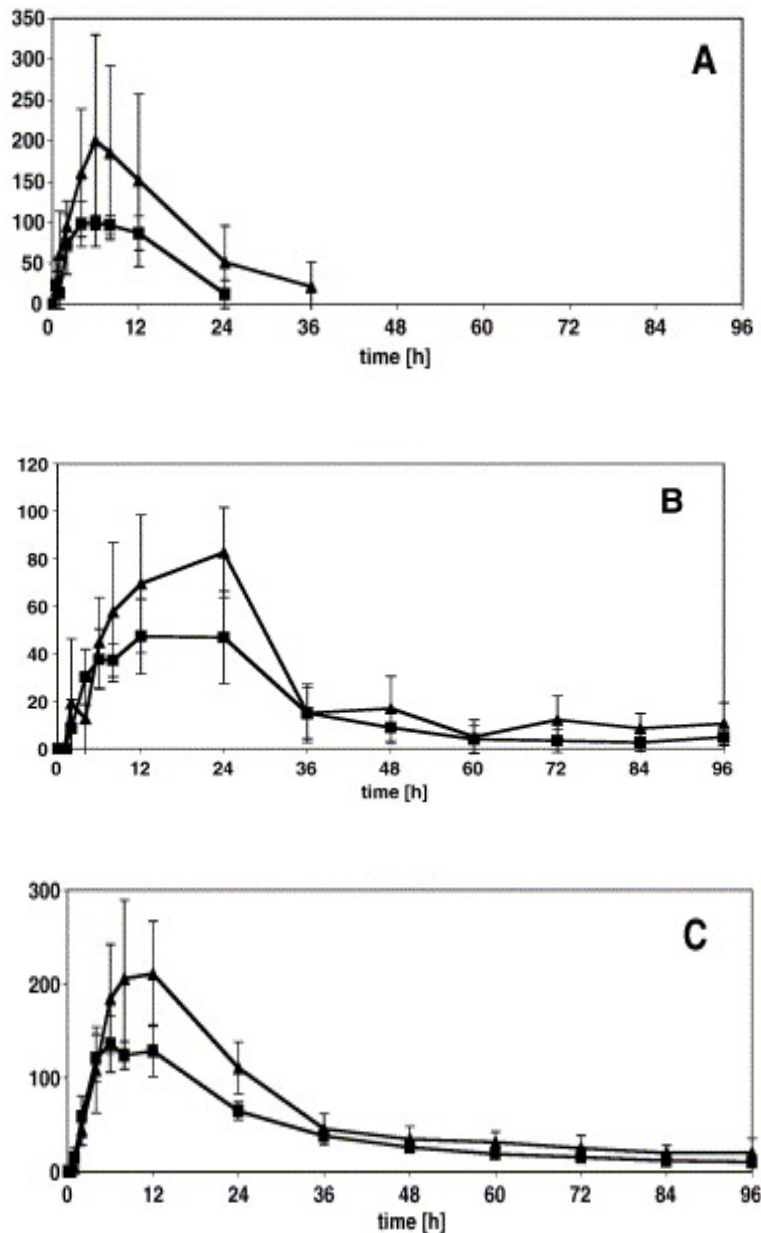
Massenspektrometrie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) mit Elektronensprayionisation (ESI) und mit der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). Um die Metaboliten mittels LC-MS/MS-ESI zu quantifizieren, wurden verdünnte Proben auf einer Reprosil Pur ODS3 HPLC-Säule getrennt. Die Trennung erfolgte durch Gradientenelution mit Wasser (Lösungsmittel A) und Acetonitril (Lösungsmittel B), und zwar im Verhältnis 87.5 % A und 12.5% B. Die Elution verläuft isokratisch für 2 Minuten. Innerhalb von 6 Minuten steigt die Lösung B um 70 % und bleibt für die nächsten 8 Minuten konstant.

Um die Metaboliten mittels LC-MS/MS- APCI zu quantifizieren, wurden die Proben mit denselben Lösungsmitteln A und B eluiert, aber in unterschiedlichem Verhältnis, und zwar 10% A und 90 % B, isokratisch für 7 Minuten mit einer Flussrate von 300 µl/min. 4-MBC war bei einer Verdampfertemperatur von 400 °C detektiert.

Ergebnisse:

Es wurde ein geschlechts- sowie ein applikationsartspezifischer Unterschied in Bezug auf die nachgewiesene Konzentration von 4-MBC festgestellt

Die maximale Plasmakonzentration ($C_{\max}$) und die Bioverfügbarkeit war bei männlichen Probanden zweimal höher als bei weiblichen, sowohl für 4-MBC als auch für zwei festgelegte Metaboliten: 3-(4-Carboxybenzyliden)-6-Hydroxycampher und 3-(4-Carboxybenzyliden) Campher. Die maximale Plasmakonzentration betrug 50-80 pmol/ml für 3-(4-Carboxybenzylidene)-6-Hydroxycampher und für 3-(4-Carboxybenzyliden) Campher 100–200 pmol/ml, also eine zweimal höhere Konzentration. Die 4-MBC-Konzentration im Blut war sechs Stunden nach dermalen Applikation erreicht und betrug 200 pmol/ml für männliche und 100 pmol/ml für weibliche Probanden (Abb.3.5, A-C) (Schauer et al., 2006).



Symbole: (▲) - Männer (■) - Frauen

A-Plasmakonzentration- Zeit Verlauf bei Männern ($T_{1/2}$:9h), mangelnde Daten für Frauen

B-Plasmakonzentration-Zeit Verlauf bei Männern ($T_{1/2}$: 31h) und Frauen ($T_{1/2}$:20h)

C-Plasmakonzentration- Zeit Verlauf bei Männern ($T_{1/2}$:26h) und Frauen ($T_{1/2}$:23h) (Schauer et al., 2006).

Abb. 2.4 Konzentration-Zeit Verlauf von 4MBC nach dermalen Applikation von 4% Zubereitung⁸

⁸ (Schauer et al., 2006)

2.1.2. (+)- Carvon

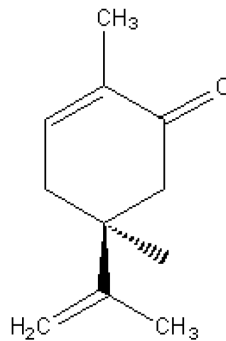


Abb. 2.5 (+)-Carvon⁹

Vorkommen:

(+) - Carvon ist ein monozyklisches Monoterpen-Keton, das in in der größte Menge in *Carum Carvi* L. (Apiaceae) vorkommt (Jäger et al., 1999) (Abb.2.7).



Abb. 2.6 *Carum Carvi* L. (Apiaceae)¹⁰

Wirkung und Anwendung:

(+)-Carvon wird als Geschmacksverstärker in der Nahrungsmittelindustrie und in kleineren Mengen als Stomachikum und Karminativum in der Pharmaindustrie verwendet. In Kombination mit anderen ätherischen Ölen werden sowohl (+)-Carvon als auch (-)-Carvon als Aromatherapiemassage für Nervenspannungen und Hautkrankheiten angewendet (Jäger et al., 2001).

Nachweis von (+)- Carvon:

⁹ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro

¹⁰ Siehe (http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/Caru_car.html)

Eine Untersuchung von Jäger und Mitarbeitern (Jäger et al., 2000) befasst sich mit dem Metabolismus von (-)-und(+)-Carvon *in vitro*. Die entstandenen Metaboliten werden mittels GC analysiert. Durch die getrennte Inkubation von (-)-und(+)-Carvon mit menschlichen Lebermikrosomen und in Anwesenheit von NADPH (Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat) wurden die Metaboliten 4R,6S-(-)-Carveol und 4S,6S-(+)-Carveol gebildet. In der zweiten Phase der Metabolisierung, die mithilfe des UDPGA (uridine S-diphosphogluaronic acid) abläuft, wurde nur 4R,6S-(-)-Carveol glucuronidiert. Der Nachweis von diesen Metaboliten erfolgte mittels GC unter Verwendung von den beiden Isomeren R- und S- Piperiton als internem Standard. Für die chirale Trennung von (-)-und (+)-Carvon wurde der Carlo- Erba HRCG 5160 Mega Series mit einem Flammenionisationsdetektor verwendet. Die Proben wurden mit einer Splitinjektion auf die Säule eingespritzt, bei einer Temperatur von 200 °C mit einem Injektionsvolumen von 1,5 µL. Die Ofentemperatur wurde isothermal bei 90 °C gehalten.

Ergebnisse:

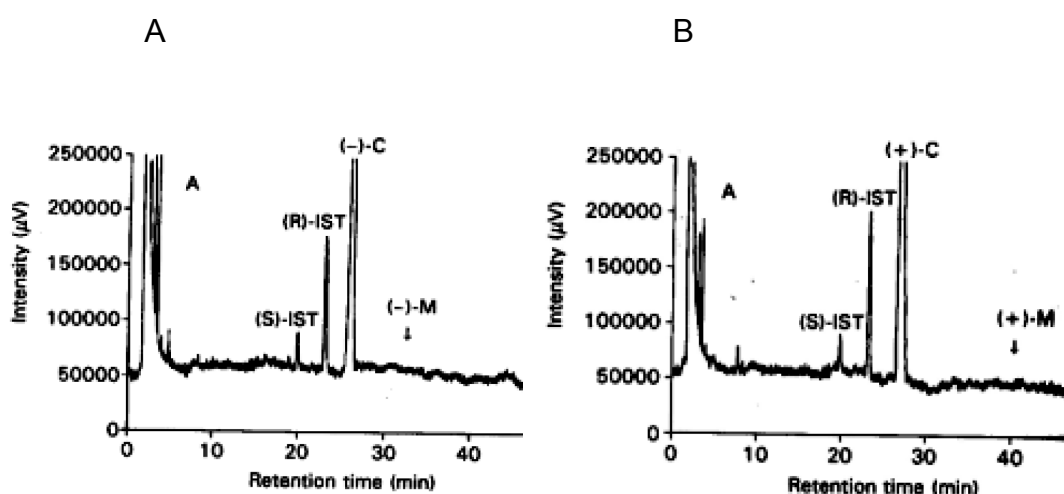


Abb. 2.7 GC-Chromatogramm von (-)-Carvon (A) und (+)-Carvon (B) nach Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen¹¹

Aus den Chromatogrammen in Abb. 2.8 (A) und 2.8(B) sind die (+)-und(-)-Carvon Peaks vor NADPH- Zugabe abzulesen. Die Metabolitenidentifizierung erfolgte mittels GC-MS. Die Massenspektren von diesen zwei Carvon-

¹¹ (Jäger et al., 2000)

Stereoisomeren waren nicht gleich, zB. kommt das M^+ -Ion bei m/z 151 nur beim (-)-Carvon vor.

Die Abbildungen 2.9 (A) und 2.9 (B) sind ein Nachweis für die Bildung von Carvon- Metaboliten nach Inkubation mit NADPH. 4R,6S-(-)-Carveol wird bei einer Retentionszeit von 32.27 Min. als ein Metabolit des (-)- Carvons und 4S,6S-(+)-Carveol, bei einer Retentionszeit von 40.95 Min als Metabolit des (+)-Carvons gebildet. Allerdings war die Bildung von diesen Metaboliten unter der Nachweisgrenze. Die zweite Phase des Metabolismus in Anwesenheit von UDPGA (uridin 5“-diphosphoglucuronicacid) zeigte, dass nur 4R,6S-(-)-Carveol glucuronidert war (Jäger et al., 2000).

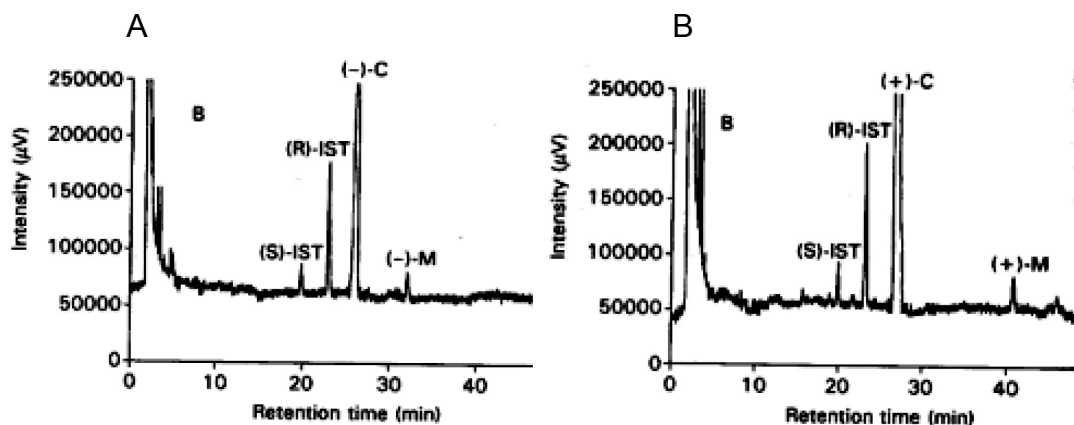


Abb. 2.8 GC-Chromatogramm von 4R,6S-(-)-Carveol (A) und 4S,6S-(+)-Carveol (B), nach Inkubation von (-)-Carvon und -(+)-Carvon mit NADPH¹²

Die pharmakokinetische Parameter waren bei der metabolischen Umsetzung von (-)- Carvon und (+)- Carvon auch unterschiedlich. K_m war beim 4R,6S-(-)-Carveol signifikant kleiner als beim 4S,6S-(+)-Carveol und v_{max} war deutlich höher bei Menschen als bei derselben Untersuchung an Ratten. Die Autoren kamen zum Schluss, dass der Metabolismus von Carvon von der Stereoselektivität und der Spezies abhängig ist (Jäger et al., 2000).

Ein Jahr später beschäftigten sich Jäger und seine Mitarbeiter wieder mit derselben Untersuchung von Carvon, aber diesmal an vier gesunden Probanden. Den Probanden wurden 300mg von (-)-Carvon oder (+)-Carvon auf den Unterbauch aufgetragen. Blutproben wurden in bestimmten Zeitintervallen

¹² (Jäger et al., 2000)

von den Patienten entnommen und zentrifugiert um Plasma zu erhalten. Urinproben wurden in längeren Zeitintervallen gesammelt und bei -21°C bis zur Analyse gelagert. Um die Glucuronide nachweisen zu können, wurden Urin und Plasma mit Beta-Glucuronidase inkubiert, danach zentrifugiert und extrahiert. Die analytische Methode zur Analyse von Blut- und Urinproben war GC. Für die chirale Trennung von (-)- und (+)- Carvon wurde wieder der Carlo- Erba HRCG 5160 Mega Series mit einem Flammenionisationsdetektor verwendet. Trägergas war Helium mit einer Flussrate von 0.5 ml/Min.^{-1} . Die Proben wurden mit dem Splitinjektor injiziert, mit einer Injektionstemperatur von 200°C und einem Injektionsvolumen von $1.5 \mu\text{L}$. Die Ofentemperatur war 90°C .

Ergebnisse:

Die Plasmakonzentration nach tropischer Applikation 300mg des (-)-oder(+)-Carvons wird in Abb.2.10 gezeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass beide Enantiomeren schon nach zehn Minuten im Blut nachweisbar sind. Zu jedem Zeitpunkt der Messung ist die (+)-Carvon-Konzentration deutlich höher als die (-)-Carvon Konzentration. Deutlich höhere C_{max} , dreimal höhere AUC Werte, höhere Elimination und ähnliche Halbwertszeit ($T_{1/2}$) sind die Eigenschaften, die (+)-Carvon im Vergleich mit (-)-Carvon beschreiben.

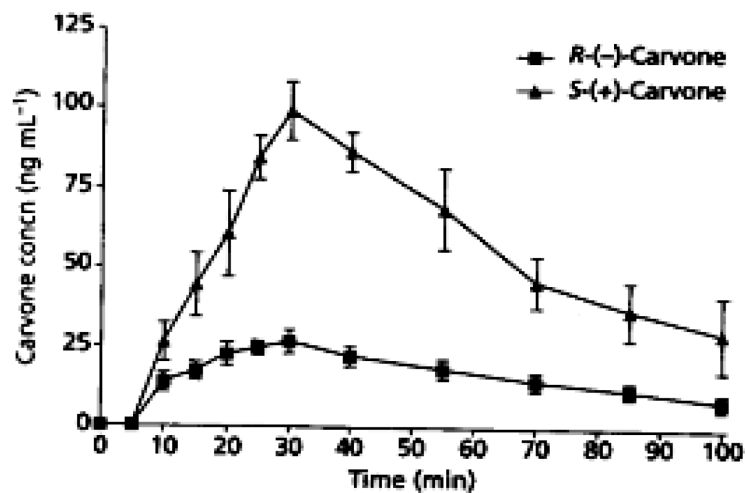
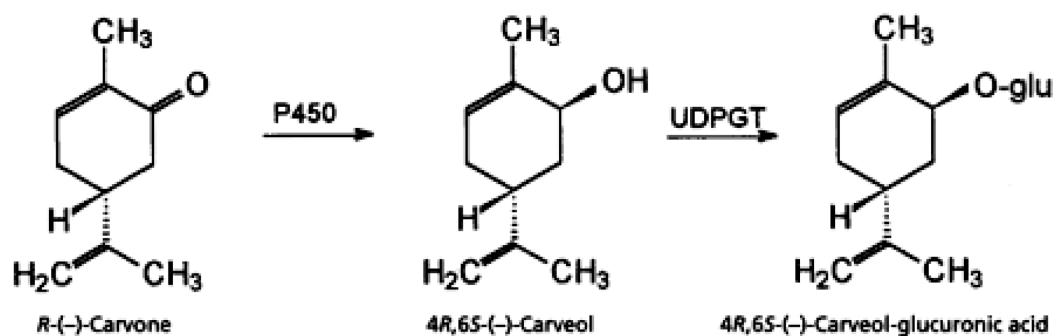


Abb. 2.9 Plasmakonzentration von (-)-Carvon oder (+)-Carvon nach einer topischen Applikation von 300 mg Carvons¹³

Die Biotransformationsprodukte von Carvon lagen im Plasma unter der Nachweisgrenze vor. Die *in vitro* gebildeten Metaboliten 4S,6S-(+)-Carveol, 4R,6S-(-)-Carveol konnten überraschenderweise *in vivo* nicht gefunden werden.

Die Urinanalyse zeigte die Bildung der Metaboliten 4R,6S-(-)-Carveol und dessen Glucuronidierung unter der Bildung von 4R,6S-(-)-Carveol-Glucuronid.

Der Nachweis von 4S, 6S-(+)-Carveol und den Glucuronid-Metaboliten blieb unter der Nachweisgrenze (Abb.2.11).



¹³ (Jäger et al., 2001)

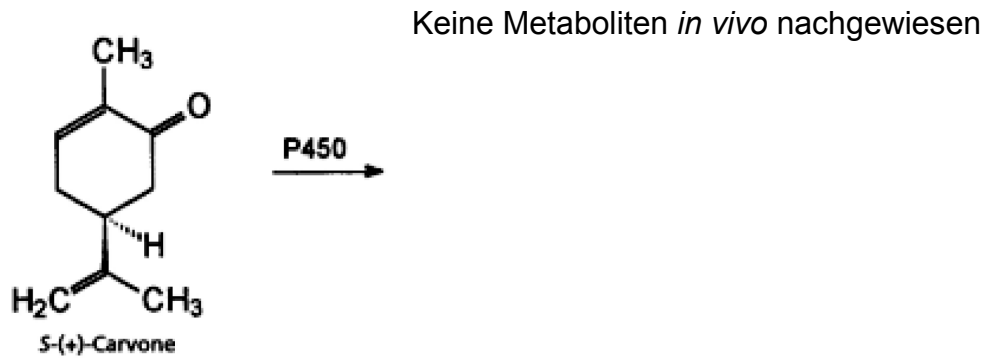


Abb. 2.10 Die Bildung von von R-(-)-beziehungsweise (+)-Carvon Metaboliten abhängig von der Stereoselektivität¹⁴

Die Studie beweist, dass die Stereoselektivität sehr wohl einen Einfluss auf die Pharmakokinetik des Carvons hat (Jäger et al., 2001).

2.1.3. (-)-Carvon

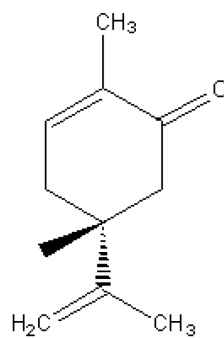


Abb. 2.11 (-)-Carvon¹⁵

Vorkommen:

(-)-Carvon ist ein monozyklisches Monoterpen-Keton mit charakteristischem minzeartigem Geruch. Der Geruch alleine weist darauf hin, dass er in der größten Menge in *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) vorkommt (Schönfelder, 2001) (Abb.2.13).

¹⁴ (Jäger et al., 2001)

¹⁵ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro



Abb. 2.12 *Mentha Spicata* L. (Lamiaceae)¹⁶

Wirkung und Anwendung:

Das ätherische Öl wird hauptsächlich als ein krampflösendes, blähungstreibendes und appetitanregendes Mittel bei Verdauungsstörungen, aber auch als Inhalationsmittel bei Erkältungskrankheiten eingesetzt. Als Einreibungen und Massagen findet *Mentha spicata* Anwendung bei Nervenspannungen und Hautkrankheiten.

Wegen seines charakteristischen spearmintartigen Geruchs und Geschmacks wird das ätherische Öl auch in der Kosmetikindustrie bei der Herstellung von Kaugummi, Mundwässern und Zahnpasta verwendet, um ein besseres Aroma zu erreichen (Fuchs et al., 1997; Ingrid et al., 2001).

Nachweis von (-)- Carvon :

Um perkutane Absorption und die Quantifizierung des Carvons zu untersuchen, haben Fuchs und Mitarbeiter (Fuchs et al., 1997) an einer weiblichen Probandin drei verschiedene Massagetypen vorgenommen. Jede dieser drei Massagen (normale, Okklusions- und Irradiationsmassage) wurde dreimal durchgeführt.

Beginnend fünf Minuten und endend 100 Minuten nach der Massage wurde der Probandin Blut entnommen, in heparinisierte Tubes gegeben und zentrifugiert. Nach einer Festphasenextraktion erfolgte mithilfe des Piperitons als internem Standard die GC bzw. GC-MS- Analyse der Probe.

¹⁶ (Schönfelder, 2001)

Für die GC-Analyse wurden die Proben mit dem Splitinjektor injiziert, der eine Injektortemperatur von 260°C hatte, und mit dem Flammenionisationsdetektor detektiert, der eine Temperatur von 200 °C aufwies. Trägergas war Stickstoff und die Quantifizierungsgrenze betrug 5 +/-1.23 ng/ml.

Für die GC-MS- Analyse wurden die Proben mit splitloser Injektion mit einer Temperatur von 250 °C injiziert, einer Säulentemperatur von 60 °C für zwei Minuten und einer Erhöhungsrate von 3 °C, bis die Temperatur von 250 °C erreicht wurde. Trägergas war Helium mit einer Flussrate von 1ml/Min.

Ergebnisse:

Die Quantifizierung und Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter wie $T_{1/2}$, AUC, und C_{max} erfolgte mittels der GC-Flammenionisationsdetektor (FID). Die Ergebnisse wurden noch durch die GC-MS von (-)-Carvon (m/z bei: 82, 93, 108, und 150) bestätigt. Es erfolgte eine rasche perkutane Absorption bereits nach zehn Minuten, wobei die C_{max} des Carvons nach eine halbe Stunde nachgewiesen wurde. Die Okklusionsmassage zeigte deutlich höhere Werte für die Carvon Eliminationshalbwertszeit und C_{max} im Vergleich mit normaler und Irradiationsmassage (Abb.3.14). Andererseits zeigte die Konstante der Absorptionsrate keinen signifikanten Unterschied bei drei unterschiedlichen Massagetypen (Fuchs et al., 1997).

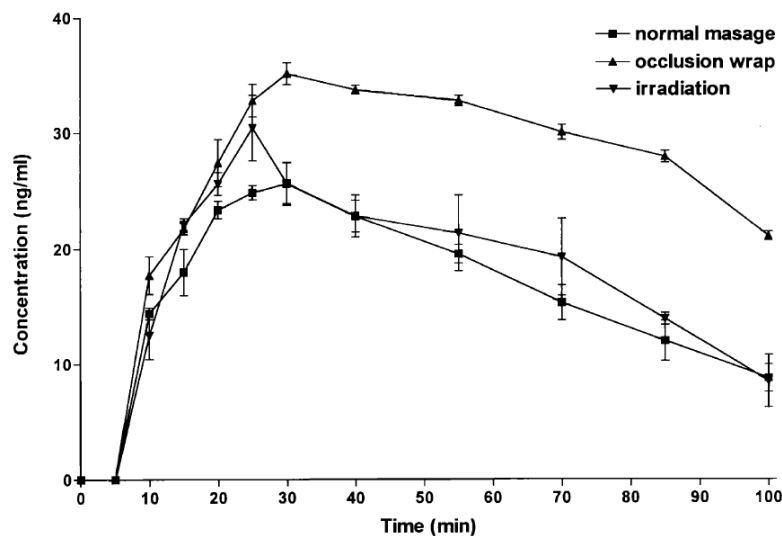


Abb. 2.13 Plasmakonzentration des Carvons in Abhängigkeit von 3 verschiedenen Massagetechniken¹⁷

2.1.4. 1,8 Cineol

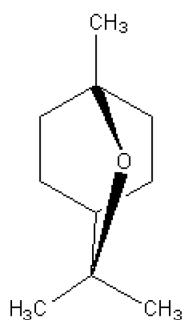


Abb. 2.14 1,8 Cineol¹⁸

Vorkommen:

1,8-Cineol ist ein monoterpenzyklischer Ether, der einen wichtigen Bestandteil bei *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae) (70-85%) darstellt (Duisken et al., 2005) (Abb.2.16).

¹⁷ (Fuchs et al., 1997)

¹⁸ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro



Abb. 2.15 *Eucalyptus globules* Labill (Myrtaceae)¹⁹

Wirkung und Anwendung:

1,8-Cineol wirkt expektorierend, mukolytisch und sekretomotorisch (Werner et al., 2006). Anwendung findet 1,8-Cineol als Nasenspray oder Desinfektionsmittel für äußere pharmazeutische Anwendungen in der Kosmetik, bei Nierensteinen, rheumatischen Erkrankungen, Neurosen, Muskelschmerzen und bei der Asthmatherapie (Duisken et al., 2005).

Nachweis von 1,8-Cineol :

Eine mögliche Korrelation zwischen der Erhöhung der Konzentration von 1,8-Cineol und einer Verbesserung der Gehirndurchblutung wurde schon in den früheren Studien untersucht (Nasel et al., 1994; Stimpfl et al., 1995). Die genaue Konzentration des Monoterpens wurde aber in diesen Studien nicht bestimmt. Mit der Pharmakokinetik des Cineols und der Bestimmung seiner Konzentration beschäftigte sich die Studie von Jäger und Mitarbeitern (Jäger et al., 1996). Die Studie wurde mit vier gesunden Probanden durchgeführt. Beginnend Null Min. und endend 60 Min nach einer 20-minütigen inhalativen Applikation des Cineols wurde den Probanden Blut entnommen, um die Konzentration des Monoterpens mittels HS-GC zu messen.

¹⁹ Siehe (<http://www.feeling.at/osshop/eukalyptusoel-globulus-eucalyptus-globulus-p-59.html?gclid=COq04f2H26YCFdSFzAod0hsm7A>)

Die Ergebnisse:

Die Ergebnisse sind in Abb. 2.17 abgebildet:

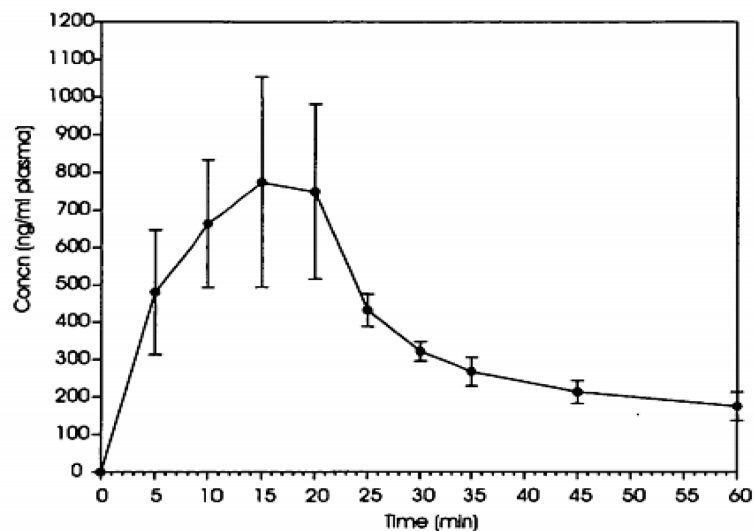


Abb. 2.16 Konzentrations-Zeit Verlauf des 1,8-Cineols²⁰

1,8-Cineol wurde schnell absorbiert und konnte schon nach fünf Minuten aus dem Blut detektiert werden. $C_{\max}$ betrug zwischen 459 und 1135 ng/ml, und diese wurde nach einer Zeit zwischen 3-7 Min. und 14-19 Min. erreicht (Jäger et al., 1996).

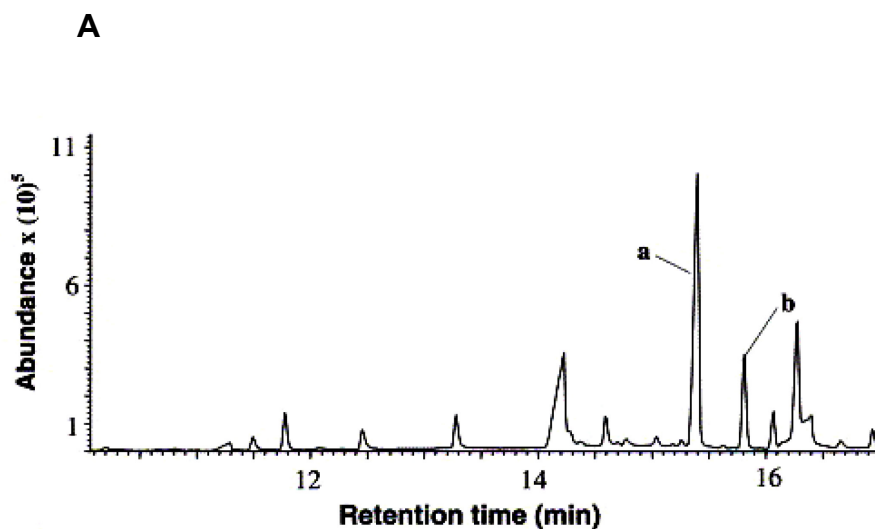
Die Studie von Duisken und Mitarbeitern (Duisken et al., 2005) befasst sich mit dem Metabolismus und dem Nachweis von Metaboliten des 1,8-Cineols. Es wurden *in vitro*, wo Stoffwechsel durch Lebermikrosomen und P-450- Enzyme ermöglicht wird, zwei Metaboliten nachgewiesen. Das Besondere an der Studie ist, dass neben dem schon bekannten menschlichen Metaboliten des 1,8 Cineols 2 α -Hydroxy-1,8-Cineol auch zum ersten Mal 3 α -Hydroxy-1,8-Cineol nachgewiesen worden sind. Die Nachweismethode war GC mit EI-MS. Für die Analyse wurde das Hewlett-Packard Model 5860 Series II verwendet, das direkt mit einem Hewlett-Packard 5972 Massenspektrometer gekoppelt war. Die Säulentemperatur wurde von 37 bis 330 °C erhöht, und zwar mit einer Erhöhungsrate von 6°C/Min. bis 200 °C und mit einer Erhöhungsrate von 15 °C von 200-330 °C. Das Trägergas war Helium.

²⁰ (Jäger et al., 1996)

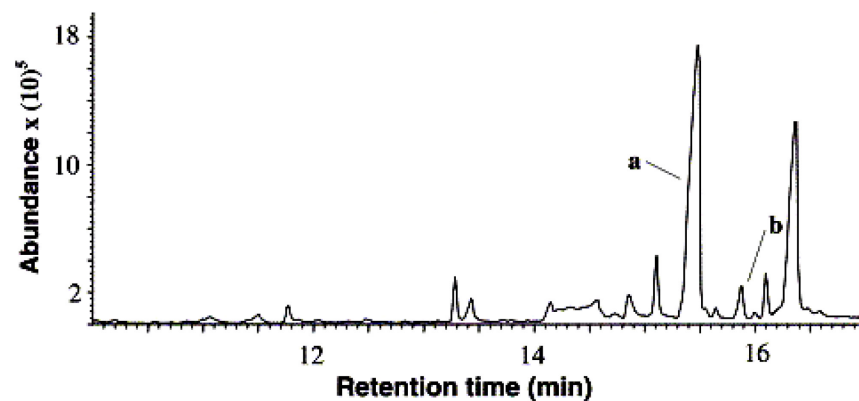
Ergebnisse:

Die Konzentration der Metaboliten hing von der Inkubationszeit, der 1,8-Cineol Konzentration und der P-450 Enzym-Konzentration ab, wobei sich eine erhöhte Bildung des Metaboliten bei höherer P-450 Enzym-Konzentration feststellen ließ, und gleichfalls konnten keine Metaboliten in Abwesenheit von P-450 Enzymen nachgewiesen werden.

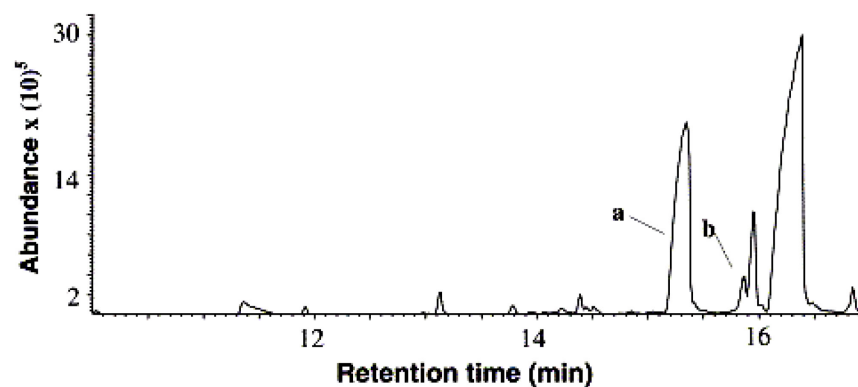
Um die Glaubwürdigkeit der Studie zu erhöhen, wurden alle diese Ergebnisse auch *in vivo* mit drei Probanden, die 1,8-Cineol-Therapie für fünf Tage einnahmen, bestätigt. Urinproben wurden durch Festphasenextraktion für die GC vorbereitet und die Massenspektren wurden durch Vergleich mit Massenspektrenbibliotheken ausgewertet. Beide Metaboliten, die *in vitro* nachgewiesen waren, wurden in Urinproben bestätigt, wobei α -Hydroxy-1,8-Cineol in jeder Harnprobe eine höhere Konzentration als 3 α -Hydroxy-1,8-Cineole erreichte, was an der Abb.3.18 sehr gut zu sehen ist (Duisken et al., 2005).



B



C



a-2 α -Hydroxy-1,8-cineole ; b-3 α -Hydroxy-1,8-cineole

Abb. 2.17 GC-MS Chromatogramm des Urinextraktes von zwei Männern (A und B) und einer Frau (C) nach oraler Applikation von 1,8-Cineol²¹

In einer aktuellen Untersuchung von Horst et al. (Horst et al., 2010) versuchte man die Metaboliten des 1,8-Cineols nach seiner Einnahme in lebensmittelrelevanten Dosen nachzuweisen. Nach Einnahme von 1.02 mg 1,8-Cineol (19 μ g / kg KG) in Form von Salbeitee wurden seine Metaboliten identifiziert und quantifiziert. Die Quantifizierung des 1,8-Cineols erfolgte mit SPME GC-MS und die Quantifizierung von Metaboliten mit LC-MS/MS. Nachdem für die internen Standards die Verbindungen [2H₃]-1,8-Cineol, [9/10-2H₃]-2-Hydroxy-1,8-Cineole und [13C, 2H₂]-9-Hydroxy-1,8-Cineole synthetisiert

²¹ (Duisken et al., 2005)

wurden, erfolgte die Isotopenverdünnungsanalyse. Nach Konsumation von Salbeitee wurde von dem Probanden zu bestimmten Zeitintervallen Blut und Harn entnommen und zur Analyse vorbereitet.

Bei der Analyse der Analyten mit SPME-GC-MS wurde für die SPME eine Carboxen/Polydimethylsiloxan-Faser verwendet. Der Probenteller wurde auf 55 °C erhitzt, die Desorption der Analyten von Fasern auf dem heißen splitlosen Injektor war bei 250°C. Die GC Analyse entwickelte sich bei einer Säulen Temperatur von 40 °C, zuerst auf 86 °C mit einer Erhöhungsrate von 3°C/ Min und dann auf 240 °C mit einer Erhöhungsrate von 40 °C/ 3Min.

Bei der Analyse der Probe mit LC-MS/MS wurden die Analyten mit folgenden Elutionsmitteln eluiert: Ameisensäure (0.1% Lösungsmittel A) und ACN (Lösungsmittel B), bei einer Flussrate von 0.2 ml/Min.

Ergebnisse:

Es wurden im Blut und Urin eines Probanden folgende Metaboliten nachgewiesen und quantifiziert: 2-Hydroxy-1,8-Cineole, 3-Hydroxy-1,8-Cineole, 9-Hydroxy-1,8-Cineole und zum ersten Mal bei Menschen 7-Hydroxy-1,8-Cineole. Der Hauptmetabolit war 2-Hydroxy-Cineol mit einer $C_{\max}$ von 86nmol/L, gefolgt von 9-Hydroxy-Cineol mit 33nmol/L und Stammverbindung mit 19nmol/L (Horst et al., 2010).

2.1.5. (-)-Fenchon

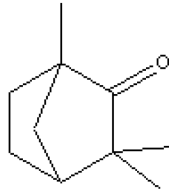


Abb. 2.18 Fenchon²²

Vorkommen:

Fenchon ist ein bicyklisches Monoterpen, das in der größten Menge in *Foeniculum vulgare* Mill (Apiaceae) vorkommt (Abb.3.20) (Schönfelder, 2001).



Abb. 2.19 *Foeniculum vulgare* Mill. (Apiaceae)²³

Wirkung und Anwendung:

(-)-Fenchon weist eine spasmolytische und sekretolytische Wirkung auf. Außerdem fördert es die Magen-Darm-Motilität und findet Anwendung bei dyspeptischen Magen-Darm-Beschwerden und bei Blähungen. Häufig wird Fenchel im Form von Sirup oder Tee bei Katarrhen der oberen Luftwege bei Kindern angewendet (Hänsel, 2010).

Nachweis von (-)-Fenchon:

²² Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro

²³ (Schönfelder, 2001)

In der Studie Miyazawa et al. wurde der Metabolismus von Fenchon durch Cytochrom-P450-Enzyme in menschlichen Lebermikrosomen untersucht. Neben dem Nachweis der Metaboliten wurde zusätzlich die Konzentrationsabhängigkeit der Metaboliten von der Cytochrom-P450-Konzentration und der Inkubationszeit gemessen. Die pharmakokinetischen Parameter der Enzyme K_m und V_{max} bestimmen, wie schnell und im welchem Ausmaß die Metaboliten entstehen werden und welches von den P-450 Cytochrom-Enzymen das wichtigste ist. Deswegen ist es auch wichtig, die Parameter zu messen.

Ergebnisse:

Nach einer Inkubation des Fenchons mit menschlichen Lebermikrosomen in Anwesenheit des NADPH-Systems wurden die entstandene Produkte mit GC-MS analysiert. Es wurden fünf Peaks in dem Chromatogramm festgestellt, wobei Peak vier und fünf immer noch unbekannt sind und die restlichen drei die entstandenen drei Metaboliten darstellen.

Peak 1 stellt den Metabolit 6-*endo* Hydroxyfenchon mit einer Retentionszeit 20.7 Min dar. Peak 2 steht für 10-Hydroxyfenchon mit einer Retentionszeit von 20.9 Min. und Peak 3 ist 6-*exo*-Hydroxyfenchon und hat eine Retentionszeit von 21.1Min. Von elf getesteten CYP P450-Enzymen wurden nur CYP2A6 und CYP2B6 als wichtige Enzyme bei der Hydroxylierung des Fenchons festgestellt. In Abb.2.21 ist auch deutlich zu sehen, dass 6-*exo*-Hydroxyfenchon eine zweimal höhere Enzymaktivität (V_{max}/K_{max}) als andere Metaboliten hat und dass durch CYP2A6 kein 10-Hydroxyfenchon entsteht. CYP2B6 und CYP2A6 ermöglichen die Hydroxylierung des (-)-Fenchons mit einer Rate von 2.66 und 2.26 $\text{nmol min}^{-1} \text{nmol}^{-1} \text{P450}$ für die 6-*exo*-hydroxyfenchon und 0.84 und 1.3526 $\text{nmol min}^{-1} \text{nmol}^{-1} \text{P450}$ für die 6-*endo*-Hydroxyfenchon und die 10-Hydroxyfenchon mit einer Rate von 1.56 $\text{nmol min}^{-1} \text{nmol}^{-1} \text{P450}$ aber nur durch CYP2B6 (Miyazawa et al. 2007).

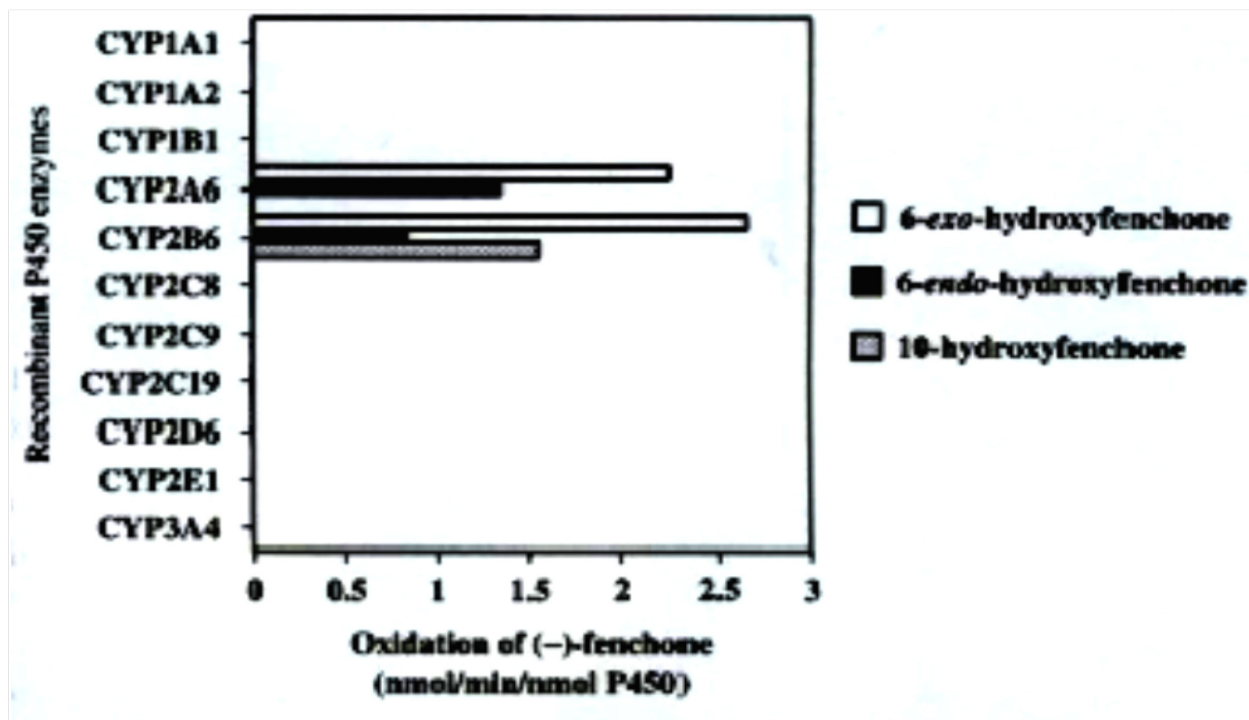


Abb. 2.20 6-exo-Hydroxyfenchon; 6-endo-Hydroxyfenchon; 10-Hydroxyfenchon Entstehung durch rekombinante P-450 Enzyme²⁴

2.1.6. (+)-Limonen

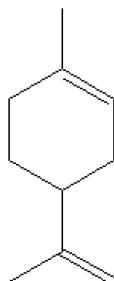


Abb. 2.21 (+)- Limonen²⁵

Vorkommen:

(+)-Limonen ist ein monozyklisches Monoterpen und ein wichtiger Bestandteil von *Citrus aurantium* L. (Rutaceae)²⁶ (Abb.2.23).

²⁴ (Miyazawa et al., 2007)

²⁵ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro

²⁶ (<http://chemiedidaktik-graz.at/content/pdf/citronensaure.pdf>)



Abb. 2.22 *Citrus aurantium* L. (Rutaceae)²⁷

Wirkung und Anwendung:

(+)-Limonen zeigt eine chemotherapeutische (Chen et al., 1999), chemopräventive (Iman et al., 2001) und penetrationsfördernde Wirkung (Krishnaiah et al., 2005).

Nachweis von (+)- Limonen

In einer älteren Untersuchung von Vigushin et al. (Vigushin et al., 1998) wurde an Krebspatienten die Effektivität und Plasmakonzentration von Limonen und seiner Metaboliten gemessen. Die pharmakokinetischen Daten wurden mittels FC-MS analysiert. Insgesamt 32 Tumorpatienten nahmen an der Studie teil und erhielten täglich 0,5-12 g/m² (+)-Limonen peroral in einem Zyklus von 21 Tagen. Die intratumorale Konzentration von Monoterpenen wurde nur bei zwei Patienten gemessen.

Ergebnisse:

Die maximale Plasmakonzentration von (+)-Limonen lag zwischen 10.8+/-6.7 und 20.5+/-11.2 µM. Die Hauptmetaboliten sind folgende: Perillasäure mit C_{max} von 20.7+/-13.2 bis 71+/-29.3 µM; Dihydroperillasäure mit C_{max} von 16.6+/-7.9 bis 28.1+/-3.1 µM; Limonen-1,2-Diol mit C_{max} von 10.1+/-8 bis 20.7+/-8.6 µM und Uroterpenol mit C_{max} 14.3+/-1.5 bis 45.1+/-1.8 µM. Die intratumorale Konzentration von Limonen war höher als die Konzentration im Plasma. In Abb.2.24 sind sowohl die C_{max}-Werte als auch die langsamere Uroterpenol

²⁷ Siehe (<http://chemiedidaktik-graz.at/content/pdf/citronensaure.pdf>)

Eliminierung und die Domination von Perillasäure im Vergleich zu den anderen Metaboliten klar zu sehen (Vigushin et al., 1998).

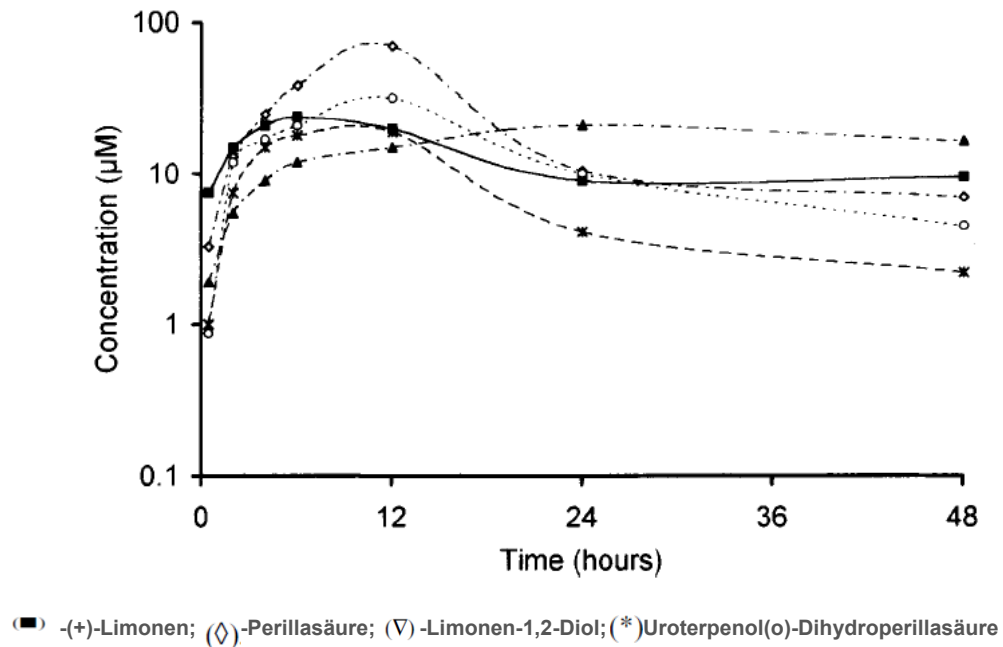


Abb.2.24 Plasmakonzentration/Zeit Verhältniss von Limonen und Huptmetaboliten bei einer Dosisapplikation von 10 g/m² ²⁸

Die Studie von Miyazawa et al. (Miyazawa et al., 2002) beschäftigte sich mit dem Metabolismus von (+)-und (-)-Limonen nach einer Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. Durch die Oxidation des Cineols in der Position sechs und sieben konnten zwei Metaboliten nachgewiesen werden: (+)-und (-)-Carveol und (+)-und(-)-Perillylalkohol, die mittels GC-MS analysiert werden. Bei der Suche nach Cyp-450 Enzymen, die für die Oxidierung des Cineols wichtig sind, wurden die Cyp-P450-Inhibitoren und Antikörper eingesetzt. Somit wurde durch die Hemmung der Cyp-P450-Enzyme, die für die Oxidation wichtig sind, auch die Oxidation des Limonens gehemmt.

Eine Mischung aus Lebermikrosomen, (+)-und(-)-Limonen-Enantiomeren, Kaliumphosphat und NADPH ermöglichte die Oxidierung des Limonens. Die Mischung wurde inkubiert, mit Dichlormethan extrahiert und der Extrakt wurde nach einer Zentrifugation für die GC-MS-Analyse bzw. für die Identifizierung der Metaboliten vorbereitet. Für die GC-Analyse wurde der Hewlett-Packard 5890

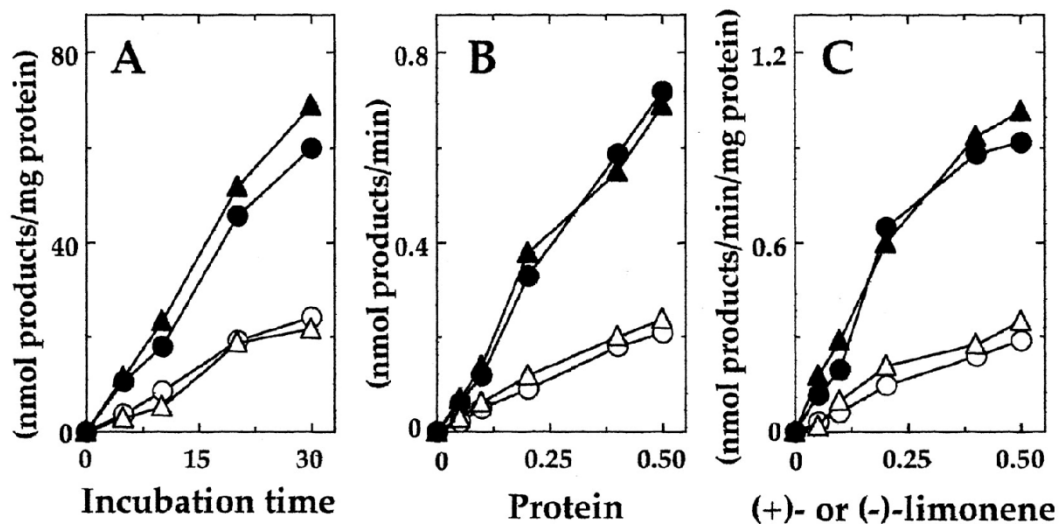
²⁸ (Vigushin et al., 1998).

A Gaschromatograph verwendet, der mit dem Splitinjektor ausgerüstet und direkt mit dem Hewlett-Packard 5972 Massenspektrometer gekoppelt ist. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1 ml/Min. verwendet.

Ergebnisse:

Es wurden zwei Metaboliten festgestellt: (+)-und(-)-*trans*-Carveol und (+)-(-)-Perillylalkohol, wobei die Lebermikrosomen bei der Oxidation in der Position sieben bzw. die Entstehung von Perillylalkohol stärkere Aktivität gezeigt haben.

Die Abb.2.25 zeigt die Abhängigkeit der Metabolitenkonzentration von drei verschiedenen Faktoren: von der Inkubationszeit, der Proteinkonzentration und der Limonenkonzentration. Unter Abb.2.25 A und B ist ein Anstieg der Konzentration von Metaboliten durch die Erhöhung der Inkubationszeit auf 30 Min und durch die Erhöhung der Konzentration des Proteins auf 0.5 mg gezeigt. Unter Abb.2.25 C ist der Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen von (+)-und von (-)-Limonen auf die Entstehung der Metaboliten gezeigt. Ein nennenswerter Unterschied zwischen Enantiomeren wurde nicht festgestellt. Es ist auch deutlich zu sehen, dass Perillylalkohol in höherer Konzentration als Carveol gebildet wird.



Symbole: (+)-Limonene (○ and ●) and (-)-limonene (△ and ▲)

Abb. 2.23 Der Einfluss von: (A) Inkubationszeit; (B) -Proteinkonzentration; (C) Limonenkonzentration auf die Entstehung von Oxidationsprodukte (+)- und (-)-trans-Carveol (offene Symbole) und (+)- und (-) - Perillyl Alkohol (geschlossene Symbole)²⁹

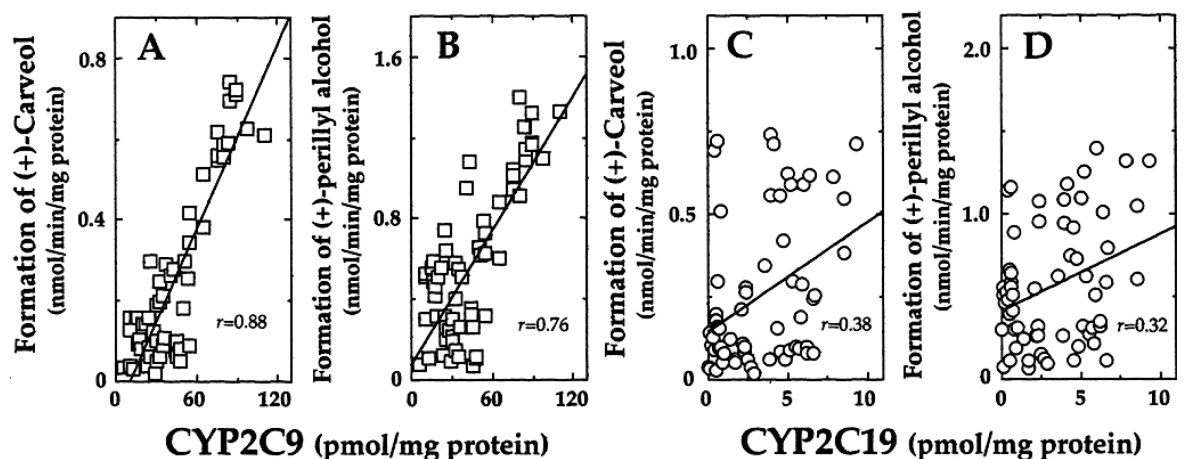


Abb. 2.24 Verhältniss zwischen Cyp2C9 und Cyp2C19 und Konzentration von gebildeten Metaboliten: Carveol und (+)- (-)-Perillyl Alkohol³⁰

Die K_m und V_{max} Werte waren für beide Enantiomere sehr ähnlich, aber die Enzymeffizienz V_{max}/K_m war bei der Bildung von Perillylalkohol bis vier Mal größer im Vergleich zu Carveol. Die K_m Werte für Cyp-Enzyme waren ungefähr 0.3mM, aber der K_m -Wert für Cyp2C9, der für die Carveolbildung verantwortlich war, lag mit 0.57mM etwas höher. V_{max} Werte waren für Cyp2C19 höher als in

²⁹ (Miyazawa et al., 2002).

³⁰ (Miyazawa et al., 2002).

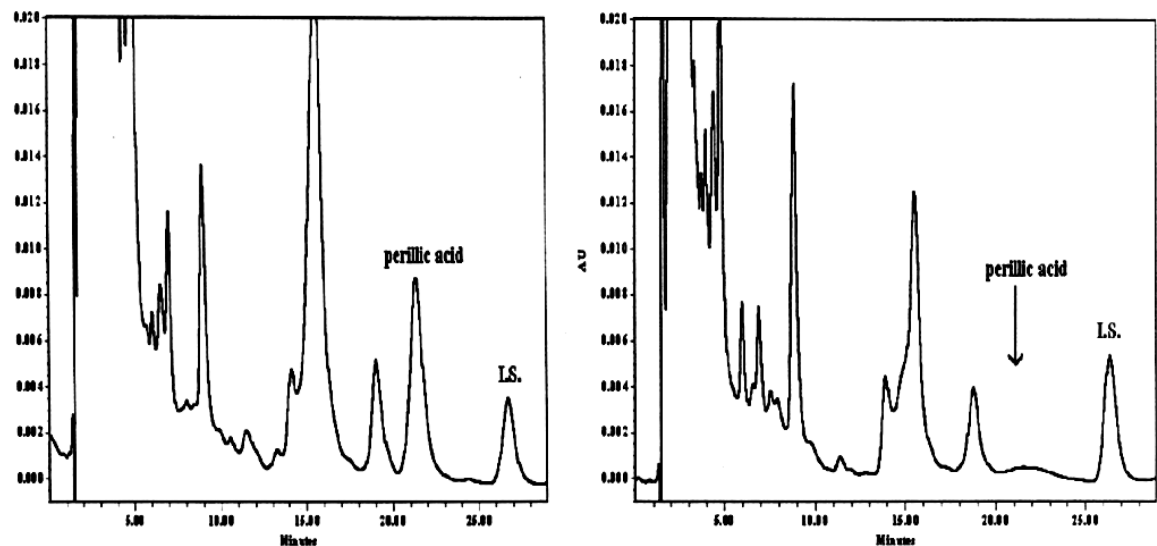
Cyp 2C9, und daraus folgend war die ($V_{\max}/K_m$) in Cyp 2C19 auch höher als in Cyp 2C9 (Abb.2.26) (Miyazawa et al., 2002).

Die Limonenkonzentration und Konzentration von Perillasäure wurde in der Studie von Chow et al. (Chow et al., 2002) nach der Konsumation der frisch vorbereiteten Limonade gemessen. Die Probanden nahmen mit dem Frühstück entweder 447 mg oder 596 mg des Limonens in Limonadenform zu sich. Nach der Konsumation wurde Blut entnommen und der RP-HPLC-Analyse mit UV-Detektion unterworfen. Den Probanden wurde Blut vor der Limonadenkonsumation und 1, 2, 4, 5 und 24 Stunden nach Konsumation abgenommen.

Die Verarbeitung des Blutes begann mit dem Zentrifugieren, das Plasma wurde dann in Kryotuben auf -80 °C für die RP-HPLC-Analyse verpackt. Kleine Plasmaproben wurden mit dem Natriumacetat-Puffer und der internen Standardlösung vermischt und in SPE-Patronen gegeben. Ein aliquoter Teil von Perillasäure und interner Standardlösung wurde nach der Eluierung mit dem Methanol in die HPLC injiziert. Der entstandene Eluent war mit einem UV Detektor mit 230 nm Wellenlänge detektiert. Die Quantifizierung von Perillasäure erfolgte mittels Eichkurven, die mit dem Plasma und Standard-Perillasäure vorbereitet war.

Ergebnisse:

Auf dem folgendem HPLC Diagramm (Abb.2.27) sind die Peaks zwei Stunden und 24 Stunden nach der Konsumation der Limonade dargestellt. Einerseits ist nach 2 Stunden ein Peak von Perillasäure bei einer Retentionszeit von 21.5 Min und ein Standard-Perillasäure-Peak bei 26.5 Min. zu sehen. Andererseits ist nach 24 Stunden kein Peak von Perillasäure zu sehen.

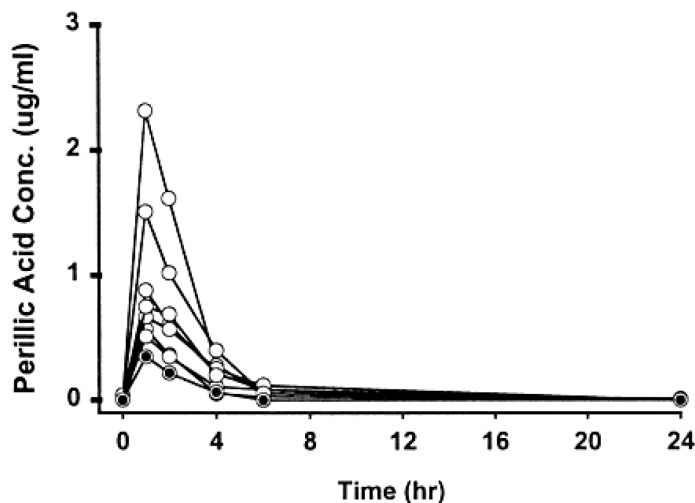


Links- nach 2 Stunden; Rechts- nach 24 Stunden

Abb. 2.25 HPLC Chromatogramm 2 und 24 Stunden nach der Limonadenkonsumation³¹

Die Plasmakonzentration der Perillasäure stieg schon eine Stunde nach Konsumation von Limonade (Abb.2.28). Die maximale Plasmakonzentration der Perillasäure betrug zwischen 0.57 bis 2.32 µg/ml bzw. 3.43 bis 13.98 µm für die Probanden, die Limonade mit 596mg des Limonens konsumiert hatten. Nachdem die maximale Konzentration erreicht wurde, fiel die Perillasäurekonzentration steil ab. Diese Werte deuten auf sichtbar unterschiedliche C_{max} bei verschiedenen Personen die dieselbe Konzentration der Limonade konsumiert haben. Nachdem die maximale Konzentration erreicht wurde, fiel die Perillasäure Konzentration steil ab (Chow et al., 2002).

³¹ (Chow et al., 2002).



Symbole: (○)-596 mg des D-Limonens; (●) 447 mg des Limonens

Abb. 2.26 Plasmakonzentration der Perillasäure nach Einnahme 596 oder 496 mg des D-Limonens³²

Es wurden viele verschiedene analytische Methoden verwendet: GC-FID; GC-MS; HPLC-MS und GC-MS, um die Konzentration des (+)-Limonens in Blut und Urin zu messen. Doch alle diese Methoden hatten eine zu geringe Empfindlichkeit, um eine Konzentration von 300 mg von (+)-Limonen nachweisen zu können.

In der Studie von Wang et al. (Wang et al., 2007) wurde versucht, eine genügend empfindliche, reproduzierbare Methode zu finden, mit der man kleine Mengen von (+)-Limonen im Blut nachweisen kann.

24 jungen gesunden Probanden wurde in Kapselform 300 mg (+)-Limonen verabreicht. Um äußere Einflüsse und Peaks zu vermeiden, hielten sich die Probanden vor Beginn der Studie und während der Studie an eine strenge Diät, die (+)-Limonen in irgendeiner Form ausschließt. Dann wurde in kurzen Zeitabständen Blut entnommen, zentrifugiert und bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

Vor der GC-MS-Analyse erfolgten flüssig-flüssige Extraktionsverfahren auf folgende Weise: zur Mischung aus dem Plasma, n-Hexan und Naphthalen (interner Standard), in n-Hexan gelöst, wurde Acetonitril zugegeben. Darauf

³² (Chow et al., 2002)

folgte Zentrifugieren und die n-Hexan-Schicht wurde für die GC und GC-MS-Analyse vorbereitet. Die GC-MS-Analyse erfolgte auf einem Agilent Gaschromatographen, der mit dem Agilent 5976 Massenspektrometer gekoppelt war. Die Kapillarsäule, die man zur Trennung verwendete, hatte die Maße 30m× 0.25 mm und war mit Methylsilikon und 5% Phenylmethylsilikon beschichtet. Die Injektortemperatur war 220°C und die Säulentemperatur bewegte sich von 60 bis 140°C. Das Trägergas war Helium mit einer Flussrate von 1,5 ml/Min.

Ergebnisse:

Die Retentionszeit des (+)-Limonens und des internen Standards(Naphthalen) waren 4.2 Min. und 4.5 Min. und die gesamte Retentionszeit war sieben Min. Charakteristische Ionen gab es bei m/z 93 bei einer Retentionszeit von 3-4.3 Min. und m/z 138 bei der Retentionszeit 4.3-5 Min. Die $C_{\max}$ des (+)-Limonens war zwischen 40.1 bis 327.4 ng/ml, was einen kleineren Mittelwert, als die bisherigen Studien berichten, ergibt. Sowohl $T_{\max}$ mit einem Wert von 0.75 -3.0 Stunden im Vergleich mit dem bis dahin berichteten Wert von 1.0-6.0 Stunden als auch der AUC-Wert waren kleiner als in der vorherigen Studien. Diese Unterschiede können durch die niedrigere Dosis von (+)-Limonen in dieser Studie erklärt werden (Abb.3.29).

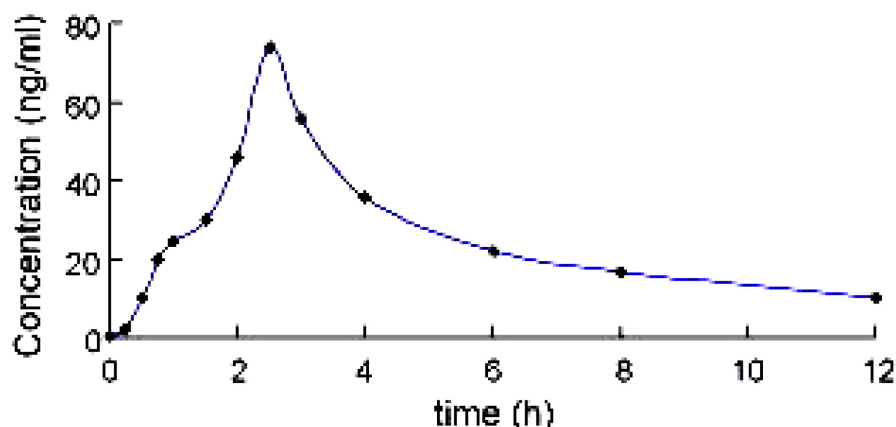


Abb. 2.27 Plasmakonzentration des D-Limonens nach einer Applikation von 300mg des D-Limonens bei 24 gesunden Probanden³³

³³ (Wang et al., 2007).

Die Methode zeigte große Genauigkeit, Präzision und Empfindlichkeit. Die mittlere Extraktionsausbeute war mit dem Wert $99.8 \pm 0.72\%$ besser als in den bisherigen Studien in der Literatur. Die äußere Einflüssen und Peaks wurden durch die angewandte Diätverfahren fast vollkommen reduziert (Wang et al., 2007).

2.1.7. Linalool

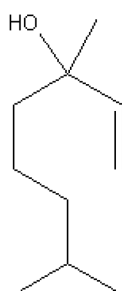


Abb. 2.28 Struktur von Linalool³⁴

Vorkommen:

Linalool ist ein ungesättigter acyclischer Monoterpen-Alkohol das in folgenden Pflanzen in der größte Menge vorkommt:

(+)-Linalool: 80-85% in *Cinnamomum Camphora* L. (Lauraceae), 60-80% *Coriandrum Sativum* L. (Apiaceae), *Lavandula angustifolia* Mill (Lamiaceae) (Abb.3.31).

(-)-Linalool: 85% in *Aniba rosaeodora* D. (Lauraceae), 60-80% in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) (Abb.3.32) (Tiefenbacher, 2008).

³⁴ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro



Abb. 2.29 *Cinnamomum Camphora* L. (Lauraceae)³⁵



Abb. 2.30 *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae)³⁶

Wirkung und Anwendung:

Die Wirkung wird als sedativ (Lehrner et al., 2005), beruhigend und stressreduzierend (Mottomura et al., 2001) beschrieben. Des Weiteren erfolgt eine Deaktivierung der physiologischen Parameter wie zum Beispiel Senkung des systolischen Blutdrucks, der Hauttemperatur, Puls, Atemfrequenz (Buchbauer et al., 2004). Linalool wirkt außerdem hyperämisch und blähungstreibend (Kubelka, 2001-2002). (-)-Linalool findet Anwendung als mildes Sedativum bei Unruhe und Schlafstörungen (Buchbauer et al., 2004).

Nachweis von Linalool

Die wichtigsten Punkte der Pharmakokinetik von Arzneistoffen sind Aufnahme, Verteilung (Distribution), Metabolisierung und die Ausscheidung bzw. Exkretion (ADME), was zusammen mit der verabreichten Dosis des entsprechenden Arzneistoffes die Konzentration des Arzneistoffes am Wirkort bestimmt³⁷.

Um pharmakokinetischen Daten näher zu kommen, hat man in der Studie von Friedl et al. (Friedl et al., 2010) drei Methoden verglichen, mit denen man Linaloolkonzentration im menschlichen Blut messen kann.

Ergebnisse:

Von den drei Probenaufgabenmethoden statische HS/GC-MS, HS-SPME/GC-MS und Flüssig-Flüssig Probenaufgabe/ GC-MS hat sich statische HS/GC-MS als beste erwiesen, vor allem wegen der einfachen Handhabung von

³⁵ Siehe (<http://www.bio-gaertner.de/pflanzen/Basilikum>)

³⁶ Siehe (<http://www.bio-gaertner.de/pflanzen/Basilikum>)

³⁷ Siehe (http://campus.doccheck.com/uploads/tx_dcmestudscripts/3316_pharmakokinetik.pdf)

Blutproben und wegen der kurzen Analysezeit Die Nachweisgrenze war ein wenig geringer bei der Inkubation bei 60 als bei 40 °C, aber die quantitativen Ergebnisse waren bei der Verwendung von α -Terpineol als interner Standard gleich (Friedl et al., 2010).

Da Linalool zusammen mit Linalylacetat einer der Hauptbestandteile der *Lavandula angustifolia* Mill (Lamiaceae) ist, wurde seine Konzentration nach topischer Applikation von Lavendelöl gemessen. 20 Minuten nach einer fünfminütigen Massage betrug die Linalool- Plasmakonzentration 121ng/ml und 90 Minuten nach der Massage war Linalool zum größten Teil eliminiert (Jäger et al., 1992).

2.1.8. Menthol

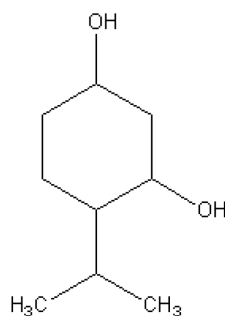


Abb. 2.31 Menthol³⁸

Vorkommen:

Wegen der drei asymmetrischen C-Atome erscheint Menthol in acht optisch aktiven stereoisomeren Formen beziehungsweise in vier folgenden diastereomeren Paaren: (-)-und (+)-Menthol; (-)- und (+)-Neomenthol; (-)- und (+)-Isomenthol und (-)- und (+)-Neoisomenthol. Zusammen mit Menthon ist Menthol Hauptbestandteil von *Mentha Piperita* L. (Lamiaceae), einer der am häufigsten eingesetzten Pflanzen in der Volks- und Alternativmedizin. Weitere wichtige Bestandteile von *Mentha Piperita* sind Isomenthon, Menthyl-acetat und Menthofuran (Abb.3.34) (McKay et al., 2006).

³⁸ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro



Abb. 2.32 *Mentha Piperita* L. (Lamiaceae)³⁹

Wirkung und Anwendung:

Menthol wirkt schmerzlindernd bei Patienten mit zentralen und peripheren neuropathischen Schmerzen (Wasner et al., 2008), analgetisch, entzündungshemmend, durchblutungsfördernd (Steflitsch, 2008), kühlend (Eccles, 1983) und insektizid (Samarasekera et al., 2008). Menthol findet Anwendung bei Gallenstörungen, Dyspepsie, Enteritis, Blähungen, Gastritis, intestinaler Colitis sowie bei Krämpfen der Gallenwege, Gallenblase und des Magen-Darm-Kanals (McKay al., 2006).

Nachweis von Menthol:

In einer placebokontrollierten Crossover Studie von Gelal und seinen Mitarbeitern wurde die Pharmakokinetik und die kardiovaskuläre Wirkung von Menthol untersucht. Den Probanden wurden Mentholkapseln, Placebokapseln und Menthol in der Nahrung bzw. Menthol als Bonbons oder Tee verabreicht. Es wurde festgestellt, dass Menthol sehr rasch zu Glucuroniden metabolisiert, die man im Harn und Blut messen konnte. Die Plasmahalbwertszeit betrug 56.2 Minuten für Kapseln und 42.6 für Bonbons oder Tee. Die Harnausscheidung von Mentholglucuronid war zwischen 45.6 und 56.6% für Mentholkapseln und Mentholbonbons. Man schließt daraus auf ähnliche Bioverfügbarkeit bei Menthol in Kapseln und Menthol in der Nahrung.

³⁹ (Schönfelder, 2001)

Blutplasma wurde 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 und 90 Minuten und Urin 2, 4, 6, 8 und 16 Stunden nach der Einnahme des Menthols entnommen. Danach wurden Blut und Urin für die GC-MS-Analyse vorbereitet. Die Mentholkonzentration im Plasma und Urin wurde vor und nach Inkubation mit Beta-Glucuronidase gemessen. Zu 1 ml Plasma und Urin wurden 0.5 ml Essigsäure, Beta Glucuronidase und 100 Mikroliter des internen Standards zugegeben und das Ganze wurde über Nacht im Wasserbad gelassen. Nachdem die organische Phase gewonnen und zur Trockene eingedampft wurde, wurde zur diesen Phase Xylen dazugegeben (50 µl für Blutproben und 500 µl für Harnprobe), wodurch die Probe für die GC-MS Analyse vorbereitet war.

Die Analyse mit GC erfolgte mit Hewlet-Packard 5890 Gaschromatograph der direkt mit Massenselektiven Detektor gekoppelt war. Die Injektionsgabetemperatur war 250 °C und die Durchlaufstreckentemperatur 280°C. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1.0 ml/L auf 70°C verwendet. Die Säulentemperatur änderte sich von 70 bis 115 °C mit einer Erhöhungsrate von 60°C/Min. und von 115 bis 275 °C mit einer Erhöhungsrate von 25°C/Min.

Ergebnisse:

Alle drei Mentholformen wurden gut toleriert, man konnte aber kein freies Menthol nachweisen, sondern nur seine Metaboliten in Form von Glucuroniden.

Die maximale Blutmentholkonzentration C_{max} für beide Mentholformen war $16.73 \pm 5.53 \mu\text{mol/L}$, die Zeit, um C_{max} zu erreichen, betrug T_{max} 61 ± 26 Min. Die Halbwertszeit war bei zwei verschiedene Mentholformen deutlich unterschiedlich, und zwar waren es bei Mentholkapseln 56 ± 8 Min. und bei Mentholbonbons 43 ± 16 Min., was aber daran liegen kann, dass die Absorption aus Kapseln langsamer abläuft als Absorption aus Tee (Abb.2.35).

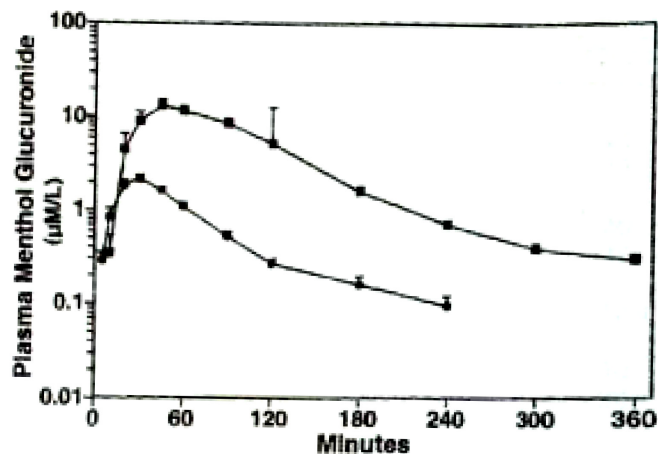


Abb. 2.33 Mentholglucuronid Konzentration nach orale Applikation von Mentholkapseln (obere Kurve) bzw. von Menthol Bonbons oder Tees (untere Kurve)⁴⁰

Die Urinhalbwertszeit war bei diesen zwei Applikationsformen signifikant weniger unterschiedlich als bei Plasma. In der Studie wurde auch festgestellt, dass sich die Ausscheidungsrate bzw. Clearance bei den beiden erwähnten Mentholapplikationsformen um 14% unterscheidet. Man konnte in dieser Studie nur einen ganz geringen kardiovaskulären Effekt des Menthols beobachten (Gelal et al., 1999).

In der Untersuchung von Spichiger et al. (Spichiger et al., 2004) wurde auch die Konzentration von Menthol und seines Metaboliten im menschlichen Blut und Urin nach enzymatischer Hydrolyse bestimmt. Mittels HS-SPME/GC-MS wurde die Trennung auf Polydimethylsiloxane/Divinylbenzenen (PDMS/DVB)-Fasern durchgeführt. Trägergas beim GC System war Helium mit einer Durchflussrate von 1.3 ml/Min. Die Injektortemperatur war 250 °C, die Säulentemperatur erhöhte sich von 50 bis 220 °C.

Ein wichtiger Schritt dabei war die Art und Weise, wie man Urin und Plasma bearbeitete. Den weiblichen Probanden wurde oral 100 g Menthol in der Kapselform appliziert. Danach wurden 0, 15, 30, 60, 120, 360 Minuten nach der Applikation jeweils fünf ml Blut von Probanden entnommen, heparinisiert, zentrifugiert und auf -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Menschliches Plasma, Acetat-Puffer, 0.2% Natriumchlorid und Isomenthol (interner Standard), mit oder

⁴⁰ (Gelal et al., 1999).

ohne Beta-Glucuronidase, wurde fest in eine Headspace-Phiole eingeschlossen.

Um nicht konjugiertes Menthol zu bestimmen, wurde die erste Probe ohne Beta-Glucuronidase gleich analysiert. Die zweite Probe mit Beta-Glucuronidase wurde über Nacht inkubiert (37 °C, 16 Stunden), um das Gesamtmenthol zu messen (unkonjugiertes Menthol und Menthol, das durch die enzymatische Analyse aus Menthol-Glucuroniden entsteht).

Nachdem 100 mg Menthol appliziert wurde, wurde Urin nach 2, 4, 6, 24 Stunden gesammelt und bei -20°C gelagert. Der Urin wurde danach 1:1000 und 1:10 mit Wasser verdünnt. Der verdünnte Urin wurde dann in derselbe Weise wie Blutplasma vorbereitet.

Ergebnisse:

Die Extraktion und die Analyse beider Proben, sowohl des Plasmas als auch des Urins, wurde mit SPME und GC durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass nach einer Applikation von 100 mg Menthol nach 30, 60 und 120 Minuten im Plasma, im Urin nach 4 Stunden nur die Mentholspuren vorhanden waren, die unter der Bestimmungsgrenze liegen. Nach 24 Stunden wurde 53.2% des Menthols im Urin als Menthol-Glucuronid (M-G) nachgewiesen (Abb.3.36) (Spichiger et al., 2003).

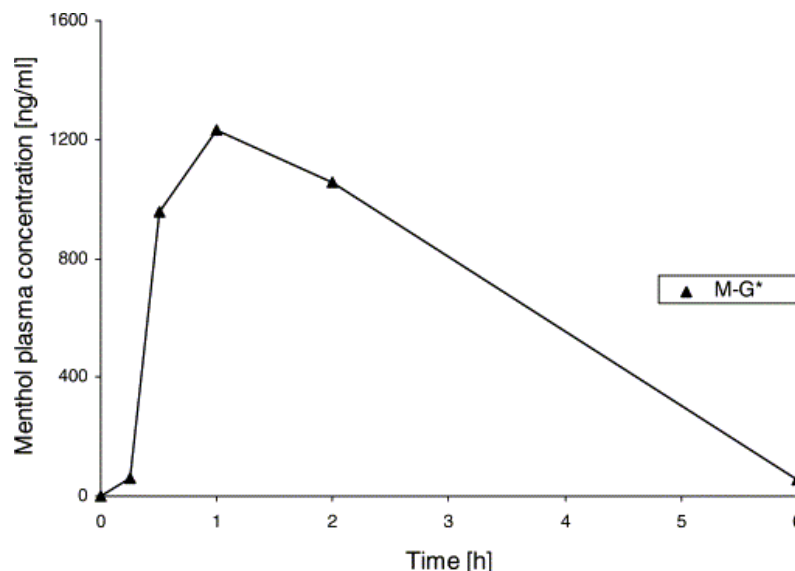


Abb. 2.34 Mentholglucuronid Plasmakonzentration nach Applikation von 100 mg Menthol⁴¹

Wie schnell Menthol freigesetzt werden kann, wenn es in einer magensaftresistenten Formulierung verpackt ist, und welche Mentholkonzentration erreicht wird, war die Frage, die sich Mascher et al. in ihrer Studie gestellt haben (Mascher et al., 2002). Es erfolgte eine doppelblinde, zweifache Crossover-Studie an sechzehn Probanden, die jeweils zweimal 180 mg Pfefferminzöl erhalten haben. Einmal geschah das in Form von magensaftresistenten Kapseln (Pfefferminzöl/Kümmelöl-Präparate Enteroplant®) und einmal in Form der Referenzsubstanz von schnell freisetzenden Formen von Kapseln. Nach erfolgter Extraktion aus dem Plasma wurde die Konzentration des Menthols durch die GC/MS bestimmt. Die gemessene $C_{\max}$ für Menthol in magensaftresistenten Kapseln betrug 1196 ng/ml und für die Referenzsubstanz 1492 ng/ml. Die gemessene Bioverfügbarkeit war auch ähnlich, aber die $T_{\max}$ war deutlich unterschiedlich, nämlich drei Stunden für Enteroplant®-Kapseln und 1.7 Stunden für die Referenzsubstanz (Mascher et al., 2002).

In einer Untersuchung von Schulz und Mitarbeitern wurden Menthol, Menthone, Isomenthone und Neomentholkonzentration im Serum von 100 Probanden mit HS-SPME-GC-MS-bestimmt (Schulz et al., 2009). Die Probanden nahmen die Monoterpene in Form von "Bramsche Pfefferminzlikör" zu sich, der durch die Headspace-Trap-Methode auf seinen Mentholgehalt geprüft und analysiert

⁴¹ (Spichiger et al., 2003).

wurde. Die Applikation erfolgte in drei verschiedenen Dosen, und zwar vier × 40 mL (entsprechend der Konzentration 5.6 mg von Menthon, 4.5 mg des Isomenthons, 1.1 mg des Neomenthols und 12.8 mg des Menthols); acht × 40 mL (entsprechend 11.2 mg des Menthons, 9.0 mg des Isomenthons, 2.2 mg des Neomenthols, 25.6 mg des Menthols absolut) und vierzehn × 40 mL (enthielt 19.6 mg des Menthons, 15.7 mg des Isomenthons, 3.9 mg des Neomenthols und 44.8 mg des Menthols absolut.) Blut wurde 0, 0,5, 1, 2, 3, 7 und 23 Stunden nach der Alkoholeinnahme entnommen, zentrifugiert und das gewonnene Plasma auf -18 °C bis zur HS-SPME–GC–MS-Analyse aufbewahrt.

Für die SPME wurden vier verschiedenen Fasern getestet und verglichen, und zwar: Carbowax/Divinylbenzene (CW/DWB), Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB) und Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). Nach der Extraktion folgte die GC-MS-Analyse auf dem Hewlett Packard GC 5890 Series II mit einem massenselektiven Detektor. Die Kapillarsäule zur Trennung hatte die Maße 30 m × 0.25 mm und die Temperatur für die Säule stieg von 40 bis 220°C. Die Temperatur für den splitlosen Injektor und massenselektiven Detektor betrug 250 und 280°C. Das Trägergas war Helium und hatte eine Flussrate von 1.15 ml/Min. ⁻¹.

Ergebnisse:

Die höchste Ausbeute der Extraktion wurde nach der Verwendung der 65 µm Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB) Faser erkannt. Die passende Probenahmetemperatur lag zwischen 25-50 °C für unterschiedliche Substanzen und die Extraktionszeit zwischen 30-60 Min. Zum Schluss wählte man eine Temperatur von 50°C und 30 Min für alle Substanzen. Die Substanzen zeigten sowohl rasche Resorption als auch Elimination und ergaben hauptsächlich durch höhere Dosierung höhere Blutkonzentration. Menthol war wegen seiner Neigung zur Glucuronidierung in Phase II des Metabolismus in sehr kleinen Mengen als freie Substanz nachweisbar. Nach einer Aufnahme von 560ml des Likörs betrug die Mentholkonzentration 19.7ng mL⁻¹ als freie Substanz und als Glucuronid 930ng/mL⁻¹.

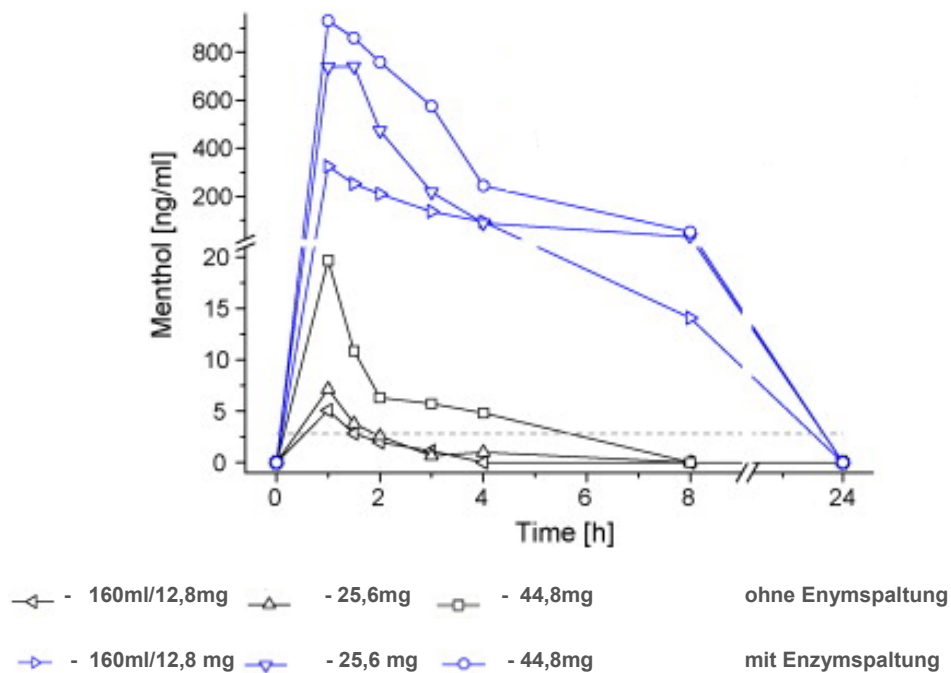


Abb. 2.35 Mentholkonzentration/Zeit bei drei verschiedenen Applikationskonzentrationen des "Bramsch Pfefferminzlikörs" vor und nach Enzymspaltung⁴²

In der aktuellen Studie von Miyazawa und Mitarbeitern (Miyazawa et al., 2011) wurde der Metabolismus von (+)-(1S, 3S, 4R) und (-)-(1R,3R, 4S) Mentholenantisomeren in menschlichen Lebermikrosomen untersucht (Miyazawa et al., 2011). Es sollte festgestellt werden, welche Cytochrom P450- Enzyme (CYP P450) von elf getesteten die wichtigste Rolle spielen, welche Metaboliten und im welchem Ausmaß entstehen und wie die pharmakokinetischen Parameter aussehen. Die Metaboliten wurden mit GC-MS nachgewiesen. Die Reaktionsmischung von Lebermikrosomen oder CYP P 450-Enzymen mit (+)- und (-)-Menthol und Kaliumphosphatpuffer, der NADPH-System enthält, wurde inkubiert. Nach Zugabe von Dichlormethan wurde die organische Phase zentrifugiert und für die GC-MS-Analyse vorbereitet.

Ergebnisse:

Die Metaboliten, die aus (+)- oder (-)-Menthol entstehen, sind: (+)-(1S,3S,4S) und (-)-(1R,3R,4R) -trans-para-Menthane 3,8-diol (Abb.2.38). Das wichtigste CYP P450-Enzym war CYP2A6 und seine mittlere Konzentration betrug 12.5+/- 10.2 pmol/ mg Protein. K_m ist sowohl für die Oxidation in Lebermikrosomen als auch für die Oxidation durch rekombinante CYP P450 zweimal höher für die

⁴² (Schulz et al., 2009)

Bildung für (+)-Menthol-8-Hydroxylierung als für (-)-Menthol, was darauf hinweist, dass die Substrataffinität des (+)-Menthols höher ist als für (-)-Menthol (Miyazawa et al., 2011).

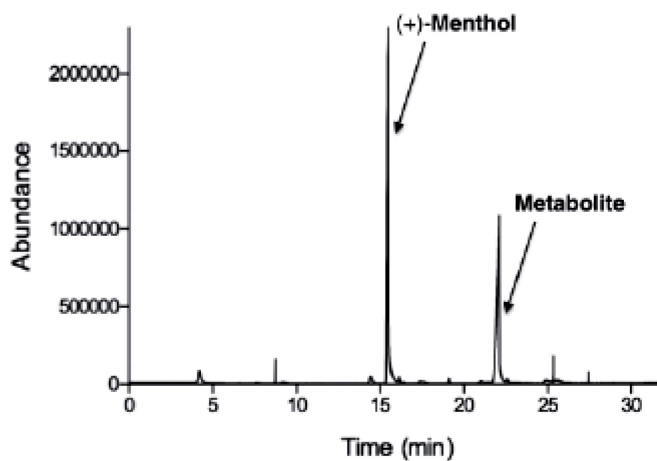


Abb. 2.36 GC-Chromatogramm des (+)-Menthols und den gebildeten Metaboliten⁴³

2.1.9. Thujon

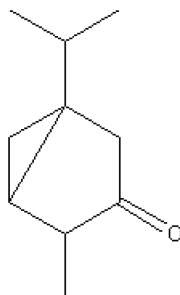


Abb. 2.37 Struktur von α -(-) und β -(+) Thujon⁴⁴

Vorkommen:

Thujon kommt in der Natur als eine Mischung aus α und β Thujon vor, in der größten Menge in *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae) und *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae)(Abb.3.40) (Schönfelder, 2001).

⁴³ (Miyazawa et al.,2011).

⁴⁴ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro



Abb. 2.38 *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae)⁴⁵

Wirkung und Anwendung:

Thujon kommt in Absinth, in der Kräuterméizin und als Würzmittel in Speisen vor (Karin et al., 2000). Das ätherische Öl von *Thuja occidentalis* findet Anwendung als Einreibung gegen Rheuma und Erkältungen (Schönfelder, 2001).

Nachweis von Thujon:

Eine ganz aktuelle Untersuchung von Abbas et al. (Abbas et al., 2011) hatte als Ziel, den Metabolismus von Thujon *in vitro* in menschlichen Lebermikrosomen zu untersuchen und die vier potenziellen Metaboliten und freies Thujon nachzuweisen. Die Nachweismethode war LC-MS.

Ergebnisse:

Es wurden zwei Haupt- und zwei Nebenmetaboliten festgestellt, und zwar 7- und 4-Hydroxythujon mit 90% der Metabolitenausbeute als Hauptmetaboliten und 2-Hydroxythujon und Carvacrol als Nebenmetaboliten. Einerseits wurden zwar keine Glucuronid- oder Sulfatkonjugate entdeckt, andererseits wurden Glutathion und Cysteinkonjugate identifiziert, aber nicht quantifiziert. Das wichtigste CYP-rekombinante Enzym für die Bildung der Hauptmetaboliten 7 und 4-Hydroxythujon ist CYP2A6, und die Enzyme für die Bildung von 4-Hydroxy-thujon sind CYP3A4 und CYP2B6 (Abass et al., 2011).

⁴⁵ (Schönfelder, 2001).

2.1.10. Thymol

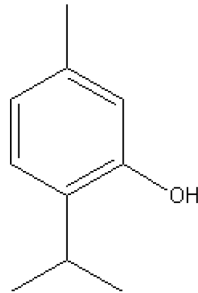


Abb. 2.39 Struktur von Thymol⁴⁶

Vorkommen:

Thymol ist ein Monoterpen-Alkohol, der am häufigsten in *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) und in *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) vorkommt (Abb.3.42) (Schönfelder, 2001).

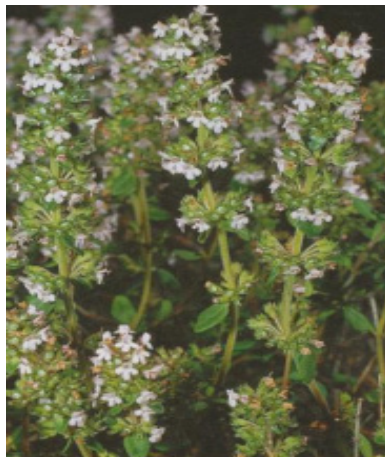


Abb. 2.40 *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae)⁴⁷

Wirkung und Anwendung:

Thymol hat eine spasmolytische, schmerzlindernde und hyperämisierende (Beer et al., 2010) sowie keimtötende und geruchshemmende Wirkung. (Schönfelder, 2001). Es findet Anwendung bei akuter Bronchitis sowohl bei

⁴⁶ Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro

⁴⁷ (Schönfelder, 2001)

Erwachsenen als auch bei Säuglingen (Nauert et al., 2008). Thymol findet auch Anwendung in Mund-, Rasier- und Gurgelwässern und als Hautreizmittel (Schönfelder, 2001).

Nachweis von Thymol:

Um die Indikation des Thymols bei chronischer und akuter Bronchitis, die durch *in vitro*-Ergebnisse nachgewiesen wurde, auch mit den *in vivo*-Ergebnissen zu belegen, beschäftigte sich Kohlert mit seinen Mitarbeitern (Kohlert et al., 2008) mit der systemischen Bioverfügbarkeit und den pharmakokinetischen Parametern des Thymols. An der Studie nahmen zwölf Probanden teil. Sie erhielten *Bronchipret® TP*-Tabletten, die 1.08 mg Thymol enthalten. Dann wurde den Probanden jede 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 24, 31, 38, 48, 55, 62, und 72 Stunden nach Einnahme der Tablette Blut entnommen, zentrifugiert, mit Essigsäure versetzt und bei -20 °C bis zur Analyse mit LC-MS-MS aufbewahrt. Blut wurde wegen der langen Eliminationshalbwertszeit für so lange Zeit entnommen. Harnproben wurden in kleineren Intervallen entnommen, und zwar 0 bis 3, 3 bis 6, 6 bis 9, 9 bis 14, 14 bis 24, 24 bis 31, 38 bis 48, 48 bis 55, 55 bis 62 und 62 bis 72 Stunden, zentrifugiert, mit Ascorbinsäure versetzt und bei -20 °C bis zur Analyse mit LC-MS-MS für Thymolmetaboliten oder GC-MS für die Thymolanalyse aufbewahrt. Für die Probennahme und Extraktion wurde SPME verwendet.

Ergebnisse:

Es wurde weder im Plasma nach einer LC-MS-MS-Analyse noch im Urin nach einer GC-MS-Analyse freies Thymol gefunden. Andererseits wurden die Metaboliten Thymolsulfate und Thymolglucuronide im Urin und nur Thymolsulfate, aber keine Glucuronide im Plasma gefunden. Das Fehlen der Glucuronide im Plasma kann das Ergebnis der geringeren Aktivität der hepatischen UDP-Glucuronyltransferase im Vergleich zur Sulfotransferase sein. Die Plasmakonzentration von $93.1 \pm 24.5 \text{ ng ml}^{-1}$ wurde nach zwei $\pm 0,8$ Stunden erreicht. Die Menge der Metaboliten, die nach 24 Stunden im Urin gefunden wurden, betrug $16.2\% \pm 4.5\%$ der eingenommenen Dosis. Schon nach 20 Minuten konnte Thymolsulfat im Plasma bestimmt werden, was auf eine schnelle Absorption des Thymols hinweist. Die lange Eliminationshalbwertszeit

von 10 bis 12 Stunden kann das Ergebnis der geringen renalen Clearance sein. (Kohlert et al., 2008)

In einer weiteren Untersuchung von Kohlert et al. (Kohlert et al., 2002) wurden Thymolkonzentration und Bioverfügbarkeit durch die zuverlässige und sensitive automatisierte Methode SPME in Kombination mit GC mit FID bestimmt. Die GC Analyse wurde auf einem Hewlett-Packard 5890 Series II mit einem split-splitlosen Injektor durchgeführt. Die Temperatur der Säule erhöhte sich von 80 auf 240°C und die Temperatur von 240°C wurde für 10 Minuten konstant gehalten. Injektor- und Detektortemperatur waren 220 und 250°C und das Trägergas war Helium. Es wurde auch in dieser Studie kein freies Thymol im Plasma festgestellt, und das wurde erst nach enzymatischer Spaltung von Thymolsulfat bestimmt. Die Konzentration wurde nach Einnahme von BronchipretTP-Tabletten (1.08mg des Thymols) gemessen.

Ergebnisse:

Die gemessene Konzentration des Thymols im Plasma hatte eine Spanne von 8.14ng ml⁻¹ fünfzehn Min. nach der Einnahme bis 125 ng/ml⁻¹ zwei Stunden nach der Einnahme der Tablette. Nach 38 Stunden sank die Konzentration wieder auf 8.14 ng ml⁻¹. Die Ausbeute des Thymols ohne enzymatische Spaltung der Phase II Konjugate betrug nur 5%, und nach der Enzymzugabe stieg die Ausbeute auf 33% (Kohlert et al., 2002).

2.1.11. (-)-Verbenon

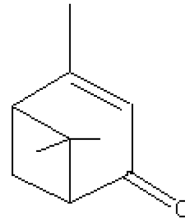


Abb. 2.41 Struktur von Verbenon⁴⁸

Vorkommen:

Verbenon gehört zur Gruppe bicyklischer Monoterpen-Ketone und kommt in *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) in seiner größte Menge vor (Abb.3.44) (Miyazawa et al., 2003).



Abb. 2.42 *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae)⁴⁹

Wirkung und Anwendung:

Verbenon hat eine cholagoge, dyspeptische und spasmolytische sowie sedative Wirkung (Steflitsch, 2007) und findet Anwendung als Duftstoff und Repellent.⁵⁰

⁴⁸Grafik erstellt mit CS Chem Draw Pro

⁴⁹Siehe

(<http://www.uniduesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Blattgewuerze/german/chemie/verbenon.html>)

Nachweis von (-)- Verbenon:

In der Studie von Miyazawa und Mitarbeitern (Miyazawa et al., 2002) wurden Metabolismus und Nachweis von Verbenonmetaboliten untersucht. Die Metaboliten wurden mit HPLC analysiert und mit UV bei 251 nm detektiert (Miyazawa et al., 2003). Der Metabolismus des Verbenons erfolgte mit menschlichen Lebermikrosomen und rekombinanten Cytochrom P450-Enzymen. Eine Standardinkubationsmischung aus humanen Lebermikrosomen oder rekombinanten P450-Enzymen und Verbenon wurde in einen Kaliumphosphatpuffer, der NADPH-System enthält, zugegeben. Nach der Inkubation wurde Dichlormethan dazugefügt, zentrifugiert, die organische Phase wurde eingedampft und für die HPLC-Analyse in 40% Methanol aufgelöst. Der aliquote Teil der Probe wurde für die Analyse in HPLC mit Spektralfluorometer verwendet. Der Eluent bestand aus 40% Methanol mit NaClO_4 (pH=2.5) und die UV-Detektion wurde bei 251 nm durchgeführt.

Ergebnisse:

10-Hydroxyverbenon wurde als Hauptmetabolit identifiziert und CYP 2A6 als Hauptenzym der Metabolisierung katalysiert. Die Michaelis-Menten-Konstante für humane Lebermikrosomen betrug:

$V_{\max}/K_{\max}$:

Humane Lebermikrosome (HL)-J22 0.04; HL-C12: 0.006

rekombinante humane P450 Enzyme CYP2A6: 0.94; CYP2B6: 0.23

Das Verhältnis von $V_{\max}/C_{\max}$ war viermal höher bei CYP2A6 als bei CYP2B6 (Abb.2.45) (Miyazawa et al., 2003).

⁵⁰ Siehe

(<http://www.uniduesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Blattgewuerze/german/chemie/verbenon.html>)

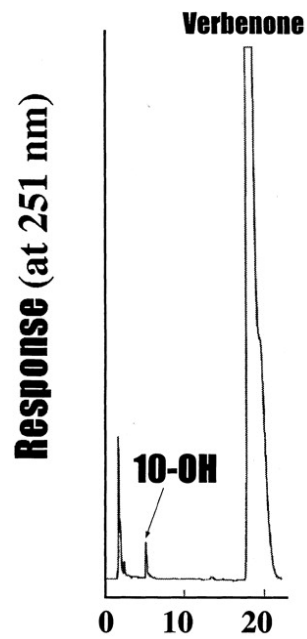


Abb. 2.43 HPLC- Chromatogramm von (-)-Verbenon und 10-Hydroxy Metaboliten⁵¹

Die Arbeitsgruppe von Miyazawa hatte bereits im Jahr 2002 10-Hydroxy-(-)-verbenon Metaboliten mittels GC-MS nachgewiesen. (Miyazawa et al, 2002).

⁵¹ (Miyazawa, 2003)

2.2. Sesquiterpene

2.2.1. α -(-)- Bisabolol

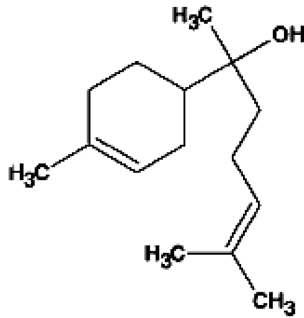


Abb. 2.44 Struktur von alpha Bisabolol⁵²

Vorkommen:

Alpha-Bisabolol ist ein monozyklischer Sesquiterpenalkohol, der zum ersten Mal aus *Matricaria Chamomilla* L-(Asteraceae) isoliert wurde (Abb.3.47) (Perbellini et al., 2010).



Abb. 2.45 *Matricaria recutita* L. (Asteraceae)⁵³

Wirkung und Anwendung:

⁵² (Perbellini et al., 2010)

⁵³ (Schönfelder, 2001).

Alpha-Bisabolol weist eine entzündungshemmende, krampflösende, antiallergische und antikanzerogene Wirkung auf (Perbellini et al., 2010). Neben der Verwendung in der Kosmetik wie in Shampoos, Duftstoffen und Pflegeprodukten findet Bisabolol auch Anwendung in pharmazeutischen Zubereitungen, die am häufigsten auf die aufgezählten Wirkungen und seine Eigenschaft, die Resorption von anderen Substanzen zu verbessern, bezogen sind (Perbellini et al., 2010).

Nachweis von alpha Bisabolol:

In einer Untersuchung von Perbellini und Mitarbeitern wurden folgende zwei Methoden verwendet, um Bisabolol im Blut zu detektieren: μ HPLC–ESI-MS und HS-GC–MS. Man versuchte die Vorteile beider Methoden auszunutzen, nämlich einerseits die Fähigkeit der GC flüchtige Substanzen nachzuweisen, andererseits die hohe Kompatibilität der HPLC mit feinen biologischen Molekülen.

Für die Vorbereitung der Probe für das μ HPLC–ESI-MS wurde humanes Blut entnommen, mit Bisabolol versetzt, mit Wasser verdünnt und mit Hexan extrahiert. Nach dem Mischen und Zentrifugieren wurde die organische Phase eingedampft, mit Methanol aufgelöst und injiziert. Die Analyse wurde auf dem 1100 FC-MS durchgeführt.

Andererseits wurde in der Vorbereitung der Probe für die HS-GC-MS Blut mit Bisabolol, mit Wasser verdünnt, gemischt und in eine Head-Space-Phiole überführt, die für eine Stunde auf 125 °C gehalten wurde, bevor mit der Analyse begonnen wurde. Die Analyse wurde auf dem 6890 Gaschromatograph (Hewlett-Packard), der mit dem 5973 Massendetektor gekoppelt war, durchgeführt. Die GC-Apparatur war mit einer Säule der Maße 30 m $\times$ 0.32 mm ausgerüstet.

Acht Blutproben, mit Alpha-Bisabolol versetzt, wurden für die Erstellung von Kalibrierungsgeraden und zur Berechnung von Nachweisgrenzen verwendet.

Ergebnisse:

Da sich Bisabolol nur zu 10% im Blutplasma befindet, wurde Gesamtblut nach Verdünnung 1:3 mit Wasser für die Analyse verwendet. Im folgenden Chromatogramm (Abb.2.48) sieht man unter A eine Blindprobe des Blutes und

unter B Blut mit 2 $\mu\text{mol/l}$ Bisabolol versetzt. Das häufigste Ion wurde bei m/z 205 mit einer Retentionszeit von 3 Minuten festgestellt. Die mittlere Ausbeute des Bisabolols betrug 45%, wenn die Extraktion mit Hexan erfolgte, und diese Ausbeute konnte durch Extraktion mit Methylenchlorid nicht verbessert werden. Die Nachweisgrenze war 0.125 $\mu\text{mol/L}$. Diese Methode verlangt sensitive Extraktion, ist zeitaufwendiger und komplizierter als HS-GC-MS, ist aber nicht auf flüchtige Substanzen beschränkt, was die Analyse von Bisabololmetaboliten, die polarer sind, ermöglicht.

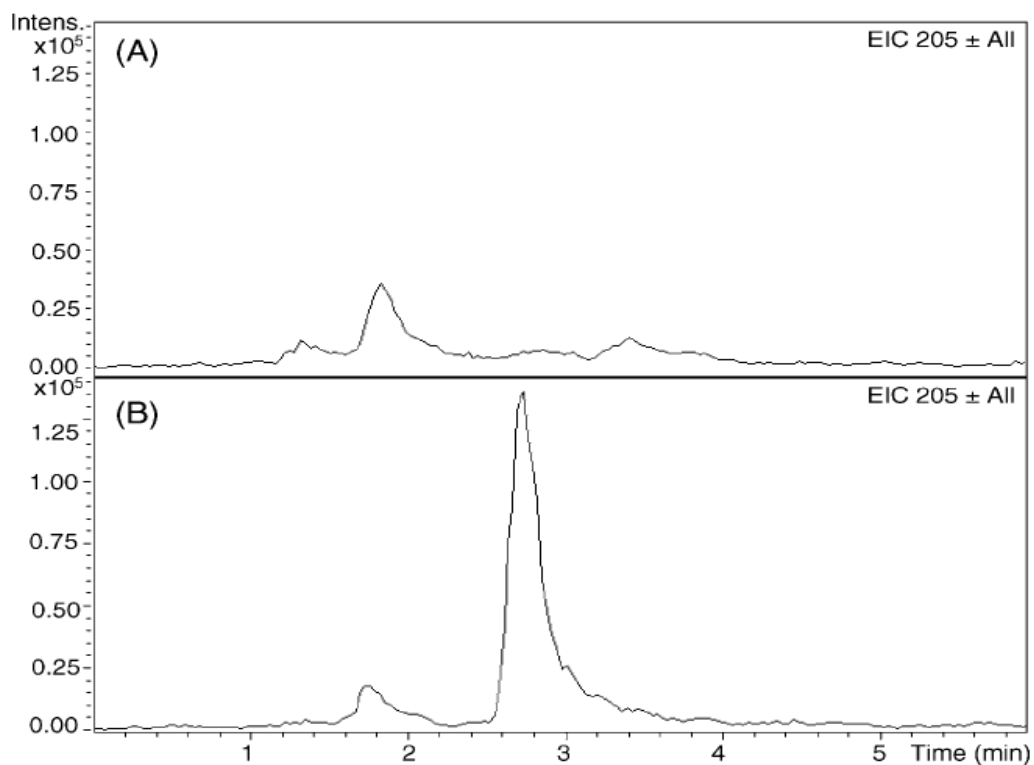


Abb. 2.46 Einzelion Massenchromatogramm Chromatogramm: (A) Chromatogramm der Blindprobe des Blutes (B) Chromatogramm des Blutes mit Bisabolol versetzt ⁵⁴

Das folgende Chromatogramm zeigt den Peak für die Blindprobe des Blutes, und den Peak jenes Blutes, das mit dem Alpha Bisabolol versetzt wurde. Die Nachweisgrenze war 0.13 $\mu\text{mol/l}$. (Perbellini et al., 2010).

⁵⁴ (Perbellini et al., 2010).

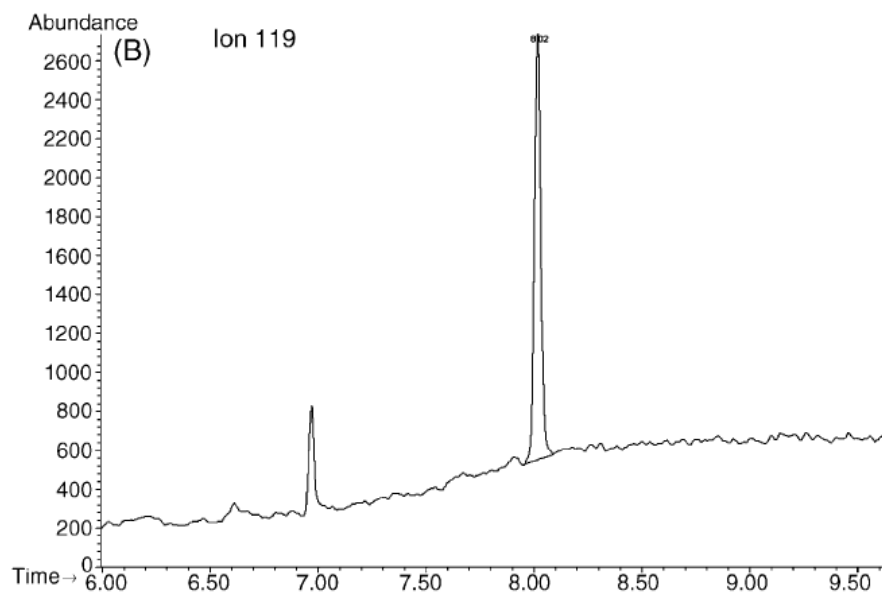
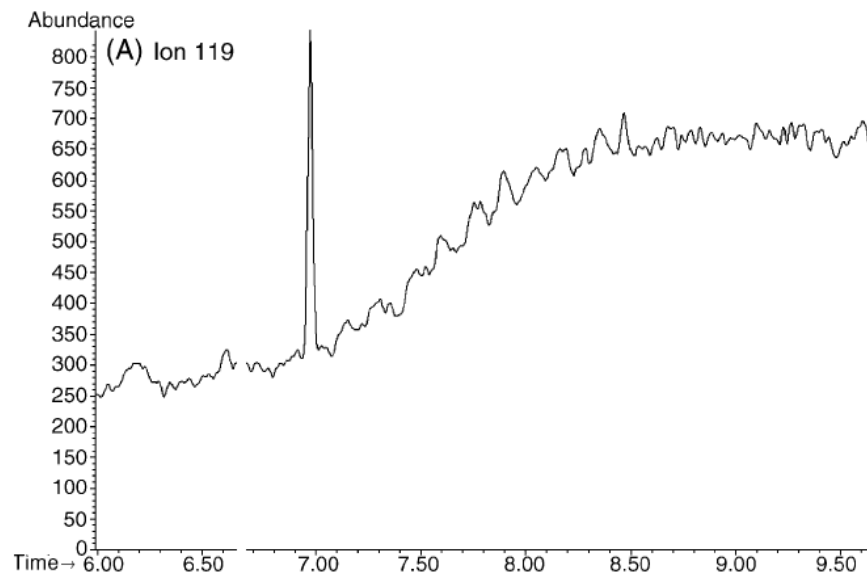


Abb. 2.47 Einzel Ion Chromatogramm von : (A)-Blut- Blindprobe ; (B)- Blut mit 2 μ mol/l des Alpha Bisabolols

HS-GC–MS erwies sich als die leichtere und schnellere Methode für die Bestimmung des Bisabolols im Blut. Die Extraktion und Probenvorbereitung ist sehr kurz, nachdem man die notwendigen Bedingungen, sprich Temperatur, eingestellt hat. Im Vergleich zum dem ESI-Spektrum zeigt sich beim Elektronenstoß- Massenspektrum eine höhere Fragmentierung mit dominanten Ionen bei m/z : 109, 119 und 205 (Perbelini et al., 2010).

2.2.2. Artemisinin

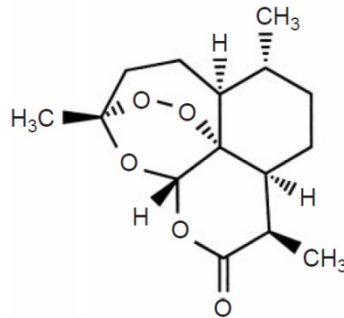


Abb. 2.48 Struktur von Artemisinin⁵⁵

Vorkommen:

Artemisinin ist ein Sesquiterpenlacton mit einer Peroxidbrücke im Ringsystem, die für seine Hauptwirkung wichtig ist. Es wurde schon 1972 aus *Artemisia annua* L. (Asteraceae) isoliert und seine Struktur 1979 aufgeklärt (Abb.3.51) (Balint, 2001).



Abb.2.51 *Artemisia annua* L. (Asteraceae)⁵⁶

Wirkung und Anwendung:

Artemisia annua wird seit 2000 Jahren in der chinesischen Medizin bei Erkältungen und Fieber verwendet. Artemisinin als Hauptkomponente weist eine antiparasitäre Wirkung auf und wird als effektives Mittel gegen mit *Plasmodium vivax* verursachte Malaria eingesetzt (Balint, 2001).

⁵⁵ (Balint, 2001)

⁵⁶ Siehe (<http://www.phytodoc.de/heilpflanze/beifuss-einjaehriger/>)

Nachweis von Artemisinin:

Der oralen Aufnahme von Artemisinin folgt eine rasche Absorption und Elimination, wobei die maximale Plasmakonzentration innerhalb von ein bis zwei Stunden erreicht wird. Andererseits zeigen die renale und die rektale Applikation eine langsamere Absorption und Eliminierung (Balint, 2001).

Die Quantifizierung von Artemisinin ist seit langem problematisch, weil es keine ultravioletten oder fluoreszierenden Chromophore besitzt, die die Detektion erleichtern.

In der Studie von Karikari et al. (Karikari et al., 2006) wurde eine einfache, selektive und sensitive HPLC- Peroxyoxalat-Chemolumineszenz(PO-CL)-Methode für die Artemisininkonzentration in humanem Serum entwickelt. Die Verwirklichung dieser Methode wird durch die Tatsache ermöglicht, dass Endoperoxide, die in der Artemisininstruktur vorkommen, unter UV- Bestrahlung in Hydroperoxide (H_2O_2) übergehen können. Die entstandene H_2O_2 reagiert mit bis (2,4-Dinitrophenyl) Oxalat (DNPO) zur 2,4,6,8-Tetrathiomorphorinopyrimido (5,4-d)-pyrimidin (TMP). TMP wird zuerst in angeregtem Zustand gebracht, dann kehrt es zurück.

Das gesamte Licht, das dadurch emittiert wird, ist proportional zu der Artemisininkonzentration.

Als Extraktionsmethode wurde Flüssigextraktion, und zwar mit *n*-Hexan, gewählt, da sie gute Ausbeute verspricht. Für die Extraktion wurde dem Humanserum *n*-Hexan zugefügt, worauf Zentrifugieren folgte. Die erhaltene organische Phase wurde zur trockenen eingedampft und ins HPLC-PO-CL-System mit dem Injektionsvolumen von 20 μL injiziert.

Das HPLC-PO-CL-System, das verwendet wurde, bestand aus zwei Flüssigchromatographiepumpen mit dem Rheodyne 7125-Injektor und einer UV- Lampe mit 250nm und 10 W. Als mobile Phase wurde Imidazol- HNO_3 mit 70% Acetonitril verwendet, und eine Mischung aus DNPO und TMP wurde als CL-Reagenz verwendet. Die Flussrate der mobilen Phase und CL-Reagenz betrugen 0.5 und 1.0 mL /Min.

Ergebnisse:

Die Flüssig-flüssig-Extraktion ermöglichte 94.2% der Ausbeute. Artemisinin konnte mit HPLC-PO- CL mit UV-Bestrahlung detektiert werden (Abb.3.52). Diese Methode ist einfach, schnell, nicht teuer und erlaubt eine schnelle und einfache Probenvorbereitung (Karikari et al., 2006).

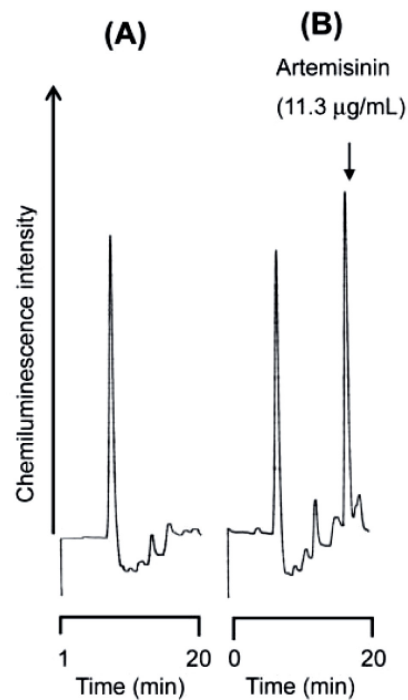


Abb. 2.52 Chromatogramm des Humanserums (A) und des Humanserums mit Artemisinin 11,3 g / ml versetzt(B)⁵⁷

⁵⁷ (Karikari et al., 2006).

3. DISKUSSION

In der wissenschaftlichen Literatur findet man viele *in vitro*- und *in vivo*-Studien über Terpene, deren Wirkung, deren mögliche Anwendung und deren Nachweis in Körper. Die größte Zahl der Studien wurde aber an Tieren durchgeführt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die vorhandenen Studien über Quantifizierung von ausgewählten Monoterpenen und Sesquiterpenen im menschlichen Körper zusammenzufassen. Die Analysen wurden in biologischen Flüssigkeiten des Menschen, vor allem in Blut und Harn, durchgeführt. Die Hauptmethoden, die diese Quantifizierung bzw. den Nachweis von Terpenen ermöglichen, sind laut vielen Studien vor allem GC und HPLC, zumeist mit MS gekoppelt. Die Methode der GC wurde im Vergleich zur HPLC wegen der flüchtigen Eigenschaften des ätherischen Öls in mehreren Studien angewendet. (Miyazawa et al. 2011; Schulz et al., 2009; Spichiger et al., 2004; Wang et al., 2007; Horst et al., 2010) Die HPLC kommt aber auch in vielen Studien zum Einsatz (Chow et al., 2002; Schauer et al., 2006; Miyazawa et al., 2002). Ein direkter Vergleich zwischen diesen zwei Methoden wurde z.B. in der Studie von Perbelini und Mitarbeitern bei der Quantifizierung von Alpha (-)-Bisabolol gemacht. Beide Methoden sind von großer Bedeutung. Einerseits könnte die GC wegen ihrer Fähigkeit, das flüchtige Bisabolol effektiv und kostengünstig zu quantifizieren, die Methode der Wahl sein. Andererseits beschränkt sich die HPLC nicht nur auf flüchtige Stoffe und könnte für die Quantifizierung polarerer Bisabololmetaboliten die Methode der Wahl sein, obwohl sie teurer ist. Es gibt also viele Möglichkeiten, wie man die Quantifizierungsgrenzen und die Qualität eines Nachweises erhöhen kann.

Die Wichtigkeit dieser beiden Methoden erkennt man auch daran, dass man durch sie auch zu spezies-, geschlechts- und stereoselektiven Unterschieden bei Terpenen kommen kann.

So wurde z.B. in der Studie von Gyobu et al. (Gyobu et al., 2007) nur ein Camphermetabolit nämlich 5- *exo*- Hydroxycampher bei den Menschen mit GC-MS nachgewiesen. Da in vielen früheren Studien an Tieren mehrere Camphermetaboliten gefunden wurden, kamen Gyobu und seine Mitarbeiter

zu dem Schluss, dass ein speziesspezifischer Unterschied im Camphermetabolismus vorliegt.

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied wurde bei der Untersuchung am 4-MBC 3-(4- Carboxybenzyliden)-Campher in der Studie von Schauer und Mitarbeitern festgestellt (Schauer et al., 2006). Die maximale Plasmakonzentration von 4-MBC und die Biverfügbarkeit war nämlich bei männlichen Probanden zweimal höher als bei weiblichen.

Auch bei den Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* gab es Unterschiede. So wies Jäger mit Mitarbeitern (Jäger et al., 2001) einen stereoselektiven Unterschied im Carvonmetabolismus nach.

In der Studie von Friedl et al. (Friedl et al., 2010) wurden drei verschiedene Extraktionsmethoden verglichen, nämlich statische HS/GC-MS, HS-SPME/GC-MS und Flüssig-Flüssig-Probenaufnahme/GC-MS. Die statische HS/GC-MS hat sich wegen der einfachen Handhabung von Blutproben und wegen der kurzen Analysezeit als einfachste erwiesen. In der Untersuchung von Schulz et al. (Schulz et al., 2009) wurde die SPME-Methode mit vier verschiedenen Fasern ausprobiert, um festzustellen, wann die größte Ausbeute gewonnen wird.

Es sind noch viele weitere Untersuchungen an Mono- und Sesquiterpenen vor allem an Menschen notwendig, damit ihr Einsatz, ihre Dosierung und ihre Wirkung optimiert werden können.

Abbildungsverzeichniss

Abb. 1.1 Isopreneinheit	10
Abb. 1.2 Aufbau eines Gaschromatographen.....	13
Abb. 1.3 Aufbau eines Massenspektrometers	16
Abb. 1.4 Aufbau einer HPLC-Apparatur.....	17
Abb. 2.1 (-)- Campher	19
Abb. 2.2 <i>Cinnamomum Camphora</i> L. (Lauraceae).....	19
Abb. 2.3 GC Chromatogramm von Campher Metaboliten im Menschen	21
Abb. 2.5 Konzentration-Zeit Verlauf von 4MBC nach dermalen Applikation von 4% Zubereitung	24
Abb. 2.6 (+)- Carvon	25
Abb. 2.7 <i>Carum Carvi</i> L. (Apiaceae).....	25
Abb. 2.8 GC-Chromatogramm von (-)- Carvon (A) und (+)-Carvon (B) nach Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen	26
Abb. 2.9 GC- Chromatogramm von 4R,6S-(-)-Carveol (A) und 4S,6S-(+)-Carveol (B), nach Inkubation von –(-) Carvon und –(+) Carvon mit NADPH.....	27
Abb. 2.10 Plasmakonzentration von (-)- Carvon oder (+)- Carvon nach einer topischen Applikation von 300 mg des Carvons	29
Abb. 2.11 Die Bildung von von R-(-) beziehungsweise S-(+)-Carvon Metaboliten abhängig von der Stereoselektivität.....	30
Abb. 2.12 (-)-Carvon	30
Abb. 2.13 <i>Mentha Spicata</i> L. (Lamiaceae).....	31
Abb. 2.14 Plasmakonzentration des Carvons in Abhängigkeit von 3 verschiedenen Massagetechniken	33
Abb. 2.15 1,8 Cineol.....	33
Abb. 2.16 <i>Eucalyptus globules</i> Labill (Myrtaceae).....	34
Abb. 2.17 Konzentrations-Zeit Verlauf des 1,8 Cineols	35
Abb. 2.18 GC-MS Chromatogramm des Urinextraktes von zwei Männern (A und B) und einer Frau (C) nach oraler Applikation von 1,8- Cineol.....	37
Abb. 2.19 Fenchon	39
Abb. 2.20 <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (Apiaceae)	39

Abb.2.21 6-exo-Hydroxyfenchon; 6-exo-Hydroxyfenchon; 10-Hydroxyfenchon Entstehung durch rekombinante P-450 Enzyme	41
Abb. 2.22 (+)- Limonen	41
Abb. 2.23 <i>Citrus aurantium</i> L. (Rutaceae)	42
Abb. 2.24 Plasmakonzentration/Zeit Verhältniss von Limonen und Huptmetaboliten bei einer Dosisapplikation von 10 g/m ²	43
Abb. 2.25 Der Einfluss von:(A) Inkubationszeit;(B)-Proteinkonzentration;(C) Limonenkonzentration auf die Entstehung von Oxidationsprodukte (+)- und (-)-trans-Carveol (offene Symbole) und (+)- und (-) - Perillyl Alkohol (geschlossene Symbole).....	45
Abb. 2.26 Verhältniss zwischen Cyp2C9 und Cyp2C19 und Konzentration von gebildeten Metaboliten: Carveol und (+)- (-)-Perillyl Alkohol.....	45
Abb. 2.27 HPLC Chromatogramm 2 und 24 Stunden nach der Limonadenkonsumation	47
Abb. 2.28 Plasmakonzentration der Perillasäure nach Einnahme 596 oder 496 mg des D-Limonens	48
Abb. 2.29 Plasmakonzentration des D-Limonens nach einer Applikation von 300mg des D-Limonens bei 24 gesunden Probanden.....	49
Abb. 2.30 Linalool	50
Abb. 2.31 <i>Cinnamomum Camphora</i> L. (Lauraceae)	51
Abb. 2.32 <i>Ocimum basilicum</i> L. (Lamiaceae).....	51
Abb. 2.33 Menthol.....	52
Abb. 2.34 <i>Mentha Piperita</i> L. (Lamiaceae)	53
Abb. 2.35 Mentholglucuronid Konzentration nach orale Applikation von Mentholkapseln (obere Kurve) bzw. von Menthol Bonbons oder Tees (untere Kurve)	55
Abb. 2.36 Mentholglucuronid Plasmakonzentration nach Applikation von 100 mg Menthol.....	57
Abb. 2.37 Mentholkonzentration/Zeit bei drei verschiedenen Applikationskonzentrationen des "Bramsch Pfefferminzlikörs" vor und nach Enzymspaltung	59
Abb. 2.38 GC-Chromatogramm des (+)-Menthols und den gebildeten Metaboliten	60
Abb. 2.39 Thujon	60
Abb. 2.40 <i>Artemisia absinthium</i> L. (Asteraceae)	61
Abb. 2.41 Thymol.....	62
Abb. 2.42 <i>Thymus vulgaris</i> L. (Lamiaceae).....	62
Abb. 2.43 Verbenon.....	65
Abb. 2.44 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.(Lamiaceae)	65
Abb. 2.45 HPLC- Chromatogramm von (-)- Verbenon und 10-Hydroxy Metaboliten.....	67
Abb. 2.46 α -Bisabolol	68

Abb. 2.47 <i>Matricaria recutita</i> L. (Asteraceae)	68
Abb. 2.48 Einzelion Massenchromatogramm Chromatogramm: (A) Chromatogramm der Blindprobe des Blutes (B) Chromatogramm des Blutes mit Bisabolol versetzt	70
Abb. 2.49 Einzel Ion Chromatogramm von : (A)-Blut- Blindprobe ; (B)- Blut mit 2µmol/l des Alpha Bisabolols.....	71
Abb. 2.50 Artemisinin	72
Abb. 2.51 <i>Artemisia annua</i> L. (Asteraceae).....	72
Abb. 2.52 Chromatogramm des Humanserums (A) und des Humanserums mit Artemisinin 11,3 g / ml versetzt(B)	74

Literaturverzeichnis

Abass K., Reponen P., Mattila S., Pelkonen O.: Metabolism of α -thujone in human hepatic preparations *in vitro* Xenobiotica, 2011; **41**(2); 101-111

Balint G.A.: Artemisinin and its derivatives an important new class of antimalarial agents, Pharmacology & Therapeutics, 200; **90**; 261– 265

Beer A.M., Lukanov J., Sagorchev P.: Investigations into the specific effects of rosemary oil at the receptor level, Zeitschrift für Phytotherapie 2010; **31**(2), 74-78

Breitmaier E.: Terpenes, Flavours, Fragrances, Pharmaca, Pherohormons, Willey-VCH, Weinheim, 2006 ; 1-30

Chan K.: Quantitation of monoterpenoid compounds with potential medicinal use in biological fluids, Journal of Chromatography A, 2001, **936**; 47-57

Chen X., Yano Y., Hasuma T., Yoshimata T., Yinna W., Otani S.: Inhibition of farnesyl protein transferase and P21ras membrane association by d-limonene in human pancreas tumor cells in vitro.Chin Med Sci J. 1999 ; **14**(3); 138-44

Chow S.H.H., Salazar D., Hakim I.A.: Pharmacokinetics of Perillic Acid in Humans after a Single Dose Administration of a Citrus Preparation Rich in d-Limonene Content, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 2002; **11**; 1472

Duisken M., Sandner F., Blömeke B., Hollender J.: Metabolism of 1,8-cineole by human cytochrome P450 enzymes identification of a new hydroxylated metabolite, Biochimica at Biophysica Acta, 2005; **1722**; 304-316

Durrer, S., Maerker K., Schlumpf M., Lichtensteiger W.: Estrogen target gene regulation and coactivator expression in rat uterus after developmental exposure to the UV filter 4-methylbenzylidene camphor, Endocrinology, 2005; **146**, 2130–2139

Eccles R., Jones A.S., The effect of menthol on nasal resistance to air flow, J. Laryngol. Otol. ,1983; **97**(8):705-9

Friedl S.M., Oedendorfer K., Kitzer S., Reznicek G., Sladek G., Heuberger E.: Comparison of liquid-liquid partition, HS-SPME and static HS GC/MS analysis for the quantification of (-)-linalool in human whole blood samples. Nat Prod. Commun., 2010; **5**(9);1447-52

Gelal A., Jacob P., Yu L., Benowitz N.L.: Disposition kinetics and effects of menthol: Clinical Pharmacology & Therapeutics , 1999; **66**; 128-135

Gey H.: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2008 ; 91-93; 63-65

Gyobu K., Miyazawa M.: In Vitro Metabolism of (-)-Camphor Using Human Liver Microsomes and CYP2A6 , Biol. Pharm. Bull. 2007; **30**(2); 230—233

Hakim I.A., Harris R.B.: Joint effects of citrus peel use and black tea intake on the risk of squamous cell carcinoma of the skin, BMC Dermatology, 2001; **1**; 3

Heuberger E., Redhammer S., Buchbauer G.: Transdermal Absorption of (-)-Linalool Induces Autonomic Deactivation but has No Impact on Ratings of Well-Being in Humans, Neuropsychopharmacology, 2004; **29**; 1925-1932

Horst K., Rychlik M.: Quantification of 1,8-cineole and of its metabolites in humans using stable isotope dilution assays; 2010; **54**; 1515-1529

Höld M.K., Sirisoma S.N., Casida J.E.: Detoxification of - α and - β Thujones (the Active Ingredients of Absinthe) Site Specificity and Species Differences in Cytochrome P450 Oxidation *in Vitro* and *in Vivo*, Chem. Res. Toxicol. 2001;**14**; 589-595

Hübschmann H.J. : Handook of GC/MS, Fundamentales and Applications Willey-VCH, Weinheim, 2009; 12-15, 96-97

Jäger W., Buchbauer G., Jirovetz L., Fritzer M. : Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil, J.Soc.Cosmet.Chem. 1992 ;**43**; 49-54

Jäger W., Nasel B., Binder R., Stimpfl T., Vycudilik W., Buchbauer G.: Pharmacokinetic Studies of the Fragrance Compound 1,8-Cineol in Humans during Inhalation Chemical Senses, 1996; **21**(4); 477-480

Jäger, W., Mayer, M., Platzer P., Reznicek G., Dietrich H., Buchbauer G.: Stereoselective Metabolism of the Monoterpene Carvon by Rat and Human Liver Microsomes, J.Pharm.Pharmacol., 2000; **52**; 191-197

Jäger W., Mayer M., Reznicek G., Buchbauer G.: Percutaneous absorption of the monoterpene carvon: Implication of stereoselective metabolism on blood levels, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001; **53**; 637-642

Kamatou G.P.P., Viljoen A.M.: A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils, J Am Oil Chem Soc , 2010; **87**; 1–7

Karikari A.A., Kishikawa N., Ohba Y., Nakashima K., Kuroda N.: Determination of artemisinin in human serum by high-performance liquid chromatography with on-line UV irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection Biomed. Chromatogr., 2006; **20**: 1157–1162

Kataoka H.: Recent Advances in Solid-Phase Microextraction and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Current Pharmaceutical Analysis, 2005; **1**(1); 65-84

Kohlert C., Abel G., Schmidt E., Veit M.: Determination of thymol in human plasma by automated headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis, Journal of Chromatography B, 2002; **767**(1); 11-18

Kohlert C., Schindler G., März R.W., Abel G., Brinkhaus B., Derendorf H., Grafe E.U., Veit M.: Systemic Availability and Pharmacokinetics of Thymol in Humans, J Clin Pharmacol, 2002; **42**; 731-737

- Krishnaiah Y.S., Chandrasekhar D.V., Rama B., Jayaram B., Satyanarayana V., Al-Saidan S.M.:** In vivo evaluation of limonene-based transdermal therapeutic system of nicorandil in healthy human volunteers, *Skin Pharmacol Physiol.*, 2005; **18**(6); 263-72.
- Kubelka W., Länger R.** Pflanzliche Arzneispezialitäten aus Österreich Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, 2001/2002 ; 2 Auflage
- Lehrner J., Marwinski G., Lehr S., Jöhren P., Deecke L.:** Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. *Physiol. Behav.*, 2005; **86**; 92-95.
- Martin D., Valdez J., Boren J., Mayersohn M.:** Dermal Absorption of Camphor, Menthol, and Methyl Salicylate in Humans, *J. Clin. Pharmacol.*, 2004; **44**(10); 1151-1157
- Mascher H., Kikuta C., Schiel H.:** Pharmakokinetik von Carvon und Menthol nach Gabe einer Pfefferminzöl und Kümmelöl enthaltenden magensaftresistenten Formulierung, *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2002; **152**(15-169); 432-436
- McKay D.L., Blumberg J.B.:** A review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha Piperita* L.), *Phytotherapy Research*, 2006; **20** (8); 619-633
- Miyazawa M., Shindo M., Shimada T.:** Metabolism of (+)- and (-)-Limonenes to Respective Carveols and Perillyl Alcohols by CYP2C9 and CYP2C19 in Human Liver Microsomes *Drug Metabolism and Disposition*, 2002; **30**(5); 602-607
- Miyazawa M., Sugie A., Shimada T.:** Biotransformation of (-)- Verbenon by Human Liver Microsomes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 2002; **66**; 2458-2460
- Miyazawa M., Sugie A., Shimada T.:** Roles of human CYP2A6 und 2B6 und Rat CYP 2C11 und 2B1 in the 10-Hydroxylation of (-)- Verbenone by liver microsomes. *Drug, Metabolism & Disposition*, 2003; **31**; 1049-1053

Miyazawa M., Gyoubu K.: Metabolism of (-)- fenchone by CYP2A6 and CYP2B6 in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 2007; **37**(2); 194-201

Miyazawa M., Marumoto S., Takahashi T., Nakahashi H., Haigou R. Nekanishi K.: Metabolism of (+) and(-) –Menthols by CYP2A6 in Human Liver Microsomes, *Journal of Oleo Science*, 2011; **60**(3); 127-132

Motomura N., Sakurai A., Yostuya Y: Reduction of menthal stress with lavendel odorant: *Percept Most Skills* , 2001; **93**(3); 713-8

Fuchs N., Jäger W., Lenhardt A., Böhm L., Buchbauer I., Buchbauer, G.: Systemic Absorption of topically applied carvone: Influence of massage technique, *J.Soc.Cosmeti.Chem.*, 1997; **48**; 277-282

Otto M. : *Analytische Chemie Wiley –VCH, Weinheim*, 2006; 324-332; 475

Perbellini L., Gottardo R., Caprini A., Bortolotti F., Mariotto S., Tagliaro F.: Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC–ion trap MS and head space-GC–MS methods, *Journal of Chromatography B*, 2004; **812**; 373–377

Rudolf H., Otto S.: *Pharmakognosie- Phytopharmazie*, Springer- Verlag Heidelberg, 2010 ; 998; 1042

Samarasekera R., Weerasinghe I.S., Hemalal K.P.: Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes, *Pest Manag Sci*, 2008; **64**(3); 290-5

Schauer, U.M.D., Völkel, W., Heusener A., Colnot T., Broschard T.H., Landenberg F., Dekant W.: Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene) camphor in rats and humans after dermal application, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006; **216** (2); 339-346

Schandry R., Nussbaumer J., Hahnenkamp S.: Die Wirkung eines campherhaltigen Phytopharmakons auf den Ruheblutdruck und die kognitive Leistung bei essenzieller Hypotonie, *Kongressband Phytopharmaka Phytotherapie*, 2008; **28**

Schmidt M.: Fixed combination of thyme herb and primula root fluid extracts against cough A non-interventional study with Bronchicum® Elixir in infants
Zeitschrift für Phytotherapie, 2008; **29**(1); 7-14

Schulz K., Bertau M., Schlenz K., Malt S., Dreßler J., Lachenmeier D.W.,
Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry determination of the characteristic flavourings menthone, isomenthone, neomenthol and menthol in serum samples with and without enzymatic cleavage to validate post-offence alcohol drinking claims ,Analytica Chimica Acta, 2009; **646**(1-2); 128-140

Schwedt G. : Taschenatlass der Analytik Wiley-VCH Weinheim, 2007; 122-126

Schönfelder I., Schönfelder P.: Der neue Kosmos Heilpflanzenführer, Franckh-Kosmos Verlags-GmbH&Co, 2001, Stuttgart, 252;258;174;272;114

Spichigera M., Mühlbauer R.C., Brenneisen R.: Determination of menthol in plasma and urine of rats and humans by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, Journal of Chromatographie B, 2004; **799**; 111-117

Steflitsch W., Steflitsch M.: Aromatherapie Wissenschaft- Klinik- Praxis- Springer Verlag, Wien, Hrsg.: Michaela Steflitsch und Michaela Steflitsch, 2007; Teil II, 325-330; 73

Svensson A.: Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the *in vitro* metabolism of artemisinin, 1999; **48**(4); 528-535

Tiefenbacher G.: Wirkung des chiralen Monoterpens Linalool auf Parameter des autonomen Nervensystems bei Sympathikuserregung, 2008, Wien

Vigushin D.M., Poon G.K., Boddy A., English J., Halbert G.W., Pagonis C., Jarman M., Coombes R.C.: Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Chemother Pharmacol, 1998; **42**(2); 111-7

Vonarburg B.: Homöotank Farbiger Arzneipflanzenführer der klassischen Homöopathie , Karl F. Haug Verlag, Stuttgart, 2 Auflage; 2005; 324

Wang S., Chen Y., Gao Z., Xiong M., Zhong Z., Ye L.: Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of D-Limonene in human plasma; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007; **44**(5); 1095-1099

Wasner G., Naleschinski D., Binder A., Schatteschneider J., McLachlan E.M., Baron R.: The effect of menthol on cold allodynia in patients with neuropathic pain. Pain Med., 2008; **9**(3); 354-8.

Werner, M., Braunschweig, R.: Praxis Aromatherapie, Karl F.- Haug Verlag, Stuttgart, 2006; 37

<http://www.bio-gaertner.de/pflanzen/Basilikum>: **Der Bio Gärtner**, (aufgerufen im März, 2011)

http://campus.doccheck.com/uploads/tx_dcmedstudscripts/3316_pharmakokinetik.pdf: **Institut für Biochemische Pharmakologie Universität Innsbruck**, (aufgerufen im Jänner, 2011)

<http://chemiedidaktik-graz.at/content/pdf/citronensaure.pdf>: **Chemiedidaktik**, (aufgerufen im Februar, 2011).

<http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/oc/terpene/campher.html>: **Institut für Chemie und Biochemie**, (aufgerufen im Februar, 2011).

<http://www.feeling.at/osshop/eukalyptusoel-globulus-eucalyptus-globulus-p-59.html?gclid=COq04f2H26YCFdSFzAod0hsm7A>: **Feeling**, (aufgerufen im Februar, 2011).

<http://www.feenkraut.de/herbs/Kampher.html>, **Heilpflanzen und Heilkräuter** (aufgerufen im Dezember, 2011).

http://www.heilpflanzen-suchmaschine.de/kampferbaum/kampferbaum_bilder.shtml (aufgerufen im Jänner, 2011).

<http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/proteomics/neueseite.html>:

Universität Heidelberg, (aufgerufen im Februar, 2011)

https://online.uni-graz.at/kfu_online/webnav.ini: **Uni Graz Online**: (aufgerufen, Jänner, 2011).

<http://www.phytodoc.de/heilpflanze/beifuss-einjaehriger>: **Phyto–Doc**, (aufgerufen, März, 2011).

<http://www.schule-bw.de/unterricht/faecher/chemie/material/unter/trenn/gc.html>,
Landesbildungsserver der Landesregierung Baden- Württemberg,
(aufgerufen im Februar, 2011)

http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/Caru_car.html: **Uni Graz**: (aufgerufen im März, 2011).

<http://www.uni-tuebingen.de/schurig/vorlesungen/Probenaufgabe.PDF>:
Eberhardt Karls Universität Tübingen, (aufgerufen im Februar, 2011)

CURICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Jasna Hadzic

Anschrift: Forsthausgasse 16/7219 1200 Wien

Geburtsdatum: 06.08.1984

Geburtsort: Tuzla BiH

Nationalität: Bosnisch

Familienstand: ledig

Schulbildung

1992-1996: Grundschule „Prva osnovna skola Srebrenik“

1996-2003: Gymnasium „Mesa Selimovic“ Tuzla

seit 2004: Pharmazie Studium an der Hauptuni Wien

Berufspraxis

Juli 2009: Ferialjob in der „Nordrand Apotheke“ Wien

Sprachkenntnisse

Sprachen: Bosnisch, Serbisch, Kroatisch

Deutsch, Englisch