



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Nachweis von *cis*-Nerolidol im humanen Urin mittels GC-MS nach transdermaler Applikation

Maria Lindmayr

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

Wien, Juli 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie
Betreuerin / Betreuer: ao.Univ.Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat. Walter Jäger

DANKSAGUNG

Danken möchte ich Herrn ao.Univ.Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat. Walter Jäger für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit und seine fachliche Beurteilung.

Besonderer Dank gilt Frau Mag. Dr.Iris Stappen für ihre große Geduld und den kompetenten und steten Beistand bei dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Außerdem möchte ich meiner Mutter danken, die mich zum Pharmaziestudium ermutigt hat und immer für mich da ist.

INHALTSVERZEICHNIS:

1 PROBLEMSTELLUNG	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 Ätherische Öle	2
2.1.1 Definition	2
2.1.2 Eigenschaften	3
2.1.3 Herstellung	4
2.2 Terpene	5
2.2.1 Chemie	5
2.2.2 Biogenese	6
2.3 Sesquiterpene	8
2.3.1 Acyclische Sesquiterpene	9
2.3.2 Monocyclische Sesquiterpene	9
2.3.3 Bi- und Tricyclische Sesquiterpene	10
2.3.4 Sesquiterpenlactone	10
2.4 Nerolidol	12
2.4.1 Vorkommen	12
2.4.2 Chemische Struktur	12
2.4.3 Physikalische Eigenschaften	13
2.4.4 Verwendung	13
2.4.5 Toxikologische Eigenschaften	13
2.4.6 Antivirale und antitumorale Eigenschaften	14
2.5 Biotransformation von Fremdstoffen	15
2.6 Headspace-Gaschromatographie	16
2.6.1 Gaschromatographie	16

2.6.1.1 Allgemeines	16
2.6.2 Begriffserklärung HS-GC	17
3 EXPERIMENTELLER TEIL	18
3.1 Chemikalien	18
3.2 Geräte	19
3.3 Probenvorbereitung	19
3.3.1 Abspaltung eines Konjugats	19
3.3.2 Ablauf	20
3.4 Methoden	21
3.4.1 Methode A	21
3.4.2 Methode B	22
3.4.3 SIM Modus	22
3.5 Probanden	23
3.6 Ablauf der Messungen	29
4 ERGEBNISSE	31
4.1 Versuchsreihe	31
4.1.1 <i>cis</i> -Nerolidol pur	31
4.1.2 Verdünnungsreihe	32
4.1.3 <i>cis/trans</i> - Nerolidol pur	35
4.2 Selbstversuche	36
4.3 Gleichgewichtseinstellungen	37
5 DISKUSSION	41
6 ZUSAMMENFASSUNG	43

7 LITERATURVERZEICHNIS	45
8 TABELLENVERZEICHNIS	48
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	49
10 CURRICULUM VITAE	51

1 PROBLEMSTELLUNG

Viren spielen oft eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Tumoren. Therapien mit synthetischen Stoffen, die in der herkömmlichen Krebstherapie eingesetzt werden, haben oft schwere Nebenwirkungen. Zur Unterstützung der Schulmedizin gibt es immer mehr Investigationen aus der Alternativmedizin, was bei der Bevölkerung auf Grund der geringeren Nebenwirkungsrate auf große Akzeptanz stößt. Daher werden immer mehr natürliche Stoffe untersucht, wie z.B. ätherische Öle. In diesem Zusammenhang wurde auch *cis*-Nerolidol auf seine antiviralen und antikanzerogenen Eigenschaften getestet.

Bei natürlichem wie auch synthetischem Nerolidol wurden starke antitumorale Effekte bei Konzentrationen unter 5 μM gefunden. Außerdem wurden hemmende Effekte auf die Vermehrung von Komponenten des Mäuse Polyomavirus in 3T6 Zellen ermittelt. Synthetisches Nerolidol minimierte die Zahl von HeLa Zellen, die eine Rolle beim Gebärmutterhalskrebs spielen, und von Jurkat Zellen, die für die T-Zell Leukämie verantwortlich sind, um 50% (CC_{50}) (Ryabchenko et al., 2008).

Auch die Idee eines Zusatzes von Nerolidol zu Sonnenschutzprodukten wäre sehr interessant. Einer Tumorbildung aufgrund der durch UV-Strahlung entstehenden DNA-Schäden könnte hier entgegengewirkt werden.

Da es noch keine Studien zum Thema Metabolismus von *cis*-Nerolidol gibt, sollte im Rahmen dieser Diplomarbeit eine Pilotstudie zur transdermalen Applikation und anschließendem Nachweis mittels GC-MS im humanen Urin durchgeführt werden.

2 EINLEITUNG

2.1 Ätherische Öle

2.1.1 Definition

„Ein ätherisches Öl ist ein Produkt mit wahrnehmbarem Geruch, das üblicherweise aus einer Vielzahl von Komponenten besteht und aus einem botanisch definierten pflanzlichen Ausgangsstoff durch Wasserdampfdestillation, Trockendestillation oder durch ein geeignetes mechanisches Verfahren ohne Erhitzen gewonnen wird. Ätherische Öle werden üblicherweise von der wässrigen Phase durch einen physikalischen Prozess getrennt, der ihre Zusammensetzung nicht wesentlich beeinflusst.

Ätherische Öle können anschließend geeigneten Behandlungen unterworfen werden und dadurch handelsüblich als terpenfreie, sesquiterpenfreie, rektifizierte oder „x“-freie ätherische Öle bezeichnet sein. (EuAB 6.2, 2008)

- Ein *terpenfreies ätherisches Öl* ist ein ätherisches Öl, dessen Monoterpen-Kohlenwasserstoffe teilweise oder vollständig entfernt wurden.
- Ein *terpen- und sesquiterpenfreies ätherisches Öl* ist ein ätherisches Öl, dessen Monoterpen- und Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe teilweise oder vollständig entfernt wurden.
- Ein *rektifiziertes ätherisches Öl* ist ein ätherisches Öl, das einer fraktionierten Destillation unterworfen wurde, um bestimmte Bestandteile zu entfernen oder deren Gehalt zu verändern.
- Ein *„x“-freies ätherisches Öl* ist ein ätherisches Öl, aus dem ein Bestandteil oder mehrere Bestandteile teilweise oder vollständig entfernt wurde(n).“ (EuAB 6.2, 2008)

2.1.2 Eigenschaften

Die Zusammensetzung eines ätherischen Öls ist sehr vielschichtig und besteht oft aus hunderten Komponenten, außerdem ist sie von genetischen Faktoren abhängig. Bisher wurden über 5000 chemische Verbindungen aus allen ätherischen Ölen isoliert.

Auf Grund der Lipophilie von ätherischen Ölen sind sie in Ethylalkohol und fetten Ölen sehr gut löslich. Die Wasserlöslichkeit ist gering, aber die alkoholischen Komponenten gehen in genügendem Maße in Teeaufgüsse über.

Ätherische Öle enthalten optisch aktive Substanzen und drehen deshalb die Ebene von polarisiertem Licht. Die Dichte ist meist geringer als die des Wassers.

Chemisch gesehen, handelt es sich um polyfunktionelle Verbindungen mit azyklischen, monozyklischen bzw. bicyklischen Monoterpen- und Sesquiterpen- Grundkörpern oder um Phenylpropanderivate. Seltener bestehen die Komponenten eines ätherischen Öls aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen, Aldehyden, Alkoholen, Ketonen, Estern oder Epoxiden, Polyinen und Hydroxidderivaten des Benzaldehyds oder Benzylalkohols.

Bei manchen Pflanzen wurden neben ätherischen Ölen auch Glykoside ihrer alkoholischen und phenolischen Komponenten entdeckt. Bei der Pfefferminze beispielsweise kann 5% des Menthols auch als Mentholglykosid vorliegen. Nach dem Absterben der Pflanze wird diese glykosidische Bindung gespalten, was zu einer Zunahme des absoluten Gehalts an ätherischem Öl bei langsamer Trocknung von Pflanzen verantwortlich ist.

Zur Identifizierung und Quantifizierung, sowie zur Aufklärung der Zusammensetzung ätherischer Öle wird am häufigsten die

Gaschromatographie (GC), insbesondere die Headspace-Gaschromatographie (HSGC, Kopfraumanalyse), in Kombination mit der Massenspektrometrie verwendet. Auch die HPLC und ¹³C-NMR-Spektroskopie finden hier ihre Anwendung (Teuscher, 2004).

2.1.3 Herstellung

Nach dem EuAB, gibt es drei Wege, die bei der Gewinnung von ätherischen Ölen eine Rolle spielen.

„Der pflanzliche Ausgangsstoff kann wie in der Einzelmonographie vorgeschrieben frisch, welk, getrocknet, ganz, zerstoßen oder gemahlen (pulverisiert) sein.

Wasserdampfdestillation: Das ätherische Öl wird gewonnen, indem der pflanzliche Ausgangsstoff in einer geeigneten Apparatur mit Wasserdampf behandelt wird. Der Wasserdampf kann von einer äußeren Quelle stammen und von außen eingeleitet werden oder durch siedendes Wasser unterhalb des Ausgangsstoffs oder siedendes Wasser, in das der Ausgangsstoff eingetaucht ist, erzeugt werden. Die Wasser- und Öldämpfe kondensieren. Wasser und ätherisches Öl werden durch Dekantieren getrennt.

Trockendestillation: Das ätherische Öl wird durch Erhitzen der Stängel oder Rinden bei erhöhten Temperaturen in einer geeigneten Apparatur ohne Zusatz von Wasser oder Wasserdampf hergestellt.

Mechanische Behandlung: Das sogenannte „kalt gepresste“ ätherische Öl wird durch mechanische Verfahren ohne Erhitzen gewonnen. Diese mechanische Behandlung wird vorwiegend bei Früchten der Gattung *Citrus* zur Gewinnung des Öls aus der Fruchtschale angewendet und die Abtrennung erfolgt anschließend mit physikalischen Methoden.

In bestimmten Fällen kann dem ätherischen Öl ein geeignetes Antioxidans zugesetzt werden“ (EuAB 6.2, 2008).

2.2 Terpene

2.2.1 Chemie

Terpene sind aus Isopren-Einheiten (Abb.1) aufgebaut, die wiederum aus fünf Kohlenstoffatomen bestehen. Je nach Anzahl der Isopren-Einheiten unterscheidet man Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene, Sesterterpene, Triterpene, Tetraterpene und Polyterpene.

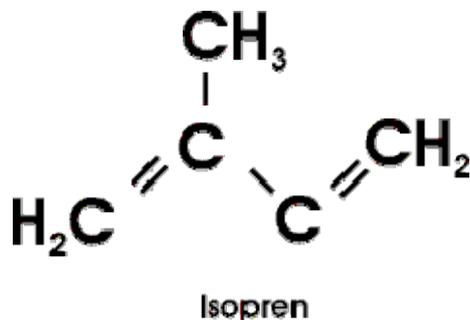


Abb. 1 Isopren (guidobauersachs)

Die Terpene liegen als Kohlenwasserstoffe oder oxygenierte Verbindungen vor, in geringem Maße auch in halogenerter Form. Durch Einführung eines Stickstoffatoms entstehen Terpenalkaloide. Eine Mischform stellen die Meroterpene dar, die aus Terpenen und nicht terpenoiden Verbindungen zusammengesetzt sind.

Außerdem gibt es bei einigen Pflanzen Sonderformen, beispielsweise bei den Hopfenbittersäuren findet man Hemiterpene, die in Form von (Iso-)Prenylresten als Substituenten an pflanzlichen Sekundärstoffen dargestellt sind. Bei Meeresschwämmen kann es zur Ausbildung von Sesterterpenen kommen (Teuscher, 2004).

2.2.2 Biogenese

Es gibt zwei Wege, wie Terpene in Pflanzen bzw. Bakterien gebildet werden können, zum einen den Acetat-Mevalonat-Weg (Abb.2), bei dem die Bildung aus drei Acetatresten erfolgt und zum anderen den Triose-Pyruvat-Weg (Abb.3, Weg B), bei dem den Anfang Pyruvate, die Salze der Brenztraubensäure, und Glycerindehyd-3-phosphat darstellen.

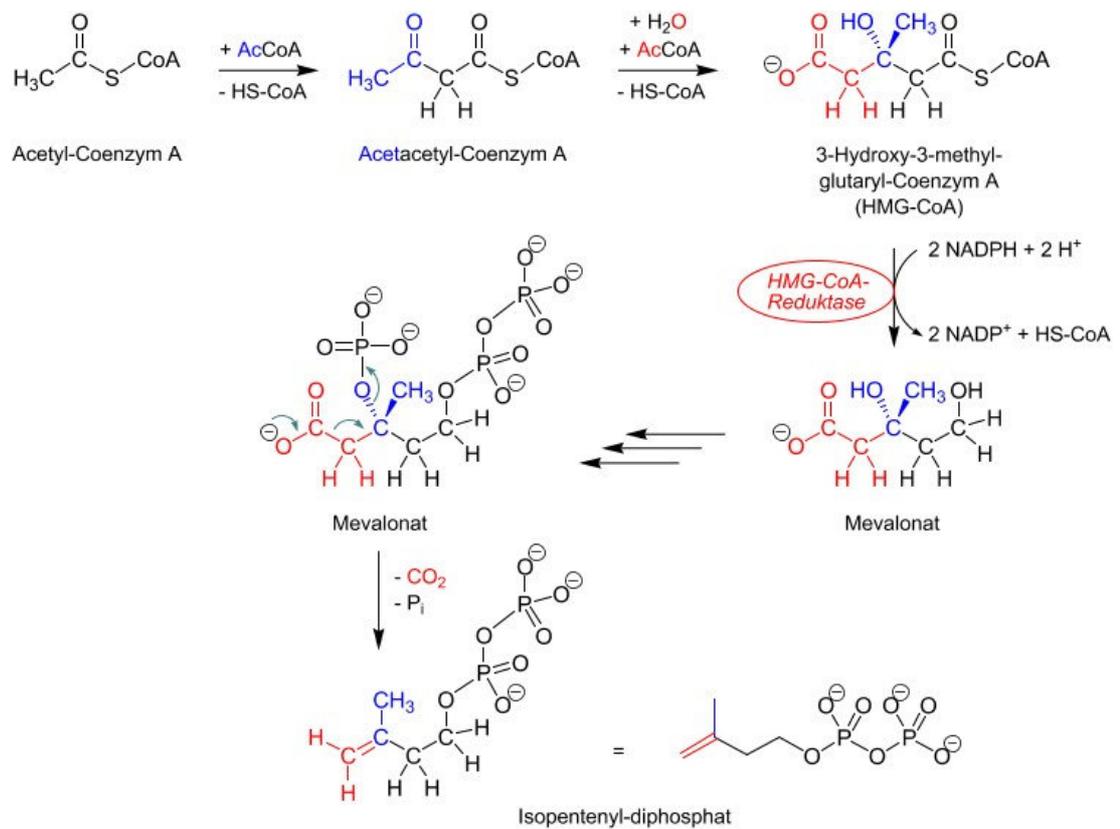


Abb.2 Acetat-Mevalonat-Weg(Enzyklopädie-ChemgaPedia)

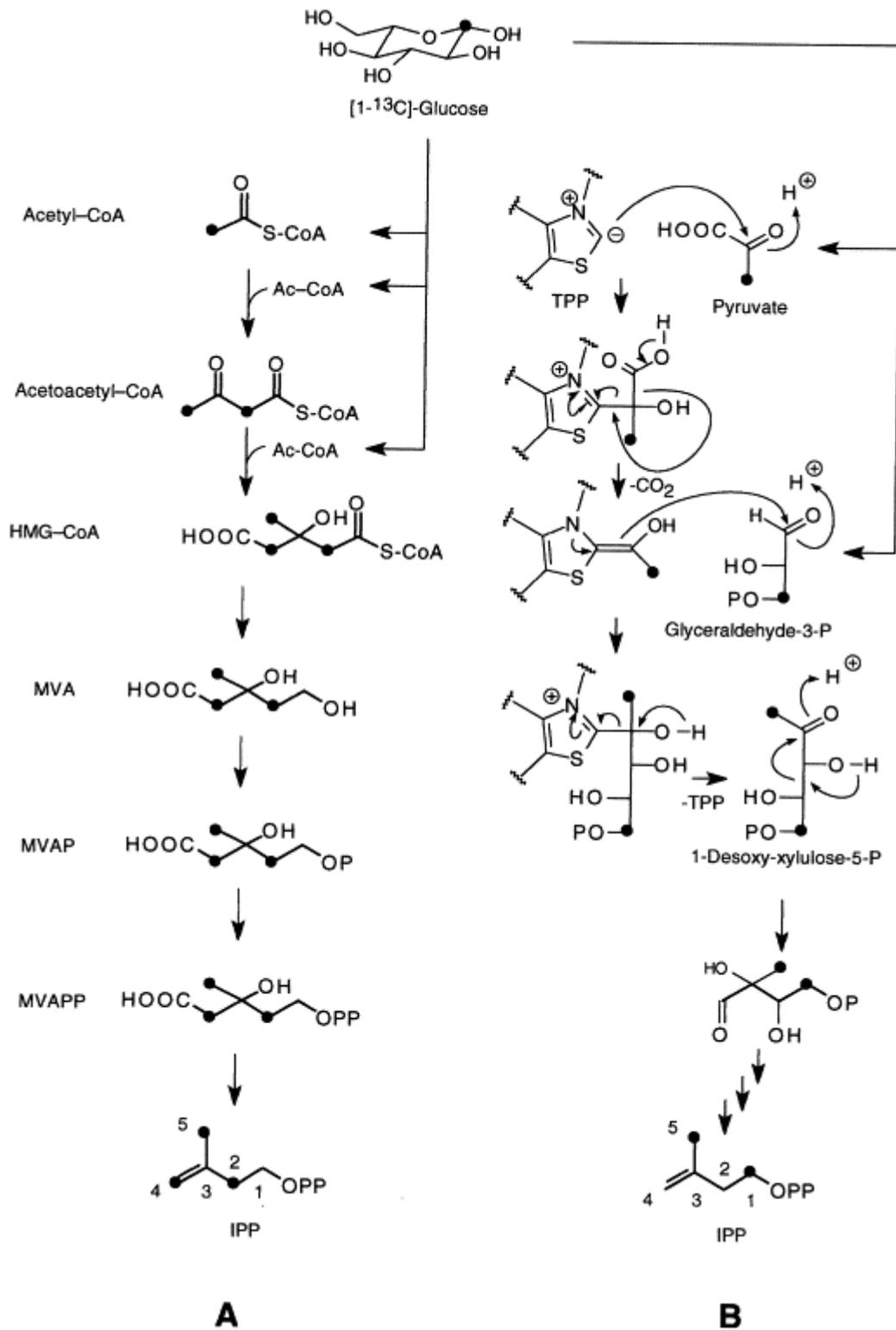


Abb.3 Weg B Triose-Pyruvat Weg (Sciencedirect)

2.3 Sesquiterpene

Die größte Gruppe der Terpene bilden die Sesquiterpene. Sie sind aus drei Isopreneinheiten aufgebaut und werden in folgende Grundstruktur-Typen (Abb.4) unterteilt:

- Aliphatische Sesquiterpene vom Farnesan-Typ
- Monozyklische Sesquiterpene vom Bisabolan-Typ, Secocadinan-Typ, und Germacran-Typ
- Bicyklische Sesquiterpene vom Cadinan-Typ, Guajan-Typ, Pseudoguajan-Typ und Valeran-Typ

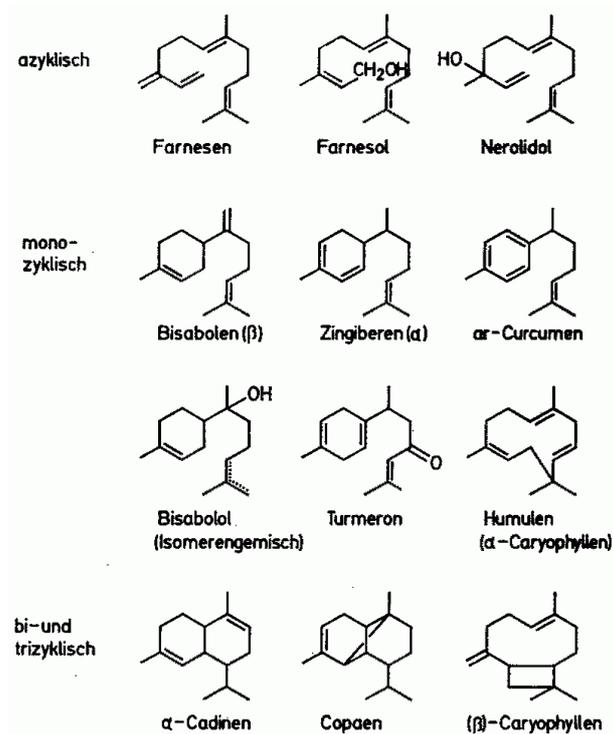


Abb.4 Grundstruktur Sesquiterpene (Lexikon Ätherische Öle)

Chemisch gesehen gibt es Sesquiterpenkohlenwasserstoffe, -alkohole, -ketone und -aldehyde oder polyfunktionelle Sesquiterpene.

2.3.1 Acyclische Sesquiterpene

Acyclische C₁₅-Sesquiterpene entstehen durch eine Addition von aktivem Isopren an Geranylpyrophosphat, wobei Farnesylpyrophosphat als Vorstufe der Sesquiterpenalkohole Farnesol und Nerolidol entsteht.

Farnesol riecht nach Maiglöckchen und ist in vielen Blütenaromen enthalten. Neben Nerolidol haben auch die Farnesene in neuerer Zeit an Bedeutung gewonnen. α -Farnesen, eine Komponente, die erstmals aus Hopfenöl isoliert werden konnte, wurde auch in vielzähligen anderen Ölen, wie Agrumenöl gefunden. Auch in Äpfeln spielt es eine wichtige Rolle bei der Geruchszusammensetzung. β -Farnesen wurde in einigen Blattlaussekreten gefunden und ist für Insekten ein Alarmpheromon (Uni-Erlangen, Department Chemie und Pharmazie).

2.3.2 Monocyclische Sesquiterpene

Die Biogenese erfolgt aus Farnesylpyrophosphat durch Pyrophosphatabspaltung, wobei nicht-klassische Carbeniumionen, die durch Cyclisierung zu monocyclischen Carbokationen mit sechsgliedriger Bisabolan-, zehngliedriger Germacran- und elfgliedriger Humulanstruktur reagieren, entstehen. Durch Hydrid- und Methylumlagerungen, Cyclisierungen und anschließender Protoneneliminierung oder Hydroxyladdition werden die unterschiedlichen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe oder -alkohole gebildet.

Ein Vertreter der monocyclischen Sechsring-Sesquiterpene ist beispielsweise α -Bisabolol, das bis zu 20% im Kamillenöl enthalten

ist und zu den entzündungshemmenden und spasmolytischen Wirkungen der Pflanze beiträgt.

Weitere Vertreter sind α -Curcumen und β -Curcumen aus den Wurzeln des Ingwergewächses *Curcuma aromatica* Salisb.

Von Germacran leiten sich die zehngliedrigen Makrocyclen ab. Zu der elfgliedrigen Komponente des Hopfenöls zählt Humulen (Uni-Erlangen, Department Chemie und Pharmazie).

2.3.3 Bi- und Tricyclische Sesquiterpene

Zu den bicyclischen Sesquiterpenen zählen das am häufigst vorkommende Caryophyllen, die Cadinene, sowie verschiedene Azulenstrukturen. Caryophyllen ist eine Komponente aus Nelken- und Hopfenöl. Azulene sind Aromaten ohne Benzolstruktur und besitzen großes antiphlogistisches Potential. Sie entstehen aus ihren Vorstufen, den Proazulenen, meistens erst bei der Wasserdampfdestillation. Sesquiterpenlactone sind fest, lipophil, nicht flüchtig und relativ stabil. Sie sind vom Geschmack her bitter.

Proazulene aus der Kamillenblüte gehen beim Erhitzen in die wasserdampflichflüchtigen, pseudoaromatischen Azulene über, wobei der Lactonring geöffnet und die Carboxylgruppe abgespalten wird. Weiters werden durch Dehydratisierung bzw. Dehydrierung Azulenderivate gebildet.

Zu den tricyclischen Sesquiterpenen zählt der im Cubebenöl vorkommende Cubebencampher. Er besitzt ein Cadinangrundgerüst (Uni-Erlangen, Department Chemie und Pharmazie).

2.3.4 Sesquiterpenlactone

Eine besondere Bedeutung haben Sesquiterpenlactone (Abb.5), die als Vorstufen der Azulene oder als Wirksubstanzen der Arnikablüten, des Mutterkrauts oder der Pestwurz vorkommen. Sie sind bei

Korbblütengewächsen (Asteraceae) weit verbreitet und kommen in geringer Zahl auch bei anderen Pflanzenfamilien vor. Diese Lactone werden in den Drüsenhaaren der Pflanzen angereichert oder überziehen als Exsudate die Oberfläche, sodass sie bei Kontakt der Haut oder Schleimhaut leicht übertragen werden. Ihre Grundkörper leiten sich von Germacran, Guajan, Pseudoguajan und Eudesman ab. Die Isopropylseitenkette ist in einen anellierten, meist fünfgliedrigen Lactonring integriert. Sie sind oft α -Methylen- γ -Lactone.

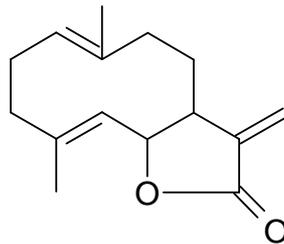


Abb.5 Sesquiterpenlacton(erstellt mit ISIS DRAW 2.4)

α -Methylen- γ -Lactone reagieren mit nucleophilen Gruppen, vor allem mit SH-Gruppen von Proteinen und alkylieren diese in der Weise einer Michael-Addition. Dadurch wirken sie antibiotisch und cytotoxisch.

Bemerkenswert ist auch ihre entzündungshemmende Wirkung, die durch Reaktion mit der I κ B-Kinase, die den NF- κ B-Inhibitor I κ B phosphorylieren und somit aktivieren kann, entsteht. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Synthese entzündungsfördernder Zytokine verantwortlich ist.

Außerdem spielt Artemisinin (Abb.6) aus dem einjährigen Beifuß eine große Rolle in der Malariatherapie. Artemisinin wird in den von Plasmodien befallenen roten Blutkörperchen angereichert und tötet die erythrozytären asexuellen und frühen sexuellen Formen durch Häm-katalysierte Oxidation verschiedener Zellkomponenten der Malariaerreger (Teuscher,2004).

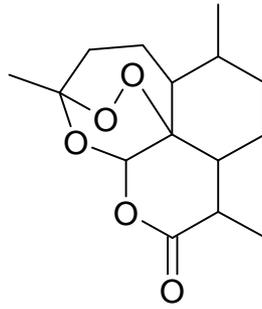


Abb.6 Artemisinin(erstellt mit ISIS Draw 2.4)

2.4 Nerolidol

2.4.1 Vorkommen

Nerolidol ist ein acyclischer Sesquiterpenalkohol aus dem ätherischen Öl der Bitterorangenblüte (*Citrus aurantium ssp. amara* L.). Weiters kommt es in Ingwer (*Zingiber officinale* Rose.), Jasmin (*Jasminum officinale* L.), Lavendel (*Lavandula officinalis* Chaix.), Teebaum (*Melaleuca alternifolia* MBC) und Zitronengras (*Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf) vor(Uni Erlangen).

2.4.2 Chemische Struktur

Nerolidol ist ein Isomer des Farnesols und liegt in der Natur sowohl in *cis*-, als auch in *trans*- Form vor. Ein *cis/trans*-Gemisch, das synthetisch hergestellt werden kann, besitzt einen blumigen Geruch und dient als Zwischenprodukt für die Vitamin E-Synthese und Vitamin K₁-Synthese (Uni Erlangen).

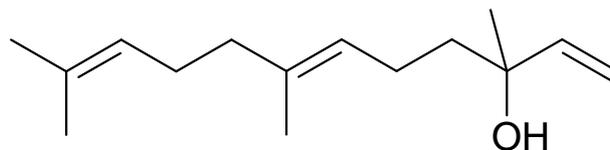


Abb. 7 cis-Nerolidol(erstellt mit ISIS DRAW 2.4)

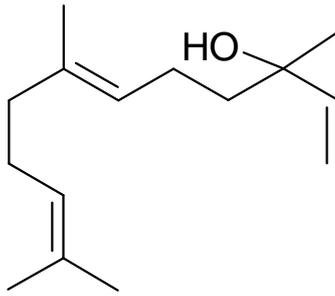


Abb.8*trans*-Nerolidol(erstellt mit ISIS DRAW 2.4)

2.4.3 Physikalische Eigenschaften

Nerolidol ist eine klare hellgelbe bis gelbe Flüssigkeit mit einem schwach blumigen Geruch, der an Rosen und Äpfel erinnert. Der Schmelzpunkt liegt bei 276°C und Flammpunkt >212°F. Der Dampfdruck wurde auf 0.1 mm Hg 20°C berechnet und die Wasserlöslichkeit auf 1.532 mg/l bei 25°C. Das Molekulargewicht beträgt 222.37 (McGinty et al., 2009).

2.4.4 Verwendung

Seine Verwendung findet Nerolidol in der Kosmetikindustrie als Aromazusatz in Kosmetikartikel wie Schminkartikel, Shampoos, Seifen und anderen Toilettartikeln aber auch in nicht kosmetischen Produkten wie Haushaltsreiniger und Geschirrspülmittel. Der weltweite Verbrauch liegt zwischen zehn bis hundert Tonnen pro Jahr. Der prozentuelle Anteil in den Formulierungen liegt im Durchschnitt bei 1.15%, was einer Tagesmaximaldosis von 0.0293 mg/kg für die Haut des Verbrauchers entspricht (McGinty et al., 2009).

2.4.5 Toxikologische Daten

Die LD₅₀ von Nerolidol wurde an Ratten getestet und ist höher als 5g/kg.

Weiters wurden diverse Untersuchungen bezüglich der Hautverträglichkeit durchgeführt. In einer Studie des RIFM 1973 (Research Institute for Fragrance Materials Inc.) wurde 4%iges Nerolidol in Paraffinöl am Rücken von fünf gesunden Männern getestet. Hierbei konnten keine Hautirritationen festgestellt werden.

Höhere Konzentrationen wurden an Ratten, Meerschweinchen und Hasen getestet, wobei herausgefunden wurde, dass 20%iges Nerolidol als eine unbedenkliche Konzentration gilt (Lapczynski et al., 2008).

2.4.6 Antivirale und antitumorale Eigenschaften

Viren spielen oft eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Tumoren. Therapien mit synthetischen Stoffen, die in der herkömmlichen Krebstherapie eingesetzt werden, haben oft schwere Nebenwirkungen. Zur Unterstützung der Schulmedizin gibt es immer mehr Investigationen aus der Alternativmedizin, was bei der Bevölkerung auf Grund der geringeren Nebenwirkungsrate auf große Akzeptanz stößt. Daher werden immer mehr natürliche Stoffe untersucht, wie z.B. ätherische Öle. In diesem Zusammenhang wurde auch *cis*-Neroldiol auf seine antiviralen und antikanzerogenen Eigenschaften getestet.

Bei natürlichem wie auch synthetischem Nerolidol wurden starke antitumorale Effekte bei Konzentrationen unter 5 μ M gefunden. Außerdem wurden hemmende Effekte auf die Vermehrung von Komponenten des Mäuse Polyomavirus in 3T6 Zellen ermittelt. Synthetisches Nerolidol minimierte die Zahl von HeLa Zellen, die eine Rolle beim Gebärmutterhalskrebs spielen, und von Jurkat Zellen, die für die T-Zell Leukämie verantwortlich sind, um 50% (CC_{50}) (Ryabchenko et al., 2008).

2.5 Biotransformation von Fremdstoffen

Nach der glomerulären Filtration werden lipophile Substanzen in den Nierentubuli weitgehend rückresorbiert. Sie können nur langsam renal ausgeschieden werden. Daher müssen sie chemisch verändert werden, sonst besteht die Gefahr, dass sie im Körper verbleiben und sich im Fettgewebe anreichern. Aus diesem Grund wandelt der Organismus mittels Enzymsystemen lipophile Substanzen in hydrophile, leichter ausscheidbare um.

Die Umwandlung findet meistens in der Leber statt, kann aber auch in anderen Organen erfolgen (Darm, Niere, Lunge, Milz, Muskeln, Haut oder Blut).

Sie verläuft in zwei Schritten:

Phase I Reaktionen:

Hier werden die Substanzen oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert.

Bei der **Oxidation** spielen Monooxygenasen, die Hämproteine vom Typ des Cytochroms P-450 enthalten, die größte Rolle. Sie katalysieren aliphatische und aromatische Hydroxylierungen, die Epoxidierung olefinischer und aromatischer Doppelbindungen, die oxidative Desalkylierung von N-,O- und S-Alkylverbindungen, die oxidative Desaminierung und die Oxidation von Thioethern und Aminen zu Sulfoxiden bzw. Hydroxylaminen.

Bei der **Reduktion**, die im Gegensatz zur Oxidation eine untergeordnete Rolle spielt, werden z.B. Carbonylverbindungen durch Alkoholdehydrogenase zu Alkoholen reduziert.

Zu den wichtigsten Bio**hydrolysen** zählen die Spaltung von Estern und Amiden zu Säuren und Alkoholen bzw. Aminen durch Esterasen, die Umwandlung von Epoxiden zu vicinalen Diolen durch Epoxidhydrolasen, die Hydrolyse von Acetalen durch Glykosidasen, sowie die Hydrolyse von Glucuroniden durch Glucuronidasen.

Phase II Reaktionen:

Hierbei handelt es sich immer um Konjugationsreaktionen, die unter Beteiligung von spezifischen Transferasen ablaufen. Es entstehen Konjugate mit:

- Aktiver Glucuronsäure
- Aktiviertem Sulfat
- Aminosäuren (besonders Glycin)
- Oligopeptiden und Bildung von Mercaptursäurederivaten
- Aktivierter Essigsäure und
- S-Adenosylmethionin

Mit Ausnahme der Essigsäurekonjugation wird stets eine saure Gruppe in das Molekül eingeführt, die durch die Salzbildung die Hydrophilie entscheidend erhöht. Die sauren Konjugate werden rasch renal oder/und biliär ausgeschieden (Mutschler, 2008).

2.6 Headspace-Gaschromatographie

2.6.1 Gaschromatographie

2.6.1.1 Allgemeines

„Chromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem sich die zu trennenden Substanzen zwischen zwei nicht mischbaren Phasen verteilen.“

Man unterscheidet die stationäre Phase und die mobile Phase, die die chromatographische Trennstrecke in eine Richtung durchströmt und so den Stofftransport bewirkt.

Die Trennstrecke nennt sich Säule und ist ein Rohr, das z.B.: mit einem Füllmaterial beladen sein kann, wie bei der gepackten Säule oder bei Kapillarsäulen ist dieses Rohr viel dünner und die stationäre Phase haftet als dünner Film in der Kapillare selbst. Die mobile Phase beinhaltet ein inertes Trägergas, wie z.B.: Stickstoff, Helium, Argon oder Wasserstoff. Bei der Gaschromatographie unterscheidet man zwischen zwei Arten. Bei der Adsorptions-Gaschromatographie ist die stationäre Phase ein festes Adsorbens, an dessen Oberfläche

die flüchtigen Analyten durch reversible Adsorption festgehalten werden, oder aus einer nichtflüchtigen Flüssigkeit, die an der Oberfläche eines Trägers haftet. Bei der Verteilungschromatographie ist die stationäre Phase flüssig und wirkt wie ein Lösemittel in dem sich die flüchtigen Analyten teilweise lösen (Kolb, 1999).

2.6.1.2 Begriffserklärung Headspace-Chromatographie

Der Begriff „HEADSPACE GASCHROMATOGRAPHIE“ wird zu deutsch als „Gaschromatographische Dampfphaseanalyse“ bezeichnet. Roman Kaiser, ein Riechstoffchemiker aus der Schweiz, etablierte in den 80er Jahren die HS-GC in dem er zahlreiche Duftstoffe aus Pflanzen gaschromatographisch untersucht hat.

Grundlage ist eine Probennahme aus der Dampfphase, die mit einer kondensierten flüssigen oder festen Phase in einem abgeschlossenen System im thermodynamischen Gleichgewicht steht (Hachenberg, 1996).

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Chemikalien

Amidosulfonsäure ($\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$)

Merck, Darmstadt , Charge: 531 CC431903

M=97,09 g/mol

Garantieschein: Gehalt (acidimetrisch)	min.99,5%
Chlorid (Cl)	max.0,001%
Nitrat (NO_3)	max.0,002%
Sulfat (SO_4)	max.0,02%
Schwermetalle (als Pb)	max.0,0005%
Eisen (Fe)	max.0,0005%
Glührückstand (600°C)	max.0,02%

Erdnussöl (Oleum Arachidis Ph.Eur.)

E. Schubert GmbH, Schumanngasse 74, A-1170 Wien

Chr. Nr.: 1135FO-1216

Methanol (CH_3OH)

Merck, Darmstadt, Charge: 2500 I091507

Für Chromatographie filtriert durch 1,5 μm Filter

Garantieschein: Gehalt (GC) min.99,7%

Identität

IR-Spektrum entspr.

Cis-Nerolidol

DSM Nutritional Products CH-4002 Basel, Schweiz

CAS-No 142-50-7

GC% 99,8

MW: 222.37

3.2 Geräte

Für die Gaschromatographie wurde ein Trace GC Ultra verwendet, das mit einem DSQ II Massenspektrometer, einem TriPlus™ Autosampler und einem Agitator kombiniert war. Alle Geräte sind von der Firma Thermo Scientific.

Die Datenanalyse wurde mit dem Programm Xcalibur™ software 1.4. SR1, ThermoElectron Corporation 1998-2003, ausgeführt.

Zur Probenvorbereitung wurde eine 1000µl Pipette verwendet und 20ml Headspaceröhrchen, Part No: 60180 - 506 (Thermo Scientific).

Zur Abdeckung der Unterarme der Probanden nach Massage des *cis*-Nerolidol-Öl Gemisches diente eine konventionelle Frischhaltefolie.

3.3 Probenvorbereitung

3.3.1 Abspaltung eines Konjugats

Da es nach Resorption von ätherischen Ölen im Körper zu Biotransformationsprozessen kommt, wie in Punkt 1.5 beschrieben, wurde davon ausgegangen, dass das durch transdermale Applikation aufgenommene *cis*-Nerolidol ganz oder teilweise in seine Konjugate übergegangen ist. Häufig kommt es zur Bildung eines Glukuronids oder eines Sulfats. Man findet in der Literatur Studien von Terpenen, die in der Phase II in diese Konjugate übergegangen sind (siehe Yamaguchi et al, 1994).

Um spezifisch ein Glukuronid von einer Substanz abzuspalten verwendet man β -Glucosidase. Aufgrund des geringen Budgets war dies leider nicht möglich, daher entschied man sich für die einfache

Variante der Abspaltung mit Säuren. Generell lassen sich Phase II Konjugate, insbesondere glukuronidierte oder sulfatierte Verbindungen, mittels Säuren leicht abspalten. Diese Spaltreaktion verhält sich prinzipiell wie eine säurekatalysierte Spaltung einer Etherbindung. Dafür werden starke Säuren eingesetzt, vor allem Salzsäure. Diese Säure aber ist flüchtig und extrem leicht flüchtig und geht daher sofort in den Dampfraum über. Mineralsäuren auf der gaschromatographischen Trennsäule zerstören diese irreversibel und sind aus diesem Grund bei einer Messung mittels GC irrelevant.

Amidosulfonsäure hingegen ist eine starke Säure, die bei Raumtemperatur kristallin ist und den Vorteil hat, dass sie nicht flüchtig ist. Daher können im Falle einer Messung mittels Gaschromatographie wie in der vorliegenden Versuchsreihe keine Komponenten davon auf die Säule kommen.

3.3.2 Ablauf

Zur Probenvorbereitung wurden 20ml Headspaceröhrchen verwendet, die mit 6 ml Urin mittels einer 1000µl Pipette befüllt wurden. Je eine Spatelspitze Amidosulfonsäure kam in jede zweite Probe. Anschließend wurden die Headspaceröhrchen mit den passenden Kappen mittels Zange fest verschlossen.

Die Proben der ersten Charge kamen dann für 30 Minuten in einen Trockenschrank bei 60°C und wurden nach Methode A (siehe S.21) vermessen.

Die zweite Charge wurde nicht mehr im Trockenschrank inkubiert, sondern gleich im Messgerät und nach Methode B (siehe S. 22) vermessen, wobei die Hälfte der Proben im SIM (Single Ion Monitoring) Modus analysiert wurde. Beim „Single Ion Monitoring“ sucht man gezielt nach den Massenpeaks der gewünschten Substanz um sie schneller zu erfassen. Man benötigt dazu

mindestens drei starke Vertreter mit einer möglichst hohen Masse um aus dem Rauschbereich heraus zu kommen.

3.4 Methoden

3.4.1 Methode A

Trace GC Ultra:

Split-Splitless Modus

Starttemperatur	(50°C)
Startzeit	(1 min)
Aufheizrate	(15°C/min)
Endtemperatur	(230°C)
Split Flow Flow	(10 ml/min)
Splitless Time	(1 min)

TriPlus Autosampler:

Inkubationsmodus	(konstant)
Analysendauer	(16min)
Probennahme	(1 ml)
Anreicherungsverzug	(1 min)
Probentiefe Vial	(25 mm)
Agitortemperatur	(60°C)
Agitator an	(10 sec)
Agitator aus	(10 sec)
Inkubationszeit	(15 min)
Syringe Temperatur	(70°C)
Füllungsgeschwindigkeit	(50 ml/min)
Injektionsgeschwindigkeit	(50 ml/min)

Injektionstiefe	(20 mm)
Pre- injectiondelay	(3 sec)
Post-injectiondelay	(3 sec)
Stand-by Agitator Temp	(40°C)
Stand-by Syringe Temp	(50°C)
Sync Modus	(normal)

Massenspektrometer:

Source Temp	(200°C)
Startzeit	(3 min)
Scanrate	(2637.10)
Scanmodus	(fullscan)
Erste Masse	(50.0)
Letzte Masse	(650.0)

3.4.2 Methode B

Alle Parameter wie bei Methode A, nur die Inkubationszeit im Agitator wurde auf 30 Minuten erhöht.

3.4.3 SIM Modus

Für das „Single Ion Monitoring“ wurden für *cis*-Nerolidol die Massenpeaks von m/z 107, m/z 136, m/z 161 gewählt (vgl. Abb. 10).

3.5 Probanden

Die Testreihe wurde an 53 humanen Probanden (34 weiblich/ 19 männlich) im Alter zwischen 21 und 37 durchgeführt. Das durchschnittliche Alter betrug 24.7 Jahre.

Die Probanden wurden in sechs Gruppen zu je sieben bis zehn Personen eingeteilt. Die Teilnehmer der einzelnen Gruppen wurden wieder in zwei Gruppen geteilt, einmal wurde Amidosulfonsäure zur Probe zugesetzt und einmal nur der Harn vermessen.

Nach Aufklärung über eventuelle Risiken, wie Hautirritationen wurde mit der Untersuchung begonnen.

Zuerst wurde eine Leerharnprobe genommen.

1ml 20%ige *cis*-Nerolidol-Erdnussöl-Mischung wurde den Probanden auf die Innenseite des Unterarms der nicht dominanten Hand mittels Pipette appliziert. Die Testpersonen sollten nun mit der dominanten Hand zwei Minuten das Ölgemisch einmassieren. Danach wurde der Unterarm mit Frischhaltefolie umwickelt. Nach 20 Minuten wurden die Folie und die Ölreste wieder entfernt. Während der Einwirkzeit saßen die Probanden in einem Seminarraum bequem auf Sesseln und hörten einen Vortrag über Nerolidol.

Die Harnentnahme erfolgte nach zwei Stunden.

Tabelle 1: Gruppe A

Alter	m/w	Gewicht kg	Größe cm	Raucher	Orale Kontrazeptiva	*
22	w	59	161	-	-	-
23	w	65	173	-	-	+
22	w	54	169	-	-	-
25	w	57	177	-	-	+
22	w	58	168	-	-	-
24	w	58	175	-	+	+
24	m	117	189	-	-	-
25	w	63	169	-	+	+
30	w	60	177	-	-	-
26	w	64	174	-	-	+

*Zusatz von Amidosulfonsäure

+ ja

- nein

Tabelle 2:Gruppe B

Alter	m/w	Gewicht kg	Größe cm	Raucher	Orale Kontrazeptiva	*
24	w	54	158	-	+	+
23	w	44	158	-	-	-
26	w	56	163	-	+	+
23	w	45	152	-	+	-
23	w	55	170	-	-	+
25	w	48	160	+	-	-
25	w	48	164	+	+	+
26	m	67	184	+	-	-
27	m	90	181	+	-	+
27	m	68	175	+	-	-

* Zusatz von Amidosulfonsäure

+ ja

- nein

Tabelle 3:Gruppe C

Alter	m/w	Gewicht kg	Größe cm	Raucher	Orale Kontrazeptiva	*
23	m	73	174	-	-	+
22	w	52	166	-	+	-
22	m	65	171	-	-	+
23	m	70	178	-	-	-
22	m	62	173	-	-	+
26	m	64	173	-	-	-
25	w	57	157	-	+	+
25	m	79	185	-	-	-

* Zusatz von Amidosulfonsäure

+ ja

- nein

Tabelle 4:Gruppe D

Alter	m/w	Gewicht kg	Größe cm	Raucher	Orale Kontrazeptiva	*
25	m	63	170	-	-	+
25	m	81	187	-	-	-
23	w	54	168	-	-	+
23	w	55	169	-	-	-
28	w	80	166	+	-	+
25	w	58	165	+	+	-
23	w	49	166	-	-	+
24	w	61	182	-	+	-
30	w	54	161	-	-	+

* Zusatz von Amidosulfonsäure

+ ja

- nein

Tabelle 5:Gruppe E

Alter	m/w	Gewicht kg	Größe cm	Raucher	Orale Kontrazeptiva	*
23	m	95	192	-	-	+
24	m	103	183	-	-	-
21	w	49	162	-	+	+
24	m	135	177	-	-	-
24	w	52	159	+	+	+
29	m	73	167	-	-	-
32	w	65	176	-	-	+
37	m	95	178	-	-	-

* Zusatz von Amidosulfonsäure

+ ja

- nein

Tabelle 6:Gruppe F

Alter	m/w	Gewicht kg	Größe cm	Raucher	Orale Kontrazeptiva	*
23	w	48	169	-	-	+
23	w	61	171	-	-	-
25	w	64	170	-	+	+
24	m	70	182	-	-	-
24	w	58	169	-	+	+
25	w	67	180	+	-	-
25	m	65	165	+	-	+

* Zusatz von Amidosulfonsäure

+ ja

- nein

3.6 Ablauf der Messungen

Die Gruppen wurden an sechs verschiedenen Tagen getestet.

Die Leerharnproben wurden eingefroren um bei einer positiven Harnprobe nach der Massage mit *cis*-Nerolidol eine Vergleichsprobe zu haben.

Außerdem wurden von allen Proben der getesteten Personen eine Reserveentnommen und eingefroren.

Nach 30 minütiger Inkubation im Trockenschrank bei 60°C wurden die Harnproben der Probanden nach Methode A (siehe S. 21) vermessen.

Nachdem die erste Methode nicht die gewünschten Ergebnisse gebracht hat, versuchte man noch eine neue Methode. Hierbei wurden die Proben nicht mehr 30 Minuten im Trockenschrank inkubiert, sondern die Inkubationszeit direkt im Messgerät auf 30 Minuten erhöht.

Nun wurden weitere 30 Reserveproben nach der neuen Methode, Methode B (siehe S. 22) vermessen, wobei die Hälfte, also 15 davon im SIM Modus erfolgte (m/z 107, m/z 136, m/z 161) um die Empfindlichkeit zu erhöhen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Versuchsreihe

4.1.1 *cis*-Nerolidol pur

Als allererster Schritt wurde *cis*-Nerolidol pur eingespritzt, um zu sehen bei welcher Minute der Peak zu sehen ist.

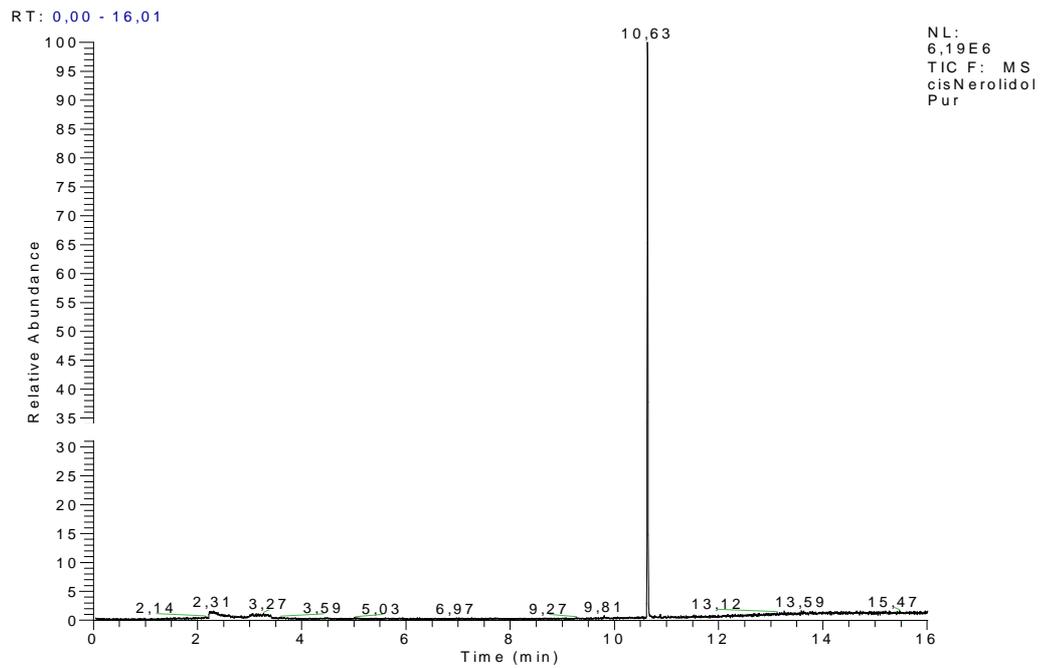


Abb. 9 *cis*-Nerolidol

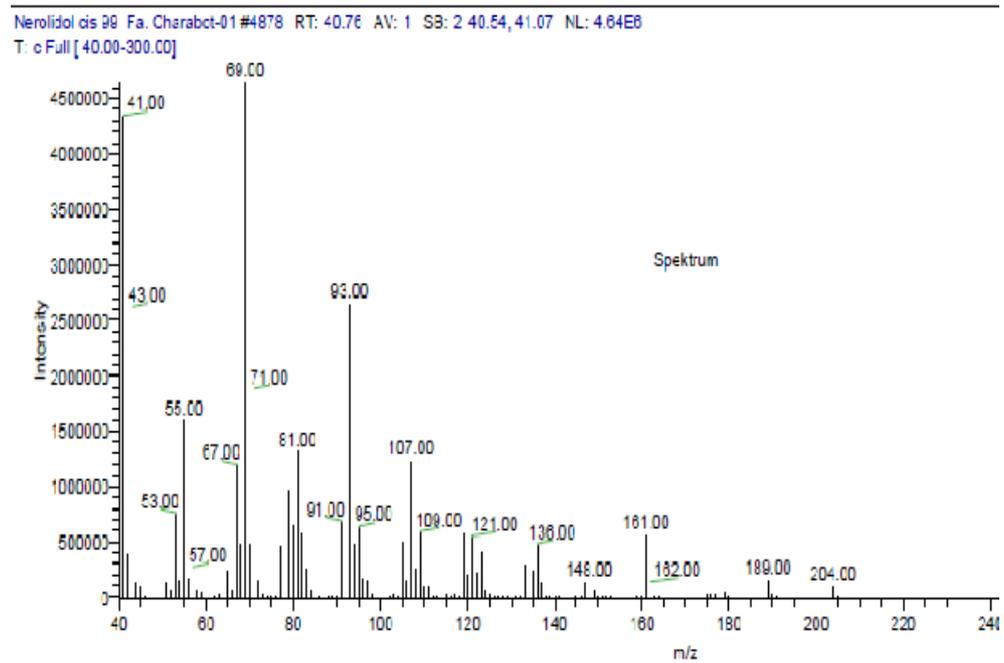


Abb. 10 Spektrum *cis*-Nerolidol

4.1.2 Verdünnungsreihe

Der nächste Schritt war das Anfertigen einer Verdünnungsreihe von *cis*-Nerolidol in Methanol, um zu sehen bei welcher Konzentration *cis*-Nerolidol noch zu erkennen ist. Die Spektren wurden im Full-Scan Modus aufgenommen.

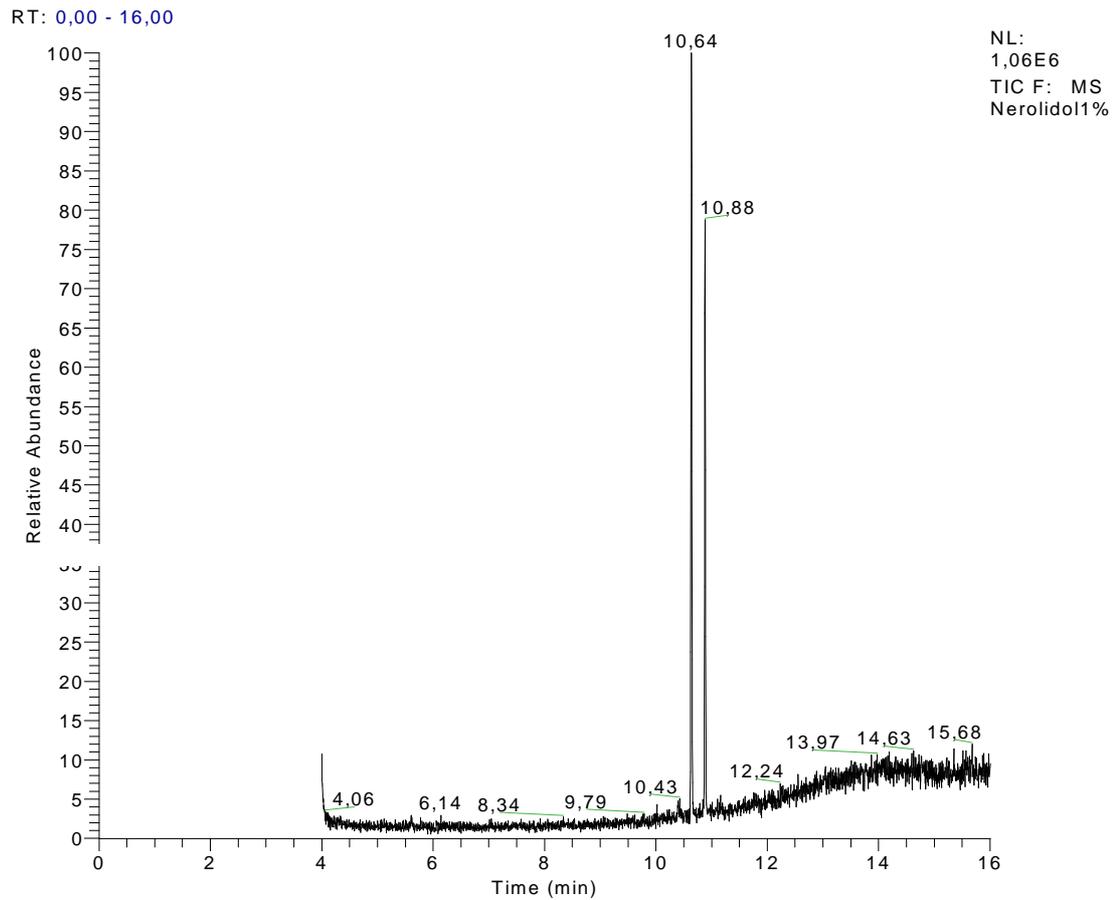
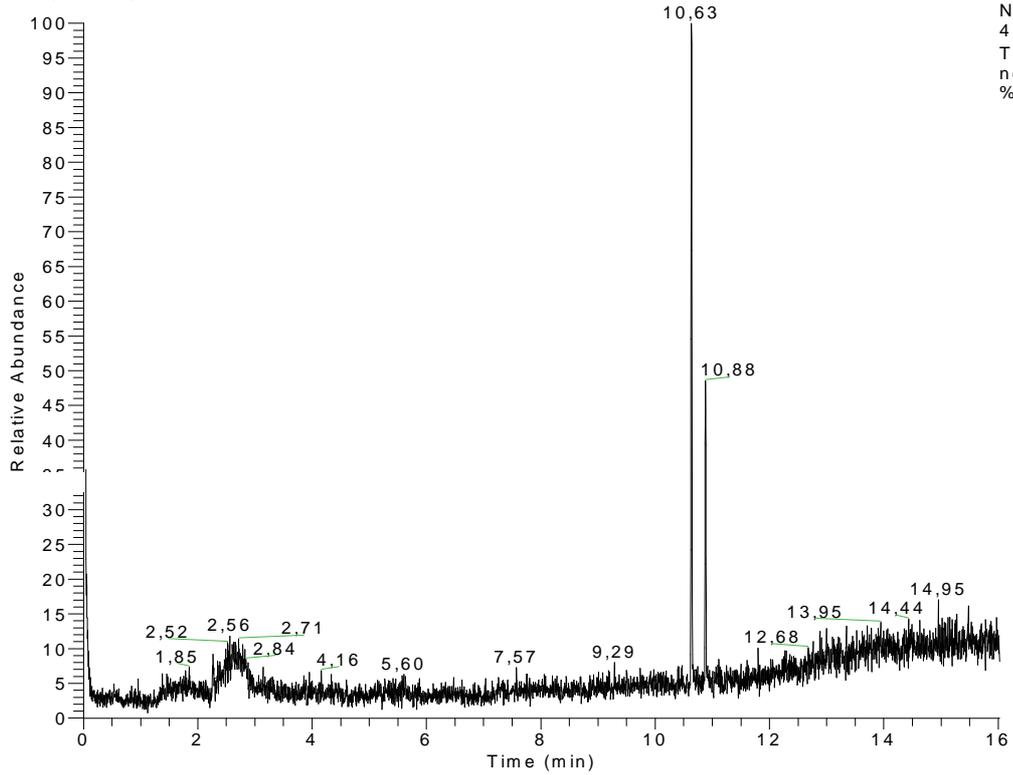


Abb. 11 1% *cis*-Nerolidol in Methanol

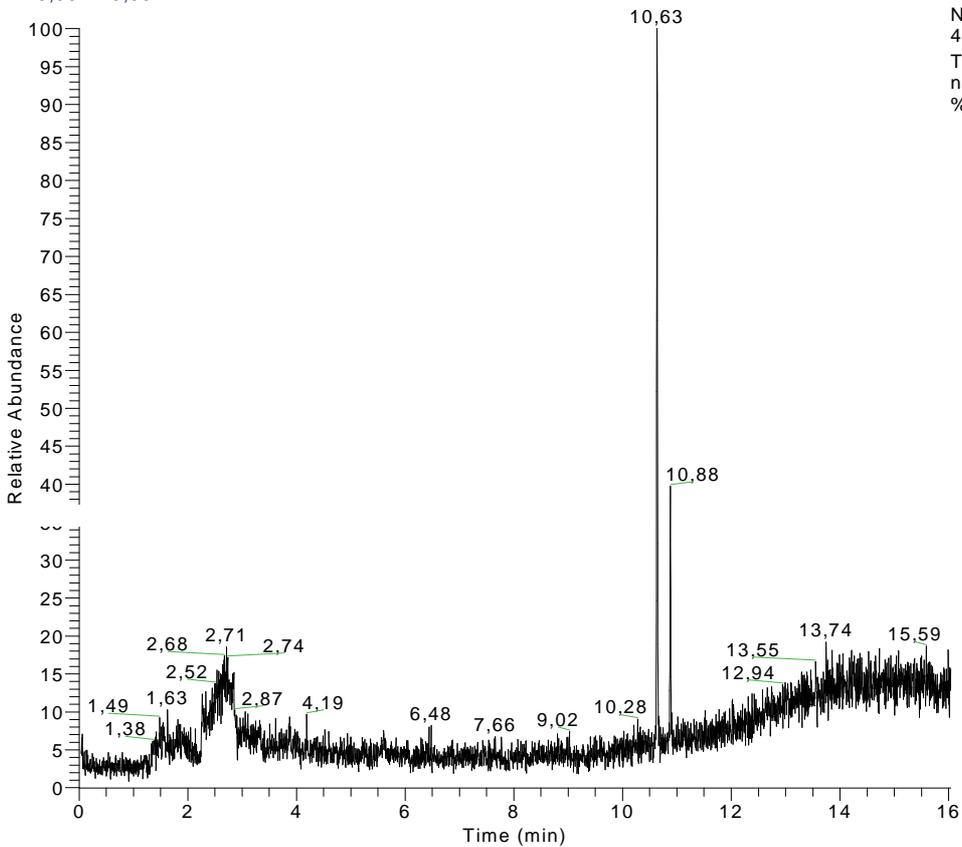
RT: 0,00 - 16,02



NL:
4,69E5
TIC F: MS
nerolidol0,5
%inmeoh

Abb. 12 0.5% *cis*-Nerolidol in Methanol

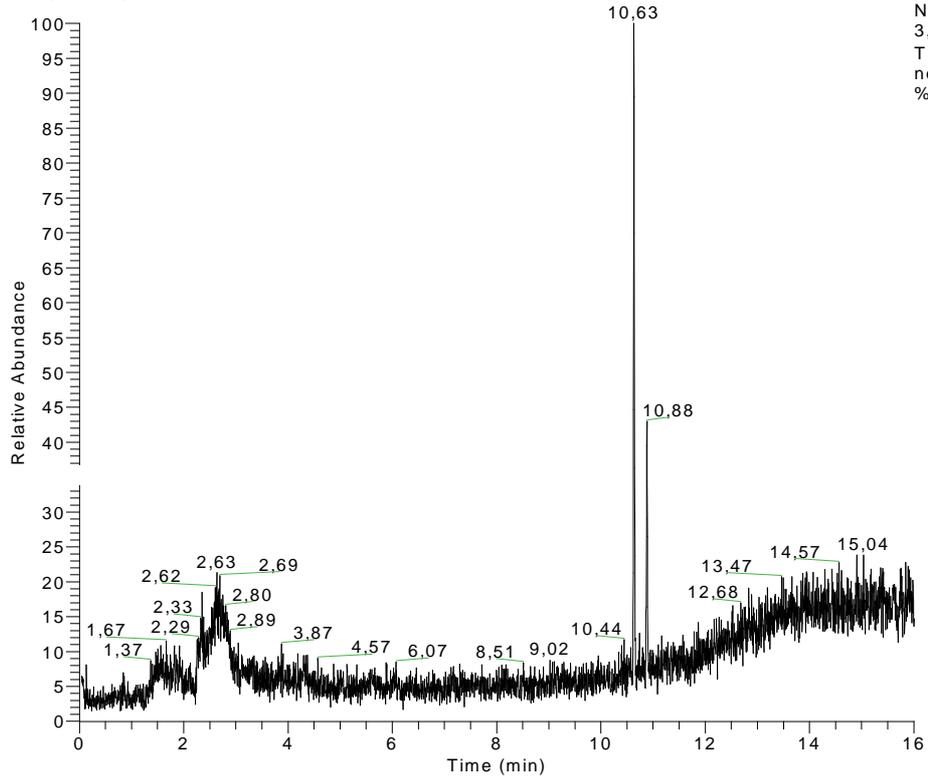
RT: 0,00 - 16,03



NL:
4,08E5
TIC F: MS
nerolidol0,2
%inmeoh

Abb. 13 0.2% *cis*-Nerolidol in Methanol

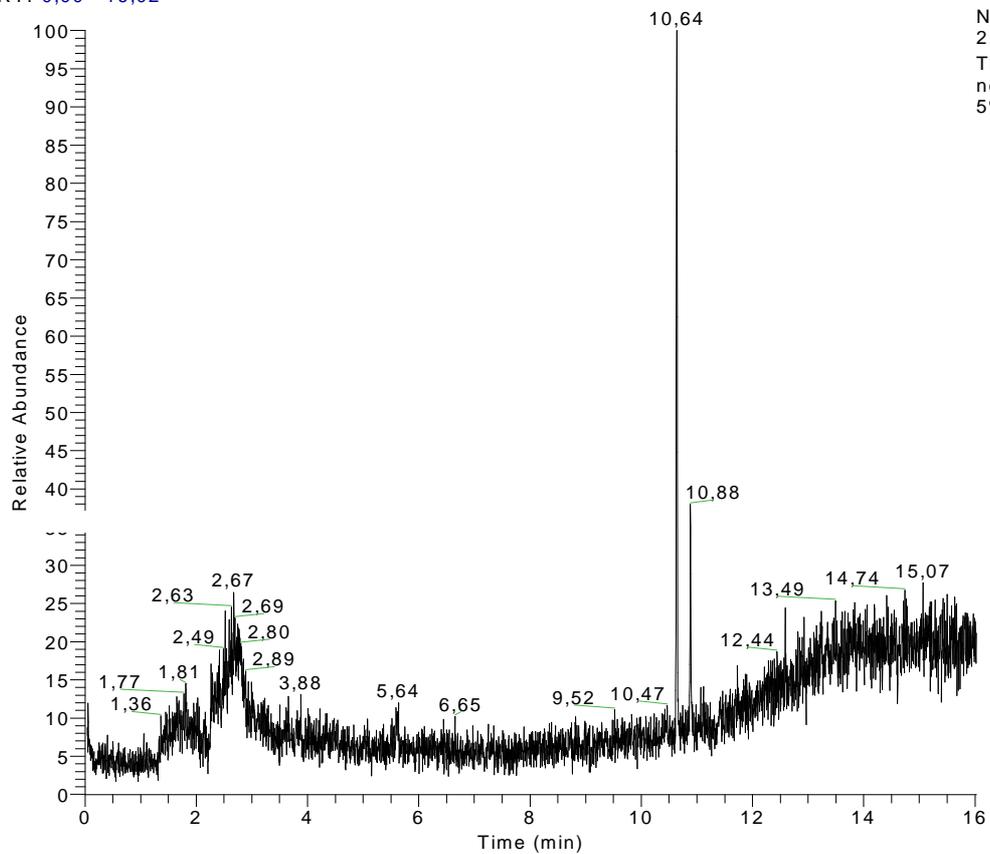
RT: 0,00 - 16,01



NL:
3,33E5
TIC F: MS
nerolidol0,1
%inmeoh

Abb. 14 0.1% *cis*-Nerolidol in Methanol

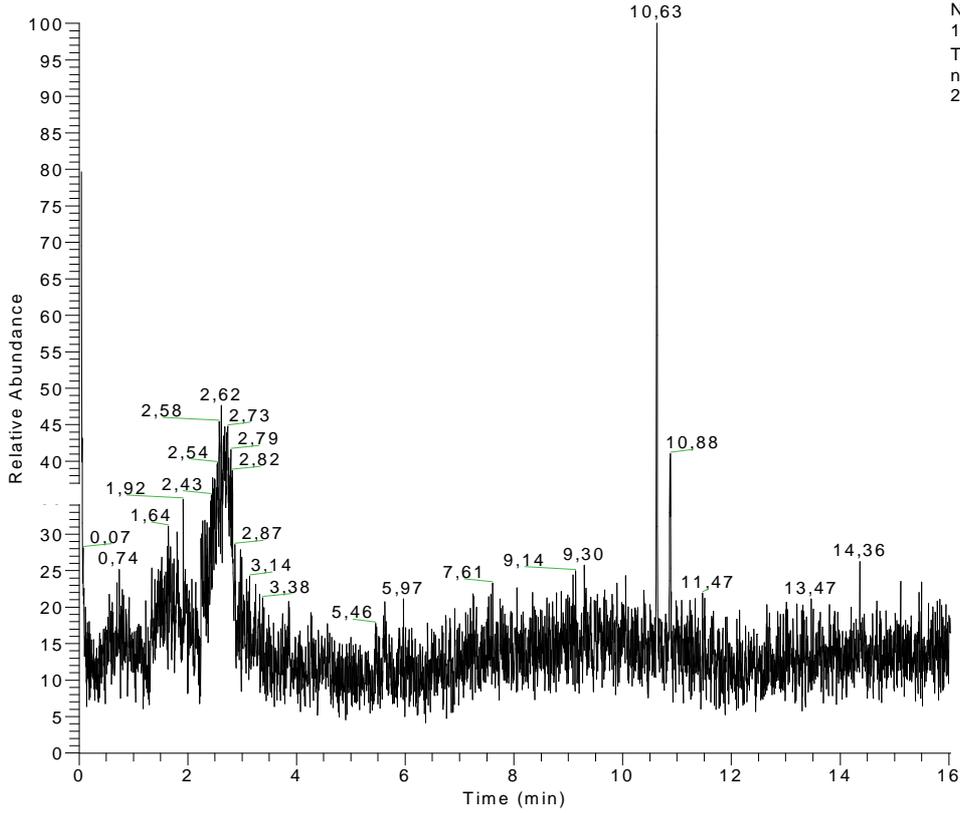
RT: 0,00 - 16,02



NL:
2,74E5
TIC F: MS
nerolidol0,0
5%inmeoh

Abb. 15 0.05% *cis*-Nerolidol in Methanol

RT: 0,00 - 16,03

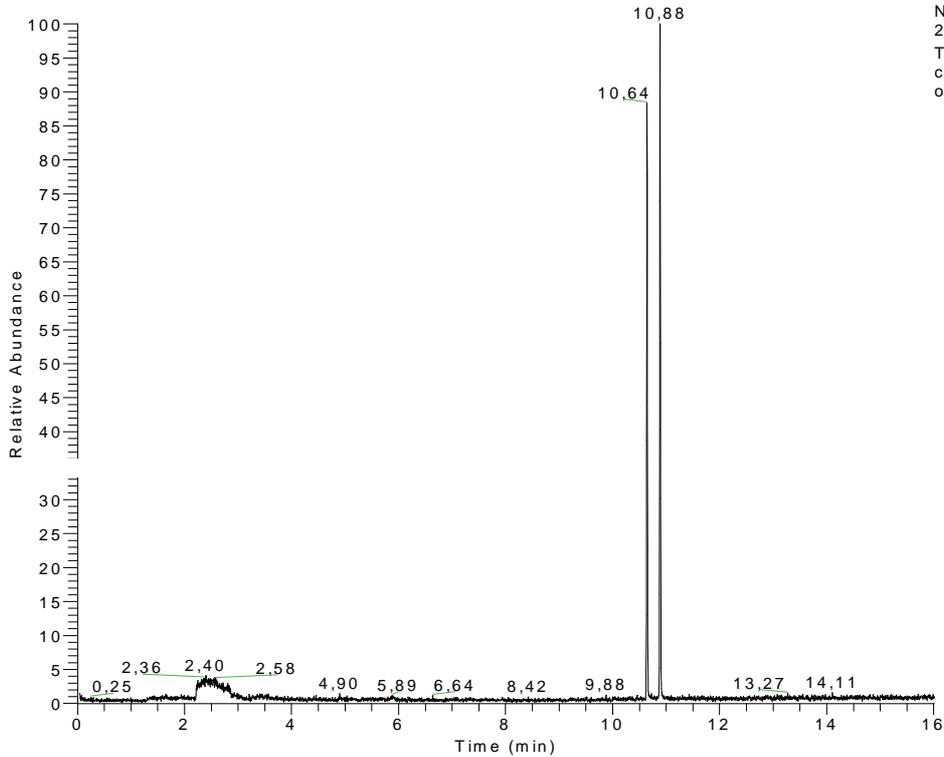


NL:
1,37E5
TIC F: MS
nerolidol0.0
2%inmeoh

Abb. 16 0.02% *cis*-Nerolidol in Methanol

4.1.3 *Cis/trans*-Nerolidol pur

RT: 0,00 - 16,01



NL:
2,05E6
TIC F: MS
cistransNer
oliPUR

Abb. 17 *cis/trans*-Nerolidol

Da bei der Verdünnungsreihe auffiel, dass zwei Peaks auftraten, einmal bei 10.63 bzw. 10.64 Minuten und einmal bei 10.88 Minuten, wurde zuerst das Chromatogramm von reinem *cis*-Nerolidol studiert und danach jenes von *cis/trans*-Nerolidol. Wie man aus dem Chromatogramm von reinem *cis*-Nerolidol sieht, erscheint es bei Minute 10.63, während die *trans*-Form bei Minute 10.88 zu erkennen ist. Somit wurde geschlossen, dass sich *cis*-Nerolidol bei Zugabe von Methanol teilweise in seine *trans*-Form umwandelt.

Bei der *cis/trans*-Isomerisierung lagert sich ein Proton an die Doppelbindung an, wobei ein Carbokation mit einer Einfachbindung entsteht, das nicht mehr rotationsbehindert ist und es nun zu einer Umlagerung kommen kann. Dies erfordert normalerweise sehr hohe Temperaturen, kann aber auch durch Säuren katalysiert werden. Bei der verwendeten Methode wurde nur bei 60°C inkubiert, was sicher noch zu keiner Isomerisierung führt. Ein weiterer Grund könnten die vorhergegangenen Harnmessungen sein, wobei die Headspace-Nadel oder der Liner mit dem sauren pH-Wert der Urinproben verunreinigt worden sind und die Umlagerung nun auf diesem Wege passieren. Abhilfe würde hier die Zugabe von basischen Substanzen, beispielsweise ein Tropfen einer flüchtigen Base, wie Pyridin oder Triethanolamin, schaffen.

4.2 Selbstversuche

Da Studien zur Hautverträglichkeit an Ratten, Meerschweinchen und Hasen ergeben hatten, dass bis zu einer Konzentration von 20% keine Hautirritationen auftreten, wurde die Konzentration der *cis*-Nerolidol-Erdnussöl Mischung bis zu 20% *cis*-Nerolidol gewählt. Für Erdnussöl entschieden man aus dem Grund, da es sehr geruchsneutral und angenehm auf der Haut ist.

Zu Beginn wurde eine Probe Leerharn genommen und vermessen, danach 1ml 20%iges *cis*-Nerolidol in Erdnussöl mit einer 1000µl

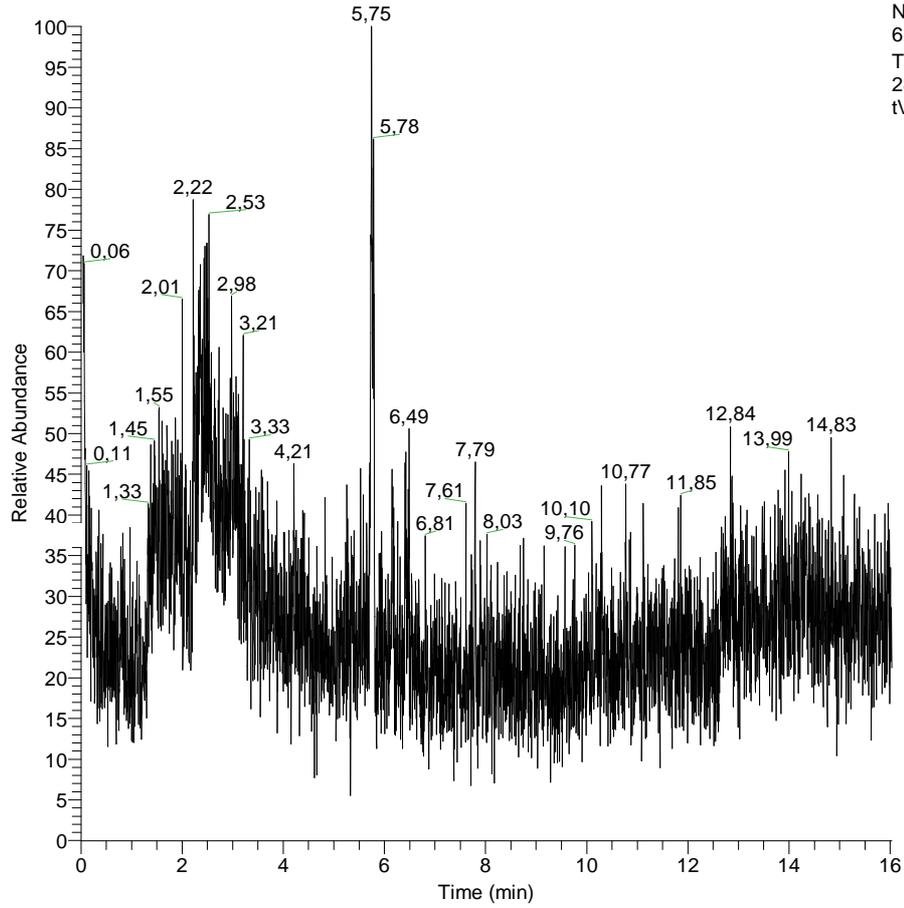
Pipette auf die Unterarminnenseite aufgetragen, zwei Minuten mit der dominanten Hand einmassiert und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Nach 20 minütiger Wartezeit wurde die Folie abgenommen und der Urin nach 1, 2, 4 und 6 Stunden vermessen.

Die Urinproben wurden je zwei mal zu 6ml in Probengefäße zu 20ml pipettiert und zu einer von den beiden wurde eine Spatelspitze Amidosulfonsäure zugesetzt, um von einem eventuell glukuronidiertem oder anders konjugiertem Nerolidol das Konjugat zu spalten. Auch zu der Leerharnprobe wurde je eine Probe mit Amidosulfonsäure versetzt um gleiche Bedingungen zu schaffen. Danach kamen sie 30 Minuten zur Inkubation in einen Trockenschrank bei 60°C und wurden anschließend nach Methode A (siehe S. 21) vermessen.

4.3 Gleichgewichtseinstellung

Um im Kopfraum des Headspaceröhrchens eine optimale Gleichgewichtseinstellung zu erzielen, probierte man mehrere Inkubationszeiten aus. Die Proben wurden nach 30, 60 und 120 Minuten bei je 60°C im Trockenschrank inkubiert und danach nach Methode A vermessen.

RT: 0,00 - 16,03



NL:
6,75E4
TIC F: MS
2StdHarnmi
tVIELamido

Abb. 18 Probe nach 30 minütiger Inkubation

RT: 0,00 - 16,03

NL:
1,31E5
TIC F: MS
2stdHarn1S
tdInkubiert

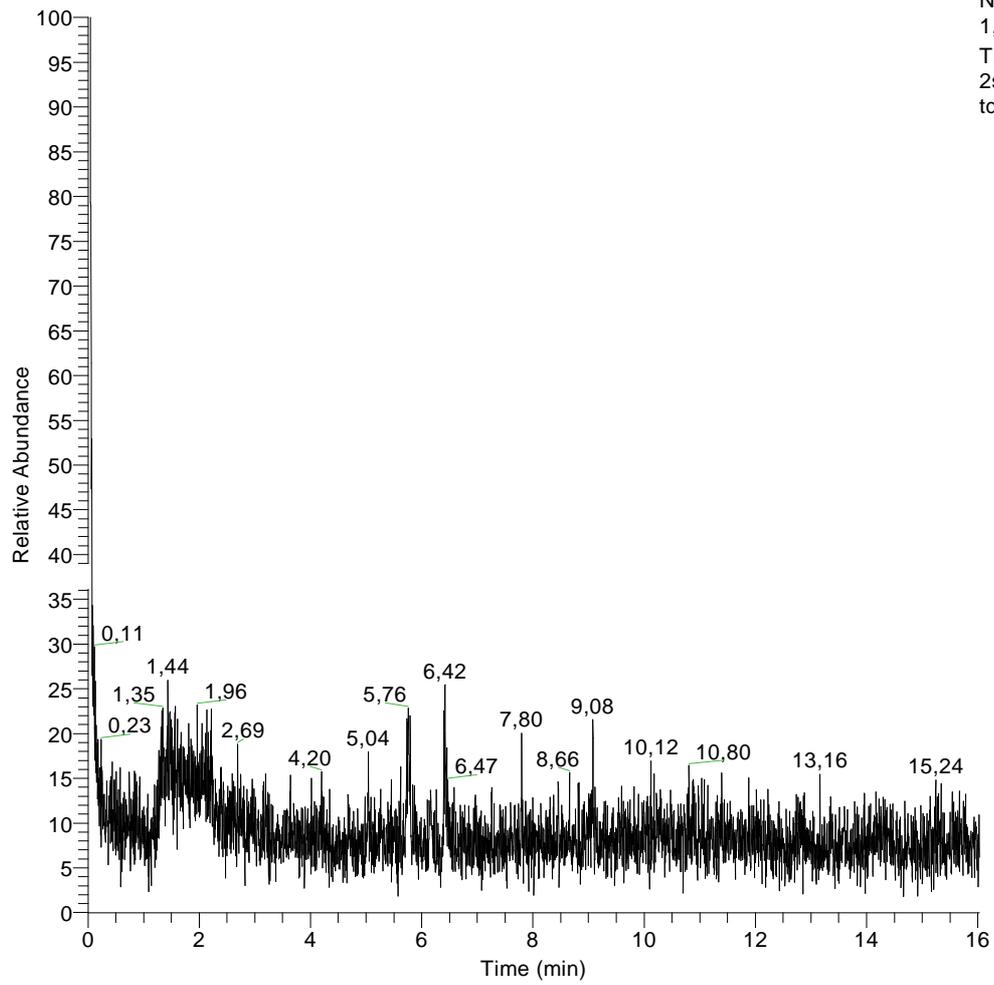
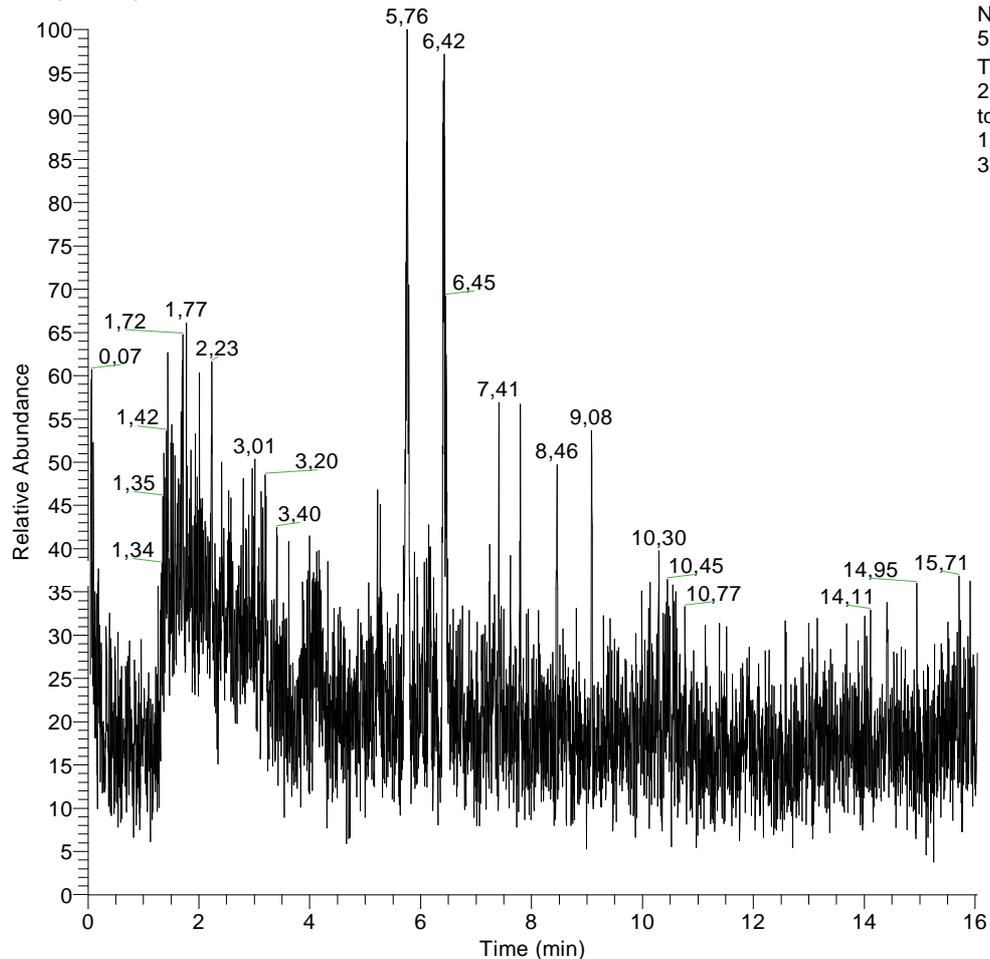


Abb. 19 Probe nach 60 minütiger Inkubation

RT: 0,00 - 16,03



NL:
5,05E4
TIC F: MS
2stdHarn2S
tdInkubiert_
111122124
321

Abb. 20 Probe nach 120 minütiger Inkubation

Da zwischen den drei Chromatogrammen mit unterschiedlicher Inkubationszeit kein Unterschied zu erkennen war, entschied man sich aus zeiteinsparenden Gründen für die Methode mit den 30 Minuten Inkubation im Trockenschrank.

Die Testreihe wurde mit einem größeren Kollektiv von 53 Versuchspersonen durchgeführt, da die Ausscheidung individuell sehr verschieden ist. Um eine repräsentative Aussage über die Exkretion von Nerolidol zu treffen wurden die Versuche fortgesetzt.

5 DISKUSSION

Nach gründlicher Literatursuche wurden über die Resorption, die Ausscheidung und die Detektionsmethoden von *cis*-Nerolidol an humanen Versuchspersonen bis jetzt noch keine Studien gefunden. Die bemerkenswerten Ergebnisse zu antitumoralen und antiviralen Eigenschaften von natürlichem und synthetisch hergestelltem Nerolidol gab daher den Anlass eine Pilotstudie zum Thema transdermale Applikation und anschließendem Nachweis mittels HS-GC-MS in menschlichen Urinproben zu machen. Da auch schon in einer älteren Studie der Nachweis erbracht wurde, dass Monoterpene wie + / -Carvon, nach 20-minütiger Dunstwickelmassage gut die Hautbarriere durchwandern und danach auch in Urinproben zu detektieren sind (Fuchs et al., 1997), entschied man sich für eine derartige Massagemethode.

Allerdings gelang es nicht in der vorliegenden Arbeit in den Urinproben der 53 Probanden *cis*-Nerolidol nachzuweisen. In der Auswertung aller Gaschromatogramme konnten keine Spuren davon gefunden werden. Hierfür gibt es mehrere mögliche Ursachen. Die gewählte Massagefläche an der Unterarminnenseite könnte zu kleingewesen sein. Sie hat jedoch den Vorteil gegenüber der Massage am Abdomen, besser durchblutet zu sein. Eine Applikation am unteren Abdomen wäre eventuell geeigneter, weil hier einfach die Resorptionsfläche größer ist. Ein Nachteil sind allerdings die vorhandenen Fettreserven, in die sich lipophile Substanzen wie Terpene gern einlagern. Die Einwirkzeit des 20%igen *cis*-Nerolidol-Erdnussölgemisches auf der Haut von den gewählten 20 Minuten unter Frischhaltefolie könnte man deutlich verlängern. Auch die Sammlung des Harns der 53 Testpersonen über 24 Stunden wäre eine Option gewesen. Bei der vorliegenden Studie entschied man sich für eine Zeitspanne von zwei Stunden. Der gesamte Metabolisierungsprozess körperfremder Produkte dauert häufig ja viel länger als diese zwei Stunden. In dieser Pilotstudie wurde der Harn der Probanden schon nach 1- 2 Stunden gesammelt und

vermessen. In dieser kurzen Zeit ist wahrscheinlich noch keine Ausscheidung zu erwarten. Bei der Studie von Nina Fuchs wurde für die erste Messung ein Sammelharn von 0-4 Stunden verwendet (Fuchs et al., 1997).

Die in dieser Studie angewandten Methoden brachten keinen Nachweis darauf, dass *cis*- Nerolidol unverändert im menschlichen Urin mittels Headspace-Gaschromatographie zu detektieren ist. Hier gibt es natürlich viele Änderungsmöglichkeiten sowohl am Gerät als auch an der Methodik. Für weitere Untersuchungen könnte man zuerst einmal die Inkubationszeit erhöhen, die hier 30 Minuten betrug. Außerdem gibt es noch viel Spielraum bei der Aufheizrate, sowie Maximaltemperatur. Da in derartigen Harnanalysestudien in einem sehr hohen Verdünnungsbereich gearbeitet wird, würde sich aufgrund der besseren Anreicherung und Aufkonzentrierung des Analyten die Festphasenextraktion oder SPME unter Umständen bessereignen. Wie bereits erwähnt kommt es bei Messungen von Urinproben zu einer Verschiebung in einen sauren pH-Bereich der Headspace-Nadel. Dies führt zu einer Isomerisierung von *cis/trans* Verbindungen, wie in Punkt 4.1.3 beschrieben, was im gegenständlichen Fall die Nachweisempfindlichkeit noch einmal herabgesetzt hat, da die Komponenten ja in einem sehr geringen Bereich in den Proben vorhanden sind. Den Versuch, ein entstandenes Glukuronid oder ein anderes Konjugat des *cis*-Nerolidols mit Amidosulfonsäure abzuspalten und im GC-MS nachzuweisen, konnte nicht erreicht werden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass einfach kein Nerolidol ausgeschieden wurde, weil es sich im Fettgewebe anreichert. Abschließend soll noch hinzugefügt werden, dass man auf Grund der vielversprechenden Eigenschaften dieser Substanz aus der Bitterorangenblüte auf jeden Fall weitere Untersuchungen durchführen sollte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit ist eine Pilotstudie zu *cis*-Nerolidol, einem Hauptinhaltsstoff des ätherischen Öls aus der Bitterorangenblüte. In früheren Studien entdeckte man die herausragenden antiviralen und antitumoralen Eigenschaften von *cis*-Nerolidol. Die Fragestellung der vorliegenden Diplomarbeit beschäftigt sich damit, ob *cis*-Nerolidol nach zwei minütiger Massage an der Unterarminnenseite und anschließender 20 minütiger Einwirkzeit unter Frischhaltefolie, im Urin von humanen Probanden nachzuweisen ist. Zu Beginn der Testreihe fertigte man eine Verdünnungsreihe an um zu untersuchen bei welchen Konzentrationen *cis*-Nerolidol mittels Headspace-Gaschromatographen, gekoppelt mit einem Massenspektrometer (HS-GC-MS) noch zu erkennen ist. Danach wurden Selbstversuche durchgeführt, wobei die Auftragemethode des Öls, als auch die Mess- und Detektionsmethode ident war mit den Methoden, die an den Probanden angewandt wurden. Die Messung erfolgte in einem Headspace- Gaschromatographen, gekoppelt mit einem Massenspektrometer. Bei der ersten Methode (Methode A) wurde 30 Minuten im Trockenschrank inkubiert, danach noch einmal fünfzehn Minuten im Agitator und im Split-Splitless Modus sechzehn Minuten im Full-Scan Modus gemessen. Aufgrund unzureichender Ergebnisse wurde eine weitere Methode (Methode B) versucht, wobei die Inkubationszeit im Agitator von 15 auf 30 Minuten erhöht wurde. Die 53 humanen Probanden (34w/ 19m) massierten sich 1 ml einer 20%igen Mischung von *cis*-Nerolidol in Erdnussöl ein und der Urin wurde nach zwei Stunden gesammelt und mittels HS-GC-MS auf Nerolidolvorkommen untersucht. Da nach gewissenhafter Durchsicht der Literatur bis dato nichts über die Art der Ausscheidung von *cis*-Nerolidol zu finden war, wurden die Probanden in zwei Gruppen unterteilt, wobei zum Urin der einen Gruppe Amidosulfonsäure zugesetzt, von der anderen hingegen nur der reine Urin analysiert wurde. Die Amidosulfonsäure wurde aus

dem Grund zugefügt, um ein von einem eventuell konjugiertem Nerolidol das Konjugat abzuspalten. Aufgrund einer geringen transdermalen Resorption dürfte Nerolidol nicht in die Blutbahn gelangen und damit auch nicht über die Nieren in den Harn ausgeschieden werden. Mögliche allgemeine Nebenwirkungen dürften daher nach kutaner Applikation nicht auftreten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Deutscher Apotheker Verlag, *Europäisches Arzneibuch* 6.22008, S.957

S. M. Friedl, K. Oedendorfer, S. Kitzer, G. Reznicek, G. Sladek, E. Heuberger, *Comparison of Liquid-Liquid Partition, HS-SPME and Static HS GC/MS Analysis for the Quantification of (-)-Linalool in Human Whole Blood Samples*, Natural Products Communications. 5: 1-6 (2010).

N. Fuchs, W. Jäger, A. Lenhardt, L. Böhm, I. Buchbauer, G. Buchbauer, *Systemic absorption of topically applied carvone: Influence of massage technique*, Journal Soc. Cosmet. Chem. 48: 277-282 (1997).

S. Goenechea, G. Ruecker, G. Hoffmann, M. Neugebauer, M. Langer, *Cleavage of the glucuronides of 2-phenylpropan-1-ol and 2-phenylpropan-2-ol, two metabolites of isopropylbenzene (cumene)*, Zeitschrift für Rechtsmedizin. 97: 83-88 (1986).

H. Hachenberg, K. Beringer, *Die Headspace-Gaschromatographie als Analysen- und Meßmethode*, Braunschweig/ Wiesbaden (1996), S.1-5;12-18;30-38;78-83

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

B. Kolb, *Gaschromatographie in Bildern*, Weinheim (1999), S.3-5

A. Lapczynski, S. P. Bhatia, C. S. Letizia, A. M. Api, *Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified)*, Elsevier, Food and Chemical Toxicology. 46: 247-250 (2008).

D. McGinty, C. S. Letizia, A. M. Api, *Addendum to material on nerolidol (isomer unspecified)*, Elsevier, Food and Chemical Toxicology. 48: 43-45 (2009).

E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-König, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, Stuttgart, (2008), S.24-33

B. Ryabchenko, E. Tulupova, E. Schmidt, K. Wlcek, G. Buchbauer, L. Jirovetz, *Investigation of Anticancer and Antiviral Properties of Selected Aroma Samples*, Natural Product Communications. 3: 1-3 (2008).

E. Teuscher, M. Melzig, U. Lindequist, *Biogene Arzneimittel* (6.Auflage), Stuttgart (2004), S. 179-182; 192-195;198;383-384;390-396

B. Thalhamer, W. Buchberger, M. Waser, *Identification of thymol phase I metabolites in human urine by headspace sorptive extraction combined with thermal desorption and gaschromatography massspectrometry*, Elsevier, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 56: 64-69 (2011).

T. Yamaguchi, J. Caldwell, P. B. Farmer, *Metabolic rate of [³H]-1-menthol in the rat*, Drug Metab. Dispos. 22: 616-624 (1994).

http://www.akoci.uni-hannover.de/AK_Kalesse/OCF-Vorträge04WS/20.12.04_Glycosidsynthese.pdf, 31.05.2012

<http://www.chemie.uni-erlangen.de/vostrowsky/natstoff/05Terpene.pdf>, 31.05.2012

http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/citr_sin.html, 31.05.2012

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Gruppe A.....	24
Tabelle 2: Gruppe B.....	25
Tabelle 3: Gruppe C.....	26
Tabelle 4: Gruppe D.....	27
Tabelle 5: Gruppe E.....	28
Tabelle 6: Gruppe F.....	29

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Isopren <i>Guidobauersachs</i> (http://www.guidobauersachs.de/oc/isopren.gif , 31.05.2012)	5
Abb.2 Acetat-Mevalonat-Weg <i>Enzyklopädie-Chemgapedia</i> (http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/width/749/height/561/vsc/de.de , 31.05.2012)	6
Abb.3 Triose-Pyruvat-Weg <i>Sciencedirect</i> (http://ars.sciencedirect.com/content/image/1-s2.0-S0031942297009928-gr1.gif , 7.6.2012)	7
Abb.4 Grundstruktur Sesquiterpene <i>Lexikon Ätherische Öle</i> (catbull.com/alamut/Lexikon/Index/Aetherische Oele.htm , 18.05.2012)	8
Abb.5 Sesquiterpenlacton erstellt mit ISIS DRAW 2.4	11
Abb.6 Artemisinin erstellt mit ISIS DRAW 2.4	12
Abb. 7 cis-Nerolidol erstellt mit ISIS DRAW 2.4	12
Abb.8 trans-Nerolidol erstellt mit ISIS DRAW 2.4	13
Abb. 9 cis-Nerolidol	31
Abb. 10 Spektrum <i>cis</i> -Nerolidol	31

Abb. 11 1% <i>cis</i> -Nerolidol in Methanol	32
Abb. 12 0.5% <i>cis</i> -Nerolidol in Methanol	33
Abb. 13 0.2% <i>cis</i> -Nerolidol in Methanol	33
Abb. 14 0.1% <i>cis</i> -Nerolidol in Methanol	34
Abb. 15 0.05% <i>cis</i> -Nerolidol in Methanol	34
Abb. 16 0.02% <i>cis</i> -Nerolidol in Methanol	35
Abb. 17 <i>cis/trans</i> -Nerolidol	35
Abb. 18 Probe nach 30 minütiger Inkubation	38
Abb. 19 Probe nach 60 minütiger Inkubation	39
Abb. 20 Probe nach 120 minütiger Inkubation	40

10 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Maria Lindmayr
Staatsangehörigkeit	Österreich
Geburtsdatum, -ort	27.10.1983, Vöcklabruck

Schulbildung

1994 – 2002	Bundesgymnasium Vöcklabruck, Reifeprüfung im Juni 2002 abgelegt
-------------	--------------------------------------------------------------------

Studium

10.2003 – 07.2012	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
Sommersemester 2009	Auslandssemester an der FU Berlin

Berufliche Tätigkeit

09.2007	Synthesen (-optimierung), Firma Pharmakon
10.2010 – heute	Geringfügige Beschäftigung, Apotheke alte Remise

Fähigkeiten und Kenntnisse

Sprachkenntnisse	Deutsch: Muttersprache Englisch: in Wort und Schrift Französisch: Grundkenntnisse Spanisch: Grundkenntnisse
------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------