

SCHLUSSBERICHT

zum Forschungsvorhaben

Schaffung von Ausgangsmaterial für die Erweiterung der
Arzneimittelpflanzenproduktion in Sachsen- Anhalt

Teilprojekt 1:

Schaffung und Untersuchung von Ausgangsmaterial für
die Selektion von Rhaponticinrhabarber und Erarbeitung
landwirtschaftlicher Anbauverfahren

Förderkennzeichen: 03i0613A

Bearbeitungszeitraum: 01.10.2001 – 30.09.2004

Projektverantwortlicher: Prof. Dr. Ingo Schellenberg

Wissenschaftlicher Bearbeiter: Dr. Gerhard Schnüber

Professor Hellriegel Institut
Bernburg
Strenzfelder Allee 28
06406 Bernburg

Bernburg, den 29.04.05

Registrier- Nr.:

Inhaltsverzeichnis

1. Zielstellung des Vorhaben
2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
3. Planung und Ablauf der Arbeiten
4. Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde
5. Verfahren und Schutzrechte, an die angeknüpft wurde
6. Versuchsdurchführung
 - 6.1 Anlage der Feldversuche
 - 6.2 Inhaltstoffliche und technologische Untersuchungen
7. Ergebnisse
 - 7.1 Wissenschaftliche Grundlagen
 - 7.1.1 Rhaponticinhaltige Arten in der Gattung Rheum
 - 7.1.2 Rheum rhaponticum
 - 7.1.3 Inhaltsstoffe von Rheum rhaponticum
 - 7.1.4 Stilbenderivate in Rheum rhaponticum
 - 7.1.5 Aufbau der Stilbenderivate
 - 7.1.6 Rhaponticin
 - 7.1.7 Desoxyrhaponticin
 - 7.1.8 Rhapontigenin und Desoxyrhapontigenin
 - 7.1.9 Dioxyrhaponticin
 - 7.1.10 Rhaponticin als Phytotherapeutikum insbesondere zur Behandlung klimakterischer Beschwerden
 - 7.2. Anbau von Rhabarber
 - 7.2.1 Pflanzgutgewinnung
 - 7.2.1.1 Wurzelstücke
 - 7.2.1.2 Herstellung von Pflanzgut durch Mikrovermehrung
 - 7.2.2 Pflanzung von Rhabarber
 - 7.2.2.1 Wurzelpflanzung
 - 7.2.2.2 Pflanzung von mikrovermehrten Pflanzen
 - 7.2.3 Landwirtschaftliche Bearbeitung der Rhabarberbestände
 - 7.2.3.1 Mechanische Bearbeitung
 - 7.2.3.2 Pflanzenschutz
 - 7.2.3.3 Pflanzenkrankheiten und Schädlinge
 - 7.2.3.4 Wurzelernte und Weiterverarbeitung
 - 7.3 Arbeiten zur Mikrovermehrung von Rhabarberpflanzen
 - 7.4 Entwicklung von Methoden zur Raponticinbestimmung
 - 7.4.1 Zugrunde gelegte Kenntnisse zur Extraktion von Rhaponticin
 - 7.4.2 Ausgangsmethoden
 - 7.4.3 Optimierung der verschiedenen Parameter bei der Ultraschallextraktion
 - 7.4.3.1 Untersuchungen zur Eignung verschiedener Lösungsmittel
 - 7.4.3.2 Methodenpräzision der optimierten Extraktionsmethode unter Wiederholbedingungen
 - 7.5 Erarbeitung einer CE - Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Rhaponticin
 - 7.5.1 Trennung von Stilbenderivaten durch CE
 - 7.5.2 Optimierung der Einflussfaktoren mit der Kapillarelektrophorese
 - 7.5.3 Ermittlung eines geeigneten pH - Wertes

- 7.5.4 Ermittlung einer geeigneten Pufferkonzentration
- 7.5.5 Präzision der Kapillarelektrophorese
- 7.5.6 Einfluss der Injektion
- 7.5.7 Zusammenfassung der einzelnen Methodenparameter

- 7.6 Erarbeitung einer HPLC - Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Rhaponticin
- 7.6.1 Zugrunde gelegte Kenntnisse zur Trennung von Stilbenderivaten durch HPLC
- 7.6.2 Chromatographische Bedingungen
- 7.6.3 Parameter der Kalibrierung
- 7.6.4 Untersuchungen zur Probennahme
- 7.6.5 Rhaponticingehalte der untersuchten Wurzelteile
- 7.6.6 Kostenkalkulation für den Anbau von Rhabarber

- 7.7 Untersuchungen der Rhaponticingehalte
- 7.7.1 Rhaponticingehalte bei unterschiedlicher N- Düngung
- 7.7.2 Selektion der Rhaponticingehalte zum Auffinden von Pflanzen mit hohen Konzentrationen an Rhaponticin
- 7.7.3 Rhaponticingehalte im Laufe der Vegetationsperiode
- 7.7.4 Einfluss der Lagerung auf die Rhaponticingehalte
- 7.7.5 Untersuchungen zur vereinfachten Auslese auf rhaponticinhaltige Pflanzen

- 8. Zusammenfassung

- 9. Anbauverfahren Rhabarber, Rheum sp.

- 10. Literaturverzeichnis

Abkürzungen und Begriffserklärungen

A	Aceton
AG	Arbeitsgruppe
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CZE	capillary zone electrophoresis (Kapillarzonenlektrophorese)
DAD	Dioden - Array - Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
EOF	Elektroosmotischer Fluss
EtOH	Ethanol
FSH	follikelstimulierendes Hormon
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HS Anhalt	Hochschule Anhalt (FH)
HW	Hauptwurzel
KAS	Düngemittel (Kalk-Ammon-Salpeter)
LH	lutinisierendes Hormon
MeOH	Methanol
MEKC	Micellare Elektrokinetische Chromatographie
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
n	Anzahl
NW	Nebenwurzel
P	Phosphor

p. a.	pro analysi (= für analytische Zwecke)
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RP-18	Umkehrphase mit C-18 - Kohlenwasserstoffkette
RT	Retentionszeit
SIOH	Silanolgruppen
SIO ⁻	negativ geladene Silanolgruppen
STABW	Standardabweichung
TS	Trockensubstanz
UV-Bereich	Ultraviolette Strahlung als Teil des elektromagnetischen Spektrums
VIS-Bereich	der für das menschliche Auge sichtbare Bereich des elektromagnetischen Spektrums
V _K	Variationskoeffizient
WFR	Wiederfindungsrate
SF	Selektionsfeld
G	Genotyp

1. Zielstellung

Ziel des Forschungsvorhabens war es, aus dem Genfond des Professor Hellriegel Institutes Bernburg Rhabarberpflanzen mit hohen Rhaponticingehalten zu selektieren und für deren Produktion Mikrovermehrungsverfahren zu entwickeln. Dazu war es notwendig, für die Selektion von rhaponticinreichen Pflanzen aus den Rhabarberarten *Rheum rhaponticum* L. und *Rheum undulatum* Samen zu gewinnen, auszusäen und nach 2 Jahren Wachstum dieser ausgesäten Pflanzen die Wurzeln auf die Rhaponticingehalte zu untersuchen.

Die Gewinnung von Rhaponticin dient der Herstellung eines pharmazeutischen Präparates. Die Produktion der Rohstoffe dafür soll in der Region Nordharz- Börde erfolgen.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde die Grundlage für die landwirtschaftliche und industrielle Produktion und die Herstellung von ausreichend rhaponticinreichen Pflanzen erarbeitet. Dafür mussten folgende Teilaufgaben bearbeitet werden:

- Erzeugung von Sämlingen, um die genetische Variabilität des Rhabarbers bei der Aussaat zur Auslese neuer rhaponticinreicher Herkünfte auszunutzen.
- Untersuchung neuer Genotypen, deren Rhaponticingehalte noch nicht bekannt sind.
- Entwicklung von Möglichkeiten für eine schnelle Einführung neuer rhaponticinreicher Rhabarbergenotypen durch genotypspezifische Mikrovermehrungsmethoden.
- Versuche zur Entwicklung von Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Rhaponticin, die schon im Jungpflanzenstadium eine Einschätzung der Gehalte ermöglichen.
- Anbau rhaponticinreicher Genotypen aus dem verfügbaren Rhabarbersortiment der HS- Anhalt und Untersuchung ihrer ackerbaulichen Eignung.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Mit dem Zuwendungsbescheid vom 25.09.2001 konnte das Verbundvorhaben

„Schaffung von Ausgangsmaterial für die Erweiterung der Arzneimittelpflanzenproduktion in Sachsen-Anhalt“

Teilthema: „Schaffung und Untersuchung von Ausgangsmaterial für die Selektion von Rhaponticinrhabarber und Erarbeitung landwirtschaftlicher Anbauverfahren“

mit dem Förderkennzeichen 03i0613A am 01.10.2001 begonnen werden.

Die Höhe der Zuwendung für das Professor- Hellriegel- Institut Bernburg e.V. betrug 854.527,00 DM (nach Ergänzung vom 19.12.2003 436.912,72 Euro) für den Bewilligungszeitraum: 01.10.2001 bis 30.09.2004

Mit dem Verbundpartner TINPLANT- Pflanzenvermehrungs GmbH Klein Wanzleben wurde für den Bearbeitungszeitraum ein Kooperationsvertrag geschlossen.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Professor- Hellriegel- Institut war Koordinator des Vorhabens

„Schaffung von Ausgangsmaterial für die Erweiterung der Arzneimittelpflanzenproduktion in Sachsen- Anhalt“

und bearbeitete das Teilvorhaben

„Schaffung und Untersuchung von Ausgangsmaterial für die Selektion von Rhaponticinrhabarber und Erarbeitung landwirtschaftlicher Anbauverfahren“.

Die TINPLANT- GmbH bearbeitete Fragen der Erarbeitung genotypspezifischer Mikrovermehrungen mit dem Forschungsthema

„Entwicklung von Verfahren zur Mikrovermehrung rhaponticinhaltiger Genotypen von Rheum rhaponticum“

Vierteljährlich und bei Bedarf erfolgten wechselseitig Beratungen der Kooperationspartner zum Informationsaustausch über den Stand der Erkenntnisse.

4. Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

Die in den Wurzeln einiger Rhabarberarten enthaltene Stilbenverbindung Rhaponticin ist östrogen wirksam. Sie kann im Gegensatz zu synthetischen Östrogenen in Kläranlagen abgebaut werden. Damit kann es nicht, wie von den synthetischen Hormonen bekannt, zu einer Belastung des Grundwassers mit Östrogenen kommen.

Das Interesse an abbaubaren Hormonpräparaten nimmt in der letzten Zeit zu. Neben dem Nachweis synthetischer Hormone im Grundwasser einiger Regionen wurden in den letzten Jahren auch gravierende Einflüsse auf die Umwelt beschrieben (z. B. Verweiblichung männlicher Fische), die auf eine Anwesenheit von Hormonen in den Gewässern zurückgeführt werden. Ebenso sind die Wirkungen synthetischer Oestrogene in den letzten Jahren in die Kritik geraten.

Bekanntlich sind die biologischen Wirkungen der pflanzlichen Stilbene denen des natürlichen Follikelhormons sehr ähnlich [CASSIDY, 2000; SIEGFRIED, 1943].

Es werden folgende Indikationsgebiete angegeben:

- Klimakterische Beschwerden
- Dysmenorrhoe und hypoplastischer Uterus
- Amenorrhoe

- Endometritis post partum bzw. post abortum
- Beschwerden im hormonfreien Intervall bei Ovulationshemmer-Einnahme

Die Akzeptanz pflanzlicher Wirkstoffe als Bestandteil in Arzneimitteln nimmt ständig zu. Oftmals können unerwünschte Nebenwirkungen ausgeschlossen werden. Eine biologische Abbaubarkeit ist ebenfalls bei vielen pflanzlichen Produkten im Gegensatz zu rein synthetisch hergestellten vorhanden.

Die in einigen Arten von Rheum enthaltene Stilbenverbindung Rhaponticin ist östrogen wirksam. Sie kann im Gegensatz zu synthetischen Östrogenen in Kläranlagen abgebaut werden. Damit ist eine Belastung des Grundwassers mit Östrogenen ausgeschlossen.

Für die Extraktion von Rhabarberwurzeln zur Rhaponticingewinnung sind Wurzeln im Alter von zwei bis drei Jahren nötig, die auch hohe Konzentrationen an Rhaponticin enthalten. Diese werden in der Regel von mehreren Rhabarberarten geerntet, die zur Sektion Rhapontica gehören. Dabei sind in den letzten Jahren Lieferprobleme des Rohstoffes aufgetreten, die verschiedenen Ursachen haben.

Die in den vergangenen Jahrzehnten aus China importierten Wurzeln entsprechen nicht mehr den Anforderungen der pharmazeutischen Industrie. Einerseits ist der Rhaponticingehalt bei den Importen in den letzten Jahren von 11 auf unter 5 % gesunken, andererseits zeigte sich, dass die getrockneten importierten Wurzeln den europäischen Anforderungen hinsichtlich ihrer Herbizidrückstände nicht mehr entsprechen.

Nach HÖLZ (2000) sind die Wurzeln aus China durch einen starken Rückgang an Rhaponticin gekennzeichnet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Abnahme der Rhaponticingehalte seit 1983 in Rhabarberproben

Untersuchungsdatum	Kontroll- Nummer	Gehalt an Rhaponticin (%)getrockneter Droge
26.07.83	83 – 180	9,04
04.06.84	84 – 206	8,28
27.03.85	85 – 224	8,9
16.07.87	87 – 187	10,4
07.01.88	88 – 005	11,06
23.08.89	89 – 240	9,13
06.02.91	91 – 037	9,42
23.02.93	93 – 111	8,26
06.10.93	93 – 475	5,89
30.06.95	95 – 209	5,45
25.07.95	95 – 242	4,10
18.09.95	95 – 314	6,60
20.03.96	96 – 094	5,70
04.08.98	98 – 270	6,19
04.08.98	98 – 271	6,49

Es ist zu erkennen, dass in den gelieferten Chargen im Verlauf von 1983 bis 1998 der Rhaponticingehalt um ca. die Hälfte abnahm. Die Gründe dafür sind in verschiedenen Ursachen zu suchen.

1. Rhapontikrhabarber wird einerseits aus Wildbeständen gesammelt, andererseits in kleinen Betrieben angebaut. Die wilden Bestände nehmen ständig ab. Inzwischen zählt Rheum rhaponticum L. nach der am 6. Juni 1997 neu gefassten und ergänzten Bundesartenschutzverordnung zu den besonders geschützten Arten.
2. Das weltweite Geschäft mit Rheum officinale und Rheum palmatum, in denen kein Rhaponticin enthalten sein darf, führte zu einer Verminderung des Anbaues der Rhapontikrhabarber und die Wurzeln werden mit denen der Medizinalrhabarber vermischt.

Darum wird angestrebt, die Rohstoffproduktion in Deutschland unter kontrollierten Bedingungen durchführen zu lassen (Leidholdt,1999), um den nach derzeitigen Erkenntnissen zu erwartenden Bedarfssteigerungen zu entsprechen.

Die dazu geeigneten Pflanzen müssen aber erst geschaffen werden.

Darum soll mit dem Vorhaben die genetische Inhomogenität der Pflanzenart Rheum rhaponticum genutzt werden, um rhaponticinreiche Genotypen zu finden.

Für die Untersuchungen im Teilthema 1 ergaben sich folgende Aufgaben:

- Schaffung von rhaponticinreichen Rhabarberpflanzen durch Selektion
- Erarbeitung von Stilbenuntersuchungsverfahren mittels Kapillarelektrophorese und HPLC
- Untersuchung von Wurzelsegmenten, einzelnen Nebenwurzeln, Stängeln und Blättern, um eine für den Rhaponticingehalt repräsentative Probe nehmen zu können
- Ermittlung morphologischer Merkmale zur Erkennung von Eigenschaften, die mit dem Rhaponticingehalt korrelieren
- Untersuchung ackerbaulicher Eigenschaften von mikrovermehrten Pflanzen

5. Schutzrechte: Es bestehen keine Patente und Schutzrechte an dem Inhalt des Forschungsvorhabens.

6. Versuchsdurchführung

6.1 Anlage der Feldversuche

Versuchsort Bernburg

Standort:	Bernburg Kohlenstrasse und Neugattersleben Sachsen- Anhalt
Höhenlage über NN	80 m
Mittl. Jahresniederschlagssumme	483 mm
Mittlere Jahreslufttemperatur	8,9° C
Hauptbodenform	Löß-Schwarzerde
Standortregionaltyp	Lö 1a 1
Bodenwertzahl	93- 100

6.2 Versuchsfeld Kohlenstraße

- Für die Versuche zur Anlage von Feldern zur Selektion rhaponticinreicher Formen wurde als erster Schritt eine Aussaat im Gewächshaus vorgenommen. Die Samen, in Vorjahren von den Genotypen des Sortimentes geerntet, wurden in Aussaatkisten ausgesät und später pikiert und getopft. Sie blieben bis zum Einziehen der Blätter im Gewächshaus und wurden dann zu einer Kältebehandlung ins Freie gestellt. Die Pflanzen trieben im Frühjahr wieder aus. Sie wurden 2002 ausgepflanzt und sollten auf ihre Rhaponticingehalte untersucht werden. Auch ein Versuch mit einer Freilandaussaat wurde angelegt. Im Jahre 2002 wurden weitere Pflanzen in Aussaatkisten und direkt in Pflanzpaletten oder Freiland auf den Versuchsfeldern Kohlenstraße und Strenzfeld ausgesät und ausgepflanzt. Es wurden mehrere Versuche zur Selektion angelegt sowie technische Versuchsfelder für Bearbeitungsversuche (Anhang Abb.1-3).

Von ausgefallenen Samen wurden aufgelaufene Pflanzen aus dem Genotypensortiment zwischen den Reihen entnommen und zur Selektion auf Rhaponticin auf anderen Versuchsfeldern ausgepflanzt.

- Es wurde ein Düngungsversuch mit In- vitro- Pflanzen angelegt, um die Auswirkungen der N- Düngung auf die Pflanzen hinsichtlich der phänotypischen Entwicklung der Pflanzen, des Ertrages und der Beeinflussung der Rhaponticingehalte zu ermitteln. Die Pflanzen des Düngungsversuches wurden im Juli 2002 ausgepflanzt und mit 4 Düngungsstufen (mit 4 Wiederholungen) angelegt. Die Ausgangsposition hinsichtlich der natürlichen Bodenverhältnisse sind relativ gleich (Abbildung 4 und 5, Anhang). Sie lagen in den optimalen Bereichen (K=11-15; P= 6- 8 und Mg 8- 11mg/100 g Boden). Im zweiten Versuchsjahr lagen die Bodenuntersuchungswerte im gleichen Bereich. (Abbildung 1 und 2)

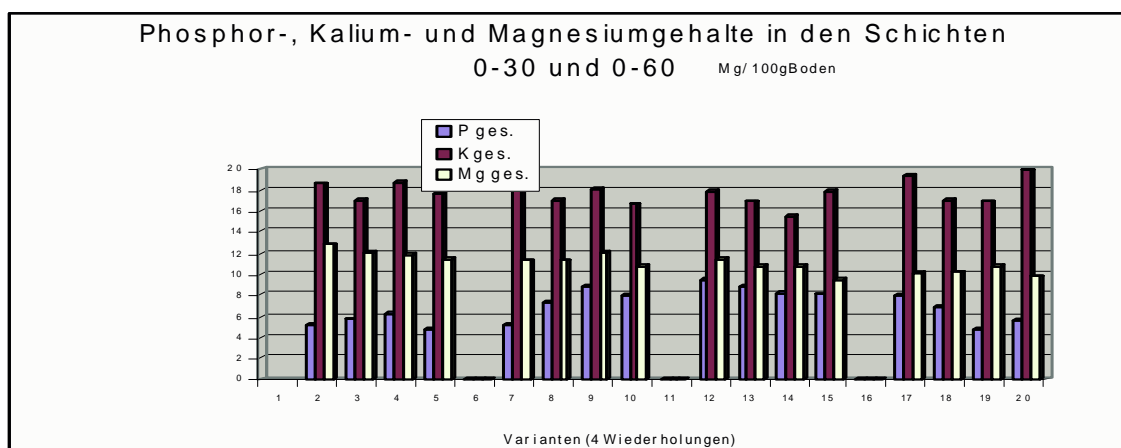


Abbildung 1: Phosphor-, Kalium und Magnesium im Boden vor der Pflanzung

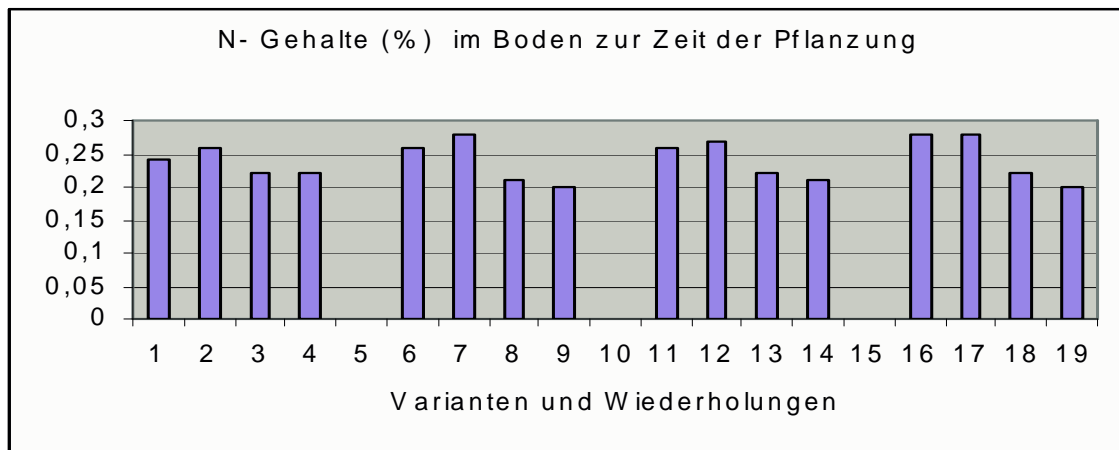


Abbildung 2: N- Gehalte im Boden, Düngungsversuch (Ausgangszustand)

Die Stickstoffgehalte lagen ebenfalls im Normalbereich und waren sehr einheitlich.

Die N- Düngung war Versuchsfaktor. Es werden folgende Düngungsstufen angewendet: 0, 80,160 und 240 kg N/ha

- Ein weiterer Versuch mit 4 Düngungsstufen wurde auf einem Damm angelegt, um zu untersuchen, wie die Wurzelentwicklung unter diesen Bedingungen verläuft. Die Pflanzung auf einem Damm, ähnlich einem Spargelbeet, soll die Ernte erleichtern. Daneben wurde untersucht, ob sich keine ertraglichen oder inhaltsstofflichen Einflüsse bei dieser Anbauart zeigen (Anhang, Abbildung 1).
- Bei der Selektionsfläche auf dem Strenzfeld befindet sich noch eine technologische Versuchsfläche, die aus mehreren Genotypen besteht (Genotyp 2, 10, 24 und 25). Sie wurde mit in die Untersuchungen einbezogen, um technologische Fragen der Bearbeitung, Ernte, Verarbeitung und andere nicht genotypspezifische Untersuchungen durchzuführen.
Eine weitere technologische Versuchsfläche bestand in auf den Feldern der Agrar GmbH Wulfen auf leichterem Boden (Anhang, Abbildung 2).

6.2 Inhaltsstoffliche Untersuchungen

Für die chemisch analytischen Untersuchungen wurden Verfahren entwickelt. Im einzelnen wurden verschiedene Extraktionsmethoden verglichen und Stilbenbestimmungsverfahren mit der Kapillarelektrophorese und der HPLC erarbeitet. Für die Lösung der Aufgaben wurden ca. 3000 Extraktionen und 6000 Einzelanalysen durchgeführt.

7. Ergebnisse

7.1 Wissenschaftliche Grundlagen

7.1.1 Rhaponticinhaltige Arten in der Gattung Rheum

Bedingt durch die hohe Bastardisierungstendenz der Familie Polygonaceae (Knöterichgewächse) gestaltet es sich schwierig, die artenreiche Gattung Rheum zu ordnen und zu systematisieren. Weiterhin fehlt es an konstanten Merkmalen, die eine

Differenzierung der Arten ermöglichen. Es gab zahlreiche Versuche eine entsprechende Systematik zu finden. Eine der ersten umfangreichen Gliederungen geht auf Losina-Losinskaja (1936) zurück. Sie systematisierte unter Einbeziehung morphologischer Merkmale (Fruchtform, Fruchtgröße, Blattform, u. a.) 49 Spezies in 7 Sektionen [HAGER, 1979].

Die pharmazeutisch bedeutendsten Arten finden sich in folgenden zwei Sektionen [HAGER, 1979]:

1. Palmata A. Los.: Bsp. Rheum officinale Baillon, Rheum palmatum Linné
2. Rhapsontica A. Los.: Bsp.: Rheum rhapsonticum Linné, Rheum undulatum Linné

Rheum rhapsonticum besitzt verschiedene Synonyme. Er wird teilweise als Rheum sibiricum, Rhapsontik - Rhabarber, Rhapsontik - Wurzel oder falscher bzw. pontischer Rhabarber bezeichnet. Für die Droge (Wurzel) sind Handelsbezeichnungen, wie Radix Rhei rhapsontici, Rhizoma Rhei rhapsontici oder Radix rhapsontici bekannt. [PANEITZ, 1995; ANONYM, 1986]

7.1.2 Rheum rhapsonticum

Die Pflanze Rheum rhapsonticum ist 1,2 – 1,5 m hoch und ausdauernd. Die unteren Blätter sind rundlich eiförmig, am Rande etwas wellig mit unterseits gefurchten Stielen. Die oberen Blätter sind länglich eiförmig und kurz gestielt (Abbildung3). In der Blütezeit von Mai bis Juni zeigt Rheum rhapsonticum gelblich weiße Blüten. [HAGER, 1979; ANONYM, 1986]



Abbildung 3: Blätter von Rheum rhapsonticum (Genotyp 17)

7.1.3 Inhaltsstoffe von Rheum rhapsonticum

Zu den Inhaltsstoffen zählen neben den hauptsächlich vorkommenden Anthracenderivaten ebenso Gerbstoffe, Flavonoide, Stilbene und organische Säuren, wie z. B. Fruchtsäuren (Citronensäure, Äpfelsäure) [HAGER, 1979].

Im Hinblick auf die Thematik dieser Arbeit sollen jedoch die Stilbene im Mittelpunkt des Interesses stehen. Stilbene sind phenolische Inhaltsstoffe, die hauptsächlich in der Wurzel von *Rheum rhaponticum* bzw. in Arten der Sectio *Rhapontica* vorkommen. Durch die Existenz vieler Bastarde sind die Stilbene jedoch weiter verbreitet. Sie konnten teilweise auch in den Wurzeln anderer *Rheum* - Arten nachgewiesen werden [SCHRATZ & WITT, 1966]. In Abbildung 4 ist eine Wurzel von *Rheum rhaponticum* gezeigt.



Abb. 4: Wurzel von *Rheum rhaponticum* (Genotyp 19)

Im Folgenden werden sowohl die strukturellen Eigenschaften als auch die analytischen Bestimmungsmethoden der Stilbenderivate in *Rheum rhaponticum* beschrieben.

7.1.4 Stilbenderivate in *Rheum rhaponticum*

Über den Gesamtgehalt an Stilbenderivaten in der Droge von *Rheum rhaponticum* gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Sicherlich auch in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode wurden bisher zwischen 1,5 (TSCHIRCH & CHRISTOFOLETTI, 1905) und 11 % Stilbenderivate (GRACZA & RUFF, 1984) gefunden.

Es konnten fünf verschiedene Stilbenderivate in *Rhei rhapontici radix* nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um *Rhaponticin* (*Rhaponticosid*), *Desoxyrhaponticin* (*Desoxyrhaponticosid*), *Rhapontigenin*, *Desoxyrhapontigenin* und *Dioxyrhaponticin*. Den Hauptanteil davon bildet *Rhaponticin*. [GRACZA, 1984]

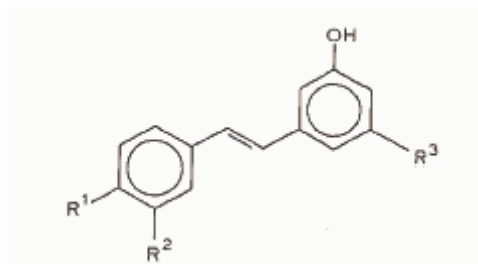
7.1.5 Aufbau der Stilbenderivate

Grundsätzlich bestehen Stilbene aus zwei Benzolringen, die über eine kurze ungesättigte Kohlenstoffkette (2 C- Atome) miteinander verbunden sind (vgl.

Abbildung 5). Die einzelnen Stilbenderivate des Rhabarbers unterscheiden sich durch ihren unterschiedlichen Hydroxylierungs- bzw. Methylierungsgrad. Charakteristisch für alle Stilbenderivate in *Rheum raphaniticum* ist die Hydroxylgruppe am zweiten Benzolring.

An den Molekülen von Rhaponticin, Desoxyrhaponticin und Dioxyrhaponticin ist ebenfalls am zweiten Benzolring zusätzlich Glukose gebunden.

Hydrolisiert (Glucoseabspaltung) man die Substanzen entstehen die jeweiligen Aglyka Rhapontigenin bzw. Desoxyrhapontigenin. Das vermutliche Aglykon von Dioxyrhaponticin konnte bisher nur in Spuren nachgewiesen werden. Eine Bezeichnung dieser Substanz wird in der Literatur nicht angegeben. [GRACZA, 1984]



	R ¹	R ²	R ³	Bezeichnung
1	OCH ₃	OH	O-Glu	Rhaponticin
2	OCH ₃	H	O-Glu	Desoxyrhaponticin
3	OCH ₃	OH	OH	Rhapontigenin
4	OCH ₃	H	OH	Desoxyrhapontigenin
5	OH	OH	O-Glu	Dioxyrhaponticin

Abbildung 5: Stilbengrundkörper in *Rheum raphaniticum* (oben) mit unterschiedlich gebundenen Restgruppen der einzelnen Stilbenderivate (unten)

7.1.6 Rhaponticin

Der Inhaltsstoff Rhaponticin wurde 1822 durch HORNEMANN beschrieben und so benannt. In den darauf folgenden Jahren wurden weitere Substanzen der Rhapontikwurzel entdeckt. TSCHIRCH und CRISTOFOLLETTI (1905) stellten jedoch fest, dass es sich dabei um identische Substanzen, das Rhaponticin, handelt.

Der strukturelle Aufbau von Rhaponticin wurde 1939 von KAWAMURA aufgeklärt. Er isolierte Rhaponticin aus der Rhabarberwurzel und erkannte es als 3,5,3'-Trihydroxy-4'-methoxystilben-3-D-glucosid. TAKAOKA konnte 1940 diese Aussage durch die Synthese von Rhaponticin bestätigen. [SPIELER, 1985]

Rhaponticin ist in *Rheum raphaniticum* in nachweisbaren Mengen vorhanden, wobei die Konzentrationsangaben entsprechend der natürlichen Herkunft auch hier sehr unterschiedlich sind. In Abhängigkeit vom Anbauggebiet des Rhabarbers und Zeitpunkt der Ernte schwanken sie zwischen 0,2 % [NEUHOFF & AUTERHOFF, 1954] und 8,8 % [KLIMEK, 1970]. Überwiegend aber wurden Konzentrationen um 5

% angegeben [SIEGFRIED, 1943; BORKOWSKI, 1965; CSUPOR, 1971; HAGER, 1979; ANONYM, 1985 u. a.].

7.1.7 Desoxyrhaponticin

Lange Zeit galt Rhaponticin als das einzige Stilben in *Rheum rhaponticum*. Aber schon FLÜCK (1952) wies darauf hin, dass Rhaponticin eventuell eine schwer abtrennbare Substanz enthalten könnte.

CSUPOR gelang es 1970 die Begleitkomponente von Rhaponticin nachzuweisen. Diese zeigte in seinen Untersuchungen Rhaponticin- ähnliche Eigenschaften, die sich mit der stark verwandten Struktur der Substanzen begründen lassen.

Die Begleitsubstanz enthielt nur eine OH-Gruppe weniger als Rhaponticin und wurde deshalb als Desoxyrhaponticin (3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilben-3-D-glucosid) bezeichnet. Aufgrund dieser Ergebnisse nahm CSUPOR (1970) an, „dass die bisher in der Literatur als reines Rhaponticin beschriebene Substanz nicht frei von dieser Beimengung war.“ Eine weitere Bestätigung dieser Annahme waren die abweichenden Schmelzpunkte.

Der Gehalt an Desoxyrhaponticin ist ebenfalls sehr unterschiedlich und hängt von der Herkunft, der Jahreszeit und vom Alter der Droge ab. Die Angaben schwanken zwischen 0,4 % [BANKS, 1971] und 4,5 % [KLIMEK, 1970].

7.1.8 Rhapontigenin und Desoxyrhapontigenin

Im sauren Milieu wird Rhaponticin zu Rhapontigenin und Glukose bzw. Desoxyrhaponticin zu Desoxyrhapontigenin und Glukose hydrolysiert [TSCHIRCH & CHRISTOFOLETTI, 1905]. Beide Aglyka konnten in der Droge mit Konzentrationen von unter einem Prozent nachgewiesen werden [BANKS, 1971] und 4,5 % [KLIMEK, 1970].

7.1.9 Dioxyrhaponticin

Das fünfte Stilbenderivat wurde von GRAZCA (1984) entdeckt. Dabei handelt es sich um ein 3,5,3',4'-Tetrahydroxystilben-3-D-glucosid. Die über HPLC ermittelte Konzentration lag bei 2,72 %. Wie vorangehend erwähnt, konnte das vermutliche Aglykon von Dioxyrhaponticin nur in Spuren nachgewiesen werden.

Bei der Extraktion von Rhaponticin werden gleichzeitig auch die eben erläuterten Stilbenderivate aus der Wurzelmatrix herausgelöst. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen beschränkten sich jedoch neben Rhaponticin lediglich auf Desoxyrhaponticin, da es mengenmäßig in relativ hohen Konzentrationen enthalten ist. Eine Trennung und quantitative Bestimmung der dazugehörigen Aglyka bzw. von Dioxyrhaponticin war im Hinblick auf das Ziel der Arbeiten nicht von Interesse.

7.1.10 Rhaponticin als Phytotherapeutikum insbesondere zur Behandlung klimakterischer Beschwerden

Begriffsbestimmung zur Thematik Klimakterium

Der Begriff Klimakterium bezeichnet den Lebensabschnitt (zwischen dem 40. und 65. Lebensjahr) einer Frau, in dem der Übergang vom Fortpflanzungsalter in die Phase der reproduktiven und hormonellen Ruhe stattfindet [LAURITZEN, 1987].

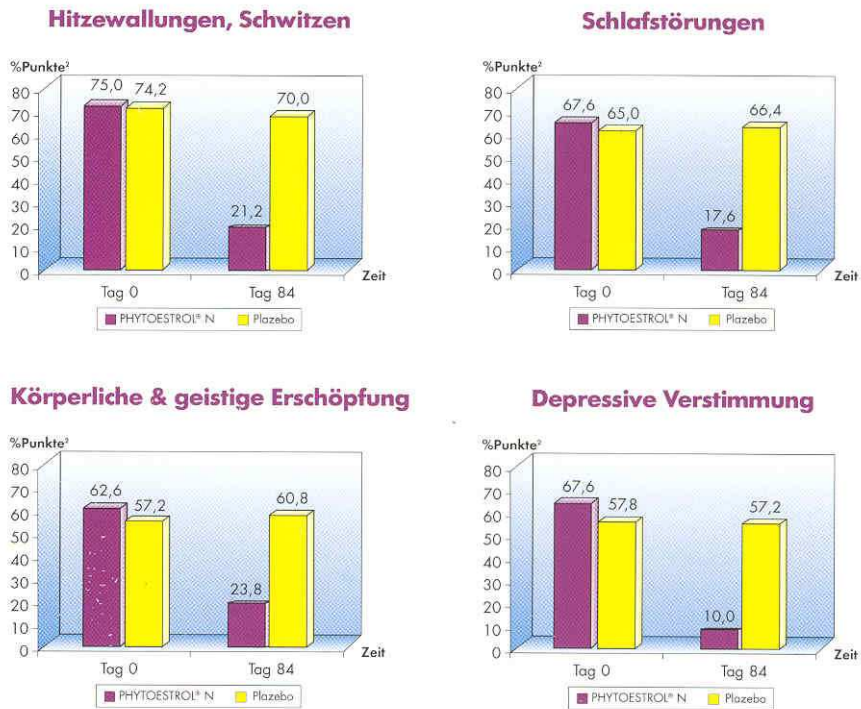
Innerhalb des Klimakteriums werden weitere Zeitabschnitte unterschieden. Die Menopause ist der Zeitpunkt, in dem die zyklischen Monatsblutungen aufhören und die letzte ovariell hormonell gesteuerte Blutung auftritt. Diese kann aber erst retrospektiv festgelegt werden, so dass aus praktischen Gründen das erste Jahr nach der Menopause zugerechnet wird.

Der Zeitabschnitt (einige Jahre) vor der Menopause wird als Prämenopause bezeichnet. Hier können bereits Blutungsstörungen und vegetative Beschwerden auftreten. Die Postmenopause beginnt am Ende der Menopause (nach 12 monatiger Amenorrhoe) und endet im Senium (= Lebensabschnitt vom 65. Jahr aufwärts). [FISCHL, 2000]

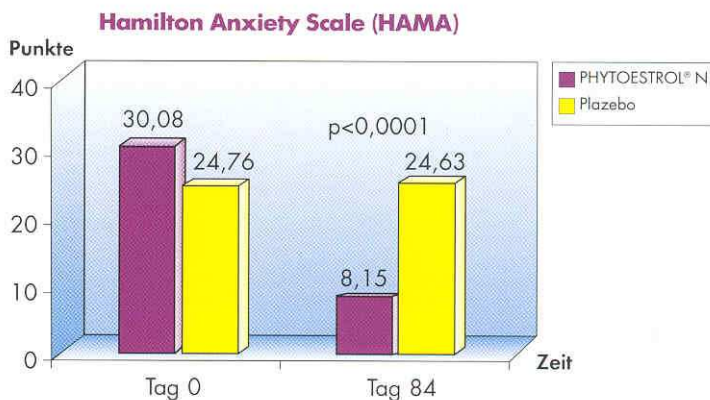
Pharmakologische Wirkung und therapeutische Anwendung von Rhaponticin

Bekanntlich sind die biologischen Wirkungen der pflanzlichen Stilbene denen des natürlichen Follikelhormons sehr ähnlich [CASSIDY, 2000; SIEGFRIED, 1943]. Besitzen Stilbene eine Hydroxylgruppe in p- Stellung, ist die östrogene Wirkung mit der einiger wirksamer Isoflavone vergleichbar [SCHAUER, 1964].

■ **PHYTOESTROL® N bessert signifikant die Einzelsymptome der MRS II, z. B.**



■ **PHYTOESTROL® N reduziert signifikant Ängstlichkeit³**



² 100 % entsprechen 5 Punkte

³ Hamilton Anxiety Scale (HAMA): 14 Items; max. 56 Punkte. Hamilton, M. The assessment of anxiety states by rating. Brit J Med Psychol 1959; 32: 50-55.

Abbildung 6: Wirkungen von Rhaponticin

Die einfache chemische Synthese der Stilbene hat viel zu ihrer umfangreichen Anwendung in der Hormontherapie beigetragen. Da es sich jedoch um reine synthetische Produkte handelt, wurde die Anwendung oft abgelehnt. Es war daher von großem Interesse auch die natürlichen in der Pflanze vorkommenden Stilbene auf ihren Nutzen für die Hormontherapie zu untersuchen. [KNÖRR et al., 1956]

Die Östrogenwirkung von Rhaponticin wurde 1943 von SIEGFRIED auf der Basis von Tierexperimenten ausführlich geprüft. „Rhaponticin zeigte eine deutliche östrogene Wirkung“ [SIEGFRIED, 1943], die allerdings schwächer war als die der

damals synthetisch hergestellten Östrogene. Aufgrund der relativ großen Mengen, die im Rhabarberrhizom vorkommen, war eine industrielle Aufarbeitung dennoch nahe liegend.

Weitere tierexperimentelle und klinische Untersuchungen folgten u. a. von KNÖRR et al. 1956 in der Universitäts- Frauenklinik Tübingen. Die östrogene Wirkung von Rhaponticin konnte dort mit Hilfe der Vaginalabstrichmethode an kastrierten

Für die klinische Untersuchung wurden Tabletten mit Rhaponticin (5 mg) und Hopfenextrakt (0,5 g Hopfen) verwendet. Die Untersuchungen ergaben, dass das Präparat sowohl bei primärer und sekundärer Amenorrhoe mit nachgewiesenem Follikelhormonmangel, bei dysmenorrhoeischen Beschwerden im Zusammenhang mit einem unterentwickelten (hypoplastischen) Uterus als auch bei Laktationshemmung und zur Behandlung von Endometritis eingesetzt werden kann. Bei der Verabreichung zeigte das Präparat gute bis zufrieden stellende Wirksamkeit bei guter Verträglichkeit. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. [KNÖRR et al., 1956]

Damit konnte bewiesen werden, dass die Verträglichkeit der pflanzlichen Östrogene im Gegensatz zu den synthetischen Stilbenen wesentlich besser ist. [GERSTER, 1981]

Der verwendete Hopfenextrakt allein erwies sich in vorangegangenen Versuchen als nicht östrogen wirksam, so dass die beschriebene Wirkung des Kombinationspräparats demnach auf Rhaponticin zurückzuführen war. Der Hopfenextrakt wurde hauptsächlich wegen seiner sedativen (vegetativ stabilisierenden) Eigenschaften eingesetzt, wodurch Rhaponticin noch besser verträglich wurde. [KNÖRR et al., 1956]

Das von KNÖRR verwendete Medikament wurde von der Chemisch Pharmazeutischen Fabrik Müller, Göppingen zur Verfügung gestellt und ist heute unter dem Namen PHYTOESTROL[®] auf dem Markt. Das Präparat wurde inzwischen auch für andere Anwendungsgebiete in der Hormontherapie getestet [METTENLEITER, 1980; BRANNTNER, 1979], die bei GERSTER (1981) zusammengefasst beschrieben werden. Generell eignet es sich für alle Indikationsgebiete, in denen eine Follikelhormontherapie notwendig ist. Für PHYTOESTROL[®] werden folgende Indikationsgebiete angegeben:

Die neueste Studie über die Wirkung von PHYTOESTROL[®] bezieht sich auf die Behandlung klimakterischer Beschwerden. Die Untersuchung an 107 Patientinnen ergab eine signifikante Linderung der Hauptsymptome Schleimhauttrockenheit, Reizbarkeit, Schweißausbrüche und Schwindel (Siehe Abbildung 6). Psychische Ängstlichkeit und Kopfschmerzen besserten sich ebenfalls innerhalb des Behandlungszeitraumes. [13/, CHEMISCH PHARMAZEUTISCHE FABRIK MÜLLER, GÖPPINGEN].

7.2 Anbau von Rhabarber

Bei Rhabarber ist die Vermehrung durch Pflanzung von Wurzelstücken üblich, da bei der Aussaat genetische Spaltungseffekte auftreten, die zur Vermischung der Sorteneigenschaften führen. Das spielte schon bei den Gemüserhabarbersorten mit definierten Geschmacksqualitäten eine Rolle und war auch für die Gewinnung von Gerb- und Farbstoffen mit bestimmten Qualitätseigenschaften von Bedeutung und ist

für den Anbau als Pharmapflanze ebenso wichtig. Zwar erfolgte in manchen Fällen noch eine Vermehrung über Samen, bei der auch hohe Stielträge zu verzeichnen waren, doch die Einheitlichkeit der Stielfarbe konnte nur bei vegetativer Vermehrung gewährleistet werden (MAYNARD, 1990).

7.2.1 Pflanzgutgewinnung

7.2.1.1 Wurzelstücke

Eine Lieferung von Pflanzstücken durch den Gartenbauhandel ist prinzipiell möglich, steht aber bei einsetzendem größerem Bedarf an der Leistungsgrenze. Vor allem bei Bedarf an speziellen Sorten oder Genotypen lässt sich der Anbau von mehreren Hektar mit Wurzelstücken nicht mehr verwirklichen, da damit in kurzer Zeit große Pflanzanzahlen nicht zu realisieren sind.

Voraussetzung für die Rhizompflanzung ist das Vorhandensein gesunder virusfreier Wurzeln.



Abbildung 7: Pflanzstück von ca. 800 g mit mehreren Knospen

Wenn man kleine Mengen an *Rheum rhaponticum* anbauen will, z. B. bei Anbauflächen um die 2000 bis 3000 Pflanzen, ist daher auch eine Gewinnung von Pflanzstücken aus vorhandenen Beständen sinnvoll. Der Landwirt muss diese Bestände dann allerdings auch zur Verfügung haben. Er kann dann die fleischigen Wurzeln als Rohstoff verkaufen und die Teile mit Knospen zu Pflanzstücken machen. Man schneidet dann bei der Reinigung der Wurzeln die Stücke mit den Knospen heraus. Im Rahmen anderer Forschungsthemen wurde diese Art der Pflanzstückgewinnung schon untersucht (Schellenberg und Schnüber, 2001).

Die Untersuchungen zur Gewinnung von Pflanzmaterial wurden an Pflanzen verschiedenen Alters mit der Sorte „The Sutton“ durchgeführt. Ein Teil der Wurzeln wurde nur zur Vermehrung geerntet, ein anderer für die großtechnische Verarbeitung. Die Pflanzstücke wurden vor der Weiterverarbeitung herausgeschnitten. Es wurde darauf orientiert, Stücke von ca. 500 g zu erreichen. Nach BIELKA (1961) und FRITZ und STOLZ (1989) soll das Gewicht der einzelnen Rhizomstücke 300 g bis 1 kg betragen. Sie müssen mindestens ein Auge (Knospe) aufweisen (Abbildung 7).

Andere Größen an Pflanzstücken (HÄGER, 1999) wurden bei der Pflanzung von Gemüserhabarber benutzt und von den Betrieben erfolgreich verwendet. Dabei wurden nur ca. 100 g große Stücke geschnitten, die sich dann aufgrund der geringen Größe auch mit geringerem Aufwand pflanzen lassen. Diese Pflanzstücke dürfen allerdings nicht lange gelagert werden, weil sie an der Luft leicht austrocknen.



Abbildung 8: Zu kleine Pflanzstücke eignen sich nicht für die Lagerung und vertrocknen

Für die Herstellung von Pflanzstücken sind kräftige Ausgangspflanzen mit gesunden Wurzeln und vielen Knospen (Augen) notwendig. Aus dem Gemüserhabarberanbau ist bekannt, dass kräftige Knospen schneller zu kräftigen Stielen und Blättern führen, was sich auch auf das Wachstum der Wurzeln auswirkt.

Als Ausbeute an Pflanzstücken wurde von 300 Wurzeln 1665 Rhizomstücke hergestellt. 1285 davon stellten mit einem Durchschnittsgewicht von 1 kg pro Stück und mehreren Augen (Knospen) eine sehr gute Qualität dar, 380 wiesen ein Durchschnittsgewicht von 462 g auf.

Beim Schneiden von 2000 Pflanzstücken wurden die Herstellungszeiten untersucht. Die Abbildung 9: zeigt, dass eine Wurzelteilung mit einem kontinuierlichen und kalkulierbaren Zeitaufwand möglich ist. Die Leistung blieb, ähnlich wie 1996 knapp unter 200 Stück je Stunde. Dabei ist nur die reine Teilungszeit berücksichtigt.

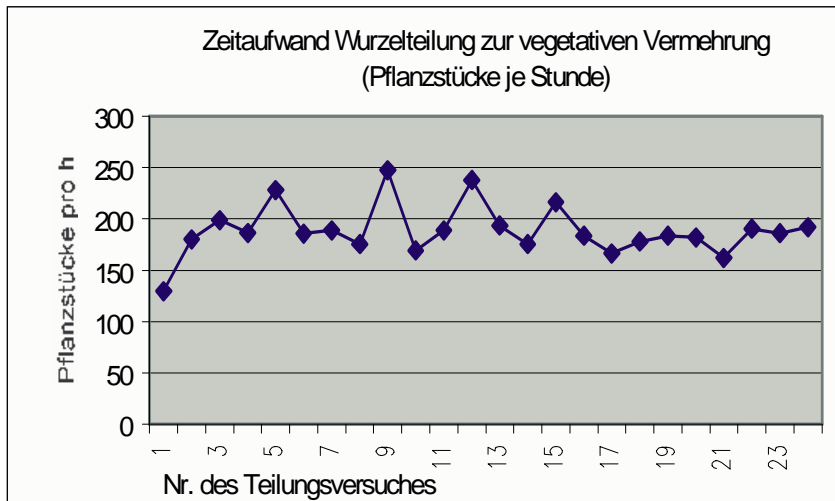


Abbildung 9 Herstellungszeiten für Pflanzstücke

7.2.1.2 Herstellung von Pflanzgut durch Mikrovermehrung

Für einen hohen Bedarf an Pflanzen und bei der Vermehrung spezieller, z. B. rhaponticinreicher Pflanzen aus der Selektion kann eine ausreichende Anzahl an Pflanzgut nur durch die Anwendung der Mikrovermehrung gewährleistet werden. Diese Thematik wurde von den Kooperationspartnern TINPLANT GmbH Klein Wanzleben bearbeitet.

7.2.2 Pflanzung von Rhabarber

7.2.2.1 Wurzelpflanzung

Zeitpunkt der Pflanzung

Die Pflanzung von Rhabarber erfolgte in Deutschland bisher fast nur im gärtnerischen Maßstab bzw. mit gärtnerischen Methoden, d. h. durch Eingraben der Pflanzstücke in den Boden. Auch in Gemüseanbaubetrieben ist keine Mechanisierung der Rhizompflanzung üblich. Sie wird meistens mit Saisonkräften durchgeführt.

Der Zeitpunkt der Pflanzung wird in Abhängigkeit von der Nutzung des Rhabarbers unterschiedlich festgelegt. Die bisher dazu beschriebenen Praktiken gehen alle von der Verwendung des Rhabarbers als Gemüse aus. Üblich ist traditionell eine Herbstpflanzung im Oktober oder November (FRITZ und STOLZ 1989). Dabei werden meistens nach dem Absterben der Blätter die Wurzeln ausgegraben, zerschnitten und gepflanzt. Begründet wird der Erfolg der Herbstpflanzung damit, dass sich während der Vegetationspause an dem Pflanzstück schon feine Haarwurzeln bilden, die im Frühjahr eine schnelle und kräftige Entwicklung begünstigen. Es kann jedoch auch vorkommen, dass bei nassen Standorten die

Bewurzelung langsamer vor sich geht und es zum Erfrieren des gepflanzten Wurzelstückes kommt (WIJK, 1998).

Eine Frühjahrspflanzung ist ebenfalls üblich. Diese wird traditionell nach Gartenbauerfahrungen (FRITZ und STOLZ 1989) bis Ende April durchgeführt. Inzwischen sind jedoch weitere Ergebnisse dazu publiziert. Im niederländischen Gemüsebau werden ebenfalls Herbst- und Frühjahrspflanzungen als üblich angesehen. Die Frühjahrspflanzung wird dort üblicherweise vom 9. Februar bis zum 1. April durchgeführt, wobei beim späteren Pflanzdatum die Wurzelstücke bis zum Pflanzen bei niedrigen Temperaturen in Torfmull (gegen Austrocknung) gelagert werden. Die besten Erfolge traten auf, wenn die Stücke nicht aus erst im Februar geernteten Wurzeln hergestellt wurden, sondern wenn die im Herbst geernteten Wurzeln zerschnitten und bei Temperaturen von -2 bis $+1$ °C aufbewahrt wurden. Dabei konnten 68% sehr gute Pflanzen erhalten werden, während bei der normalen Frühjahrspflanzung mit im Februar geernteten Wurzeln nur 50% gut angewachsen waren (WIJK, 1998).

Der sogenannten Sommerpflanzung wird erst in den letzten Jahren Beachtung geschenkt. Dabei werden die Pflanzstücke von Anfang Mai bis Ende August ausgepflanzt. Untersuchungen anhand der Qualität und des Ertrages der oberirdischen Stielmasse zeigten, dass die besten Ergebnisse an Biomasse (zweijährige Untersuchungen) bei Rhabarber erhalten wurden, die vom 11. Mai bis zum 24. Juni gepflanzt wurden (WIJK, 1997).

Bei Nutzung der Wurzeln zur Gerbstoffgewinnung ist es aber sinnvoll, erst nach der Vegetationsperiode die Mutterwurzeln zu ernten und Pflanzstücke herauszuschneiden, weil bis dahin noch mit Wurzelwachstum zu rechnen ist.

Pflanzung mit dem Pflanzpflug

Die Wurzelpflanzung mit einem Pflanzpflug wurde in einem anderen Vorhaben¹ schon beschrieben. Es wurde ein Pflanzgerät (Eigenbau) modifiziert, das vorher in Baumschulen zum Einsatz kam. Mit dem Gerät wird eine Furche gezogen, in welche die Pflanzstücke eingeworfen werden.

Unmittelbar nachdem die Wurzelstücke in die Erdrinne geworfen werden, erfolgt ein Zustreichen der Rinne mit Erde durch angebrachte Bleche. Zwei Räder drücken dann die Erde fest.

Die Pflanzzeiten betragen pro Hektar (ermittelt bei Parzellenversuchen) 4 bis 5 Stunden.

Pflanzung durch Auslegen der Pflanzstücke in eine vorgefertigte Furche

Es wurden auf den Versuchsflächen am Standort Bernburg mit einem Einscharpflug Furchen gezogen und die Pflanzstücke hineingeworfen. Anschließend wurde wieder zugepflügt, so dass die Wurzelstücke in der vorgesehenen Tiefe unter der Erde lagen. Prinzipiell tritt bei dem manuellen Einwurf der Pflanzstücke der gleiche Mangel wie bei der Variante mit dem Pflanzpflug auf, die Abstände zwischen den Pflanzen innerhalb einer Reihe sind (besonders bedingt durch das anschließende Zupflügen) nicht so gleichmäßig, dass später der Acker längs und quer bearbeitet werden kann.

1 Hektar konnte auf diese Weise mit 4 Personen in 10,5 (insgesamt 42 Arbeitsstunden) bepflanzt werden.

Handpflanzung

Es wurde eine Schnur mit Markierungen eingesetzt, um zwischen den Pflanzen gleiche Abstände zu gewährleisten. Eine Person grub mit dem Spaten Löcher für die Wurzelstücke in den gut gelockerten Boden, eine andere Person warf die Pflanzstücke in die Löcher und beim Ausstechen des nächsten Loches wurde die Erde in das mit der hineingelegten Wurzel geworfen, womit das Pflanzstück gleich bedeckt wurde. Die Pflanzzeit für einen Hektar betrug mit 4 Personen 14,75 h (insgesamt 59 Arbeitsstunden).

7.2.2.2 Pflanzung von mikrovermehrten Pflanzen

Beim Anlegen eines Feldes mit mikrovermehrten Pflanzen zeigte sich (dieses ebenfalls schon bei Versuchen zu einem anderen Thema,¹), dass mit herkömmlichen Pflanzmaschinen keine erfolgreiche Pflanzung möglich war, weil die Abstände zwischen den Pflanzen nicht realisiert werden konnten und auch die Blätter der kleinen Setzlinge abbrachen.

Es wurde deshalb versucht, Methoden für eine rationelle Handpflanzung zu entwickeln.

Zur Kennzeichnung der Pflanzstelle wurden mit den Abständen markierte Schnüre verwendet, die sich schnell anordnen lassen. Der Boden wurde tief durchgefräst. Mit einem speziell dafür gefertigten Metall- Pflanzstock wurden Löcher



Abbildung 10: Mikrovermehrte Rhabarberpflanzen mit Wurzelballen (Größe 4 cm)

¹ Entwicklung von Verfahren zum Anbau sowie zur biotechnologischen Erzeugung von fruchtsäure-, gerb- und farbstoffhaltigen Pflanzenarten aus der Sicht einer industriellen Verwertung der Inhaltsstoffe (FKZ L22-60203/NR-A032)

in die Erde gestoßen, in welche die Pflanzen eingesetzt wurden. Die eingesetzten Pflanzen wurden danach festgetreten. Die Methode erwies sich als sehr produktiv. Die Pflanzen mit den 4 cm Wurzelballen wuchsen gut an. Bei ausgetrocknetem Boden ist jedoch ein Angießen oder eine Bewässerung notwendig.

Zeitaufwand für die Pflanzung der mikrovermehrten Pflanzen:

Ausmessen und Etiketten stecken für 50 Reihen 40 min, das entspricht je Reihe	0,8 min
Pflanzschnur längs (Reihenverlauf) stecken	2,0 min
Pflanzlöcher mit Spezialgerät bereiten	5,0 min
Pflanzentransport zur Pflanzreihe (berechnet auf 1 Reihe mit 50 Pflanzen)	1,2 min
Pflanzen mit Wurzelballen in die Pflanzlöcher einlegen	2,5 min
Pflanzen festtreten	2,5 min

1 Person benötigt für 50 Pflanzen 14 Minuten, das entspricht für einen Hektar 20 Stunden und 45 Minuten (4445 Pflanzen/ha) bzw. 31 Stunden (6667 Pflanzen je ha).



Abbildung 11-13: Mikrovermehrte Pflanzen nach der Pflanzung sowie im 2. und 3. Wachstumsjahr. Die Pflanzen wuchsen gut an und bildeten gleichmäßige Bestände.

7.2.3 Landwirtschaftliche Bearbeitung der Bestände

7.2.3.1 Mechanische Bearbeitung

Die Pflege von Rhabarber ist bisher fast nur in Handarbeit durchgeführt worden. Bei großen Beständen ist, will man so wenig wie möglich Herbizide einsetzen, eine maschinelle Bearbeitung zur Reinhaltung notwendig, da Handarbeit zu erheblichen

Kosten führt. Schon in einem früheren Vorhaben wurden dazu Versuche durchgeführt (Anhang S. 4).²

Die Flächen wurden deshalb mit der Hackmaschine bearbeitet.

Es zeigte sich, dass eine wirksame Bearbeitung der Längsreihen durchgeführt werden kann. Die Wildkräuter zwischen den Reihen werden fast vollständig durch das Hacken entfernt.

Innerhalb der Reihen bleiben jedoch viele Kräuter stehen. Das geschieht vor allem bei der ersten Bearbeitung, wenn der Rhabarber noch nicht viel Blattmasse entwickelt hat, die durch Beschattung des Bodens in der Reihe eine Unkrautentwicklung vermindert.

Bestände mit großen Genotypen decken den Boden zwischen den Reihen schnell ab, auch wenn die Pflanzen in Abständen von 1,50 x 1,50 m gepflanzt sind. Innerhalb der Reihen ist meistens auch eine Bearbeitung (quer) notwendig. Kleinere Genotypen muss man dann enger pflanzen. Wenn innerhalb der Reihen nur Meterabstände gewählt werden, werden die Reihen schneller dicht, können dann aber nur schlecht mit herkömmlicher Technik bearbeitet werden. Man braucht dann kleinere Technik, die dann extra angeschafft werden muss.

7.2.3.2 Pflanzenschutz

Obwohl der Anbau des Rhabarbers nach den Forderungen der Verarbeiter so wenig wie möglich mit Pflanzenschutzmitteln behandelt werden soll, sind Versuche mit Herbiziden durchgeführt worden, um bei Bedarf eingesetzt werden zu können. In einem früheren Forschungsthema wurden schon verschiedene Herbizide getestet, um die Verträglichkeit der Mittel zu testen. Die Ergebnisse sind im Anhang Seite 3 dargestellt.

Im Rahmen des Vorhabens zum Rhaponticinrhabarber wurden alle Versuchsfelder hinsichtlich der Bekämpfung der Unkräuter bearbeitet und untersucht. Da durch die vorhergehenden Arbeiten die Wirkungen einzelner Herbizide auf die Rhabarberpflanzen und auf die Unkräuter schon ermittelt wurde, sind die Untersuchungen auch im Praxismaßstab auf den größeren Versuchsfeldern durchgeführt worden. Die kleineren Bestände zur Selektion und die Parzellenversuche wurden mechanisch mit der Einradhackmaschine bearbeitet.

Tabelle 2. Unkrautbekämpfung auf den Selektionsflächen

Versuchsfeld	Behandlung	Unkrautbonitur nach der Behandlung	
		Bedeckungs- Grad % 22.04.04	Unkräuter
Selektionsfläche 1	mechanisch	6	Kreuzkraut, Klettenlabkraut,
Selektionsfläche 2	mechanisch	6	Distel, Kamille, Besenrauke, ausgesamerter Rhabarber
Selektionsfläche 4	mechanisch	15	Distel, Kamille, Besenrauke, Klatschmohn,

² Entwicklung von Verfahren zum Anbau sowie zur biotechnologischen Erzeugung von fruchtsäure-, gerb- und farbstoffhaltigen Pflanzenarten aus der Sicht einer industriellen Verwertung der Inhaltsstoffe

Versuchsfeld	Behandlung	Unkrautbonitur nach der Behandlung	
Selektionsfläche 5	mechanisch	26	Ampfer, Besenkrout, Kamille, Pfeilkresse, Hirtentäschel, Distel
Selektionsfläche 6	unbehandelt	59	Ampfer, Besenkrout, Kamille, Pfeilkresse, Hirtentäschel, Distel, Knauelgras, Hohlzahn, Vogelmiere, Beifuß,
Düngungsversuch	mechanisch	7	Kreuzkraut, Klettenlabkraut Distel, Kamille, Besenrauke, Klatschmohn, Kan. Berufskraut

Tabelle 3:

Technische Versuchsflächen Mittel Sencor			
Strenzfeld	G 2 OL	61	Klettenlabkraut (ca.40 %), Distel, Kamille, Bärenklau
	G2, 24, 25 KLW	67	Klettenlabkraut (ca.40 %), Distel, Kamille, Bärenklau
G 10	Sencor 1 kg/ha	23	Klettenlabkraut, Distel, Bärenklau, Löwenzahn
G 10	Sencor 1 kg/ha	43	Klettenlabkraut, Distel, Löwenzahn, Kanadisches Berufskraut
G 10	unbehandelt	68	Klettenlabkraut, Distel, Löwenzahn, Kanadisches Berufskraut, Taubnessel, Hirtentäschel, Beifuß,, Vogelmiere

Der geringste Unkrautbewuchs war auf den Selektionsflächen 1 bis 5 (Tabelle 2) aufgetreten, welche in den Vorjahren mechanisch mit der Einradhacke gepflegt wurden. Diese Pflegeart ist aber für große Flächen nicht zu realisieren.

Die technischen Versuchsflächen (Tabelle 3) auf dem Strenzfeld zeigten stärkere Verunkrautungen. Die Flächen mit den Genotypen 2, 24 und 25 wurden am 9. März mit Sencor behandelt. Die Bedingungen dafür waren gut. Der Boden war leicht gefroren und Niederschläge waren nicht aufgetreten, so dass es zu einer günstigen Verteilung des Mittels kam. Die Wirkung war trotzdem nicht befriedigend und schlechter als in vorhergehenden Jahren. Das Vorauflaufmittel Sencor bekämpft keine Wurzelunkräuter, kein Kettenlabkraut und vorhandene Unkräuter dürfen das 3-Blattstadium noch nicht erreicht haben. Klettenlabkraut bildete den Hauptbestandteil der Bodenabdeckung. Die Rhabarberpflanzen auf dieser Versuchsfläche (kleine Genotypen) hatten auch keine sehr große Blattmasse, so dass sie den Boden erst später abdeckten als großblättrige Sorten. Damit konnten sich im Laufe der letzten 3 Jahre auch gegen das Mittel resistente und Wurzelunkräuter ansiedeln.

Die Versuchsfläche mit dem großblättrigen Rhabarber G 10 wurde ebenfalls mit Sencor behandelt. Eine Kontrollfläche wurde nicht gespritzt. Die Wirkung des Mittels war gut. Es herrschte noch keine so große Grundverunkrautung vor wie bei den kleineren Rhabarbergenotypen. Auf den behandelten Flächen mit diesem Genotyp waren 23 und 43 % des Bodens bedeckt. Es waren alles Unkräuter, die gegen das Mittel resistent waren.

Die unbehandelte Fläche war mit 68 % Bedeckungsgrad am stärksten verunkrautet.

Dort standen nicht nur die Wurzelunkräuter sondern auch die häufig auftretenden Frühjahrsunkräuter, die auf den behandelten Flächen fehlten.

Die Unkrautbekämpfung ist erfolgreich anzuwenden. Bei frühen Behandlungsterminen tritt beim Rhabarber keine Schädigung auf. Wurzelunkräuter müssen gesondert behandelt werden. Die vorhandenen Distel und wurden schon bei anderen Rhabarberflächen erfolgreich mit Lontrel behandelt, ohne dass der Rhabarber beeinträchtigt wurde.

7.2.3.3 Pflanzenkrankheiten und Schädlinge

Rhabarber ist eine kräftige Pflanze, die von wenig Schädlingen befallen wird, wenn man bei der Vermehrung von gesundem Material ausgeht. Viele Schädlinge treten nur gelegentlich oder bei extremen Witterungsbedingungen auf. Beschrieben werden für den Gemüserhabarberanbau z. B. Blattflecken (Rhamularia rhei). Es kommen dabei ovale bis unregelmäßig geformte braune Flecken auf den Blättern vor. KÜHN (1987) beschreibt Rhabarbermosaik, Stängelgrundfäule, Violetter Wurzeltöter, Falscher Mehltau, Rhabarberrost, und Blattfleckenkrankheit. Manchmal treten auch Cystenaale auf, welche die Pflanze meistens vom Grund her befallen (auch wenn sie dann im Stängel schmarotzen). Diese Schädlinge treten hauptsächlich auf, wenn vor dem Pflanzen von Rhabarber als Vorfrucht ebenfalls Rhabarber, Spinat, Kohl oder Kohlrabi standen. Gelegentlich kommen auch zwei Blattkäferarten (ESTER, 1998) vor, die sich zwar auch massenhaft vermehren können, aber nicht bekämpft werden müssen. Weitere Angaben zu aufgetretenen Krankheiten beim Rhabarber sind im Anhang S. 8 dargestellt.

7.2.3.4 Wurzelernte, Trocknung und Extraktion

Die Wurzelernte kann durch Auspflügen mit einem Spezialpflug (in der HS Anhalt angefertigter Pflug mit U- Messer und Rüttler vorgenommen werden. Die Wurzeln werden damit gleich vorgereinigt (Anhang Seite 9).

Bei den im Düngungsversuch verwendeten kleinen Genotypen wäre auch ein Wurzelroder aus dem Heil- und Gewürzpflanzensektor möglich.

Eine spezielle maschinelle Verladetechnik für die großen Rhabarberwurzeln existiert nicht und kann nur mit einem Rad- oder Frontlader vorgenommen werden. Rüben- und Kartoffelrodetechnik eignen sich nicht und müssten erst dafür modifiziert werden. Reinigung und Trocknung kann in Trockenwerken vorgenommen werden oder in speziellen Anlagen mit Wirbelschichttrocknern. Die dabei erhaltenen Schnitzel oder Pellets sind im Anhang S. 10 dargestellt.

Es wurden aufbauend auf einer gründlichen Analyse der im Labormaßstab gewonnenen Ergebnisse geeignete kleintechnische Extraktionsverfahren getestet. Für die vorliegende Aufgabenstellung kamen nur folgende Verfahren in Frage.

- fest-flüssig Extraktion
- fest-flüssig Trennung
- Aufkonzentrierung des Extraktes
- Ausfällen von Nebenprodukten
- fest-flüssig Trennung
- getrennte Aufkonzentrierung der gewonnenen Extrakt- und Raffinadphase
- Trocknung und Konfektionierung.

Schwerpunkt im Rahmen des geplanten Vorhabens war die Optimierung der Prozessstufen und die Ermittlung der erforderlichen Aufarbeitungsschritte für kleintechnische Versuche.

Für die fest-flüssig Extraktion gab es folgende Möglichkeiten für die Gewinnung der Stilbene Rhaponticin und Desoxyrhaponticin.

- Perkolatoren
- Mixer-Settler im Kreuz- und Gegenstrom
- Wirbelschichtextraktoren

Als geeignetes Verfahren erwies sich der Einsatz des Perkolators mit anschließender saurer Ausfällung des Rhaponticins und Desoxyrhaponticins.

7.3 Arbeiten zur Mikrovermehrung der Rhabarberpflanzen

Die Arbeiten zur Mikrovermehrung der Rhabarberpflanzen wurde von den Kooperationspartnern TINPLANT Pflanzenvermehrung Kleinwanzleben durchgeführt und in einem gesonderten Bericht dargestellt.

7.4 Entwicklung von Methoden zur Raponticinbestimmung

7.4.1 Zugrunde gelegte Kenntnisse zur Extraktion von Rhaponticin

Die Extraktion von Rhaponticin wird von verschiedenen Autoren beschrieben. Nach TSCHIRCH & CRISTOFOLETTI (1905) zeigt Rhaponticin in Mischungen von Aceton und Wasser und verdünntem Ethyl- und Methylalkohol besonders gute Löslichkeitseigenschaften. Ebenfalls löslich ist Rhaponticin in Natronlauge, Kalilauge bzw. Sodalösung. Es löst sich darin allerdings farblos und bekommt erst beim Erwärmen seine Farbe zurück. In erwärmtem Aceton, Eisessig, Ethyl- und Methylalkohol hingegen ist es nur gering löslich. Auch in kaltem Wasser lässt sich Rhaponticin nur wenig lösen, in heißem Wasser jedoch sehr leicht. Ether, Benzol, Chloroform und Petrolether sind ungeeignete Lösungsmittel für Rhaponticin.

Tabelle 4: Übersicht der in der Literatur angegebenen Extraktionsmethoden

Autoren	Jahr	Einwaage	Lösungsmittel	Ziel
NEUHOFF & AUTERHOFF	1954	0,5 g	15 ml Ethanol	Nachweis - Verfahren
KNÖRR, LEHR & PROBST	1956	--	Aceton	Hormontherapie
BORKOWSKI & SOBICZEWSKA	1965	0,5 g	5 ml Methanol (heiß)	Nachweis - Verfahren
CSUPOR	1970	100 g	750 ml Aceton/ H ₂ O (2:1; v/v)	Isolierung eines neuen Stilbenglucosids
BANKS & CAMERON	1971	800 g	1 l Methanol	Isolierung eines neuen Stilbenglucosids
NONAKA & MINAMI	1977	2,05 kg	19 l MeOH/ H ₂ O (3:2; v/v)	Charakterisierung von Stilbenglucosiden
KASHIWADA & NONAKA	1987	30 g	300 ml Aceton/ H ₂ O (1:1 v/v)	Charakterisierung von Stilbenglucosiden

7.4.2 Ausgangsmethoden

Als Ausgangsbedingungen wurden nach Literaturstudien die in Tabelle 4 dargestellten Parameter gewählt.

Die verwendeten Ausgangsmethoden wurden mit A und B bezeichnet werden.

Tabelle 5: Extraktionsbedingungen der Ausgangsmethoden A und B

Bedingungen	Ausgangsmethode A	Ausgangsmethode B
Einwaage	400 mg	50 mg
Lösungsmittelvolumen	4 ml	50 ml
Lösungsmittel	Methanol	Aceton/Wasser (1:1;v/v)
Extraktionsgerät	Ultraschallbad	Ultraschallbad
Extraktionstemperatur	60 °C	60 °C
Extraktionsdauer	15 min	15 min

Folgende Einflussgrößen wurden bei der Methodenentwicklung untersucht:

- Lösungsmittel
- Verhältnis Probeneinwaage und Lösungsmittelvolumen
- Mehrfachextraktion
- Standard - Addition
- Korngröße des Probenmaterials
- Extraktionstemperatur
- Extraktionsdauer

Die Extraktionsversuche erfolgten am Genotyp 21.

7.4.3 Optimierung der verschiedenen Parameter bei der Ultraschallextraktion

7.4.3.1 Untersuchungen zur Eignung verschiedener Lösungsmittel

Es wurden folgende Lösungsmittel nach Ausgangsmethode A überprüft:

- Aceton/ Wasser (1:1; v/v),
- Methanol,
- Methanol/ Wasser (1:1; v/v),
- Ethanol/ Wasser (1:1; v/v).

Die Ergebnisse zeigten, dass MEOH rein und Aceton/H₂O die größten Ausbeuten ergaben. Es wurde für die weiteren Versuche Aceton/Wasser genommen, da es weniger toxisch ist und nur 0,2% weniger Rhaponticin damit erhalten wurde. (Ausführliche Darstellung im Anhang S. 11)

Bei der weiteren Optimierung wurden die Standardabweichungen durch zweimalige Vermahlung vermindert.

Die Variante B zeigte signifikant höhere Ausbeuten und einen geringeren Variationskoeffizienten (3,3 gegenüber A mit 5,8). Es wurden deshalb 400 mg Probe mit 4 ml Lösungsmittel versetzt und nach dem Ultraschallbad auf 10 ml aufgefüllt. Abbildung 14 zeigt die ermittelte Rhaponticinausbeute im Vergleich zu den bisher erzielten Ausbeuten.

Die Rhaponticinanalysen wurden mittels HPLC durchgeführt.

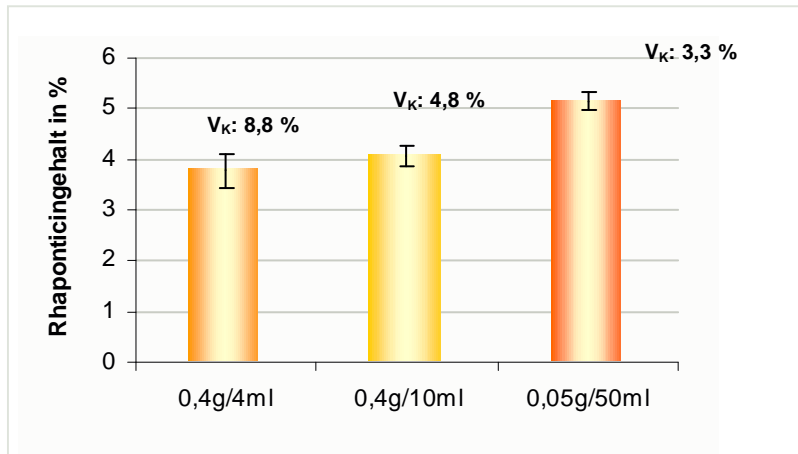


Abbildung 14: Extraktion von 400 mg Probe mit und ohne Auffüllschritt im Vergleich zur Ausgangsmethode B 0,05g/50 ml (n = 10)

Durch den Auffüllschritt konnte eine signifikante Steigerung der Ausbeute (von 3,78 % auf 4,05 %) erreicht werden. Trotzdem lag der gemessene Wert noch unter dem von Methode B (5,14 %). Wahrscheinlich bewirkt die höhere Einwaage von 400 mg Wurzelmehl eine stärkere Lösungsmitteladsorption als 50 mg Probe.

In der folgenden Versuchsreihe (Abbildung 15) wurden die Proben von je 50 mg Wurzelmehl mit 5 ml Aceton/ Wasser versetzt, wobei die Hälfte der Proben nach dem Ultraschallbad auf 10 ml Aceton/ Wasser aufgefüllt wurden. In der folgenden Abbildung sind beide Rhaponticingehalte im Vergleich zur ursprünglichen Methode B dargestellt.

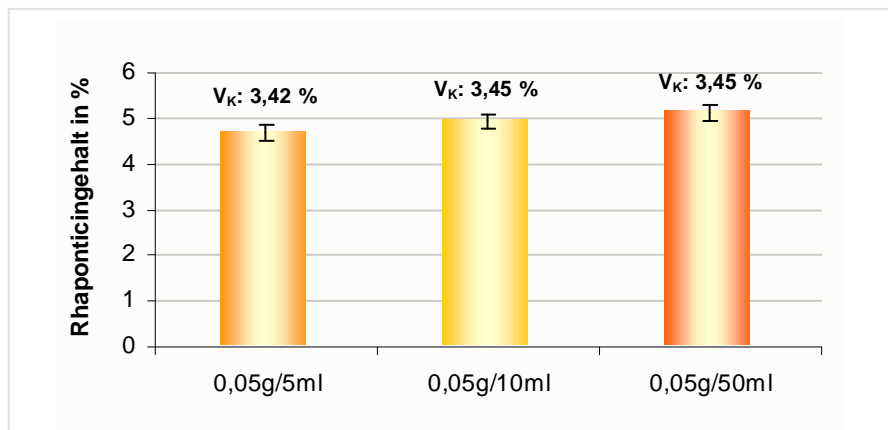


Abbildung 15: Extraktion von 50 mg Probe mit und ohne Auffüllschritt im Vergleich zur Ausgangsmethode B 0,05g/50 ml (n = 10)

Es sind auch hier mit dem Auffüllschritt (10 ml), höhere Rhaponticinausbeuten (4,9 %) erzielt worden als ohne den Auffüllschritt (4,68 %). Die Mittelwerte der 10 Extraktionen von den Lösungsmittelvolumina 5 ml und 10 ml zeigen signifikante Unterschiede. Der Unterschied der Ergebnisse von Lösungsmittelvolumina 10 ml und 50 ml hingegen ist nicht signifikant. Die Rhaponticinausbeute mit 10 ml Lösungsmittel (4,9 %) erreicht fast die bisherige Maximalausbeute von 5,1 % aus der ursprünglichen Methode B, obwohl nur ein Fünftel der Lösungsmittelmenge verwendet wurde. Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit dieser Methode durchgeführt.

Schlussfolgernd kann an dieser Stelle festgestellt werden: In der Extraktionsmethode ist nach der Extraktion im Ultraschallbad ein Auffüllen der Extrakte mit Lösungsmittel sinnvoll, um den Anteil an zurück gehaltenem Extrakt bzw. die Wahrscheinlichkeit für einen Sättigungseffekt zu verringern. Dazu wurden weitere Versuche durchgeführt, die in den folgenden Abschnitten detaillierter betrachtet werden sollen.

Zur Überprüfung, ob bei der Extraktion eine erschöpfende Auszehrung stattfindet, oder ob noch Reste in dem Mehl zurückbleiben, wurden Mehrfachextraktionen durchgeführt. Sie sind im Anhang ausführlich beschrieben. Schon mit der ersten Extraktion war schon die gesamte Menge an Rhaponticin aus dem Wurzelmehl extrahiert. Weiterhin sollte ermittelt werden, ob in dem verbleibenden Wurzelmehl in Lösungsmittel gelöstes Rhaponticin adsorbiert wird. Demnach konnte eine Sättigung des Lösungsmittels als mögliche Ursache für die niedrigeren Ausbeuten bei geringen Lösungsmittelmengen ausgeschlossen werden. In diesem Konzentrationsbereich liegt keine Sättigung vor.

Die Einflüsse von Korngröße, Temperatur und Extraktionsdauer sind im Anhang ebenfalls ausführlich beschrieben dargestellt und sollen hier nur kurz erwähnt werden.

Die Korngröße der Probe übt bei der geringen Einwaagemenge von 50 mg einen großen Einfluss aus. Nach mehreren Versuche wurden für eine Variante entschieden, bei der das einmal gemahlene Wurzelpulver gesiebt (0.5 mm) und dann eingewogen wird.

Der Einfluss der Extraktionstemperatur war gering. Von den geprüften Varianten erwies sich 60 °C als am günstigsten und wurde für die weiteren Versuche eingesetzt.

Für die Prüfung der Extraktionszeit wurden Zeiten von 10 bis 40 Minuten untersucht. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten durch die Dauer der Extraktion.

Zusammenfassung der durchgeführten Optimierungsparameter

Abgeleitet aus den beschriebenen Ergebnissen wurden bei der optimierten Extraktionsmethode folgende Bedingungen gewählt:

- ✓ Lösungsmittel: Aceton/ Wasser - Gemisch (1:1; v/v)
- ✓ Einwaage: 50 mg
- ✓ Lösungsmittelvolumen: 10 ml (insgesamt mit Auffüllschritt)
- ✓ Mehrfachextraktion: nein
- ✓ Korngröße: ≤ 0,5 mm
- ✓ Temperatur: 60 °C
- ✓ Extraktionszeit: 15 min

Die gewonnenen Extrakte wurden anschließend mit Methanol in HPLC - Vials verdünnt und direkt vermessen. Ein Teil des restlichen Extraktes einer jeweiligen Probe wurde in verschraubbare Braunglas - Vials überführt und bei -18 °C aufbewahrt.

7.4.3.2 Methodenpräzision der optimierten Extraktionsmethode unter Wiederholbedingungen

Mit der optimierten Extraktionsmethode, konnten nun die eigentlichen Rhabarberwurzelpollen extrahiert werden. An jedem Tag, an dem Extraktionen von Rhabarberproben stattfanden, erfolgte parallel eine Extraktion der bisher verwendeten Probe Genotyp 21 (Fraktion 4). Insgesamt wurde an sieben verschiedenen Tagen extrahiert und analysiert.

Die Präzisionsdaten sind in Tabelle 6 aufgeführt. Es handelt sich hierbei um eine Methodenpräzision von Tag zu Tag.

Tabelle 6: Methodenpräzision am Beispiel Genotyp 21

Probe Genotyp 21	Substanzgehalt (%)	Peakfläche
Rhaponticin (n = 7)	5,19	68,32
STABW	0,22	2,92
V _K (%)	4,29	4,27
Desoxyrhaponticin (n = 7)	1,55	22,03
STABW	0,09	1,32
V _K (%)	6,01	6,01

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Variationskoeffizient von Desoxyrhaponticin bedingt durch die geringere Konzentration in der Probe, höher ausfällt als der von Rhaponticin. Im Hinblick auf die Zielstellung der Arbeit können die Werte trotzdem akzeptiert werden. Variationskoeffizienten um 5 % gelten, bei Betrachtung der gesamten Methode (einschließlich Extraktion), als ausreichend. Damit ist eine Selektion rhaponticinreicher Genotypen möglich.

7.5 Erarbeitung einer CE - Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Rhaponticin

7.5.1 Trennung von Stilbenderivaten durch CE

Über die Trennung von Stilbenderivaten mittels Kapillarelektrophorese ist in der Literatur bisher nur sehr wenig beschrieben worden. SHANG & YUAN (2002) berichteten über eine MEKC - Methode zur qualitativen Bestimmung von verschiedenen Rhabarberinhaltsstoffen. GU et al. konnten durch Kapillaronenelektrophorese Resveratrol in Wein sehr erfolgreich analysieren. Weiterhin identifizierten CHEN et al. (2001) oligomere Stilbene mit Hilfe der CZE aus den Wurzeln der *Caragana* Spezies.

Die zuletzt genannten Methoden der Kapillaronenelektrophorese sollten den Ausgangspunkt für die Analysenentwicklung darstellen.

Im Folgenden werden die strukturellen und chemischen Eigenschaften von Rhaponticin und Desoxyrhaponticin als Voraussetzung für die kapillarelektrophoretische Trennung ausführlicher erläutert. Vergleicht man die

Formeln der zwei Stilbenderivate Rhaponticin und Desoxyrhaponticin in den Abbildungen 16 und 17, so stellt man fest, dass es sich um fast identische Substanzen handelt, die sich lediglich in einem Sauerstoffatom bzw. in einer Hydroxylgruppe unterscheiden.

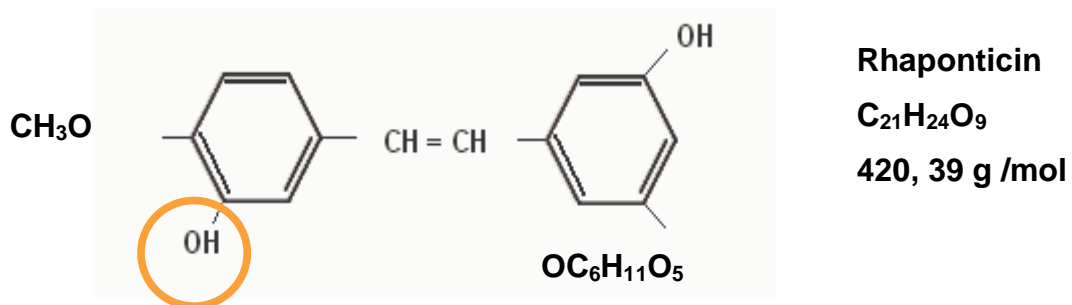


Abb. 16: Struktur-/ Summenformel und Molekülmasse von Rhaponticin

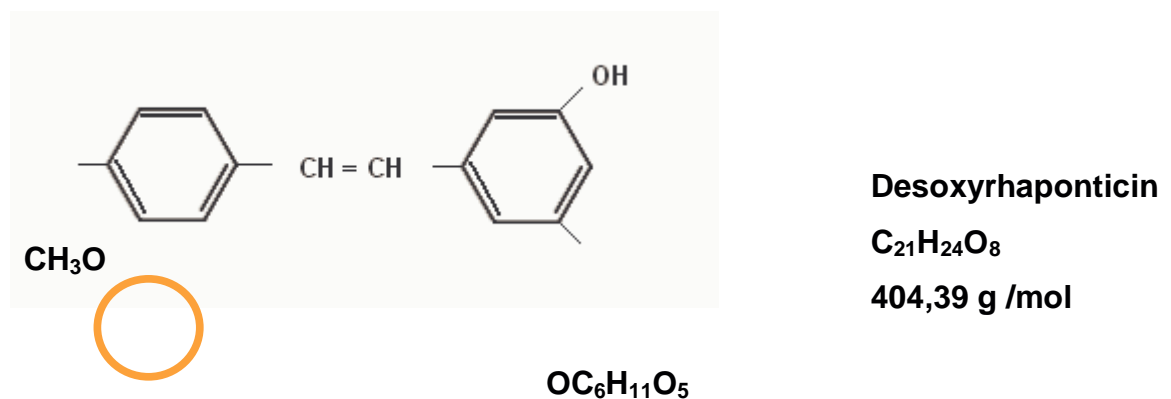


Abb. 17: Struktur-/ Summenformel und Molekülmasse von Desoxyrhaponticin

Der Ionencharakter der Probeanalyten war nicht bekannt. Die Stilbenderivate können aber durch entsprechend saure oder basische Puffer so beeinflusst werden, dass sie partiell positiv oder negativ geladen werden. Die Wahl des Puffers bestimmt also die „Ladung“ der Probenmoleküle und demzufolge deren Migrationsrichtung.

Rhaponticin besitzt insgesamt (incl. Glukose) sieben und Desoxyrhaponticin sechs Hydroxylgruppen, die in Abhängigkeit vom pH - Wert unterschiedlich reagieren. Im basischen pH - Bereich (Überschuss an OH^-) reagieren die Stilbenderivate als Anionen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandern sie dann zuerst in Richtung Anode. Da die Trennung aber durch den EOF überlagert wird (Geschwindigkeit EOF > Geschwindigkeit der Analyten), sollten beide Substanzen schließlich zur Kathode (zum Detektor) transportiert werden können.

Aufgrund der geringen Unterschiede in der Struktur und Molekülmasse ist es wahrscheinlich, dass Rhaponticin und Desoxyrhaponticin in sehr kurzen Abständen detektiert werden. Dabei wird Desoxyrhaponticin die Substanz sein, die den Detektor zuerst erreicht. Denn ausgehend von der Strukturformel ist Rhaponticin stärker negativ geladen, da sich eine weitere Hydroxylgruppe am zweiten Benzolring befindet. Dadurch wird es mit einer höheren Geschwindigkeit als Desoxyrhaponticin in Richtung Anode wandern und demzufolge mit dem EOF später an der Kathode erscheinen.

Im sauren pH- Bereich wäre auch die Reaktion zu Kationen möglich. Hier herrscht ein Überschuss an H_3O^+ , die von den Hydroxylgruppen der Analyten angezogen werden, so dass die Stilbenderivate als Kationen getrennt werden.

7.5.2 Optimierung der Einflussfaktoren mit der Kapillarelektrophorese

Für die Optimierung der Methode wurde als Standard der aufgereinigte Trockenextrakt der Pharmazeutischen Fabrik Müller, Göppingen eingesetzt, der Rhaponticin und Desoxyrhaponticin enthält. Gleichzeitig kann damit die Trenneffizienz der Methode besser kontrolliert werden. Die Substanz wurde in Methanol gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt.

Durch Vorversuche zur Methodenentwicklung, die im Rahmen dieses Forschungsprojektes bereits durchgeführt wurden, waren folgende Versuchsbedingungen vorgegeben [SCHELLENBERG und SCHNÜBER, 2001]:

- Kapillarlänge 64,5 cm
- Kapillardurchmesser 75 µm
- Hydrodynamische Injektion 50 mbar Druckdifferenz
- Spannung 25 kV
- Injektionszeit 4 s
- Puffer 20 mM Borat pH 9,3
- Temperatur 25 °C
- Detektion DAD 320 nm

Die Absorptionsspektren der Substanzen wurden unter Verwendung eines Dioden - Array - Detektors mit Hilfe von Einzelstandards ermittelt. Das Absorptionsmaximum lag bei beiden Substanzen bei 320 nm (Abbildung 18).

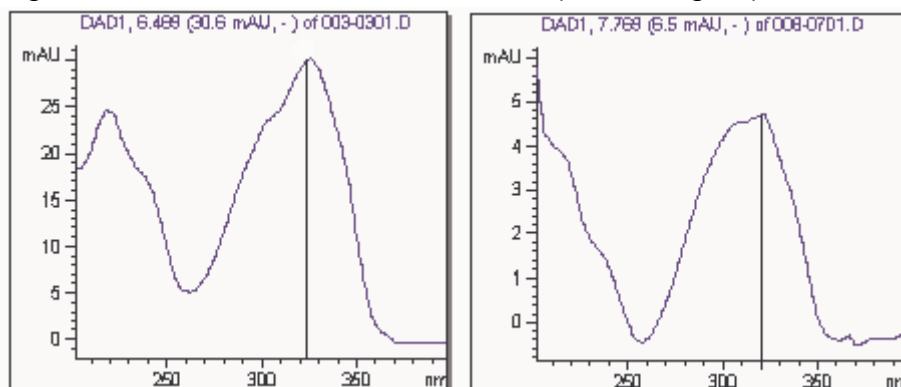


Abb. 18: Absorptionsspektren von Rhaponticin (links) und Desoxyrhaponticin (rechts)

Ausgehend von den genannten vorliegenden Versuchsbedingungen lag die Zielstellung darin, die Einflüsse der aufgeführten Parameter näher zu untersuchen, die Trenneffizienz zu erhöhen und die Methode zu validieren.

7.5.3 Ermittlung eines geeigneten pH - Wertes

Der pH-Wert des Puffers hat, wie bereits erwähnt, einen entscheidenden Einfluss auf den Transport der Proben zum Detektor und somit auf die Trennqualität der Analyten. Der pH-Wert- Einfluss auf die Migration der Ionen ist auf zwei Ursachen zurückzuführen. Zum einen ist die Trennung in der CZE mehr oder weniger vom EOF überlagert, der vom Dissoziationsgrad der Silanolgruppen abhängig ist und somit durch den pH-Wert bestimmt wird. Nach ENGELHARDT (1994) und GÜNZLER (1998) bewirkt eine pH -Wert - Steigerung im kathodischen Modus eine Geschwindigkeitserhöhung des EOF, weil mit zunehmenden pH - Wert auch der

Dissoziationsgrad der Silanolgruppen steigt. Also kann mit höheren pH - Werten die Migrationszeit und gleichzeitig die Analysenzeit verkürzt werden.

Folgende pH - Werte wurden hinsichtlich der Trenneffizienz getestet:

- 50 mM Phosphatpuffer pH 2,5
- 50 mM Boratpuffer pH 7,0
- 25 mM Boratpuffer pH 9,3

Die Ergebnisse konnten die beschriebene Theorie bestätigen. Die Elektropherogramme zeigten deutlich, dass im pH- Bereich von 2,5 und 7 keine Trennung der Substanzen Rhaponticin und Desoxyrhaponticin erzielt werden konnte.

Bei einem pH - Wert von 9,3 konnten die Analyten sauber getrennt werden.

Trotz der getrennten Zielanalyten bei pH 9,3 erkennt man einen weiteren Peak zwischen beiden Substanzen, der durch Rhaponticin überlagert wird. Die versteckte Substanz ist möglicherweise ein weiteres Stilbenderivat, was bei der Aufreinigung des Trockenextraktes eventuell nicht vollständig entfernt wurde.

Aus diesem Grund war es erforderlich die Trennung weiter zu optimieren und andere pH- Werte im basischen Bereich zu überprüfen.

Es wurden pH - Werte von 9,5 bis 10,5 getestet, wobei sich der pH - Wert 10,0 als geeignet herausstellte. Der unbekannte Peak zwischen Rhaponticin und Desoxyrhaponticin wurde hier am besten abgetrennt (vgl. Abb. 19).

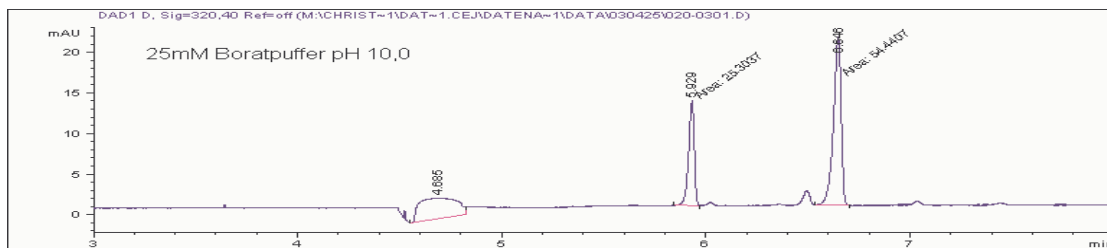


Abbildung 19: Standardelektropherogramm, links Desoxyrhaponticin, rechts Rhaponticin
25mM Boratpuffer pH 10,0

7.5.4 Ermittlung einer geeigneten Pufferkonzentration

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Optimierung des Analysenverfahrens ist die Konzentration des eingesetzten Puffers. Nach ENGELHARDT (1994) nimmt der EOF mit zunehmender Ionenstärke ab. Demnach sind die höchsten Wanderungsgeschwindigkeiten und die kürzesten Analysenzeiten mit niedrigen Pufferkonzentrationen zu erreichen. Die durchgeführte Messreihe im Bereich von 5 bis 40 mM Boratpuffer bestätigte diese Aussage (Abbildung 20).

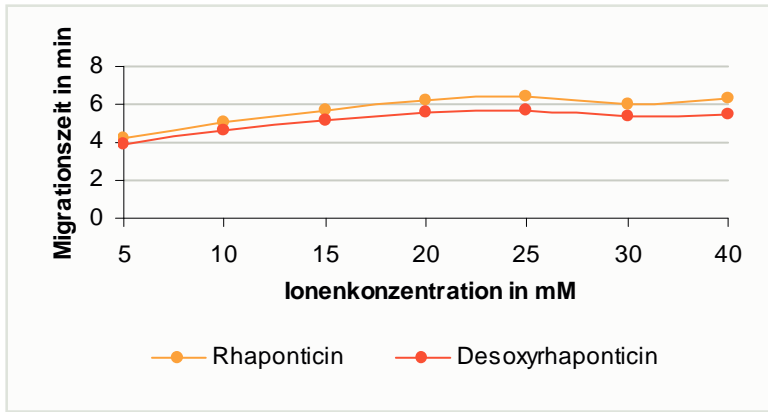


Abbildung 20: Migrationszeit in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Puffers

Es zeigte sich, dass bei geringerer Ionenstärke die Migrationszeiten kürzer waren als bei höherer. Unter Berücksichtigung von Migrationszeit und Trennung wurde der 25 mM Puffer ausgewählt (Abbildung).

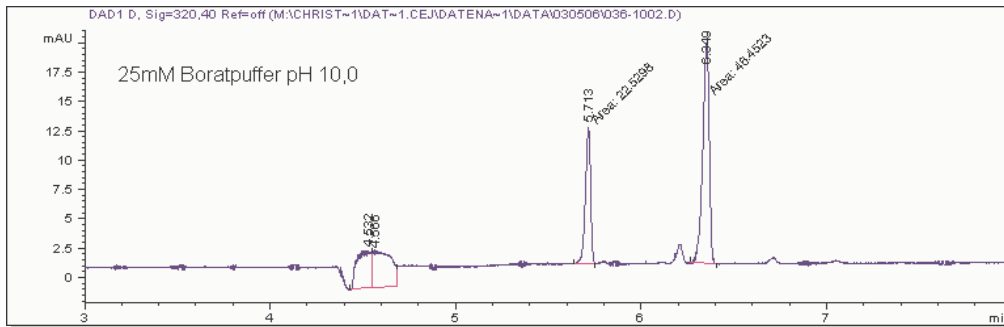


Abbildung 21: Vergleich der Elektropherogramme mit 5 mM und 25 mM Boratpuffer

Es wurde der Einfluss einiger Injektionsparameter untersucht (ausführlich im Anhang). Bei der Zeit wurde von 0,5 bis 5 Sekunden Injektionszeit geprüft. Die Peakflächen erhöhten sich mit der Injektionszeit, da eine größere Probenmenge in die Kapillare gedrückt wird.

7.5.5 Präzision der Kapillarelektrophorese

Bei den bereits durchgeführten Versuchsreihen fiel auf, dass hauptsächlich die Peakflächen und teilweise auch die Migrationszeiten der Analyten starken Schwankungen unterworfen waren. Daraufhin wurde der Standard 30-mal injiziert. Die statistische Auswertung der ermittelten Peakflächen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Reproduzierbarkeit der Peakflächen

Verbindung	MW Peakfläche (n = 30)	STABW (n = 30)	V_K % (n = 30)
Rhaponticin	76,16	5,94	7,80
Desoxyrhaponticin	36,72	3,14	8,54

Es ist deutlich zu erkennen, dass keine ausreichende Reproduzierbarkeit der Methode gegeben ist. Nach KROMIDAS (1999) sind bei der CE Variationskoeffizienten von < 2 % erreichbar.

Die hier ermittelten V_K waren zu hoch, um verschiedene Herkünfte von Rheum rhapsonticum hinsichtlich ihres Rhapsonticingehaltes selektieren zu können.

Die Migrationszeiten hingegen waren in dieser Versuchsreihe relativ stabil. Die errechneten V_K lagen zwischen 0,6 und 0,7 %.

Da für die Quantifizierung jedoch die Reproduzierbarkeit der Peakflächen und der Migrationszeiten eine wichtige Rolle spielen, war es notwendig die Ursachen für die hohen Standardabweichungen genauer zu überprüfen. Die Injektion stellt diesbezüglich einen weiteren Optimierungspunkt dar.

7.5.6 Einfluss der Injektion

Injektionsdauer

Es wurden Injektionszeiten von 0,5 bis 5 s angewendet, um präzise zu injizieren. Die Probenzone soll dadurch möglichst klein gehalten werden, so dass sie nicht zur Bandenverbreiterung beiträgt. Um zu prüfen, welche Injektionsdauer zu reproduzierbaren Peakflächen führt, wurden auch Injektionszeiten getestet, die über den empfohlenen Werten liegen. Abbildung 22 zeigt die Peakflächen in Abhängigkeit von der Injektionsdauer

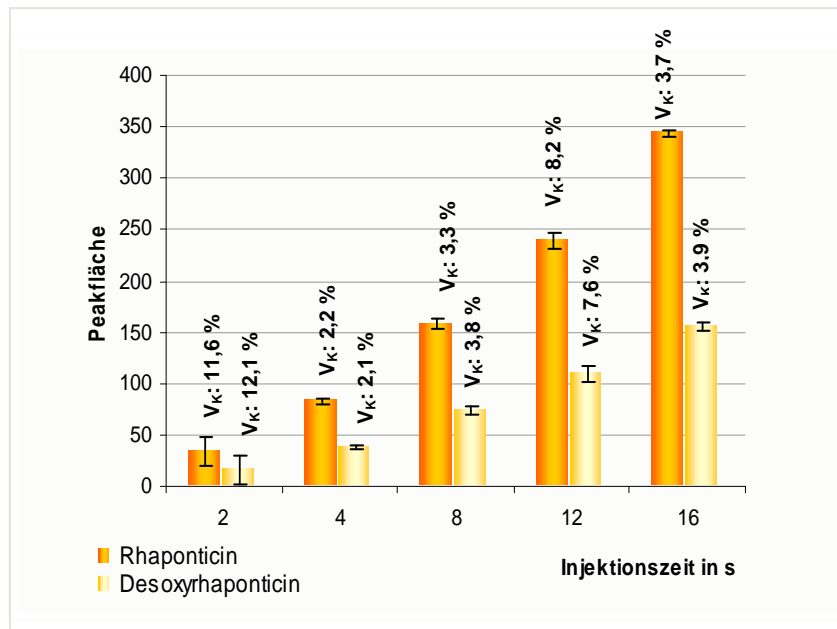


Abb. 18: Peakflächen in Abhängigkeit von der Injektionsdauer

Abbildung 22: Variationskoeffizienten bei unterschiedlicher Injektionsdauer

Die Peakflächen stiegen erwartungsgemäß mit zunehmender Injektionszeit an. Die Flächenzunahme ist kontinuierlich und entsprach dem durch die längere Injektion ansteigendem Probevolumen.

Die Variationskoeffizienten schwankten zwischen 2,2 und 12,1 %, wobei der

niedrigste bei den Peakflächen der 4 s Injektion errechnet wurde (Abbildung 22). Demnach kann durch kürzere bzw. längere Injektionszeiten die Reproduzierbarkeit der Methode nicht erhöht werden. Die 4 s Injektion wurde beibehalten.

Die Migrationszeiten der Komponenten stiegen mit zunehmender Injektionsdauer von 6,0 auf 6,6 min bei Rhaponticin und bei Desoxyrhaponticin von 5,3 auf 6,1 min (Abbildung 23).

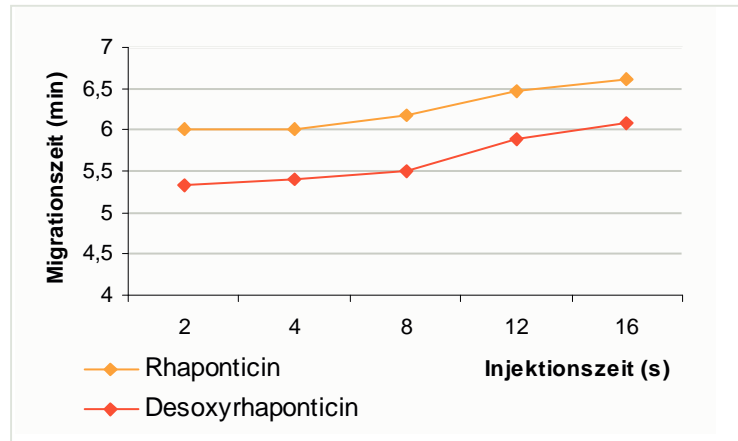


Abbildung 23: Migrationszeit in Abhängigkeit von der Injektionsdauer

Je länger injiziert wird, desto weiter wird die Probe in die Kapillare gedrückt. Dadurch bleibt weniger Kapillarlänge bzw. Zeit zum Trennen. Werden die Analyten dennoch getrennt, verschiebt sich die Migrationszeit nach hinten und die Trenneffizienz verschlechtert sich.

Die zwei Elektropherogramme in Abbildung 20 zeigen eine optimale Trennung der Komponenten nur bei 4 s Injektionszeit. Wird länger injiziert (8, 12 oder 16 s), ist der unbekannte Peak vor Rhaponticin nicht mehr getrennt. Er geht in den Rhaponticin - Peak über, so dass dieser sich verändert und als Fronting - Peak erkennbar ist.

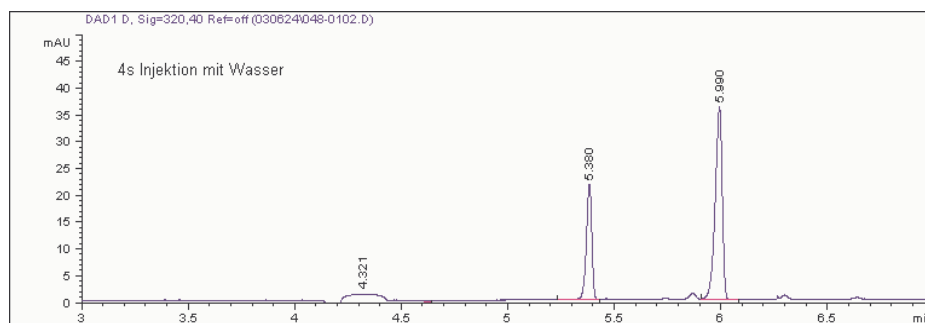
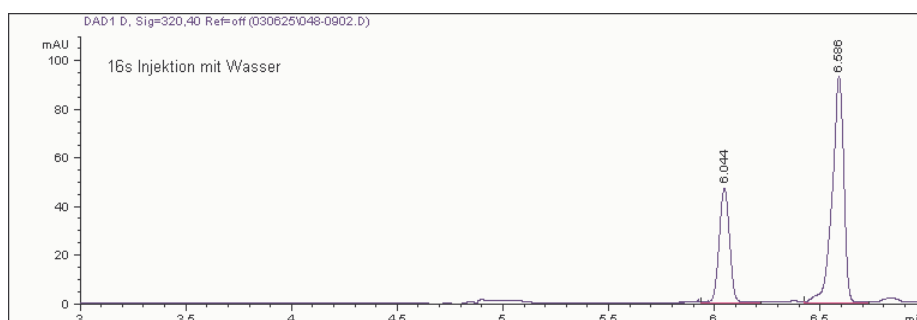


Abb. 24: Vergleich der Injektionszeiten 4 und 16 s



Wassereinfluss während der Injektion

Der angelegte Strom und die Ladung der Analyten bestimmen die Flussrichtung der Komponenten. Dadurch ist es möglich, dass diese beim Analysenstart in das Inletgefäß zurück wandern. Aus diesem Grund wurde unmittelbar nach der Injektion für 1,5 s Wasser in die Kapillare gepumpt, das den Rückfluss verhindert und alle Komponenten unter den gleichen Bedingungen starten lässt.

Um zu prüfen, ob das Wasser entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse hatte, wurden Versuche mit und ohne Wasser durchgeführt. Dabei gaben weder die Peakflächen (Abbildung 25) noch die relativen Standardabweichungen der Messreihen Auskunft darüber, welche der genannten Injektionsweise optimal bzw. präziser ist.

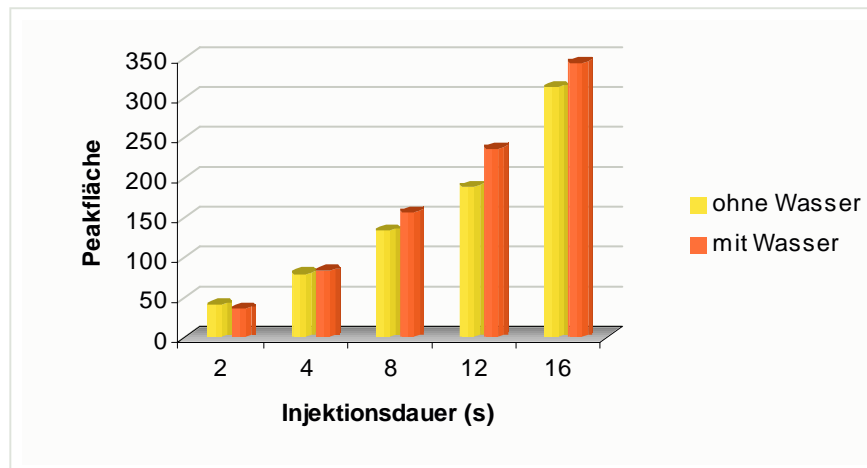


Abbildung 25: Peakflächen von Rhaponticin in Abhängigkeit von der Injektionsdauer im Vergleich zur Wasserinjektion

Bei der Injektion mit Wasser waren die Peakflächen, ausgenommen die 2 s Injektion, prinzipiell größer als ohne. Dieser Effekt würde der oben erwähnten Vermutung entsprechen. Möglicherweise wandern die Anionen während der Injektion ins Inletgefäß zurück, wodurch weniger Analytkonzentration detektiert wird. Um sicher zu gehen, dass die reale Rhaponticinkonzentration gemessen wurde, erfolgten alle weiteren Probeninjektionen mit Wasser.

Einfluss der Temperatur

Der Einfluss der Temperatur auf Effizienz und Selektivität wird derzeit noch diskutiert [ENGELHARDT, 1994]. Bekannt ist aber, dass mit steigender Temperatur die Geschwindigkeit des EOF und des Analyten zunimmt [CUNAT- WALTER, 1995]. Daher ist es wichtig die Kapillare auf einer konstanten Temperatur zu halten und somit die entstehende Joulesche Wärme abzuführen. Wird dies nicht gewährleistet, kann es zur Erwärmung des Puffers in der Kapillare führen und somit zu Effizienzverlusten und schlechter Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten.

Nach Aussagen von AGILENT TECHNOLOGIES (2003) kann durch eine Temperatursenkung die Reproduzierbarkeit des Systems erhöht bzw. die Methode stabilisiert werden. Aus diesem Grund wurden Messreihen mit Temperaturen von 10 °C bis 25 °C durchgeführt. Im Vergleich zur bisher verwendeten Temperatur von 25 °C konnte tatsächlich eine Senkung der Variationskoeffizienten festgestellt werden. Als optimal stellte sich die Temperatur von 15 °C heraus, da hier die geringste Standardabweichung (2 %) vorlag.

Das nachfolgende Diagramm in Abbildung 26 soll die Ergebnisse der 25 °C und 15 °C Analyse noch einmal verdeutlichen. Durch die Temperatursenkung wurden die Variationskoeffizienten von maximal 24 % auf maximal 5 % minimiert.

Da im Verlaufe der Methodenentwicklung einige Messreihen mehrmals wiederholt wurden, konnten die erhaltenen Peakflächen von verschiedenen Tagen verglichen werden.

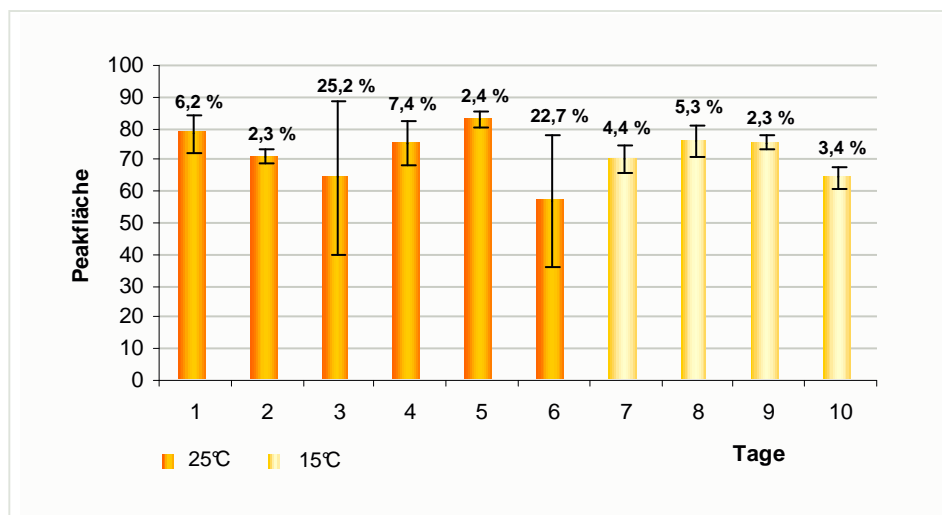


Abb. 22: Reproduzierbarkeit der Peakflächen innerhalb einer und verschiedener Messreihen bei 25 °C und bei 15 °C Analysentemperatur mit angegebenen V_k – Werten (in %)

Außerdem bestätigte sich die oben genannte Aussage, dass mit sinkender Temperatur die Migrationszeit steigt (Abbildung 27).

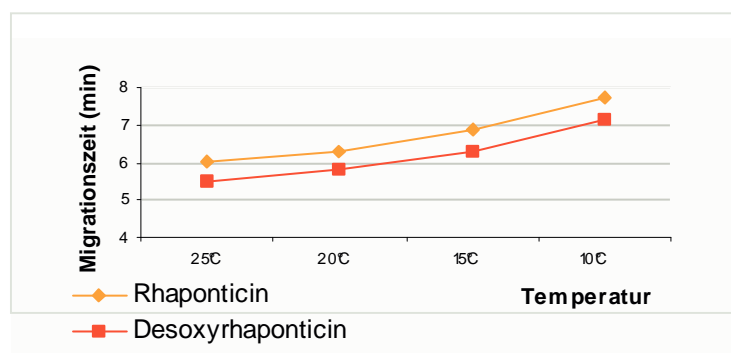


Abbildung 27: Migrationszeit in Abhängigkeit von der Analysentemperatur

Die zunehmende Viskosität der Probe und des Puffers bewirkte eine Geschwindigkeitssenkung des EOF. Obwohl sich dadurch die Analysenzeit insgesamt verlängerte (von 6 auf 7 min), wurde die Temperatur von 15 °C beibehalten.

7.5.7 Zusammenfassung der einzelnen Methodenparameter

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass durch die Änderung verschiedener Parameter (pH - Wert, Pufferkonzentration) die CE - Methode hinsichtlich der Trenneffizienz optimiert werden konnte. Die Bedingungen wurden den hauptsächlich vorkommenden Stilbenderivaten Rhaponticin und Desoxyrhaponticin angepasst, so dass sowohl im Standard (vgl. Abb. 17) als auch in der Probe (vgl. Abb. 24) eine optimale Trennung der Komponenten möglich war.

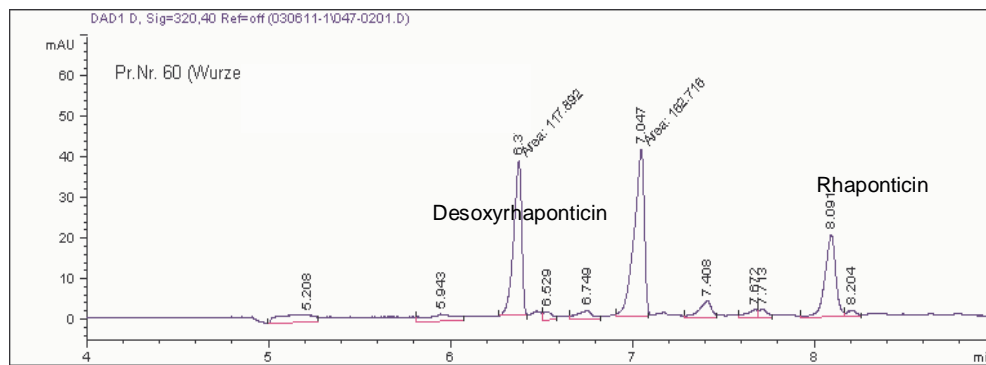


Abb. 28: Elektropherogramm vom Genotyp 18

Folgenden Parameter wurden ausführlich untersucht und entsprechend für optimal befunden:

- Injektionszeit 4 s mit Wasser
- Puffer 25 mM Borat pH 10,0
- Temperatur 15 °C

Von der Optimierung weiterer Parameter (Spannung, Injektionsart, Kapillarlänge und – durchmesser) wurde abgesehen, da keine wesentliche Verbesserung der Trenneffizienz und der Messpräzision erwartet wurde.

Im Hinblick auf die Zielstellung der vorliegenden Arbeit musste an dieser Stelle entschieden werden, dass die Kapillarelektrophorese aufgrund der immer noch unzureichenden Präzision der Methode für die quantitative Bestimmung der Stilbenderivate nicht geeignet ist.

Zeitweise wurden zwar innerhalb einer Messreihe reproduzierbare Ergebnisse mit niedrigen relativen Standardabweichungen um 2 – 3 % erreicht. Jedoch lassen die starken Schwankungen innerhalb verschiedener Messreihen (bis zu 7,5 %) eine Selektion von geeigneten Rhabarbernachkommen mit unterschiedlich hohen Rhaponticingehalten noch immer nicht zu.

Des Weiteren wurde bei den durchgeführten Versuchsreihen mit Standardsubstanzen gearbeitet. Bei realen Proben würde der zusätzliche Matrixeinfluss die Reproduzierbarkeit weiter verschlechtern.

Außerdem beziehen sich die bisher errechneten Standardabweichungen nur auf die chromatographische Trennung und analytische Bestimmung der CE. Eine ausreichend hohe Präzision der gesamten Analysenmethode, einschließlich Extraktion, kann demnach nicht erwartet werden.

Es war erforderlich eine weitere Analysenmethode zur Rhaponticinbestimmung heranzuziehen.

7.6 Erarbeitung einer HPLC - Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Rhaponticin

7.6.1 Zugrunde gelegte Kenntnisse zur Trennung von Stilbenderivaten durch HPLC

GRACZA und RUFF (1984) stellten fest, dass die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der bisherigen Methoden zur Rhaponticinbestimmung, einschließlich der Dünnschichtchromatographie, bedingt durch die Lichtempfindlichkeit der Stilbenderivate (vgl. Abb. 25), nicht ausreichend ist. Sie beschrieben ein HPLC - Verfahren, das eine getrennte Erfassung der fünf bisher bekannten Stilbenderivate ermöglichte. Gleichzeitig wies diese Methode eine sehr hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ($V_{K \text{ Rhaponticin}}$: 0,66 %) auf.

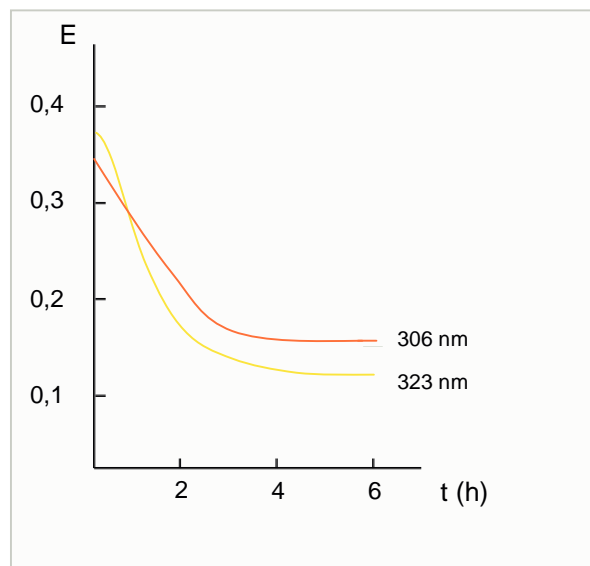


Abbildung 29: Abnahme des Stilbengehaltes in einer ethanolischen Analysenlösung bei Tageslicht [GRAZCA & RUFF, 1984]

GRACZA & RUFF (1984) trennten die Stilbenderivate mit Hilfe eines Acetonitril-Wasser- Gemisches über einer RP - 18 - Säule. Die unpolaren Anteile der Analyten halten sich bevorzugt an der unpolaren stationären Phase auf und die polaren Hydroxylgruppen vermehrt in der polaren mobilen Phase. Durch die unterschiedliche Anzahl der gebundenen Hydroxylgruppen an den Stilbenen kann man theoretisch sehr gut nachvollziehen, in welcher Reihenfolge sie eluieren (Tabelle 8).

Das Stilben mit den meisten OH - Gruppen (Dioxyrhaponticin, 8 OH - Gruppen) eluiert aufgrund der höchsten Polarität zuerst.

Tabelle 8: Reihenfolge der eluierten Stilbenderivate

Retentionszeit	Stilben	Anzahl der Hydroxylgruppen
↓ zunehmend	Dioxyrhaponticin	8
	Rhaponticin	7
	Desoxyrhaponticin	6
	Rhapontigenin	3
	Desoxyrhapontigenin	2

Hinzu kommt der Einfluss der eingesetzten mobilen Phase. Wasser kann die apolaren Alkylgruppen der stationären Phase nicht benetzen und ist daher eine schwache mobile Phase, die die Analyten nur sehr langsam eluiert. Ein steigender Anteil an Acetonitril erhöht jedoch die Elutionskraft der mobilen Phase, wodurch auch Analyten mit geringerer Polarität weiter transportiert werden können. Eine Trennung der einzelnen Stilbenderivate wird somit ermöglicht.

7.6.2 Chromatographische Bedingungen

In Anlehnung an die Methode von GRACZA & RUFF (1984) sowie von BORTH (1998) wurde eine HPLC- Methode zur quantitativen Bestimmung von Rhaponticin und Desoxyrhaponticin erarbeitet und optimiert. Eine effektive Trennung wurde, wie in der Literatur beschrieben, mit Acetonitril/ Wasser - Gemischen mittels Gradientenelution erzielt.

Mit der in der für die Arbeiten verfügbaren HPLC- Apparatur konnte die Flussrate von 2,0 ml/ min nicht realisiert werden. Nach Jahn (2003) darf die maximal mögliche Flussrate bei diesem Gerät aus Sicherheitsgründen nur 1,2 ml/ min betragen, so dass das Gradientenprofil entsprechend neu erarbeitet werden musste. Es entstand folgendes zeitliches Schema (Tabelle 9):

Tabelle 9: Gradientenprofil der optimierten HPLC - Methode

Zeit in min	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	100	0
8	75	25
9	0	100
13	100	0

Die Gesamtanalysenzeit wurde wegen der Reäquilibration von 13 auf 17 min verlängert. Alle weiteren chromatographischen Bedingungen sind in der nächsten Übersicht (Abbildung 30) zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 10: Chromatographische Bedingungen

Eluent A:	15 % ACN : 85 % H ₂ O + 0,05 % Phosphorsäure (85 %)
Eluent B:	80 % ACN : 20 % H ₂ O + 0,05 % Phosphorsäure (85 %)
Arbeitsweise:	Gradiententrennung (vgl. Tabelle)
Flussrate:	1,2 ml/ min
Injektionsvolumen:	5 µl
Vorsäule:	Luna C18 (4 mm x 3,0 mm I.D.), PHENOMENEX
Trennsäule:	Luna 5u C 18 (250 mm x 4,6 mm I.D.), PHENOMENEX
Thermostat:	20 °C
Detektor:	DAD
Wellenlänge:	320 nm
Software:	Hewlett Packard Chem Station Rev. 6.03

In Abbildung 31 ist ein Chromatogramm des Trockenextraktes aus Göppingen in einer Konzentration von 10 µg/ml mit den zwei Stilbenderivaten Rhaponticin und Desoxyrhaponticin dargestellt.

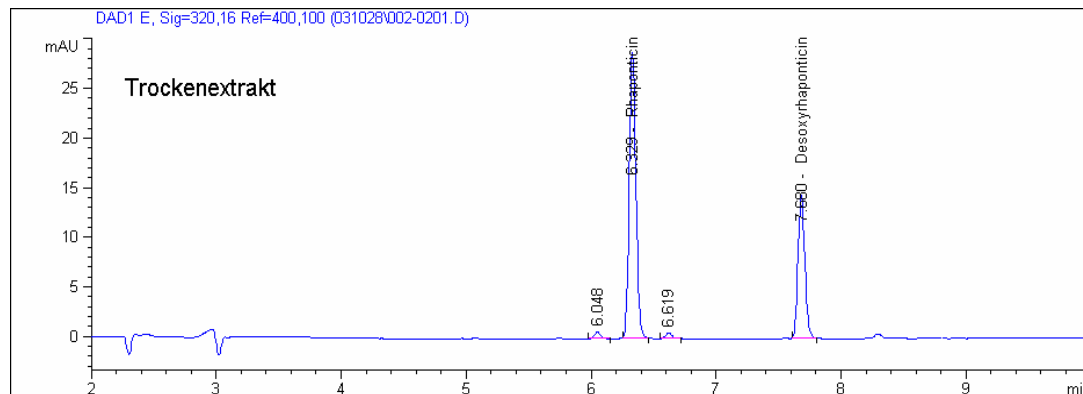


Abb. 32: HPLC - Standardchromatogramm

Der Autosampler wurde auf einer konstanten Temperatur von 20 °C gehalten und wegen der Lichtempfindlichkeit der Stilbenderivate mit Alufolie abgedunkelt.

7.6.3 Parameter der Kalibrierung

Stammlösungen: 10 mg Rhaponticin in 1 ml Methanol
 10 mg Desoxyrhaponticin in 1 ml Methanol
 Mehrpunktkalibrierung: 8 Konzentrationsstufen mit je drei Wiederholungen

Die nachfolgenden Abbildungen 33 zeigt die Chromatogramme der zwei externen Standards von EXTRASYNTHESE.

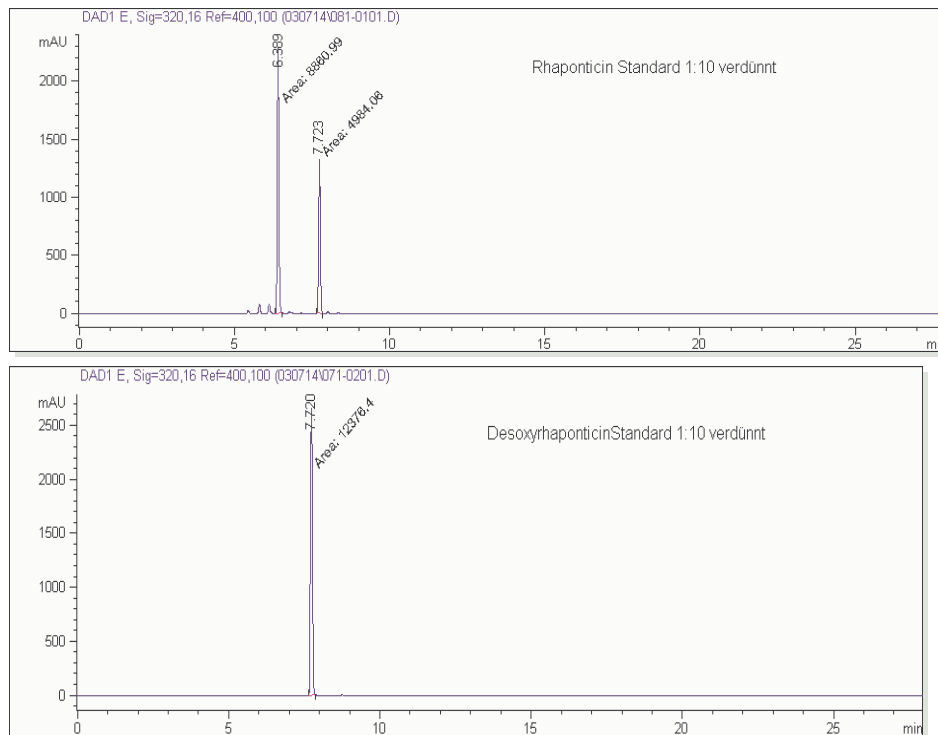


Abbildung 33: Chromatogramm des Standards Rhaponticin (oben) und Desoxyrhaponticin

Daraus ist ersichtlich, dass der Standard Rhaponticin nicht in reiner Form vorlag, sondern durch eine zweite Substanz verunreinigt ist. Der Störpeak im Rhaponticinstandard wurde durch Vergleich der Retentionszeiten und Spektren als Desoxyrhaponticin identifiziert.

Da Rhaponticin demzufolge nicht als Reinsubstanz zur Verfügung stand, musste zuerst Desoxyrhaponticin kalibriert werden. Dadurch war eine quantitative Bestimmung von Desoxyrhaponticin in den verschiedenen Konzentrationslevels des Rhaponticinstandards möglich. Die Differenzen der bekannten Konzentrationen der Gesamtstandardlösung und den gemessenen Konzentrationen von Desoxyrhaponticin ergaben die entsprechenden RhaponticinKonzentrationen.

Die statistischen Kenngrößen der Kalibration sind im Anhang S. 15 dargestellt

Tabelle 11: Zusammenfassung der Methodenkenndaten

Methodenkenndaten	Rhaponticin	Desoxyrhaponticin
Kalibrierfunktion	linear	linear
Arbeitsbereichmitte	3,45 µg/ml	2,91 µg/ml
Achsenabschnitt a	0,669701 ± 1,5756	-0,15532 ± 0,8977
Steigung b	13,15 ± 0,35	14,29 ± 0,24
Korrelationskoeffizient r	0,99964	0,99986
Bestimmtheitsmaß r ²	0,99928	0,99972
Reststandardabweichung	1,164	0,6496
Verfahrensstandardabweichung	0,0886	0,0454
Rel. Verfahrensstandardabweichung	2,57 %	1,56 %
Nachweisgrenze	0,1376 µg/ml	0,0713 µg/ml
Erfassungsgrenze	0,2752 µg/ml	0,1426 µg/ml
Bestimmungsgrenze	0,4996 µg/ml	0,2624 µg/ml

Die errechneten Methodenkenndaten liegen im akzeptablen Bereich.

Die analytischen Grenzwerte, Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze, von Rhaponticin und Desoxyrhaponticin wurden nach DIN 32645 ermittelt.

Rhaponticin kann ab einer Konzentration von 0,14 µg/ml mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 50 % qualitativ nachgewiesen werden. Liegt die gemessene Konzentration über 0,28 µg/ml, ist mit einer statistischen Sicherheit von 95 % Rhaponticin in der Probe vorhanden. Eine quantitative Bestimmung von Rhaponticin ist ab einer Konzentration von 0,50 µg/ml möglich, bei einer relativen Ergebnisunsicherheit von 33 %.

Präzision der HPLC

Um die Präzision der optimierten HPLC - Methode zu prüfen, wurden von den Referenzsubstanzen bzw. einer Probe jeweils 10 Messungen (Injektionen) aus ein und demselben Vial durchgeführt und statistisch ausgewertet. Als Streuungsmaß und damit als Präzisionsmaß werden die Standardabweichung (STABW) und der Variationskoeffizient (V_K) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgeführt

Tabelle 12: Präzisionsdaten der HPLC - Analyse unter Wiederholbedingungen

Standard	Konzentration (µg/ml) n = 10	Area n = 10	Retentionszeit n = 10
Rhaponticin MW	4,920	65,95	6,45
STABW	0,007	0,08	0,005
V _K (%)	0,136	0,12	0,081
Desoxyrhaponticin MW	7,446	105,97	7,713
STABW	0,012	0,174	0,002
V _K (%)	0,16	0,164	0,026
Probe Genotyp 21	Konzentration (µg/ml) n = 10	Area n = 10	Retentionszeit n = 10
Rhaponticin MW	5,135	68,66	6,45
STABW	0,017	0,214	0,008
V _K (%)	0,331	0,311	0,124
Desoxyrhaponticin MW	1,44	20,36	7,74
STABW	0,005	0,033	0,004
V _K (%)	0,348	0,16	0,052

Wie aus der Tabelle ersichtlich, liegen alle Variationskoeffizienten des Standards unter 0,17 %. Die V_K der Probe sind bedingt durch den Matrixeinfluss mit 0,35 % minimal höher.

In den Datensätzen konnten unter Anwendung des Grubbs - Tests (mit Hilfe der SQS - Software) keine Ausreißer gefunden werden. Demnach ist der Grad der Streuung der einzelnen Werte um den Mittelwert gering und die Methode arbeitet präzise.

Die Selektion der verschiedenen Rhabarbergenotypen nach ihren Rhaponticingehalten kann mit der HPLC- Methode realisiert werden.

7.6.4 Untersuchungen zur Probennahme

Nachdem die Methodenentwicklung sowohl bei der Extraktion als auch bei der HPLC abgeschlossen war, konnten die Proben entsprechend den optimierten Bedingungen extrahiert und analysiert werden.

Das zur Verfügung stehende Pflanzenmaterial wurde bei der Probennahme nach folgenden Kriterien systematisiert. Zunächst wurden die verschiedenen Herkünfte von Rheum rhaponticum unterschieden. Von jedem Genotyp wurden Blatt-, Stängel-, Hauptwurzel- und Nebenwurzelproben entnommen, wobei die Nebenwurzeln weiter in Nebenwurzelansatz bzw. -spitzen getrennt wurden. Abbildung 45 zeigt ein Schema von der Aufteilung der Rhabarberwurzel.

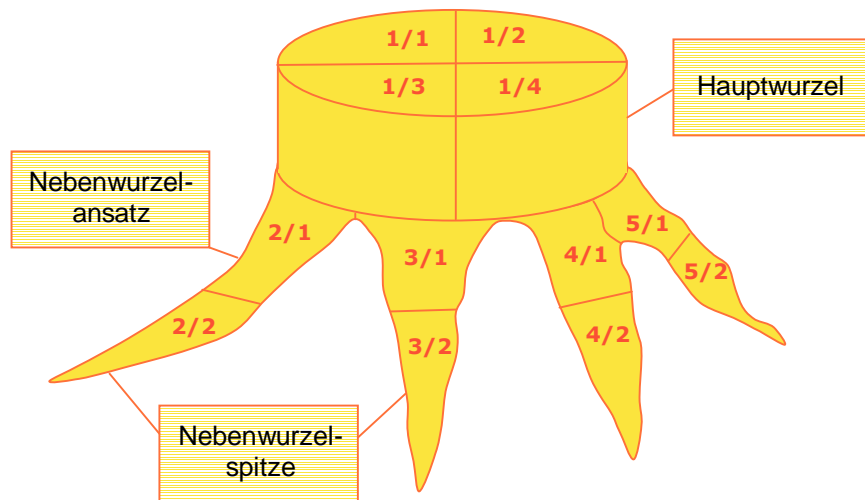


Abbildung 38: Einteilung der Wurzel von *Rheum raphaniticum* in verschiedene Segmente

Die Hauptwurzel wurde in vier Teile zerlegt. Von den Nebenwurzeln wurden fünf Stück (in Abb. 38 nur vier gezeigt) abgetrennt, die jeweils noch in Ansatz und Spitze geteilt wurden. Insgesamt lagen somit pro Wurzel 16 Proben vor. Hinzu kamen noch die Stängel und Blätter der Pflanze, die auch jeweils in vier Teile unterschieden wurden. Eine komplette Rhabarberpflanze ergab demzufolge 24 Proben.

Damit sollte festgestellt werden, wie groß die Unterschiede der Rhapsonticingehalte zwischen den einzelnen Wurzelsegmenten sind und ob die Rhapsonticingehalte in den Blättern bzw. Stängeln mit denen in der Haupt- oder Nebenwurzel korrelieren.

Die Untersuchung der oberirdischen Pflanzenteile ist für die Entwicklung der Frühselektionsmethode von großer Bedeutung, weil dadurch eventuell schon in sehr frühen Stadien des Pflanzenwachstums auf Rhapsonticingehalte der erntereifen Wurzel geschlossen werden kann. Große Unterschiede im Gehalt an Stilben-derivaten zwischen den einzelnen Wurzelsegmenten würde die Selektion erschweren, da bei jeder Pflanze zu viele Teile bzw. eine zu große Probenmenge entnommen werden müssten.

Es wurden alle Blätter,- Stängel- und Hauptwurzelproben der Genotypen 16 bis 21 sowie die Nebenwurzelproben der Genotypen 16, 17, 18 und 20 extrahiert und untersucht, weil nach den Voruntersuchungen bei diesen Genotypen hohe und niedrige Rhapsonticingehalte zu erwarten waren. Dabei basierte die Auswahl auf den Rhapsonticingehalten der.

Aufgrund der Präzisionsergebnisse der gesamten Extraktionsmethode einschließlich Analyse wurde die Extraktion für jede Probe zweimal durchgeführt. Für die erhaltenen Extrakte jedoch wurde wegen der hohen Präzision der Analysenmethode (HPLC) eine Einfachbestimmung als ausreichend betrachtet.

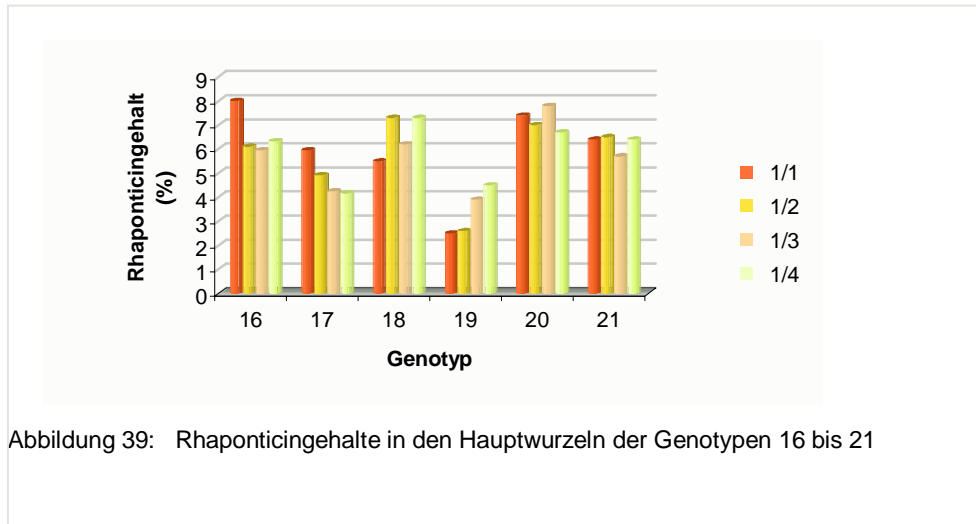
7.6.5 Rhapsonticingehalte der untersuchten Wurzelteile

Hauptwurzel

Abbildung 39 zeigt, dass sich die verschiedenen Genotypen in ihren Rhapsonticingehalten in der Wurzel differenzieren. Die niedrigsten Gehalte wurden beim Genotyp 19 gemessen. Sie lagen dort zwischen 3,1 und 5,6 %. Die Genotypen 18, 20 und 21

wiesen im Vergleich zur Literatur sehr hohe Rhaponticinkonzentrationen auf. Die Mittelwerte aus den verschiedenen Segmenten lagen bei 6,3% (GT 21), 6,6 % (GT 18) und 7,3 % (GT 20).

Die Differenzen zwischen den einzelnen Segmenten innerhalb des Wurzelkerns sind in der Abbildung 46 ebenfalls zu erkennen. Sehr große Unterschiede traten besonders innerhalb der Genotypen 16, 17 und 19 auf. Die Rhaponticingehalte innerhalb der Genotypen 20 und 21 waren im Gegensatz dazu relativ konstant.



Die folgende Abbildung 40 zeigt ein typisches Chromatogramm einer Hauptwurzelprobe.

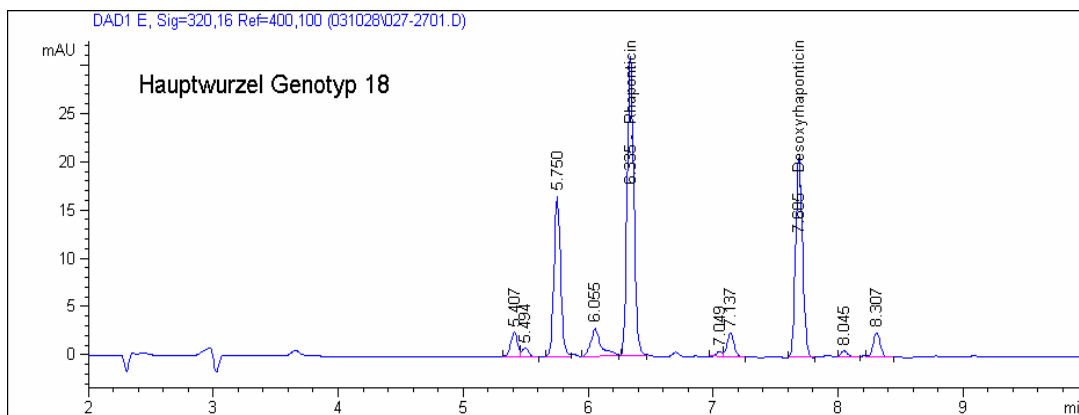


Abbildung 40: Chromatogramm eines Hauptwurzelextraktes vom Genotyp 18

Neben Rhaponticin und Desoxyrhaponticin waren weitere Peaks zu sehen, die nach ihren Spektren zu urteilen, eine stilbenähnliche Struktur aufweisen. In der Literatur [GRACZA, 1984] wurde bisher von fünf Stilbenderivaten in *Rheum rhaponticum* berichtet, die eventuell mit den Substanzen im Chromatogramm übereinstimmen. Eine genaue Identifikation der Peaks konnte aufgrund fehlender Standards nicht erfolgen.

Vergleicht man die Chromatogramme der einzelnen Genotypen, so stellt man häufig eine gewisse Gleichförmigkeit fest. Beispielsweise wurde der auffallende Peak mit der RT von 5,75 min (Abbildung 40.) bei allen Genotypen in quantitativ unterschiedlichen Mengen detektiert.

Die unbekannte Substanz eluierte aufgrund ihrer höheren Polarität zeitlich gesehen vor Rhaponticin. Die Größe des Peaks weist auf nicht unerhebliche Mengen dieser Substanz in der Wurzel hin.

Nach GRACZA (1984) könnte der Peak möglicherweise als das fünfte Stilbenderivat Dioxyrhaponticin identifiziert werden. In seiner Arbeit analysierte er diese Substanz mit einer Konzentration von 2,4 %, Desoxyrhaponticin mit einer geringfügig höheren Konzentration von 2,7 % und Rhaponticin mit einer fast doppelt so hohen Konzentration von 4,7 %. Betrachtet man die Peakhöhen im Chromatogramm der Abbildung 40 könnte ein ähnliches Verhältnis vermutet werden. In den Hauptwurzeln der anderen Genotypen, mit Ausnahme von Genotyp 17, stimmt das Verhältnis ebenfalls überein. Zudem konnte beim Spektrenvergleich mit Rhaponticin, vermutlich bedingt durch die geringe Abweichung der Strukturformeln, eine 96 %ige Übereinstimmung festgestellt werden.

Von allen weiteren Peaks, die auf dem Chromatogramm in Abbildung 40 zu sehen sind, zeigten noch zwei stilbenähnliche Spektren. Sowohl der Peak bei 8,3 min als auch der Peak bei 8,04 min konnten als Stilbenderivate vermutet werden. Vielleicht handelt es sich hierbei um die beiden Aglyka Rhapontigenin und Desoxyrhapontigenin. Die Peakgröße bzw. -fläche weist wie bei GRACZA (1984) auf sehr geringe Konzentrationen hin. Er berichtete von 0,67 % (Rhapontigenin) bzw. 0,22 % (Desoxyrhapontigenin). Bedingt durch die Polarität müsste der zuerst detektierte Peak Rhapontigenin sein. Widersprüchlich erscheinen dann aber die Konzentrationsverhältnisse der Substanzen. Theoretisch müssten beide in demselben Verhältnis wie Rhaponticin und Desoxyrhaponticin vorhanden sein. Eine Erklärung wäre, dass es sich bei dem Peak von 8,04 min um eine andere Substanz handelt und der zuletzt detektierte Peak Rhapontigenin ist. Die Konzentration von Desoxyrhapontigenin ist in dem verdünnten Extrakt (1:500) vermutlich so niedrig, dass die Substanz nicht mehr als Peak erkannt werden kann. Um diese Problematik genauer zu untersuchen, könnte man den Extrakt in etwas höheren Konzentrationen analysieren oder empfindlichere Detektionsverfahren anwenden. Allerdings war diese Problematik nicht Gegenstand der Arbeit.

Nebenwurzel (NW)

Wie auf S. 75 erwähnt, konnten nur von ausgewählten Genotypen die Rhaponticingehalte in den NW untersucht werden. Die Auswahl der Genotypen basierte auf den Ergebnissen der Rhaponticingehalte in den HW. Es wurden jeweils zwei Genotypen mit hohen (Genotyp 18, 20) bzw. niedrigen Rhaponticingehalten (Genotyp 16, 17) gewählt. Genotyp 19 wurde nicht weiter untersucht, da die Ergebnisse die Gehaltsanforderungen der Chemisch Pharmazeutischen Fabrik Müller, Göppingen nicht erfüllen.

Die untersuchten Nebenwurzeln (Ansatz und Spitze) zeigten durchschnittlich 1 - 2 % geringere Rhaponticinkonzentrationen als der Wurzelkern. In Abbildung 48 sind die Gehalte von den NW- Ansätzen in den einzelnen Genotypen dargestellt.

Tabelle 13: Rhaponticingehalte in den Nebenwurzeln

Genotyp	16	17	18	20
Wurzelstück				
2/1	2,6	2,1	4,5	5,0
3/1	3,8	2,8	5,4	6,9
4/1	3,7	2,7	5,4	6,8
5/1	4,4	2,5	6,3	6,7
6/1	3,4	1,9	6,2	5,9

Die Ergebnisse der Nebenwurzelsansätze bestätigen die Ergebnisse der Hauptwurzeln hinsichtlich der Verteilung der Rhaponticinkonzentrationen in den einzelnen Genotypen. Genotyp 17 hat im Mittelwert ebenfalls geringere Gehalte als Genotyp 16, und Genotyp 20 weist mit $\bar{\varnothing}$ 6,9 % erneut die höchste Rhaponticinkonzentration auf.

Die Differenzen zwischen den einzelnen NW- Ansätzen innerhalb eines Genotyps sind hier weniger ausgeprägt als in den Hauptwurzelsegmenten.

Abbildung 41 stellt die ermittelten Gehalte der NW- Spitzen dar. Sie unterscheiden sich nur gering von den Konzentrationen der NW- Ansätze. Allerdings wurde hier die $\bar{\varnothing}$ Maximalkonzentration (7,4 %) bei Genotyp 18 festgestellt.

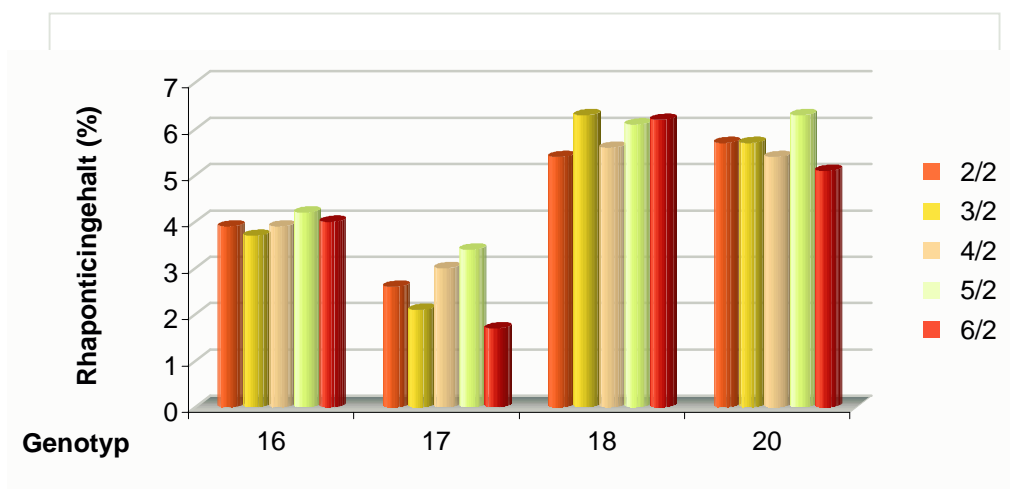


Abbildung 41: Rhaponticingehalte in den Nebenwurzelspitzen der Genotypen 16, 17, 18 und 20

Das Inhaltsstoffmuster der Nebenwurzeln ist sowohl im Wurzelansatz als auch in den Wurzelspitzen mit dem der Hauptwurzeln vergleichbar. In Abbildung 42 ist ein Beispielchromatogramm einer Nebenwurzel dargestellt.

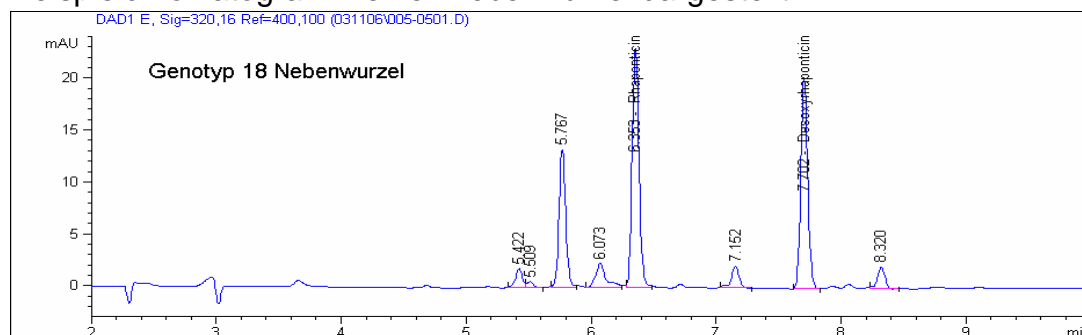
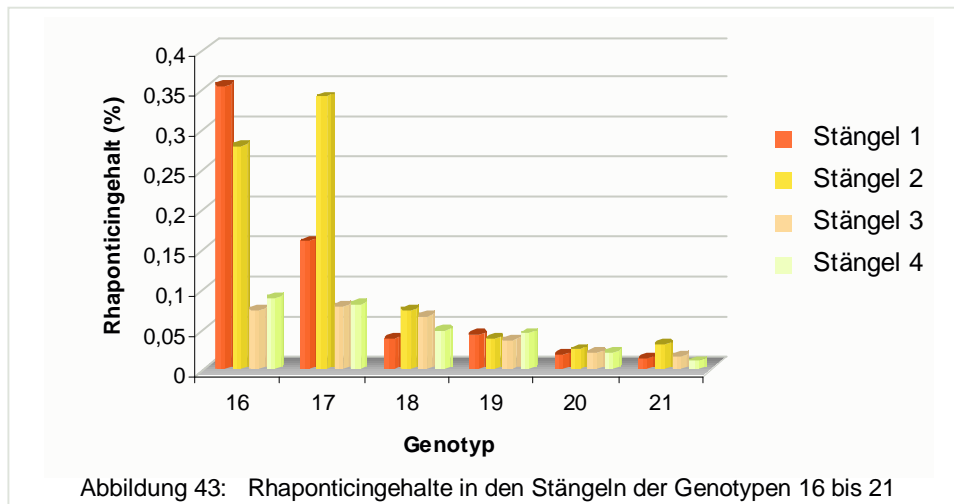


Abbildung 42: Chromatogramm eines Nebenwurzelextraktes vom Genotyp 18

Stängel

Die in den Stängeln gemessenen Rhaponticinkonzentrationen sind im Vergleich zu den Wurzeln deutlich geringer (s. Abbildung 43). Die Stängel enthielten teilweise 300mal weniger Rhaponticin als die Wurzeln der gleichen Pflanze. Durchschnittlich wurden in den einzelnen Genotypen nur zwischen 0,02 und 0,2 % Rhaponticin gefunden.



Weiterhin fällt auf, dass die Gehalte einzelner Stängelteile der Genotypen 16 und 17 stark von den durchschnittlichen Konzentrationen abweichen.

Vermutlich sind die Stilbene im Rhabarber bedingt durch ihre hohe Lichtempfindlichkeit nativ hauptsächlich in der Wurzel konzentriert. Der Anteil, der sich dennoch in den Stängeln befindet, wird eventuell durch die Lichteinwirkung abgebaut. Da die Sonneneinstrahlung an jeder Pflanze und an den verschiedenen Stängelteilen sehr ungleichmäßig ist, können unabhängig vom Genotyp nur extrem niedrige und variierende Konzentrationen gefunden werden.

Aufgrund der niedrigen Rhaponticinkonzentrationen in den Stängeln musste der Extrakt in der HPLC unverdünnt gemessen werden.

In der folgenden Abbildung ist ein Beispielchromatogramm eines Stängelextraktes gezeigt.

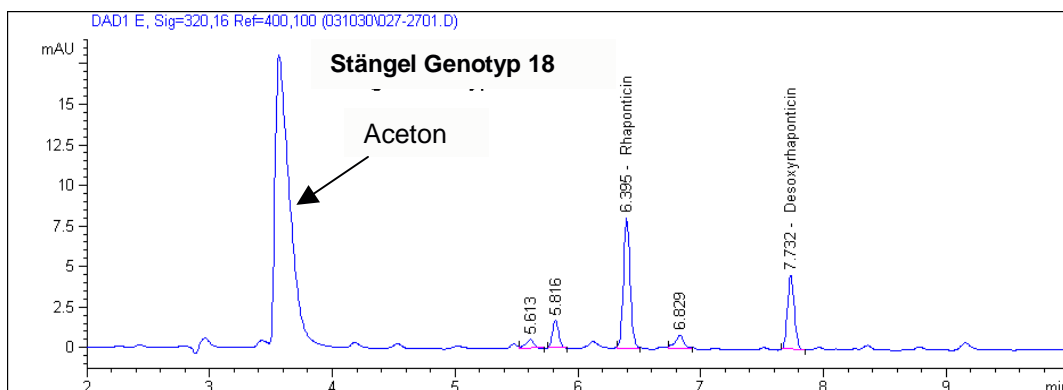


Abbildung 44: Chromatogramm eines Stängelextraktes vom Genotyp 18

Blätter

Die Erklärungsansätze für die niedrigen Rhaponticingehalte in den Stängeln lassen sich ebenso auf die Rhabarberblätter übertragen. Durch die deutlich höhere Lichteinstrahlung an den Blättern, liegt die Rhaponticinkonzentration an dieser Stelle der Pflanze vermutlich weit unter der Stängel.

Bei der Auswertung der Chromatogramme konnte überwiegend weder Rhaponticin noch andere Stilbenderivate identifiziert werden. Neben Überlagerungen durch Peaks mit gleicher Retentionszeit wie Rhaponticin und Desoxyrhaponticin traten hauptsächlich Coelutionen auf, was durch Spektrenvergleich mit den Standardsubstanzen belegt werden konnte. Eine saubere Trennung der Stilbenderivate von anderen Blattinhaltsstoffen war mit der angewandten Analyse­methode nicht möglich. Nur im Genotyp 18 konnte Rhaponticin und Desoxyrhaponticin mit Sicherheit nachgewiesen werden. In Abbildung 45 ist ein Chromatogramm einer Blattprobe vom Genotyp 18 dargestellt.

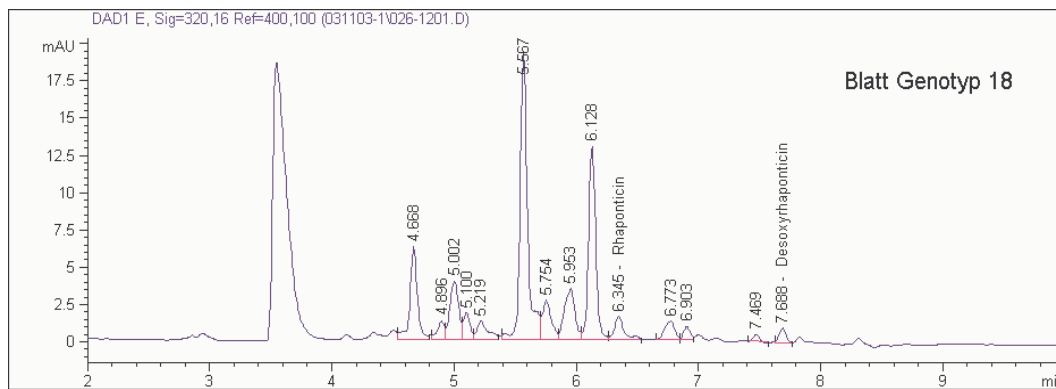


Abbildung 45: Chromatogramm einer Blattprobe vom Genotyp 18

Es unterscheidet sich deutlich von den Chromatogrammen der Wurzel- oder Stängelproben. Die nicht sauber getrennten Peaks deuten auf eine andere Substanzklasse ohne Stilbencharakter hin. Vermutlich handelt es sich dabei hauptsächlich um Chlorophyll, Anthracenderivate oder andere Blattinhaltsstoffe. Um eine genaue Rhaponticinbestimmung in den Blättern durchführen zu können, müssten weitere Probenvorbereitungsschritte durchgeführt werden, die die störenden Komponenten beseitigen.

Schlussfolgerungen für die Probennahme

Die Schwankungen innerhalb der einzelnen Wurzelsegmente einer Pflanze sind begrenzt, so dass die Selektion hinsichtlich der Probenanzahl etwas vereinfacht werden kann.

Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen Haupt- und Nebenwurzeln festgestellt werden. Das bedeutet hohe Rhaponticinkonzentrationen in NW- Ansatz oder – spitze deuten auf noch höhere Gehalte (1 – 2 % mehr) im Wurzelkern (HW) hin. Demzufolge ist es für die Selektion ausreichend NW- Proben zu entnehmen und zu untersuchen.

Untersuchungen an mikrovermehrtem Rhapontikrhabarber

Die Fläche wurde mit In vitro –Pflanzen bepflanzt, die aus einer Nachkommensserie des Genotypen 20 erhalten wurde und für die Anbauversuche mikrovermehrt wurden. Die Pflanzen befanden sich in einem guten, wachstumsfähigen Zustand, waren aber im Vergleich mit anderen durch Samen erhaltenen Pflanzennachkommen relativ klein. Sie gehörten aber zu den ersten Pflanzen, die Rhaponticingehalte zwischen sieben und 8 Prozent enthielten.

Die Pflanzen wurden im Juli 2002 ausgepflanzt. Der Versuch enthielt 16 Parzellen mit je 24 Pflanzen und 4 Parzellen mit je 12 Pflanzen, die auf einem Damm angebaut wurden. Bei derartigen Anpflanzungen ist eine leichtere Beerntung der Pflanzen möglich. Bei Feuchtigkeitsmangel kann es jedoch schnell zum Austrocknen der Pflanzen kommen.

Beim Düngungsversuch wurden folgende Varianten in vierfacher Wiederholung angelegt:

0 kg N/ha, 80 kg N/ha, 160 kg N/ha, 240 kg N/ha.

Zu Beginn der Vegetationsperiode wurden Bodenproben genommen.

Es zeigte sich, dass die Ausgangsgehalte hinsichtlich des N- Gehaltes bei den einzelnen Varianten sich nicht wesentlich unterschieden und die Parzellen bei P, K und Mg im Bereich einer optimalen Versorgung lagen (Abbildung 1 und 2). Im Jahre 2003 wurden ebenfalls Bodenproben gezogen. Die Bodenwerte lagen im üblichen Bereich (Tabelle 13).



Abbildung 46: Düngungsversuch mit mikrovermehrten Pflanzen

Erträge

Der Versuch wurde zum Ende der Laufzeit des Vorhabens geerntet, um die Erträge sowie die Gehalte an Rhaponticin bei den verschiedenen Düngungsstufen zu ermitteln.

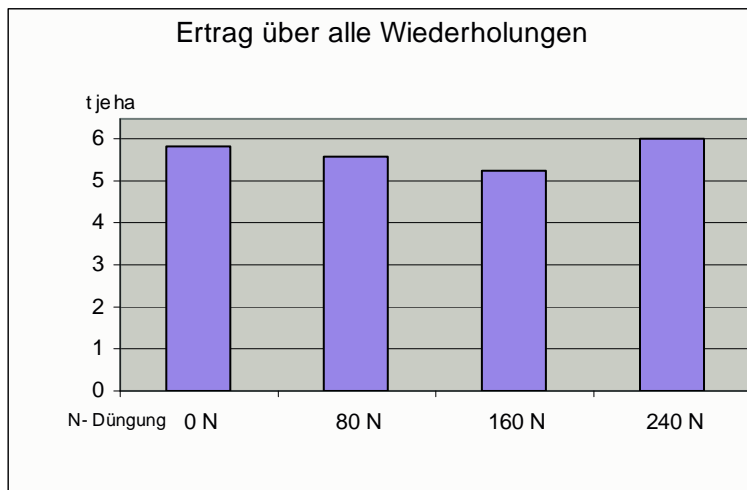


Abbildung 47: Erträge von Rheum rhaponticum im Düngungsversuch

Die Erträge sind auf t je Hektar berechnet. In der Abbildung 47 ist zu erkennen, dass sich die durchschnittlichen Erträge der einzelnen Düngungsvarianten nicht stark unterscheiden

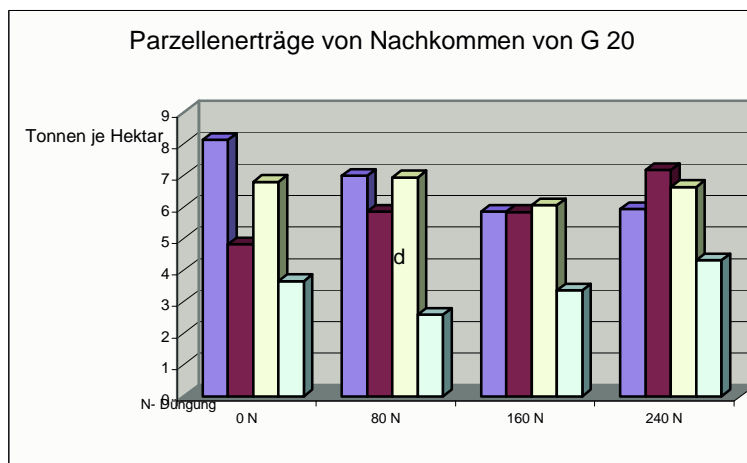


Abbildung 48: Parzellenerträge im Düngungsversuch

Betrachtet man die Einzelerträge auf den Parzellen, ist zu erkennen, dass die d- Wiederholung (hellblau) durch besonders geringe Erträge auffällt. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden. Die Bodenproben geben keinerlei Hinweise auf eine schlechtere Versorgung dieser Parzellen mit Nährstoffen (Tabelle 13). Die Parzellen der d- Wiederholungen sind in der Tabelle grau untersetzt. Es lässt sich keine Unregelmäßigkeit gegenüber den anderen Wiederholungen erkennen. Der notwendige Stickstoff wurde entsprechend den Varianten verabreicht.

Tabelle 13: Kali- und Phosphorgehalt im Boden beim Düngungsversuch

Variante	Bodentiefe	K ₂ O	P ₂ O ₅
0 kg N/ha	0-60	29,3	21,0
	0-60	26,8	19,5
	0-60	29,5	16,5
	0-60	27,0	15,0
80 kg N/ha	0-60	28,3	22,0
	0-60	28,1	22,5
	0-60	33,9	16,0
	0-60	24,1	14,0
160 kg N/ha	0-60	29,8	24,0
	0-60	27,5	21,0
	0-60	24,7	13,0
	0-60	28,1	23,5
240 kg N/ha	0-60	29,8	22,5
	0-60	32,2	25,5
	0-60	26,8	21,5
	0-60	30,1	24,0
Damm 1	0-60	34,4	29,5
Damm 2	0-60	37,0	28,5
Damm 3	0-60	36,7	26,0
Damm 4	0-60	33,5	25,5

Als Vorfrucht waren einige Jahre Getreide und im Jahr vor der Rhabarberpflanzung war Rhabarber ausgesät worden, der im Laufe des Jahres wieder entfernt wurde. Ein Entzug spezieller Nährstoffe kann in der kurzen Zeit nicht stattgefunden haben. Es waren an den Pflanzen auch keine Krankheitssymptome zu entdecken. Mögliche Ursachen können eventuell Bodenverdichtungen aus früheren Bearbeitungszeiten sein, die ein vermindertes Wasserhaltevermögen bewirken.

Die Pflanzen, die auf dem Damm gewachsen waren, wiesen ebenfalls keine Ertragserhöhung durch die N- Düngung auf. Die höchsten Erträge wurden bei der 80 kg N- Stufe gefunden. Die geerntete Wurzelmasse der 0 kg- N-Stufe lag in der Höhe, wie sie auch bei den anderen Parzellen in den 0-N-Stufen ermittelt wurde. Bei allen anderen

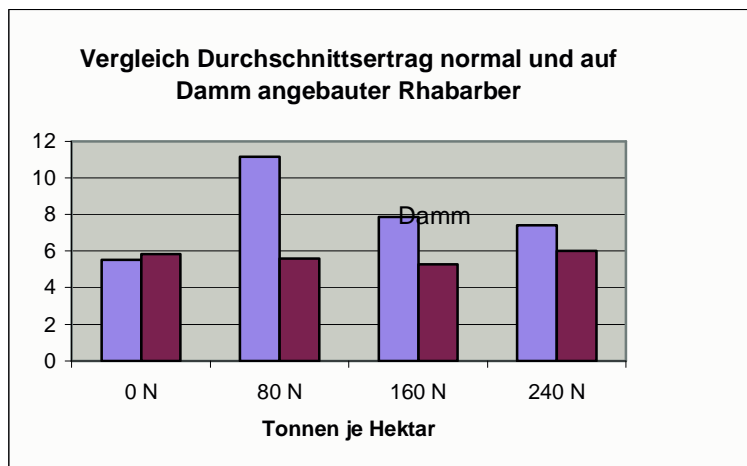


Abbildung 49: Erträge von den Parzellen und vom Damm

N- Gaben hatten die auf dem Damm geernteten Wurzeln höhere Erträge aufzuweisen, die mit steigender N- Gabe abnahmen. Während der Hauptwachstumszeit gab es 2004 ausreichend Niederschläge, die auf dem Damm eine gute Pflanzenentwicklung ermöglichten. Wenn die technische Möglichkeit besteht, derartige Pflanzungen vorzunehmen und für ausreichend Wasser zu sorgen, besteht kein ertraglicher Nachteil bei der Dampfpflanzung. Die Ernte könnte dadurch erheblich erleichtert werden.

Die in diesen Versuchen gefundenen geringen Reaktionen auf die N- Düngung sind wahrscheinlich auf die im Bernburger Boden (Bodenklasse 93-100) vorhandenen und ausreichenden Nährstoffe zurückzuführen.

Die In- vitro- Pflanzen, die für diese Versuche hergestellt wurden, waren außerdem recht kleinwüchsig und entzogen demzufolge wenig Nährstoffe. Es kam dadurch nicht zu Mangelerscheinungen bei den Varianten mit einer geringen N- Gabe.

Die erhaltenen Erträge sind im Vergleich mit in anderen Versuchen (Forschungsthema Gerbstoffgewinnung) erhaltenen Erträgen ebenfalls gering. Das kann einerseits auf die genetischen Eigenschaften dieser mikrovermehrten Pflanzen mit relativ hohem Rhaponticingehalt zurückzuführen sein, andererseits auch auf die späte Pflanzzeit bei Anlage des Versuches erst im Juli 2002. Die Wachstumsperiode ist zu dem Zeitpunkt eigentlich schon weit fortgeschritten und die Pflanzen hatten in dem Anbaujahr nur noch ausreichend Zeit, um richtig anzuwachsen. Eine frühere Möglichkeit einer Pflanzung und Versuchsdurchführung sowie anschließender Mikrovermehrung gab es aber aufgrund des Beginns des Vorhabens im Oktober 2001 und der kurzen Laufzeit nicht.

7.6.6 Kostenkalkulation für den Anbau von Rhabarberwurzeln

Tabelle 14: Kosten der landwirtschaftlichen Herstellung Rhabarberwurzeln
(Landwirtschaftliche Kosten je Hektar)

1. Jahr		Euro	Erläuterungen
Pflanzstücke		2223,00	4446 Pflanzen, je Pflanze 50 Cent
Organische Düngung	50 t	60,00	Miststreuer Schlepper mit Fahrer Mist Eigenleistung
Einarbeitung (Grubber)		46,00	Schlepper mit Fahrer
Saatbettaufbereitung		16,00	Saatbettkombination
Pflanzung	40 h	421,00	56 h gesamter Arbeitslohn Pflanzpersonen, Schlepper u. Fahrer nur 4h
2 x Hacken, längs und quer		82,00	Schlepper, Fahrer, Hackmaschine
Düngung	50 kg N, KAS	43,00	KAS, Fahrer, Schleuderstreuer, Traktor, 15 min

2. Jahr

2 x Hacken, längs		45,20	Schlepper, Fahrer, Hackmaschine
Düngung	150 kg N, KAS	93,00	KAS, Fahrer, Schleuderstreuer, Traktor, 15 min

3. Jahr

2 x Hacken, längs		41,00	Schlepper, Fahrer, Hackmaschine
Düngung	150 kg N, KAS	93,00	KAS, Fahrer, Schleuderstreuer, Traktor, 15 min
Erntevorbereitung Blatt entfernen (Mulchen, Fräse)		56,25	Fräse, Traktor, Fahrer
Auspflügen	3,0	81,00	Schlepper u. Fahrer 2/h Pflug 7/h
Aufnehmen vom Feld		270,00	4 Pers. je 27h a 10E/h, Traktor 27h, a 10 E/h,
Beladen auf Container		27,00	Teleskoplader, Fahrer
Transport		150,00	150 km, km = 1,00 E
Deckungsbeitrag 4 Jahre		2250,00	750 E/Jahr
Reinigung, Zerkleinerung Trocknung		550,00	Waschen, Schnitzel, Trocknen

Gesamt 6454,45 Euro

Ertrag 6 -10 t/ha, Trockensubstanz 33%, Getrocknetes Material 2 - 3, t.
1 t getrockneter Wurzel kostet 2151,5 - 3227,23 Euro. Für den Landwirt sind 750 Euro Deckungsbeitrag pro Jahr angenommen und im Preis enthalten.

Die Preise für die Landwirtschaftliche Erzeugung der Rhabarberwurzeln (Tabelle 14) wurden nach dem KTBL- Taschenbuch Landwirtschaft 2002/2003 und den in den Versuchen durchgeführten Arbeiten kalkuliert. Zugrunde gelegt wurden die Kosten für den überbetrieblichen Maschineneinsatz.

Die erhaltenen Erträge für die geernteten Wurzeln waren sehr gering. Die Ursache dafür ist in diesem Abschnitt schon beschrieben worden. Ausgehend von den Erfahrungen mit anderen Versuchen mit verschiedenen Rhabarbergenotypen können die Wurzelmassen erheblich größer sein und die hier erreichten Erträge um mindestens 100% überschritten werden. Darum wurden bei Erträgen und Kosten ein Bereich und keine genauen Zahlen angegeben.

7.7 Untersuchungen der Rhaponticingehalte

7.7.1 Rhaponticingehalte bei unterschiedlicher N- Düngung

Für die Rhaponticinuntersuchungen wurden von allen Pflanzen des Versuches Proben entnommen, um eine repräsentative Probenahme zu erreichen. In der Abbildung 50 sind die durchschnittliche Rhaponticingehalte der Wurzeln aus den verschiedenen Düngungsvarianten dargestellt. Es zeigte sich ein leichter Anstieg der Rhaponticingehalte von 0 bis 240 kg N/ha. Die Einzelwerte unterliegen innerhalb der Wiederholungen der einzelnen Düngungsstufen großen Schwankungen, so dass sich die Zunahme mit der Düngung nicht sichern ließ.

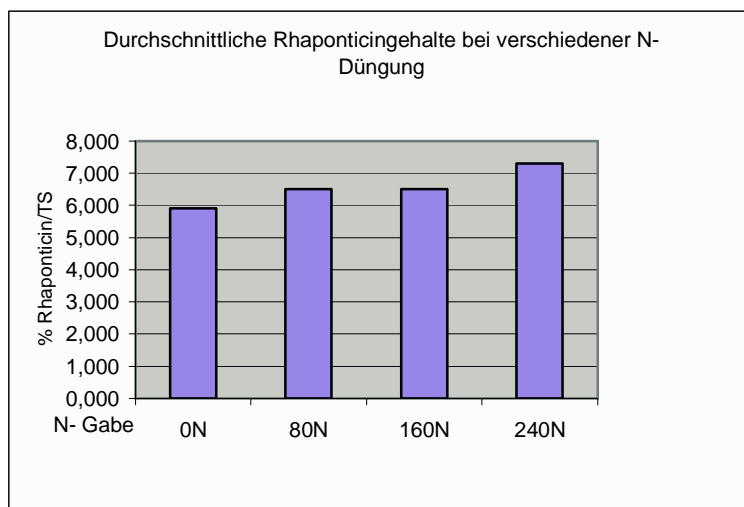


Abbildung 50 : Rhaponticingehalte von Rheum rhaponticum bei verschiedener N- Düngung

In der nächsten Abbildung (51) sind die auf dem Damm erhaltenen Rhaponticingehalte im Vergleich zu den Gehalten aus der Parzellenpflanzung dargestellt. Sie waren um 2,4 bzw. 1,8 % höher. Eine Erklärung für diese Erhöhung konnte nicht gefunden werden. Die Erträge auf dem Damm sind auch gering höher als in den Parzellen, eine positive Beziehung zwischen Ertrag und Rhaponticin konnte aber nicht gefunden werden.

Die Schwankungen in den Rhaponticingehalten liegen wahrscheinlich wie bei den Parzellenversuchen in den Bereichen, wie sie in einzelnen Pflanzen und Pflanzenteilen vorkommen. Die Versuche auf dem Damm sind ohne Wiederholung angelegt worden

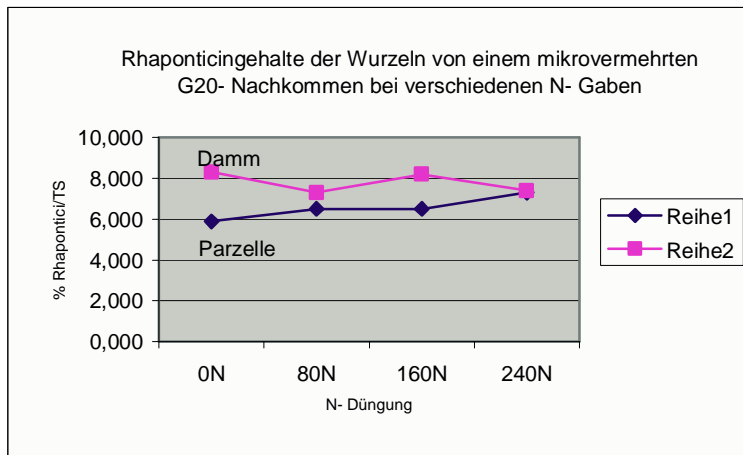


Abbildung 51 Durchschnittsgehalte an Rhaponticin in den Proben aus normaler Parzellenpflanzung (blau) und Dammpflanzung (rot)

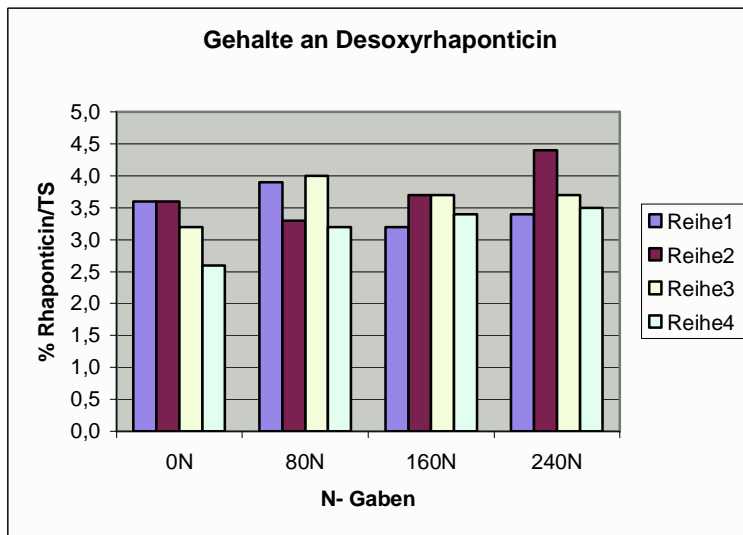


Abbildung 52: Gehalte an Desoxyrhaponticin bei den verschiedenen Düngungsvarianten

Die Konzentrationen an Desoxyrhaponticin verhalten sich wie die Rhaponticingehalte. Sie zeigen eine positive Korrelation zum Gehalt an Rhaponticin von $r = 0,96$.

Das Verhältnis von Rhaponticin zu Desoxyrhaponticin beträgt 65 % Rhaponticin zu 35 % Desoxyrhaponticin und wäre für eine technologische Gewinnung von Rhaponticin ausreichend (Minimum = 60 % Rhaponticin). Dieses Verhältnis ist wichtig für die Zusammensetzung des standardisierten Präparates.

Zwischen dem Ertrag und dem Rhaponticingehalt besteht eine Korrelation von - 0,45. Die Beziehung ließ sich nicht sichern und kann daher nur als richtungsweisend angesehen werden.

7.7.2 Selektion der Rhaponticingehalte zum Auffinden von Pflanzen mit hohen Konzentrationen an Rhaponticin

Die Hauptaufgabe des Vorhabens war die Untersuchung von durch Aussaat erhaltenen Pflanzen, um rhaponticinreiche Pflanzen für die Mikrovermehrung zu finden. Alle untersuchten Proben stammen aus Kreuzungen, die auf dem Versuchsfeld zufällig stattgefunden haben. Die Pflanzen der verschiedenen Genotypen standen in einem Komplex und es bestand die Möglichkeit einer gegenseitigen Befruchtung durch Insekten. Jeder Genotyp stand immer mit 4 weiteren Pflanzen in einer Reihe. Von den einzelnen Pflanzen wurden die Samen geerntet und mit der Bezeichnung der Mutterpflanze gekennzeichnet. Die ausgesäten Pflanzen wurden im Jahr 2002 auf die einzelnen Selektionsfelder ausgepflanzt und im Jahr 2004 wurden davon Proben geerntet, die getrocknet, gemahlen und nach dem entwickelten Verfahren extrahiert und mittels HPLC auf die Rhaponticingehalte untersucht, um eventuelle Pflanzen herauszufinden, die einen erhöhten Rhaponticingehalt aufweisen. Die rhaponticinreichen Pflanzen werden als Genreserve angebaut und dann bei Bedarf der Fa. Tinplant für Mikrovermehrungsarbeiten zur Verfügung gestellt.

Die aufgeführten Genotypen gehören alle zu *Rheum rhaponticum* L. und *Rheum undulatum* L. und sind sogenannte Rhapontikrhabarber.

Genotyp 16

Die zusammengefassten Analysenwerte der Pflanzen des Genotyps 16 sind in der Tabelle 15 dargestellt.

Vom Genotyp 16 wurde insgesamt 416 Proben geerntet, die auf 5 Versuchsfeldern aufgewachsen waren. Dabei stammt der größte Anteil der Proben von den Selektionsfeldern 4, 5 und 6.

Der durchschnittliche Rhaponticingehalt der Proben lag 3,3 % in der Trockensubstanz. Die Werte wiesen über alle Selektionsfelder einen Bereich von 1,1 bis 7,4 % Rhaponticin auf.

Die Mittelwerte auf den einzelnen Selektionsfeldern schwankten zwischen 2,5 und 3,6 % Rhaponticin.

Tabelle 15 Rhaponticingehalte der Nachkommen des Genotyps 16 auf den verschiedenen Selektionsflächen

	1	2	4	5	6	Alle SF
Anzahl	13	8	63	257	75	416
Mittelwert	3,3	2,5	2,7	3,6	3,1	3,3
Min	1,6	1,5	1,1	1,8	1,6	1,1
Max	5,1	3,6	5,4	1,0	5,0	7,4

Die gesamten Proben von G 16 zeigt die Abbildung 53

Der Hauptanteil der untersuchten Proben des Genotyps 16 wies Rhaponticingehalte zwischen 3 und 5 Prozent auf. Die niedrigsten Werte lagen zwischen 2 und 3 Prozent, sie wurden bei 35 Proben gefunden. Gehalte über 6 % wurden nur bei sieben Genotypennachkommen gefunden. 2 Genotypennachkommen wiesen Werte über 7% auf und sollen für eine Mikrovermehrung und spätere Verwendung zur Rhaponticingewinnung genutzt werden.

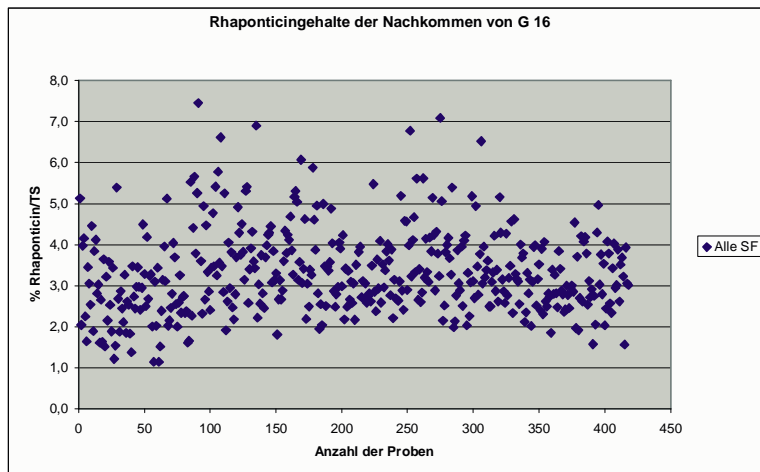


Abbildung 53: Rhaponticingehalte der Nachkommen von Genotyp 16

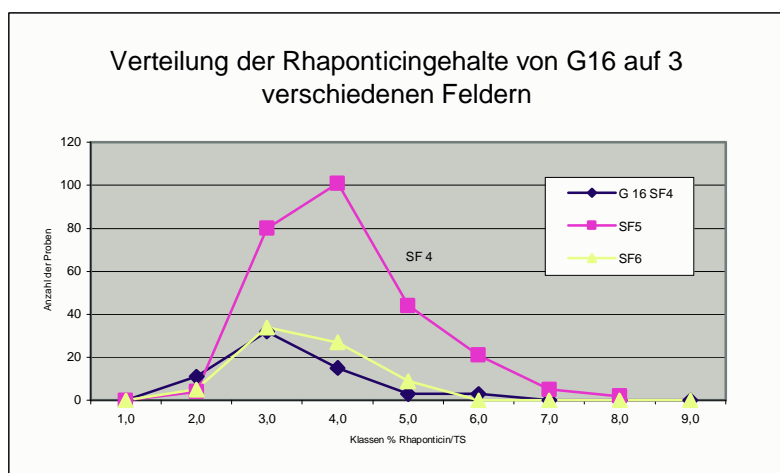


Abbildung 54: Die Nachkommen von Genotyp 16 auf den verschiedenen Selektionsfeldern

Auf der Abbildung 54 ist zu erkennen, dass auf SF 5 die meisten Pflanzen einen Gehalt zwischen 3 und 4 % aufweisen, bei den anderen Selektionsfeldern liegt das Maximum bei 2-3 %.

SF 4 und SF 6 zeigen die meisten Proben in den Rhaponticinklassen zwischen 3 und 4, bei SF 5 lag der größte Anteil der Rhaponticingehalte zwischen 4 und 5%.

Die Durchschnittsgehalte der einzelnen Selektionsfelder lagen von 2,5 bis 3,3 %. Möglicherweise handelt es sich um einen Standorteinfluss, denn das Selektionsfeld 5 liegt auf dem Strenzfeld und die anderen an dem Versuchsfeld Kohlenstraße. Es kann aber auch an einer zufälligen Auswahl der Sämlinge beim Auspflanzen liegen, da auf den Feldern 4 und 6 weniger Pflanzen aufgezogen wurden.

Genotyp 17

Die zusammengefassten Werte der Nachkommen des Genotyps 17 sind in der Tabelle 16 dargestellt.

Vom Genotyp 17 wurden 156 Sämlinge ausgepflanzt, der größte Teil auf den Selektionsfeldern 5 und 6. Die einzelnen Nachkommen wiesen Rhaponticingehalte

zwischen 1,3 und 7,1 % Rhaponticin in der Trockensubstanz auf. Die einzelnen Rhaponticingehalte auf allen Versuchsfeldern sind in der Abbildung 55 dargestellt.

Tabelle 16

Selektionsfläche	SF 1	SF 2	SF 5	SF 6	Alle SF
Anzahl	12	8	66	69	156
Mittelwert	3,2	2,4	3,6	3,1	3,3
Minimum	2,0	1,3	1,5	1,6	1,3
Maximum	5,5	3,8	7,1	5,2	7,1

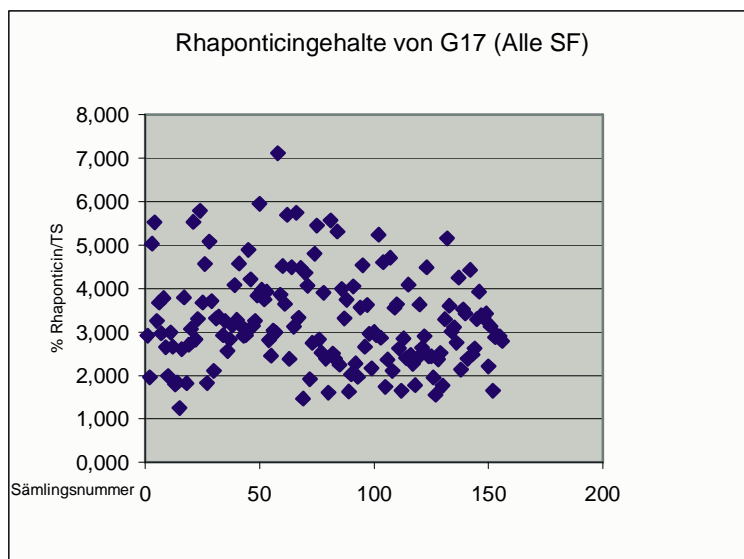


Abbildung: 55: Rhaponticingehalte aller Nachkommen von G 17

In der Abbildung 55 sind die Rhaponticingehalte aller Proben dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Gehalte mit einer Ausnahme zwischen 1 und 6 % liegen. Eine Probe besitzt einen Rhaponticingehalt von 7,1 %/TS. Die Pflanze wird für die Mikrovermehrung und für eventuelle Kreuzungsarbeiten weiterverwendet.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte auf den einzelnen Selektionsfeldern. Sie befinden sich zwischen 2 und 4 %. Die Mittelwerte auf den beiden Versuchsfeldern SF5 und SF6, die für die meisten Pflanzen von G 17 zur Anzucht dienten, unterschieden sich nur schwach.

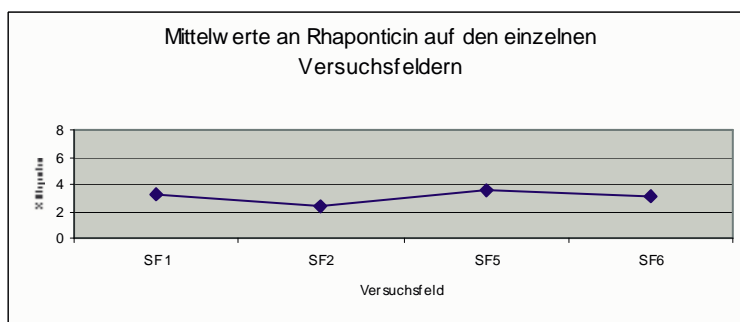


Abbildung 56: Mittelwerte der Rhaponticingehalte auf den einzelnen Selektionsfeldern

Die Verteilung der Rhaponticingehalte des Genotyps 17 ist in der nächsten Abbildung 57 dargestellt. Der größte Teil der untersuchten Proben besitzt Rhaponticingehalte zwischen 2 und 4 %.

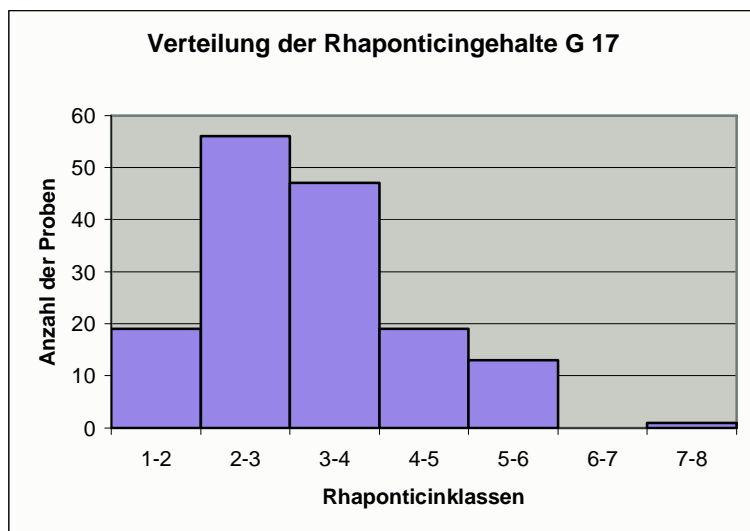


Abbildung 57: Verteilung der Rhaponticingehalte über alle Selektionsfelder

Genotyp 18

Die zusammengefassten Analysenwerte der Pflanzen des Genotyps 18 sind in der Tabelle 17 dargestellt.

Vom Genotyp 18 wurde insgesamt 242 Proben, die von 5 Versuchsfeldern geerntet und analysiert. Dabei stammt der größte Anteil der Proben von den Selektionsfeldern 4, 5 und 6.

Der durchschnittliche Rhaponticingehalt der Proben lag bei 3,3 % in der Trockensubstanz. Die Werte wiesen über alle Selektionsfelder einen Bereich von 1,3 bis 7,7 % Rhaponticin auf.

Die Mittelwerte auf den einzelnen Selektionsfeldern schwankten zwischen 3,2 und 4,7 % Rhaponticin.

Tabelle 17: Rhaponticingehalte der Sämlinge von G 18

Selektionsfläche	SF 1	SF 2	SF 5	SF 6	Alle SF
Anzahl	8	8	151	75	242
Mittelwert	3,4	3,2	4,4	4,7	3,3
Minimum	2,9	2,1	2,1	2,2	1,3
Maximum	3,9	4,5	7,7	7,5	7,7

Die gesamte 242 Rhaponticingehalte von Genotyp 18 über alle Selektionsfelder sind in der Abbildung 57 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass die meisten Proben Rhaponticingehalte besitzen, die zwischen 2 und 7 % liegen. Unter 2 % sind keine Werte gefunden worden.

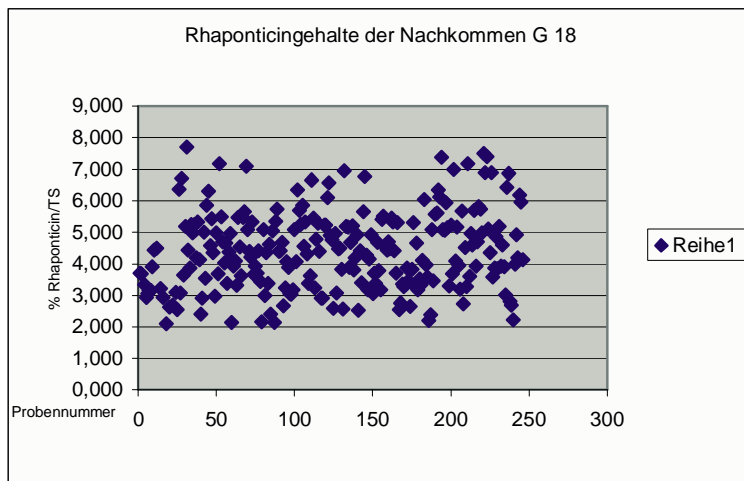


Abbildung 57: Rhaponticingehalte der Proben auf allen Versuchsfeldern

Die Verteilung der Gesamtproben des Genotyps 18 ist in der Abbildung 58 dargestellt.

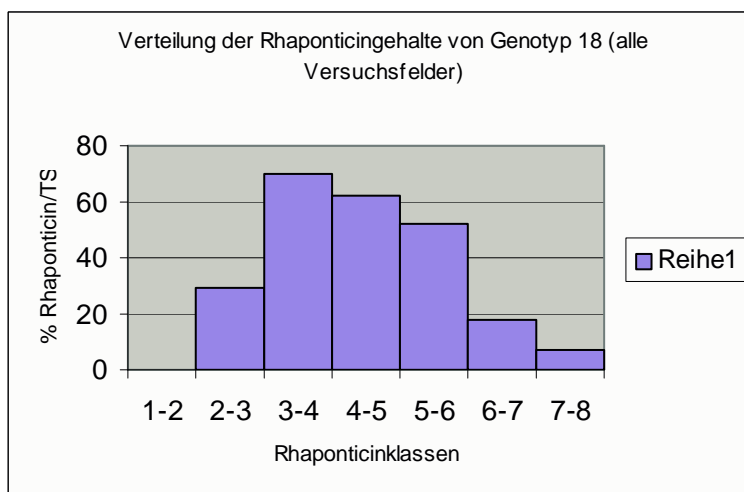


Abbildung 58: Verteilung der Rhaponticingehalte von Genotyp 18

Hier ist zu erkennen, dass der größte Teil der untersuchten Proben in den Bereichen von 3 bis 6 % aufzufinden war. Unter 3 und über 6 % sind wenig Rhaponticingehalte erhalten worden.

7 Werte liegen über 7 % und werden als Reserve für die Mikrovermehrung zur Verfügung gestellt.

Genotyp 19

Vom Genotyp 19 waren insgesamt sind nur 19 Pflanzen ausgepflanzt worden. Beim Genotyp 19 zeigte sich eine außerordentlich schlechte Keimfähigkeit, so dass nur wenig Pflanzen für das Pikieren in Töpfe und die Auspflanzung zur Verfügung standen.

Der niedrigste Wert von diesem Genotyp war 0.1 und der höchste 5,2 % Rhaponticin in der Trockensubstanz (Abbildung 59). Pflanzen, die für eine Weiterverwendung geeignet waren, wurden in dieser Serie nicht gefunden.

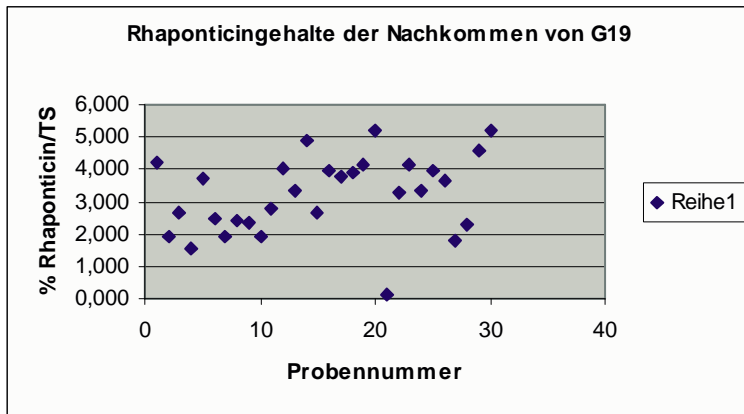


Abbildung 59: Rhaponticingehalte der Nachkommen von Genotyp 19

Genotyp 20

Die zusammengefassten Analysenwerte der Pflanzen des Genotyps 20 sind in der Tabelle 18 dargestellt.

Vom Genotyp 20 wurde insgesamt 173 Proben geerntet, die auf 4 Versuchsfeldern aufgewachsen waren. Dabei stammt der größte Anteil der Proben von den Selektionsfeldern 5 und 6.

Der durchschnittliche Rhaponticingehalt der Proben lag 4,5 % in der Trockensubstanz. Die Werte wiesen über alle Selektionsfelder einen Bereich von 2,2 bis 7,4 % Rhaponticin auf.

Die Mittelwerte auf den einzelnen Selektionsfeldern schwankten zwischen 2,5 und 7,7 % Rhaponticin.

Tabelle 18: Rhaponticingehalte von Genotyp 20

Selektionsfläche	SF 1	SF 2	SF 5	SF 6	Alle SF
Anzahl	15	6	124	24	173
Mittelwert	4,3	4,7	4,5	4,3	4,5
Minimum	2,5	3,6	2,2	2,3	2,2
Maximum	5,9	6,3	7,7	6,8	7,7

In der Abbildung 60 ist zu erkennen, dass auf allen Versuchsfeldern die Gehalte mit einer Ausnahme über 2 % lagen. Einige Proben hatten einen Rhaponticingehalt zwischen 7 und 8 %/TS und werden für die Mikrovermehrung und eventuelle Kreuzungsarbeiten weiterverwendet.

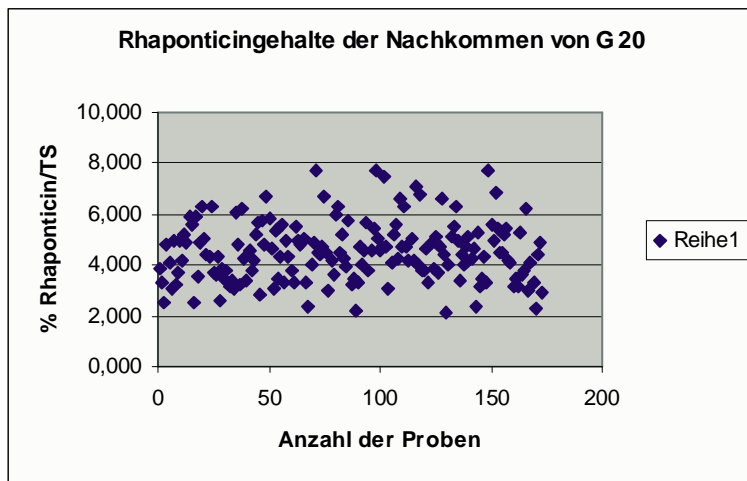


Abbildung 60: Rhaponticingehalte der Nachkommen von Genotyp 20

Genotyp 21

Die zusammengefassten Analysenwerte der Pflanzen des Genotyps 21 sind in der Tabelle 19 dargestellt.

Vom Genotyp 21 wurde insgesamt 366 Proben geerntet, die auf 4 Versuchsfeldern aufgewachsen waren. Dabei stammt der größte Anteil der Proben von den Selektionsfeldern 5 und 6.

Der durchschnittliche Rhaponticingehalt der Proben lag bei 4,0 % in der Trockensubstanz. Die Werte wiesen über alle Selektionsfelder einen Bereich von 1,2 bis 8,6 % Rhaponticin auf. Das war der höchste Wert von allen Genotypen und Selektionsfeldern.

Die Mittelwerte auf den einzelnen Selektionsfeldern schwankten zwischen 3,5 und 4,3 % Rhaponticin.

Tabelle 19: Rhaponticingehalte von Genotyp 20

Selektionsfläche	SF 2und 4	SF 5	SF 6	Alle SF
Anzahl	71	74	221	366
Mittelwert	3,5	4,3	4,0	4,0
Minimum	1,8	1,8	1,2	1,2
Maximum	8,1	7,7	7,8	8,1

Die Verteilung der Rhaponticingehalte über alle Proben des Genotyps 21 ist in der Abbildung 61 dargestellt. Die überwiegende Menge der Proben liegt, wie schon beim Genotyp 20 relativ hoch und der Mittelwert beträgt 4,0 % Rhaponticin. Der größte Teil der Proben ist zwischen 3 und 4 % angesiedelt. 2 Proben dieses Genotyps liegen zwischen 7 und 8 % und eine Probe über 8 %. Die drei Pflanzen sind für die Weiterverwendung vorgesehen.

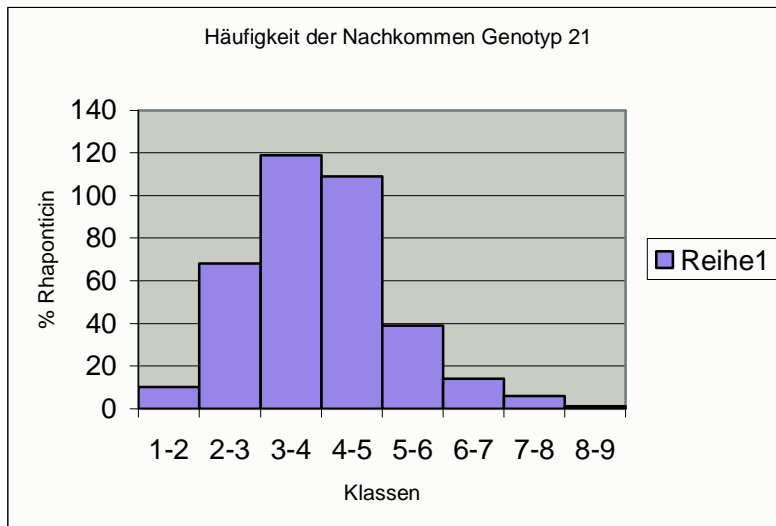


Abbildung 61: Verteilung der Rhaponticingehalte beim Genotyp 21

Genotyp 34

Die zusammengefassten Ergebnisse sind in der Tabelle 19 dargestellt

Tabelle 19: Rhaponticingehalte der Nachkommen des Genotyps 34 auf den verschiedenen Versuchsflächen Selektionsflächen

	1	2	4	5	6	Alle SF
Anzahl	5	8	77	49	60	199
Mittelwert	2,9	2,9	2,7	3,9	3,7	3,4
Min	2,1	0,8	0,7	1,5	1,3	0,7
Max	4,0	4,3	6,4	7,8	7,1	7,8

Vom Genotyp 34 wurde insgesamt 199 Proben geerntet, die auf 5 Versuchsfeldern aufgewachsen waren. Dabei stammt der größte Anteil der Proben von den Selektionsfeldern 4, 5 und 6.

Der durchschnittliche Rhaponticingehalt der Proben lag 3,4 % in der Trockensubstanz. Die Werte wiesen über alle Selektionsfelder einen Bereich von 0,7 bis 7,8 % Rhaponticin auf.

Die Mittelwerte auf den einzelnen Selektionsfeldern schwankten zwischen 2,7 und 3,9 % Rhaponticin.

In der Abbildung 62 sind die Rhaponticinwerte des Genotyps 34 dargestellt:

Die Proben zwischen 7 und 8 % Rhaponticin werden mit ins Sortiment für die Mikrovermehrung gepflanzt.

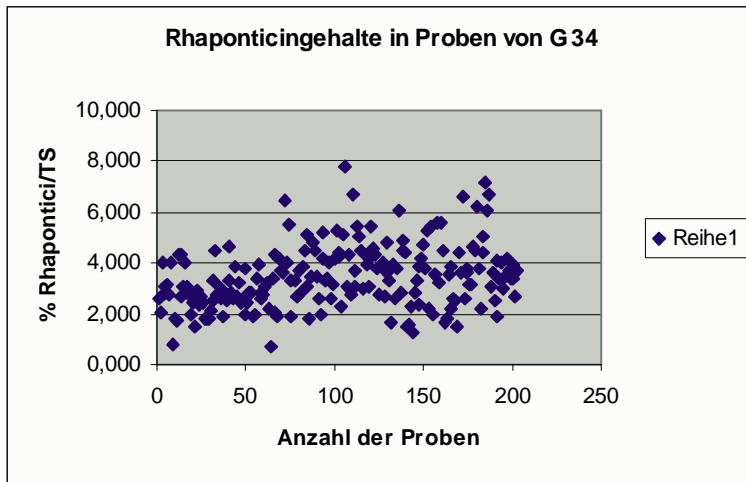


Abbildung 62: Rhaponticingehalte der Nachkommen von Genotyp 34

7.7.3 Rhaponticingehalte im Laufe der Vegetationsperiode

Für die Untersuchung der Rhaponticingehalte im Verlaufe des Jahres wurden von den vorhandenen Selektionsflächen aus den Nachkommen von jedem Genotyp eine Pflanze ausgewählt, die in den Jahren 2003 und 2004 jeden Monat beerntet wurde. Je nach Witterung konnten Pflanzenteile ab April oder ab Mai geerntet werden. Zum Ende der Wachstumsaison in den Monaten September und Oktober waren keine Blätter und Stiele zum Ernten mehr vorhanden. Die Wurzeln wurden dann ebenfalls nicht mehr geerntet, um die Pflanze nicht zu schädigen.

Die Wurzelprobe wurde jeweils von Nebenwurzeln entnommen. Blätter und Stiele wurden ganz geerntet. Die Proben wurden getrocknet, analysiert und die Werte in % der Trockensubstanz berechnet.

Gehalte in den Wurzeln

Die Abbildung 62 zeigt die Durchschnittsgehalte über alle 7 Genotypen für die Jahre 2003 und 2004. In beiden Jahren zeigt sich ein Rhaponticinmaximum im Monat Mai. Der Aprilwert aus dem Jahre 2004 ist ebenfalls geringer als der aus dem Mai des Jahres.

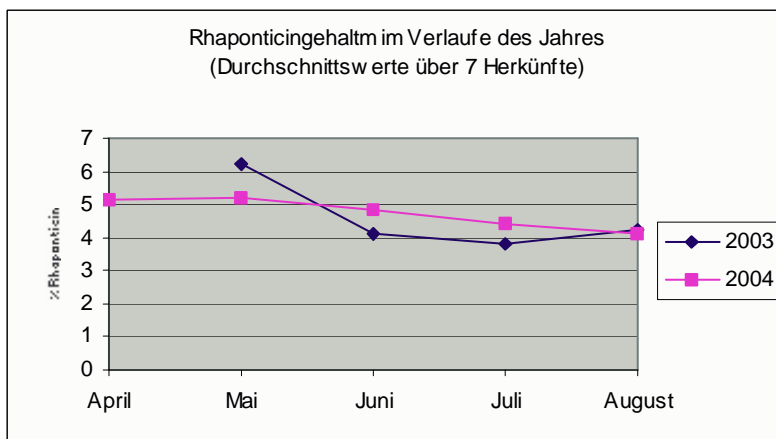


Abbildung 62: Rhaponticingehalte im Verlaufe der Vegetation 2003

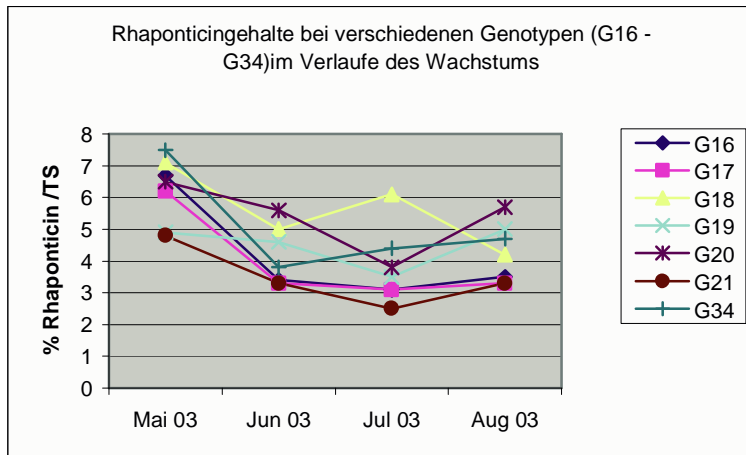


Abbildung 63: Rhaponticingehalte der einzelnen Genotypen 2003 in der Vegetationsperiode

Die einzelnen Genotypen (2003) reagierten nicht alle gleich. Sie zeigten zwar alle ihr Maximum im Mai, Genotyp 18 wies aber zusätzlich im Juli einen erhöhten Wert auf.

2004 wurde bei 5 Genotypen die gleiche Tendenz gefunden wie 2003. Die höchsten Rhaponticinkonzentrationen traten im Mai auf. Die Genotypen 16 und 20 besaßen ihr Rhaponticinmaximum im Monat Juni.

Gehalte in Stielen und Blättern

Die Rhaponticingehalte in den Blättern und Stielen wiesen äußerst geringe Werte auf. Die durchschnittlichen Gehalte lagen bei den Monatsproben weit unter einem Prozent. Bei den Stielen nimmt der durchschnittliche Gehalt des Jahres 2003 im Verlauf der Wachstumsperiode geringfügig ab und steigt im August wieder an. Bei den Blättern ist durchweg eine Abnahme zu verzeichnen (Abbildung 64).

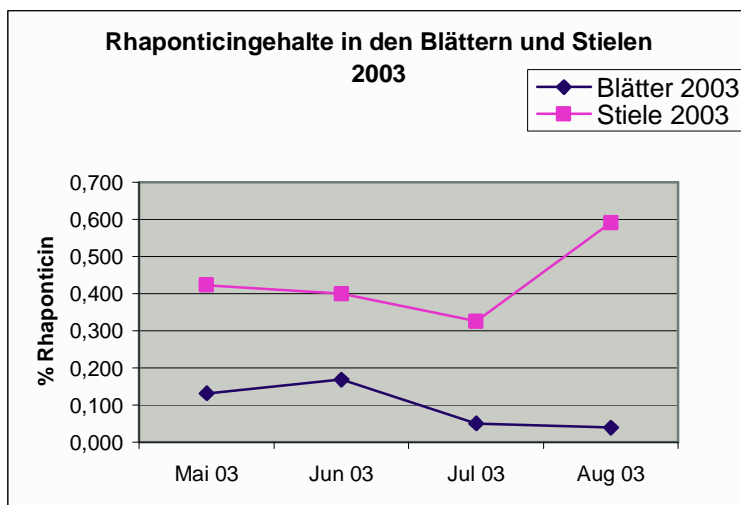


Abbildung 64: Rhaponticin in Blättern und Stielen in der Vegetationsperiode 2003

Im Jahre 2004 konnten nur bis August Proben genommen werden, weil die Pflanzen sehr früh zu welken begannen und die Blätter und Stängel waren nicht mehr zu ernten.

Es zeigt sich aber bei den Durchschnittswerten der Blätter und Stängel, dass ebenfalls der Trend einer Abnahme mit dem Fortschreiten des Jahres verbunden war.

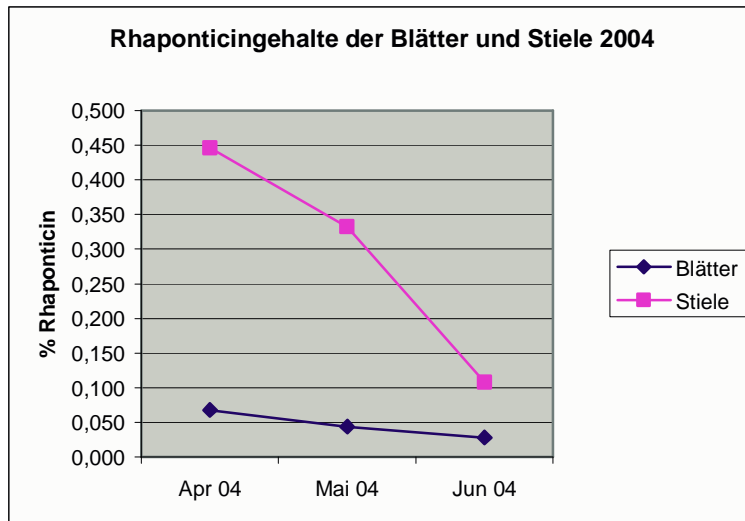


Abbildung 65: Rhaponticin in Blättern und Stielen in der Vegetationsperiode 2004

Es kann vermutet werden, dass die Rhaponticingehalte, die in den oberirdischen Organen der Blätter enthalten sind, im Verlaufe der Wachstumsperiode abgebaut werden und in die Wurzel eingelagert werden. Eine Zunahme des Wurzel-Rhaponticingehaltes erfolgt trotzdem nicht, da die absoluten Gehalte in den Blättern äußerst gering sind. Die Gehalte in den oberirdischen Pflanzenteilen sind so gering, dass sie wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Rhaponticingehalt in der Wurzel ausüben. Es wäre aber für eine Auslese oder Züchtung eine Vereinfachung gewesen, wenn man sie für eine Rhaponticineinschätzung nutzen könnte. Beziehungen zwischen den Blättern, Stielen und den Wurzeln hinsichtlich des Rhaponticingehaltes wurden bei den hier untersuchten Proben nicht gefunden.

7.7.4 Einfluss der Lagerung auf die Rhaponticingehalte

Aus dem Rhabarbersortiment des Professor Hellriegel- Institutes Bernburg wurden in vergangenen Jahren unter anderen Zielstellungen Proben genommen und für Untersuchungen aufgearbeitet. Darunter waren auch einige Proben von den rhaponticinholdigen Genotypen *Rheum rhaponticum* und *Rheum undulatum*. Die Proben waren in den verschiedenen Jahren geerntet, zerkleinert und getrocknet worden. Sie wurden für die Rhaponticinanalysen gemahlen und mittels HPLC untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Einfluss der Lagerung auf die Rhaponticingehalte

Genotyp	1994	1996	1998	2001
17		2,8	2,6	3,5
18	4,1	2,5	2,5	7,8
20		6,7	6,8	8,0
34	1,4	0,2	2,9	

Die Tabelle zeigt keine eindeutigen Unterschiede in den verschiedenen Erntejahren. Es ist aber zu erkennen, dass die Proben aus dem Jahr 2001 die höheren Rhaponticingehalte bei den einzelnen Genotypen aufweisen.

Es muss damit gerechnet werden, dass bei einer längeren Lagerung die Rhaponticinkonzentrationen in den Wurzeln abnehmen und deshalb nach der Ernte sobald wie möglich die Extraktion von Rhaponticin erfolgen sollte.

7.7.5 Untersuchungen zur vereinfachten Auslese auf rhaponticinhaltige Pflanzen

Die Ernte des Rhabarbers zur Rhaponticingewinnung findet frühestens nach 2 Wachstumsperioden statt. Zwar hat sich im ersten Jahr bei manchen Herkünften schon eine ausreichende Menge an Rhaponticin in den Wurzeln gebildet; aber der Ertrag ist noch sehr gering und der Zuwachs in einer weiteren Wachstumsperiode ist sehr groß (in der Regel über 100 %).

Für eine Selektion oder Züchtung von rhaponticinreichen Rhabarberpflanzen ist es aber von Vorteil, wenn schon im ersten Wachstumsjahr eine Kontrolle des Rhaponticingehaltes möglich ist und man zumindest kontrollieren kann, ob es sich um höhere oder geringere Werte handelt.

Eine einfache Auslese über die Untersuchung der oberirdischen Organe würde die Arbeit erleichtern, weil man dann die Pflanze nicht Ausgraben oder beschädigen muss, um eine Probe zu nehmen.

Es wurden deshalb die Rhaponticingehalte von Wurzeln und Stielen bei einigen Genotypen untersucht.

Dabei wurden zwischen den Rhaponticingehalten in den Wurzeln und in den Stielen folgende Korrelationen erhalten:

Nachkommen aller Rheum rhaponticum G 16 bis G21	0,010 Rhaponticin
Rheum undulatum G 34	0,029 Desoxyrhaponticin

Die Korrelationskoeffizienten zeigen, dass zwischen den Rhaponticingehalten in den Wurzeln und in den Stielen keine Beziehung besteht. Es wurden auch für die einzelnen Genotypen die Korrelationskoeffizienten errechnet.

Rhaponticin:	Nachkommen G16	n = 77	r = -0,236
Desoxyrhaponticin			r = -0,164
Rhaponticin:	Nachkommen G17	n = 76	r = -0,065
Desoxyrhaponticin			r = -0,072
Rhaponticin:	Nachkommen G18	n = 29	r = -0,050
Desoxyrhaponticin			r = 0,057
Rhaponticin:	Nachkommen G20	n = 63	r = -0,061
Desoxyrhaponticin			r = -0,090
Rhaponticin:	Nachkommen G21	n = 144	r = -0,061
Desoxyrhaponticin			r = -0,090
Rhaponticin:	Nachkommen G34	n = 56	r = -0,060
Desoxyrhaponticin			r = -0,060

Auch bei den einzelnen Genotypen wurden keine Beziehungen gefunden, die von den Rhaponticingehalten in den Blättern auf die Konzentrationen in den Wurzeln schließen lassen.

Eine weitere Möglichkeit einer Einschätzung des Rhaponticingehaltes ist das Aussehen der oberirdischen Pflanzenteile, der Stiele und der Blätter. An den Blättern kann man zumindest die Anlagen von *Rheum rhaponticum* erkennen. In der Abbildung im Anhang S. 18 sind verschiedene Herkünfte aus dem Sortiment dargestellt. Sie zeigen alle die für *Rheum rhaponticum* L. charakteristischen Blätter, die eiförmig oval sind und am Rand stark wellig gekraust sind. Es wurden jedoch zwischen den Nachkommen keine Pflanzen gefunden, die mit bestimmten Rhaponticingehalten gekoppelt sein könnten. Bei den in der Abbildung dargestellten Pflanzen sind die Genotypen 16 und 20 am ähnlichsten. Ihre Rhaponticingehalte unterscheiden sich jedoch um 2 %/TS.

Die Rhabarberstiele waren die zweite Möglichkeit für eine Einschätzung. So wurde bei der Erarbeitung der Systematik der Stiel von *Rheum rhaponticum* als Merkmal für diese Art mit genutzt und als „unterseits gefurcht“ beschrieben. Im praktischen Anbau sind die Merkmale der verschiedenen Rhabarberarten in den letzten 200 Jahren miteinander vermischt worden, was auch der Grund ist, dass man schwierig rhaponticinreiche Pflanzen dieser Art findet.

Es wurden von aus Samen gezogenen Nachkommen mehrerer Genotypen aus dem Sortiment die Stängelquerschnitte verglichen, um zu ermitteln, ob es bei den Pflanzen mit hohen oder geringen Rhaponticingehalten morphologische Unterschiede gibt. Die Abbildung 66 zeigt die Stiele der Nachkommen von Genotyp 21.

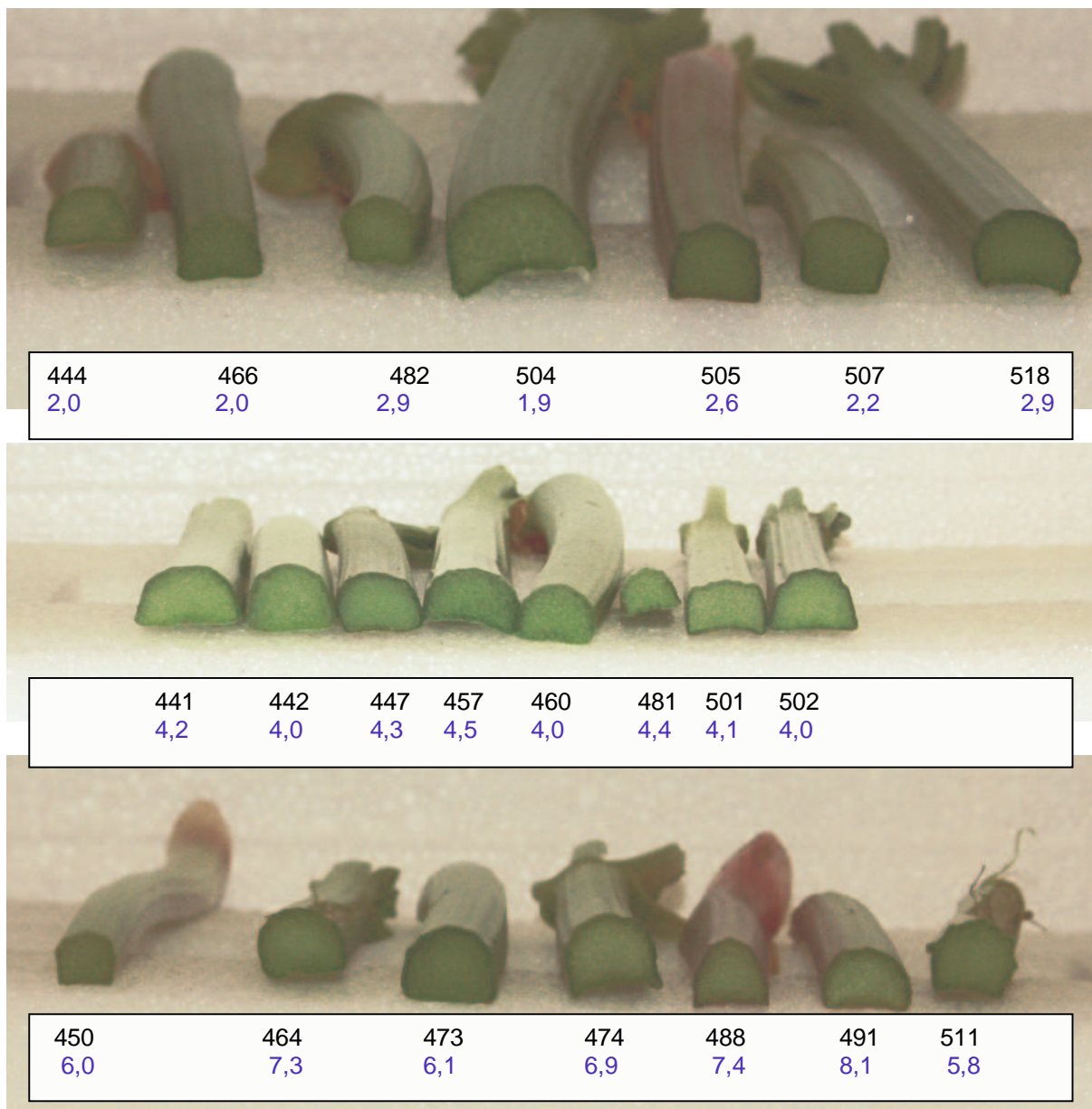


Abbildung 66: Stielquerschnitte von Rhabarbern mit unterschiedlichen Rhaponticingehalten

Die obere Zahl ist die Pflanzennummer, die blaue Zahl ist der Rhaponticingehalt der Wurzeln, die zu dem über der Zahl abgebildetem Stängel gehört.

Es ist zu erkennen, dass sich die Stängelformen nicht so klassifizieren lassen, dass bestimmte Stängelformen einem bestimmten Rhaponticingehalt zugeordnet werden können.

Die Stängel der Pflanzen mit Rhaponticingehalten von 2 bis 3 % sind sehr unterschiedlich. Nr. 444 und 504 sind flach gewölbt, 466, 482 und 507 sind hochgewölbt. Nr. 505 besitzt auf der Stängelfläche oben eine keine Spitze.

Diese Spitze tritt aber auch bei den rhaponticinreichen Formen 450, 474, 488 und 511 auf. Die Probe 491 ist am rhaponticinreichsten und besitzt einen flach gewölbt Stiel, wie die Nachkommen mit den mittleren Rhaponticingehalten um 4 %.

Eine Selektion auf hohen Rhaponticingehalt anhand der Stielform ist bei den untersuchten Rhabarberpflanzen nicht möglich.

8. Zusammenfassung

Im Rahmen des Forschungsvorhabens „Schaffung und Untersuchung von Ausgangsmaterial für die Selektion von Rhaponticinrhabarber und Erarbeitung landwirtschaftlicher Anbauverfahren“ wurden Methoden zur Rhaponticinbestimmung entwickelt, rhaponticinreiche Rhabarberformen für die Mikrovermehrung selektiert und ackerbauliche Eigenschaften von Rhapontikrhabarber untersucht. Für die Bearbeitung des Vorhabens wurden umfangreiche Feldversuche angelegt. Sie dienten dem Anbau von Selektionsformen und der Durchführung anbautechnologischer Untersuchungen.

Für die Untersuchung der Rhaponticinkonzentrationen in den Wurzeln wurden Methoden zur Rhaponticinextraktion entwickelt und angewendet. Zur Bestimmung kamen Verfahren mittels Kapillarelektrophorese (CE) und HPLC zur Entwicklung. Genutzt wurde die HPLC- Methode, da die CE keine ausreichende Reproduzierbarkeit aufwies. Für die Probennahme wurden nach methodischen Untersuchungen die Nebenwurzeln ausgewählt.

Aus dem Rhabarbersortiment wurden von den Herkünften von *Rheum rhaponticum* und *Rheum undulatum* Samen geerntet, ausgesät, pikiert, getopft und auf verschiedenen Selektionsfeldern ausgepflanzt. Durch die genetische Aufspaltung der Sämlinge nach der Aussaat von Rhabarber wurden Rhabarberpflanzen mit unterschiedlichen Rhaponticingehalten erwartet.

Es zeigten sich bei den Pflanzen große Unterschiede in der Rhaponticinkonzentration. Die Gehalte lagen zwischen 1 und 8 % in der Trockensubstanz. Es wurden Pflanzen mit hohen Gehalten von 7 bis 8 % gefunden und für die Mikrovermehrung ein gesondertes Sortiment angelegt, auf das bei Bedarf zurückgegriffen werden kann.

Die untersuchten Merkmale für eine vereinfachte Auslese rhaponticinreicher Pflanzen eigneten sich nicht für eine Selektion nach morphologischen Merkmalen. Die Nutzung der Rhaponticingehalten in den Blättern und Stielen konnten ebenfalls nicht für eine Schätzung des Rhaponticingehaltes genutzt werden.

Auf den großen Versuchsflächen mit verschiedenen Rhabarberarten wurden ackerbauliche Versuche vorgenommen, um Einzelheiten beim Anbau, der Pflege, der Düngung und der Ernte zu untersuchen.

Die Rhabarberfelder lassen sich mechanisch mit ausreichender Wirkung bearbeiten. Bei kleinen Pflanzen mit engen Reihenabständen ist eine kleine Technik notwendig. Unkrautbekämpfungen sind ebenfalls möglich. Zur Zeit ist kein Mittel zugelassen und eine Behandlung muss gesondert beim Pflanzenschutzamt beantragt werden.

Es zeigte sich, dass beim Anbau der rhaponticinreichen selektierten Form des Rhapontikrhabarbers auf den Böden der Region Börde 80 kg N/ha ausreichen. Eine Steigerung der N- Düngung bis auf 240 kg/ha brachte keinen Ertragszuwachs. Die Düngung zeigte auch keinen signifikanten Einfluss auf den Rhaponticingehalt.

Im zweiten Wachstumsjahr auf dem Feld wurden von 2100 Pflanzen Proben genommen und die Proben nach Zerkleinerung und Trocknung untersucht. Es konnten 14 Pflanzen mit knapp 8 % Rhaponticin gefunden werden (G16=2;G17=1;G18=2;G20=5;G21=3;G34=1). Die Pflanzen werden in ein Sortiment für die Mikrovermehrung umgepflanzt.

9. Anbauverfahren Rhabarber

Standortansprüche: Rhabarber wächst auf allen Bodentypen, wenn sie gut drainiert und gedüngt sind. Die beste Wachstumsgrundlage sind humus- und nährstoffreiche Boden mit guter Wasserversorgung, da die großen Blätter eine hohe Verdunstungsrate aufweisen. Stauende Nässe ist jedoch schädlich.

Vorfrucht: Keine Ansprüche, möglichst nicht nach sich selbst und nicht nach Luzerne.

Pflanzenschutz: Systematischer Pflanzenschutz ist bei Rhabarber nicht erforderlich, wenn man die Standortansprüche berücksichtigt und die Flächen ordentlich düngt und bearbeitet.

Die bekannten Krankheiten beim Rhabarber treten nur gelegentlich auf. Bei der Pflanzung muss deshalb darauf geachtet werden, dass das Material frei von Virus- und Pilzkrankheiten ist. Bei Viruserkrankungen den Bestand nicht lange stehen lassen und den Standort wechseln. Tierische Schädlinge treten selten massenhaft auf.

Sortenwahl: Für den Anbau zur Rhaponticingewinnung werden Sorten oder Herkünfte der Arten *Rheum rhaponticum*, *Rheum undulatum* und *Rheum wittrockii* genutzt.

Bodenvorbereitung: Organische Düngung einbringen und gut einarbeiten, da sonst Schwierigkeiten beim Pflanzen mit dem Pflanzpflug auftreten. Besonders bei Einsatz von In-vitro-Pflanzen muss der Boden tiefgründig gelockert und geglättet sein.

Pflanzung: Pflanzung von Rhizomstücken: Eine Herbstpflanzung wird bevorzugt, Frühjahrspflanzungen sind bis April möglich. Eine Aussaat ist aufgrund der hohen genetischen Aufspaltungsrate nicht üblich.

Pflanzung ist von Oktober bis April möglich, wenn frostfreie Witterung vorherrscht. Die Pflanzung wird mit der Hand oder mit einem Pflanzpflug vorgenommen. Bei letzterer Methode werden die Pflanzstücke in die vom Gerät gezogene Furche eingeworfen und danach durch die Maschine wieder zugestrichen. Einwerfen von Pflanzstücken in eine Furche, die mit einem Einscharpflug hergestellt wird und anschließendes Zupflügen ist ebenfalls möglich.

Reihenabstand je nach technologischen Möglichkeiten von 1,0 bis 1,5 m, Pflanzenabstand in der Reihe ebenfalls von 1,0 bis 1,5 m. Wenn frühe Stängelernte vorgesehen ist, werden manchmal noch engere Abstände bevorzugt.

Pflanzung mikrovermehrter Pflanzen: Bodenvorbereitung wie bei Rhizompflanzung vornehmen. Eine feuchtigkeitsbewahrende Pflanzbettbereitung im Frühjahr ist günstig für das Anwachsen der jungen Pflanzen. Die Pflanzung erfolgt ab Mitte Mai.

Pflanzung mit herkömmlichen Pflanzmaschinen ist aufgrund der großen Blätter nicht möglich. Es ist eine Handpflanzung oder eine Pflanzung mit speziell modifizierten Maschinen notwendig. Dabei ist auf gute Einhaltung der Abstände (auch innerhalb der Reihe) zu achten, da die Bearbeitung dann erleichtert wird. Bei trockener Witterung ist eine Beregnung notwendig oder zumindest ein Angießen der Pflanzen.

Unkrautbekämpfung: Mit Wachstumsbeginn mechanisch durch Hand- oder Maschinenhacke die Unkräuter beseitigen. Bis zur Schließung des Bestandes nach Bedarf zur Unkrautbeseitigung hacken.

Bei mikrovermehrten Pflanzen ist anfangs eine häufigere Bearbeitung notwendig, da die Pflanzen im ersten Jahr langsamer wachsen und den Bestand später abdecken.

Im zweiten Anbaujahr ist durch Abdeckung des Bodens mit den großen Blättern in der Regel nur eine einmalige Unkrautbeseitigung durch Hacken notwendig.

Für Rhabarber sind z. Z. in Deutschland keine Herbizide zugelassen.

Düngung: Durch die hohe Biomasse des Rhabarbers liegt ein intensiver Nährstoffentzug vor. Alle Düngungen sollten jedoch auf einer detaillierten Bodenanalyse basieren. Bei pH- Werten unter 5,5 ist zu kalken. Als Grunddüngung sind 500 dt Stallmist zu geben. Der K- Bedarf ist groß (200- 250 kg K_2O / ha) und Stickstoff müssen im ersten Jahr 150 und im zweiten 200 kg N/ha, geteilt (Wachstumsbeginn und Juli) verabreicht werden. Wenn nur die Wurzeln geerntet werden oder kleinwüchsige Sorten angebaut werden, ist weniger Düngung notwendig. Limitierend ist häufig Wasser, wenn Grundwasser nicht ausreichend zur Verfügung steht. Untersuchungen auf schweren Böden zeigten keine Ertragsunterschiede bei den Wurzeln, wenn unterschiedliche Nährstoffmengen verabreicht wurden.

Wurzelernte: Die Wurzelernte kann am besten durch Auspflügen mit einem Spezialpflug (in der HS Anhalt angefertigter Pflug mit U- Messer und Rüttler) vorgenommen werden. Die Wurzeln werden damit gleich vorgereinigt. Eine spezielle maschinelle Verladetechnik für die großen Rhabarberwurzeln existiert nicht und kann nur mit einem Rad- oder Frontlader vorgenommen werden. Rüben- und Kartoffelrodetechnik eignen sich nicht und müssten erst dafür modifiziert werden. Reinigung und Trocknung kann in Trockenwerken vorgenommen werden.

10. Literaturverzeichnis

Agilent Technologies (2003):
Service Hotline, mündliche Mitteilung

Anonym (1986):
Rheum rhaponticum L. Monographie, Chemisch Pharmazeutische Fabrik Müller,
Göppingen

Banks, H. J.; Cameron, D. W. (1971):
A new natural Stilbene glucoside from Rheum rhaponticum (polygonaceae). In:
Australian journal of chemistry, 24 (24), S. 2427 - 2433

BIELKA, R.: Grundriß des Feldgemüsebaues. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag,
1961

Borkowski, B.; Sobivzewska, M. (1965):
Determination of rhaponticin in the root of rhubarb. In: Acta Poloniae Pharmaceutica,
22 (6), S. 529 ff

Borth; S. (1998):
Zur Therapie klimakterischer Beschwerden mit Cimicifuga racemosa und Rhaponticin
beim östrogenrezeptorpositiven Mammkarzinom. Dissertation, Medizinische Fakultät
in Göttingen

Branntner, F. (1979):
Pflanzliche Sexualhormone in der Frauenheilkunde. In: Erfahrungsheilkunde, 28, S.
413 - 416

Cassidy, A; Hanley, B.; Lamuela-Raventos, R., M. (2000):
Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to
human health. In: Journal of the science of food and agriculture, 80 (7), S. 1044 -
1062

Chemisch Pharmazeutische Fabrik Göppingen, Carl Müller GmbH u. Co. KG (2003):
Prospekt PHYTOESTROL[®] N bei klimakterischen Beschwerden.

Csupor, L. (1970):
Desoxy- rhaponticin, ein neues natürliches Stilbenderivat in Rhizoma Rhei Rhapontici
(L.). In: Archiv der Pharmazie, 303, S. 681 ff

Csupor, L. (1971):
Spektralphotometrische Bestimmung des Rhaponticins und des Desoxy- rhaponticins
in Rhizoma Rhei rhapontici (L.). In: Archiv der Pharmazie, 304, S. 32 ff

Dionex
Methodenoptimierung in der beschleunigten Lösemittelextraktion (ASE[®]), Applikation
208

Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T. (1994):
Kapillarelektrophorese – Methoden und Möglichkeiten. Vieweg Verlag,
Braunschweig/ Wiesbaden

Fischl, F. (2000):
Begriffsbestimmung und Pathophysiologie. In: Menopause – Andropause: Die Hormonsubstitution im Wandel der Zeit; hrsg. von: Fischl, F. H.; Huber, J. C. 2. Aufl. Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, S.29 – 32

FRITZ; D., STOLZ, W.: Gemüsebau. Eugen Ulmer-Verlag Stuttgart 1989

Gerster, G. (1981):
Die Anwendung von Rhaponticin im Licht der modernen Endokrinologie. In: Zeitschrift für angewandte Phytotherapie, 2, S. 91 - 97

Gracza, L. (1984):
3,5,3',4'-Tetrahydroxystilben-3-D-glucosid, ein drittes Stilbenglykosid in Rhei rhapontici Radix. In: Archiv der Pharmazie, 317, S. 374 ff

Grazca, L.; Ruff, P. (1984):
Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographische Trennung und quantitative Bestimmung von pflanzlichen Stilbenderivaten. In: Journal of Chromatography, 287, S. 462 - 465

Günzler, H. (1998):
Analytiker-Taschenbuch. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Hager (1979):
Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Band 6, Teil B, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

HÄGER, 1999: Persönliche Mitteilung. Erfahrungen bei Sommerpflanzung von Gemüserhabarber

Hewlett Packard (1996):
Referenzhandbuch: ChemStation Konzepte

Jahn (2003):
mündliche Mitteilung

Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishoka, I.; Nishizawa, M.; Yamagishi, T. (1988):
Studies on rhubarb (Rhei Rhizoma). XIV. Isolation and characterization of Stilbene glucosides from Chinese rhubarb. In: Chem Pharm Bull, 34 (4); S. 1545 - 1549

Kawamura, S. (1939):
Über die Konstitution des Rhaponticins. In: Chemisches Zentralblatt, I, S. 130

Kleiner, J.; Lernhardt, U.; Wachter, G. (2001):
Handbuch zu SQS 2000

Klimek, B. (1970):
Estrogenic properties of rhaponticin. In: Farmacja polska, 26, S. 635 ff

Knörr, K; Lehr; H. Probst, V. (1956):
Hormontherapie mit einem Wirkstoff aus der Rhabarberwurzel. In: Hippokrates, 27, S. 327 ff

- Knörr, K; Lehr; H. Probst, V. (1956):
Hormontherapie mit pflanzlichen Östrogenen. In: Die Medizinische, 5, S.195 ff
- Kromidas, S. (1999):
Validierung in der Analytik. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: WILEY-VCH Verlag GmbH
- Lauritzen, C. (1987):
Endokrinologie der Prä- und Postmenopause. In: Band 1, Gynäkologische Endokrinologie; hrsg. von: Lauritzen, C., 2. Aufl. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg- Verlag, S. 218 - 221
- Lauritzen, C. (2002):
Prävention mit Phytoestrogenen. In: Zentralblatt für Gynäkologie, 24, S. 262 - 268
- Leidholdt, R. (1998):
Schriftliche Mitteilung an Herrn Dr. Schnüber, Chemisch Pharmazeutische Fabrik Müller, Göppingen
- Mettenleiter, M. (1980):
Phytoestrol im hormonfreien Intervall bei Ovulationshemmer- Einnahme. In: Fortschritte der Medizin, 98, S. 489 - 500
- Neuhoff, E. W.; Auterhoff, H. (1954):
Beiträge zur Analytik von Rhabarber - Drogen. In: Deutsche Apotheker Zeitung, 94, S. 541 ff
- Nonaka, G.; Minami, M.; Nishioka, I. (1977):
Studies on rhubarb (Rhei Rizoma). III. Stilbene glycosides. In: Chem. Pharm. Bull., 25 (9), S. 2300 - 2305
- Paneitz, A. (1995):
Untersuchungen zu Vorkommen, Genotoxizität und Metabolismus von anthranoiden Inhaltsstoffen aus Pflanzen der Gattung Rheum L. Dissertation, Universität Hamburg
- Schauer, H. (1964):
Pflanzliche Östrogene. In: Deutsche Apotheker Zeitung, 104, S. 987 - 989
- Schellenberg, I.; Schnüber, G. (2000):
Projektantrag: Schaffung von Ausgangsmaterial für die Erweiterung der Arzneimittelpflanzenproduktion in Sachsen- Anhalt. 03I0613A BMBF, Projektträger Jülich GmbH
- Schellenberg, I.; Schnüber, G. (2001):
Zwischenbericht zum Teilprojekt: Schaffung und Untersuchung von Ausgangsmaterial für die Selektion von Rhaponticinrhabarber und Erarbeitung landwirtschaftlicher Anbauverfahren. 03I0613A BMBF, Projektträger Jülich GmbH
- Schratz, E.; Witt, H. (1966):
Anthrachinonaglyka und Rhaponticin in Artbastarden von Rheum. In: Deutsche Apotheker Zeitung, 40, S. 1437 - 1441
- Shang XY, Yuan ZB (2002):
Determination of six effective components in Rheum by cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography. In Yao Xue Bao, 37 (10), S. 798 - 801

Siegfried, B. (1943):
Rhabarber, Rhapontik und Rhapontizin. In: Pharmazeutica Acta Helvetiae, 18, S. 531
- 534

Spieler, H. (1985):
Monographie Rheum rhaponticum L.

Tschirch, A.; Cristofolletti, U. (1905):
Über die Rhaponticwurzel. In: Archiv der Pharmazie (Weinheim), 243, S. 443 - 457

WIJK, C., Kanters, FML.: Vermeerdering zomerstek rabareber optimal tot half juni?
PAV Bulletin Vollegrondsgroenteteelt. 1997, 22-23.

WIJK, C.: Teelt van rabarber: Teelthandleiding- Praktijkonderzoek voor de ackerbouw
en de Vollegrondsgroenteteelt. 1998, Nr 82.

ANHANG

Abbildung A1:
Versuche Kohlenstraße

FLURWEG

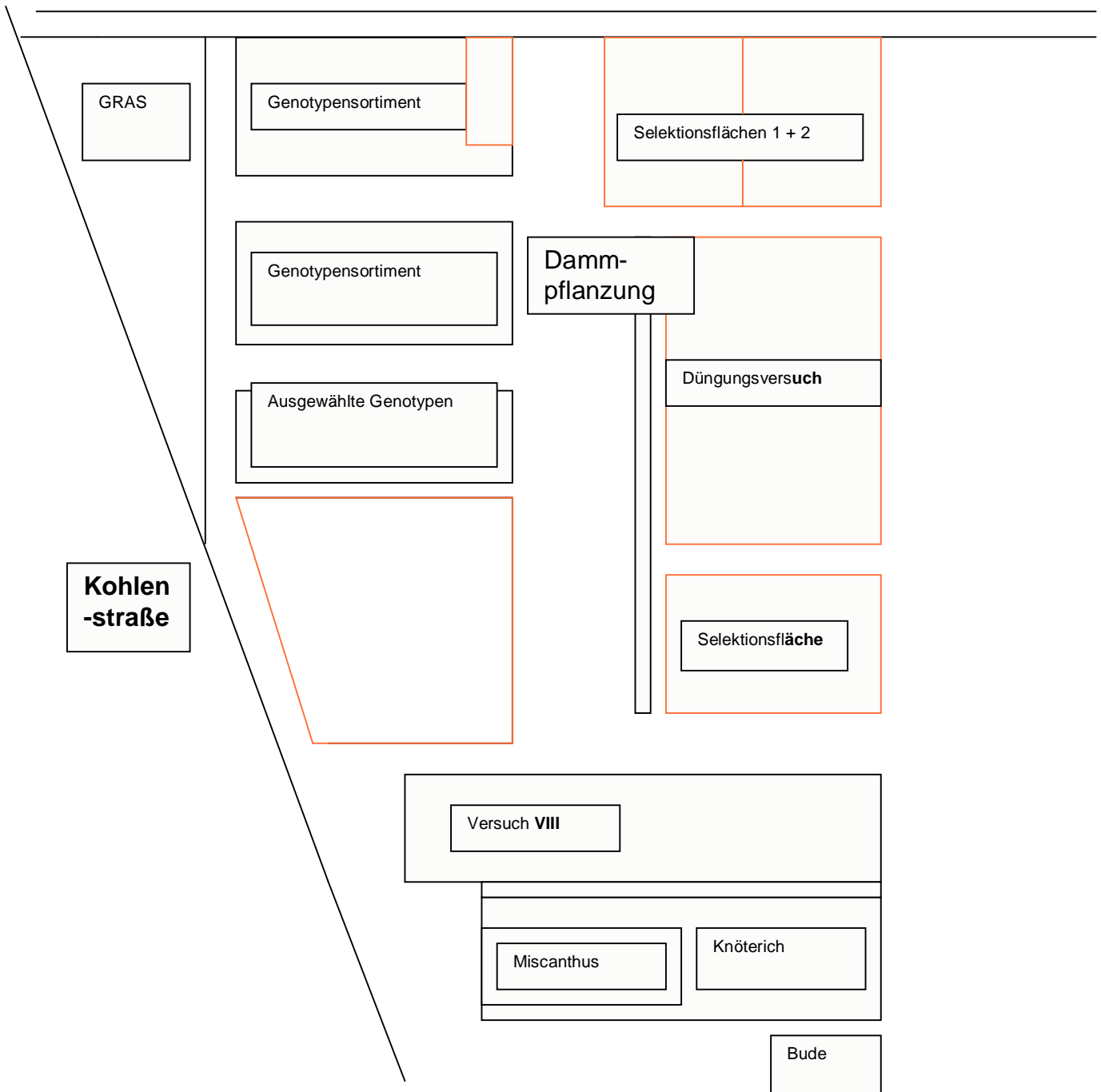


Abbildung A2: Versuchsfeld Strenzfeld

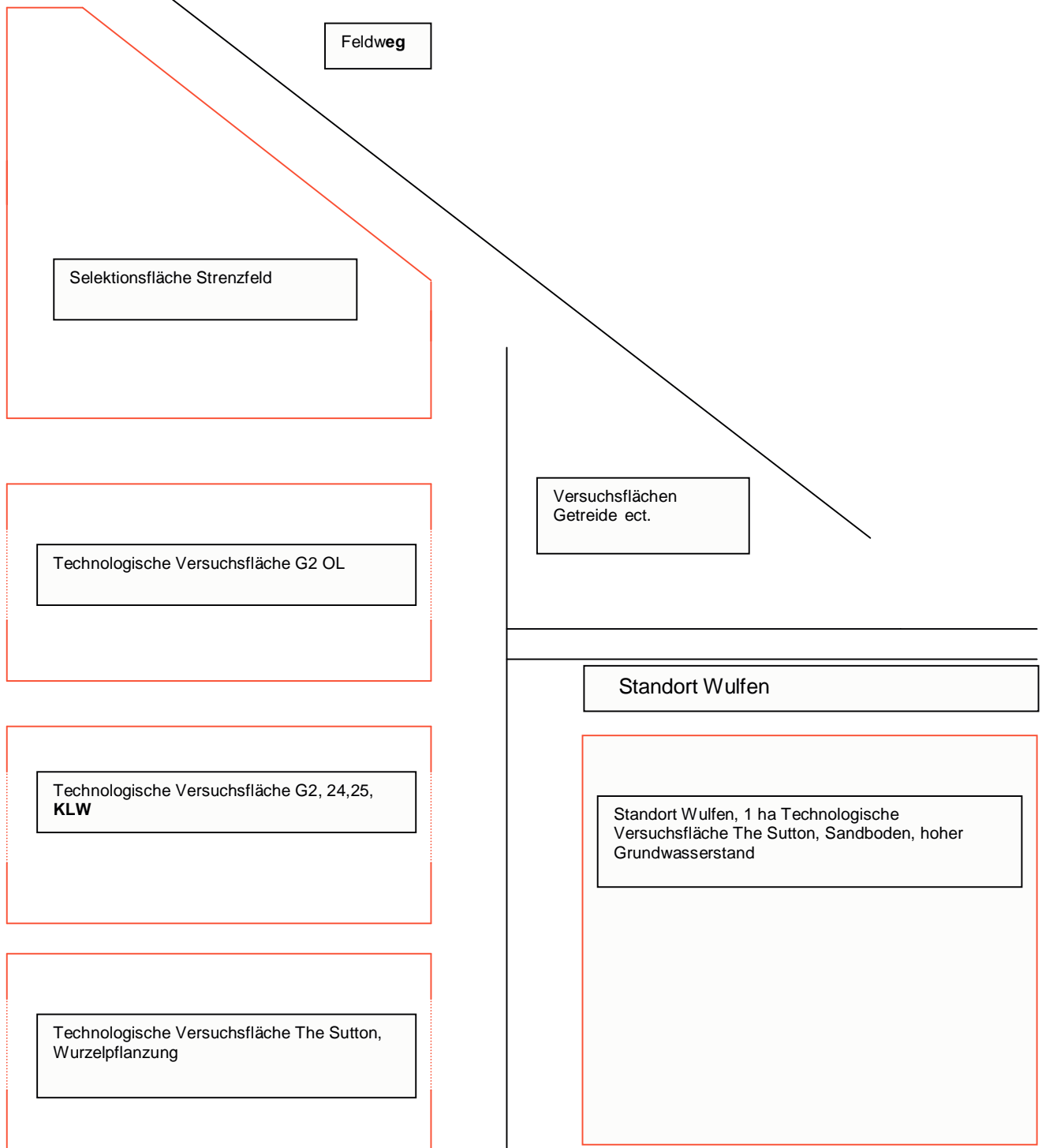


Abbildung A3: Selektionsfläche Strenzfeld am Gewächshaus

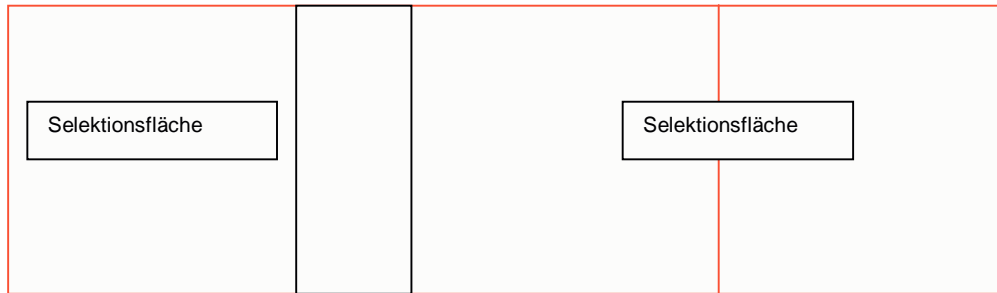


Abbildung A4: Pflanzen von Wurzelstücken mit dem Pflanzpflug

Landwirtschaftliche Bearbeitung der Rhabarberbestände

Für die landwirtschaftliche Bearbeitung wurden folgende Versuchsanlagen angelegt, bzw. genutzt:

Versuchsort Wulfen

- Genotyp 10 (Sorte „The Sutton“), Wurzelpflanzung

Versuchsort Bernburg

- Genotyp 2, In- vitro- Pflanzung 1998
- Genotyp 2, In- vitro- Pflanzung 1999
- Genotyp 24, In- vitro- Pflanzung 1999
- Genotyp 25, In- vitro- Pflanzung 1999

Parzellenversuche Bernburg (Kohlenstraße)

Genotypensortiment, Ausgewählte Genotypen, Aussaatversuche, Versuch VIII

Im Unterschied zu den Parzellenversuchen wurden die großen Bestände, auch die verschiedenen Genotypen, so hintereinander angelegt, dass sie mit landwirtschaftlicher Technik in einer Richtung in einem Arbeitsgang bearbeitet werden konnten.

1. Versuchsort Wulfen

1998

Die Bearbeitung erfolgte 1998 nur mechanisch, ohne Einsatz von Herbiziden. Es zeigte sich, dass die reine mechanische Bearbeitung 1998 nicht ausreichend war. Die Unkrautbedeckung setzte in dem Versuchsjahr durch die anfänglich vorhandene Feuchtigkeit und Wärme im Mai sehr schnell ein. Obwohl die über Wurzeln gepflanzten „The Sutton“- Bestände relativ schnell wuchsen, bedeckten die Pflanzen den Boden nicht vollständig, so dass die Unkräuter sich vor allem innerhalb der Reihen durchsetzen konnten.

Durch die Bearbeitung zwischen den Reihen waren die Bestände aber noch relativ sauber. Im Sommer überwucherten dann große Exemplare Gänsefuß, Gänsekohldistel, Ackerdistel und vereinzelt andere Wildpflanzen die Bestände.

Noch schwieriger gestaltete sich die Pflege der mikrovermehrten Rhabarberpflanzen. Sie waren im ersten Anbaujahr nur wenig gewachsen, so dass die Unkräuter schnell höher waren als die Rhabarberpflanzen. Dabei zeigten sich große Differenzen zwischen der Sorte „The Sutton“ und dem Genotyp 2. „The Sutton“ wuchs zwar im Jugendstadium ebenfalls langsam, holte aber schnell auf. Eine Bodenbedeckung mit Unkräutern konnte aber ebenfalls nicht vermieden werden. Das hatte zwischen den Pflanzen innerhalb der einzelnen Reihen starken Unkrautwuchs bis zu 90 % Bedeckungsgrad zur Folge.

Der Genotyp 2 zeigte von Anfang an ein geringeres Wachstum als „The Sutton“. Im Laufe des Jahres kräftigten sich die Pflanzen, jedoch die großen Wachstumsdifferenzen zum „The Sutton“ blieben erhalten.

1999

1999 wurden die Versuche mit dem zugelassenen Mittel Kerb50 W behandelt. Zur Vorbereitung der Behandlung mit Kerb 50W wurden die Bestände auf dem Standort Wulfen im Winter mit einem Striegel bearbeitet. In den Herbst- und Wintermonaten hatte sich ein starker Bewuchs mit Vogelmiere eingestellt. Die relativ starke Verunkrautung des im Vorjahr ohne Herbizid bearbeiteten Schlages könnte sonst dazu führen, dass sehr viele trockene Unkräuter den Boden teilweise abdecken und die Wirkung des Herbizides einschränken bzw. schon verbrauchen (Miere).

Nach dem Striegeln wurde ein Teil des Bestandes mit Kerb 50 W gespritzt. Die Behandlung wurde so weit wie möglich hinausgezögert, um die Wirkung zu verlängern. Die Bonituren sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle A1: Unkrautbewuchs (31.03.1999) nach Behandlung (20.01.1999) eines Rhabarberfeldes mit Kerb 50W

	Unkrautbonitur je Variante 1 m ²										
	Anzahl Unkräuter/m ²					Bedeckungsgrad %					
Bonitur	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	Ø
Fläche 1 behandelt (G10 Wurzelpflanzung)	14,	23,	27,	17,	26	10,	15,	25,	30,	25	21
Fläche 2 behandelt (G2, G10, mikroverm.)	14,	5,	122,	12,	37	10,	6,	85,	15,	25	28
Unbehandelt (G10 Wurzelpflanzung)	40,	41,	55,	56,	44	85,	70,	95,	90,	80	84

Die Bonituren ergaben 10 Wochen (31.3.) nach der Behandlung weniger Unkräuter und einen Bedeckungsgrad von 24,6 % im Vergleich zur unbehandelten Fläche (84 %). Die Dauer der Wirkung war jedoch nicht befriedigend. Am 20.4. musste deshalb eine mechanische Bearbeitung mit einer Anbaufräse in Längsrichtung vorgenommen werden. Zwischen den Pflanzen innerhalb der Reihen erfolgte keine Bearbeitung. Der Unkrautbestand nahm dann bis Mitte Mai stark zu, wobei hauptsächlich Wurzelunkräuter wie Distel teilweise dichte Bestände bildeten. Die Wirkung von Kerb 50W auf die Entwicklung der Unkräuter war insgesamt nicht ausreichend. Vor allem beim Genotyp 2 (mikrovermehrt), bei dem eine Bedeckung der Bestände durch die Blätter auch 1999 nicht eingetreten war, wies der Boden einen Unkrautbewuchs mit fast 100 % Bedeckungsgrad auf. Die Ursachen dafür lagen in dem speziellen Fall an den für die Boden- und Größenverhältnisse dieses Rhabarbers zu großen Pflanzenabständen.

Die nicht befriedigenden Ergebnisse in der Bearbeitung der Bestände der mikrovermehrten Pflanzen des Genotyps 2 führten zu der Schlußfolgerung, dass bei den weiteren Pflanzungen die Abstände innerhalb der Reihen bei den verschiedenen Herkunftten variiert werden müssen. Der Versuch wurde nach Prüfung der Wurzelmassen (Ø 1,5 kg/Wurzel) umgebrochen, weil kein Wurzelzuwachs erfolgt war.

2000

2000 befand sich auf dem Versuchsort noch ein ha der Sorte „The Sutton“, der bearbeitet werden musste. Es wurde von weiteren chemischen Maßnahmen abgesehen. Der Schlag wurde im März mit einem Schwergrubber längs und quer bearbeitet. Die oberirdische Masse entwickelte sich dann sehr schnell, so dass der Boden gut abgedeckt war und es kam nur zu geringem Unkrautwachstum. Ab Mitte Mai entwickelten sich dann wieder Distel, die nesterweise über das ganze Feld verteilt waren und die Rhabarberpflanzen überragten. Sie wurden in Versuchen, eine lokale Bekämpfung durchzuführen, mit der Rückenspritze mit Lontrel behandelt. Der Erfolg war sehr gut. Der Boden war dann das ganze Jahr vor allem mit Gräsern bedeckt, die aber aufgrund der Beschattung durch die Blätter nur zögernd wuchsen.

2001

2001 wurde der gleiche Schlag noch einmal gegrubbert. Die Wirkung entsprach dem Jahr 2000. Die Unkräuter wurden gestört und der Rhabarber deckte den Boden ab. Disteln traten nur vereinzelt auf.

2. Versuchsort Bernburg - Untersuchungen zur Verträglichkeit und Wirkung von Pflanzenschutzmitteln

Die Praxisversuche auf dem Standort Bernburg lagen bei den Versuchsflächen der Hochschule und der LVA. Es wurden anfangs auch Handarbeiten durchgeführt, um einen guten Gesamtzustand der Versuchsflächen zu gewährleisten. Die Beschreibung der Pflege dieser Versuche wird deshalb auf Untersuchungen zur Herbizidanwendung beschränkt, die dann letztlich 2001 auch die einzige Bearbeitung blieb.

- A. Parzellenversuche Genotyp 2, (3. Wachstumsjahr*)
- B. Parzellenversuche alle Genotypen (2. Wachstumsjahr*)
- C. Praxisversuche

* Teilflächen innerhalb der Großversuche.

Die Untersuchungen zur Herbizidanwendung wurden in Abstimmung mit dem Pflanzenschutzamt des ALF Bernburg vorgenommen. Weiterhin wurden beim akuten Auftreten einer Wurzelkrankheit in Zusammenarbeit mit dem Pflanzenschutzamt Magdeburg und Bernburg eine Bekämpfung durchgeführt.

Für die Versuche zur Herbizidverträglichkeit und –wirkung wurden die Rhabarberpflanzen mit verschiedenen Mitteln behandelt.

Sencor	1kg/ha
Stomp	3,5 kg/ha
Flexidor	0,4 l/ha
Kerb 50W	3,0 kg/ha
Kerb 50 W	3,0 kg/ha kombiniert mit Round up 4,0 l/ha.

Behandlungstermine waren der 20. Januar und der 6. März 2000 , um den Einfluss auf die Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen.

Zu A: (Parzellenversuche Genotyp 2, 3. Wachstumsjahr, Behandlung am 20.01.2000)

Die Versuche wurden in vier Wiederholungen durchgeführt. Der Rhabarber befand sich noch in der Winterruhe. Es waren noch keine Knospen ausgetrieben. Die Pflanzen befanden sich im dritten Wachstumsjahr. Obwohl es hauptsächlich auf eine Verträglichkeitsuntersuchung des Rhabarbers gegenüber den verschiedenen Herbiziden ankam, wurden Unkrautbonituren vorgenommen. Ausgangslage und Behandlungen des Spritztermins sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Erster Behandlungstermin

Tabelle A2 : Behandlung von Genotyp 2 im dritten Standjahr mit verschiedenen Herbiziden (20.01.01)

Mittel	Aufwandsmenge	Bedeckungsgrad (%)		
		zum Spritztermin	Bonitur 21.03.	Bonitur 02.05.
Unbehandelt		6	5	25
Sencor	1kg/ha	5	0	5
Stomp	2,5 kg/ha	4	3	4
Flexidor	0,4 kg/ha	4	3	16
Kerb 50W	3,0 kg/ha	5	2	17
Kerb/Round up	3,0/4,0kg/ha	5	0	4

Hauptunkräuter: Vogelmiere, Bingelkraut, Taubnessel, Kleine Brennesel

Die eingesetzten Herbizide riefen in dem Stadium keine Schädigungen an den Rhabarberpflanzen hervor. Es zeigte sich, dass die Varianten Sencor, Stomp und die Kombination Kerb/Round up die beste Langzeitwirkung aufwiesen. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit 25% Bedeckungsgrad zeigten alle Mittel eine Wirkung. Die Ergebnisse deckten sich bei den eingesetzten Mitteln mit denen von Untersuchungen des Pflanzenschutzamtes Bernburg auf den Versuchsflächen der HS- Anhalt in Wulfen (MEYER, 1999).

Zweiter Behandlungstermin

Tabelle A3: Behandlung von Genotyp 2 im dritten Standjahr mit verschiedenen Herbiziden im März (06.03.00).

Variante	Aufwandsmenge	Bedeckungsgrad (%)	
		zum Spritztermin	Bonitur 02.05.
unbehandelt		4	11
Sencor	1kg/ha	5	9
Stomp	2,5 kg/ha	4	4
Flexidor	0,4 kg/ha	3	6
Kerb 50W	3,0 kg/ha	4	7

Hauptunkräuter: Vogelmiere, Bingelkraut, Taubnessel, Kleine Brennesel

Bei der Behandlung am zweiten Spritztermin kam es zu leichten Schädigungen an den Blättern der Pflanzen, die sich schon entfaltet hatten, bzw. gerade bei der Entfaltung waren. Die Schäden waren aber nicht bleibend. Nach dem Abfallen der mit den Mitteln benetzten Blätter konnte man keinen Unterschied mehr zu den nicht behandelten Pflanzen erkennen. Die Wirkung auf die Unkräuter hält jedoch bei einer Behandlung im März länger an.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem späteren Spritztermin im März der Unkrautbewuchs zeitlich weiter hinausgezögert wurde, als bei der Januarbehandlung. Allerdings zeigte die unbehandelte Kontrolle ebenfalls weniger Bewuchs. Auffällig ist, dass die Wirkung von Sencor geringer war als bei der Behandlung erfolgte zu den gleichen Terminen wie bei dem dreijährigen Genotyp 2. Es wurden je vier Pflanzen mit den Mitteln gespritzt. Die meisten Pflanzen befanden sich noch im Rotknospentadium. Ziel war es, die Reaktion der Rhabarberpflanzen in diesem Stadium auf den Kontakt mit den eingesetzten Mitteln zu untersuchen.

Es zeigte sich die gleiche Wirkung wie bei den älteren Pflanzen. Beim frühen Spritztermin war keine Schädigung zu erkennen. Bei den Pflanzen, an denen sich schon kleine Blätter befanden, waren geringe Beeinträchtigungen zu erkennen (Sencor, Stomp), die aber nach einem Monat nicht mehr zu sehen waren. Zu Wachstumsschädigungen kam es nicht.

im ersten Behandlungstermin. Der schlechte durchschnittliche Wirkungsgrad beruhte hauptsächlich auf dem Bewuchs der dritten Wiederholung, bei der ein Bedeckungsgrad von 15 % ermittelt wurde. Dieser hohe Bedeckungsgrad ist darauf zurückzuführen, dass die auf der Parzelle stehenden Unkräuter beim Behandeln schon größer waren als beim ersten Spritzen und Sencor bei Pflanzen über dem 3-Blatt- Stadium schlechter wirkt, so dass die Unkrautpflanzen nur wenig geschädigt wurden und weiter wuchsen. Die Unkrautarten auf dieser Wiederholung bestanden vor allem aus Vogelmiere, Ackerhohlzahn, Bingelkraut und Ackerkratzdistel.

Pflanzenkrankheiten und Schädlinge

In einem Versuch zu einem früher bearbeiteten Vorhaben¹ wurde auf einem Schlag auf dem Versuchsfeld Wulfen ein Befall mit pilzlichen Schaderregern festgestellt. Es kam zu einer Verfärbung einiger Blätter, die im Verlaufe der nächsten Wochen zunahm. Es lag ein Befall vor, der als Blattfleckenkrankheit durch den Pilz *Ascochyta rhei* identifiziert wurde.

Von den 300 Pflanzen im Bestand waren ca. 35 % befallen, davon 2% schwer (über die Hälfte der Blätter zeigten Schäden).

Die Identifizierung des Erregers wurde über das Pflanzenschutzamt des ALF Bernburg im Institut für Phytopathologie Aschersleben vorgenommen. Eine Bekämpfung des Pilzes wurde nicht durchgeführt, da mit fortschreitender Vegetationsperiode der Befall abnahm. Die infizierten Blätter vertrockneten und neu nachwachsende Blätter zeigten die Symptome des Pilzbefalls nicht mehr.

Auf dem betroffenen Stück wurde die Infektion und Verbreitung des Pilzes durch die engen Pflanzenabstände und durch das feuchte Frühjahr gefördert. Der Bestand wurde nicht bearbeitet und eine Blatternte wurde ebenfalls nicht vorgenommen, so dass die Blätter (Abstand in der Reihe nur 1m, großblättrige Sorte, „The Sutton“) sehr eng standen.

Von den 300 Pflanzen im Bestand waren ca. 35 % befallen, davon 2% schwer (über die Hälfte der Blätter zeigten Schäden).

Die Identifizierung des Erregers wurde über das Pflanzenschutzamt des ALF Bernburg im Institut für Phytopathologie Aschersleben vorgenommen. Eine Bekämpfung des Pilzes wurde nicht durchgeführt, da mit fortschreitender

¹ Entwicklung von Verfahren zum Anbau sowie zur biotechnologischen Erzeugung von fruchtsäure-, gerb- und farbstoffhaltigen Pflanzenarten aus der Sicht einer industriellen Verwertung der Inhaltsstoffe

Vegetationsperiode der Befall abnahm. Die infizierten Blätter vertrockneten und neu nachwachsende Blätter zeigten die Symptome des Pilzbefalls nicht mehr.

Auf dem betroffenen Stück wurde die Infektion und Verbreitung des Pilzes durch die engen Pflanzenabstände und durch das feuchte Frühjahr gefördert. Der Bestand wurde nicht bearbeitet und eine Blatternte wurde ebenfalls nicht vorgenommen, so dass die Blätter (Abstand in der Reihe nur 1m, großblättrige Sorte, „The Sutton“) sehr eng standen.

Auf den anderen Schlägen aus der Herbstpflanzung 1995, die innerhalb der Reihe Pflanzenabstände von 1,50 m aufwiesen und noch nicht so viel Grünmasse entwickelt hatten, wurde kein Pilzbefall festgestellt.

Der Befall wiederholte sich im Folgejahr 1997 nicht. Ein Grund dafür dürfte die Trockenheit des Sommers 1997 gewesen sein. Auch auf anderen Schlägen konnte keine Infektion durch Pilzkrankheiten festgestellt werden.

In Jahren mit hohem Befallsdruck ist eine vorbeugende Behandlung oder eine Bekämpfung von *Ascochyta rhei* in frühen Stadien mit Fungiziden möglich.

Im Mai 2000 trat eine weitere Schädigung auf dem Schlag von Genotyp 24 und 25 auf. Die beiden Genotypen fielen im Mai 2000 durch Schadsymptome auf, die vom Pflanzenschutzamt Magdeburg als



Abbildung A4-1: Stängelgrundfäule bei Genotyp 25

Stängelgrundfäule mit nachfolgender bakterieller Wurzelfäule als Folgeinfektion bestimmt wurde (LOPEZ, 2000).

Die Pflanzen zeigten welke Blätter, die sich leicht herausziehen ließen und starben sehr schnell ab. Sie wiesen an ihren Wurzeln zu dem Zeitpunkt auch keine aktiven Knospen mehr auf. Merkwürdig war, dass der unmittelbar daneben stehende Genotyp 2 nicht eine erkrankte Pflanze aufwies. Genotyp 24 gehört zur Art *Rheum rhabarberum*, Genotyp 25 ist eine alte Landsorte (den Merkmalen nach auch *rhabarberum*) und Genotyp 2 gehört zu *Rheum officinale*. Vielleicht ist das Ausbleiben des Befalls von Genotyp 2 auf den Unterschied in der Art zurückzuführen.

Um eine Weiterverbreitung der Krankheit zu verhindern, wurde der Bestand nach Hinweisen von LOPEZ (2000) mit 0,15 % -ger Lösung Previcur N behandelt und nach einer Woche mit 3kg Aliette/ha.

Es traten danach keine weiteren Schädigungen auf.

Die bisher bei den Versuchen aufgetretenen Krankheiten beim Rhabarber führten bei der Ascochyta- Blattfleckenkrankheit nicht zu Ausfällen. Bei der Stängelgrundfäule mit anschließender bakterieller Wurzelfäule starben die befallenen Pflanzen ab. Nach einer Behandlung mit Previcur und Aliette wurden keine weiteren Infektionen an anderen Rhabarberpflanzen mehr festgestellt.



Abb. 5: Pflug zum Auspflügen der Wurzeln



Abb. A6: Getrocknete Rhabarberwurzelschnitzel (Trockenwerk)



Abb. A7: Rhabarberwurzel- Pellets aus der Wirbelschichttrocknung

Zu Methodenentwicklung

Untersuchungen zur Eignung verschiedener Lösungsmittel

In Anlehnung an die durchgesehenen Literaturangaben wurden folgende Lösungsmittel nach Ausgangsmethode A überprüft:

- Aceton/ Wasser (1:1; v/v),
- Methanol,
- Methanol/ Wasser (1:1; v/v),
- Ethanol/ Wasser (1:1; v/v).

Die dabei ermittelten Rhaponticinausbeuten sind in Abbildung A8 graphisch dargestellt.

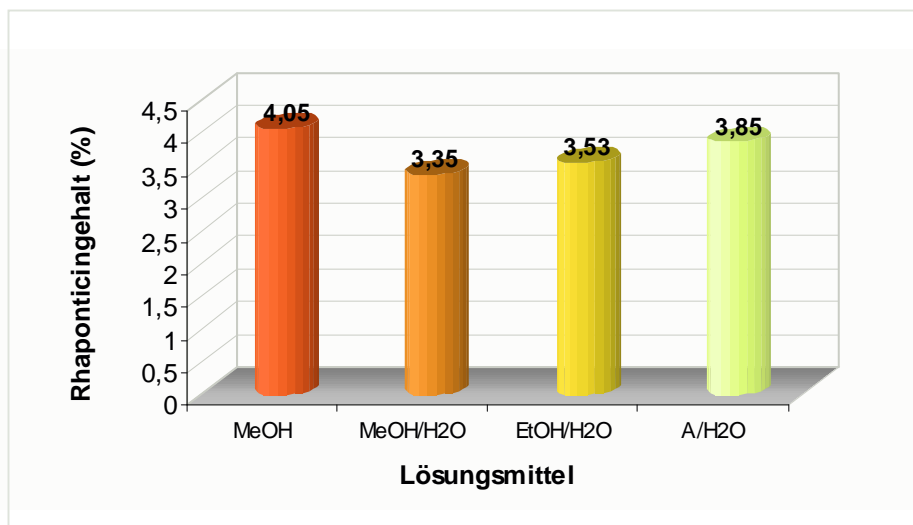


Abb. A8: Ermittelte Rhaponticinausbeuten bei der Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln nach Ausgangsmethode A (n = 10)

Die Ergebnisse zeigen, dass mit den einzelnen Lösungsmitteln zwischen 3,35 und 4,05 % Rhaponticin extrahiert wurden. Die höchste Ausbeute wurde mit Methanol erzielt. Da aber für die Extraktion so wenig wie möglich toxische Substanzen eingesetzt werden sollen und die Rhaponticinausbeute im Vergleich zu Aceton/ Wasser nicht wesentlich effizienter (0,2 % höher) war, wurde für alle künftigen Versuche das Aceton/ Wasser - Gemisch als Lösungsmittel eingesetzt.

Bei den Vorversuchen zur Eignung verschiedener Lösungsmittel fiel auf, dass die einzelnen Messwerte innerhalb der Versuchsreihe teilweise stark schwanken. Die ermittelten Variationskoeffizienten lagen zwischen 5 und 30 %.

Als Erklärung für diese starken Abweichungen kann das inhomogene Wurzelmaterial genannt werden. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde die schon zerkleinerte Wurzelprobe vor den folgenden Extraktionsversuchen noch mal in einer handelsüblichen Kaffeemühle gemahlen. Die Konsistenz der Droge war nun feiner und homogener und soll im Folgenden als Wurzelmehl bezeichnet werden.

Die Ergebnisse der Extraktionsversuche mit der 2x gemahlene Droge zeigten wesentlich geringere Standardabweichungen im Bereich von 5,4 bis 13,0 %. Damit ergab sich ein weiterer Optimierungspunkt.

Untersuchungen bezüglich Probeneinwaage und Lösungsmittelvolumen

Um nun zu prüfen, mit welchem Verhältnis von Probenmenge und Lösungsmittelvolumen die höchsten Rhaponticinausbeuten erreicht werden, wurden beide Ausgangsmethoden mit Aceton/ Wasser (1:1; v/v) durchgeführt. Abbildung A9 zeigt die Ergebnisse im Vergleich.

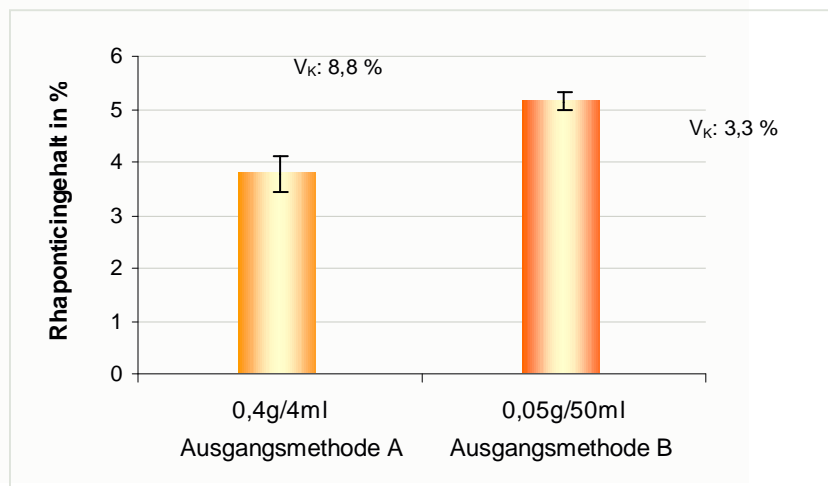


Abb. A9: Vergleich der Ausgangsmethoden A und B (Lösungsmittel: Aceton/ H₂O); n = 10

Mehrfachextraktion

Um genauer zu überprüfen, wieviel von dem zurückgehaltenen Rhaponticin im Wurzelmehl durch das Auffüllen von Lösungsmittel in den verfügbaren (freien) Extrakt übergeht, wurden Nachextraktionen der bereits extrahierten Probe durchgeführt. Dazu wurden 50 mg Wurzelmehl mit 5 ml Aceton/ Wasser versetzt. Nach dem Zentrifugieren wurde dann der maximal mögliche Überstand abgenommen und dessen Volumen gemessen. Es konnten immer 4,7 ml +/- 0,1 ml Extrakt überführt werden. Das bedeutet es verbleiben 0,3 ml +/- 0,1 ml Extrakt im festen Rückstand.

Der zurückbleibende Extrakt enthält vermutlich Rhaponticin, was die Ausbeute verringert, wenn nicht mit Lösungsmittel aufgefüllt wird. Der Rückstand wurde drei weitere Male mit Lösungsmittel (5 ml) versetzt, extrahiert, zentrifugiert und die entstehenden Überstände getrennt analysiert.

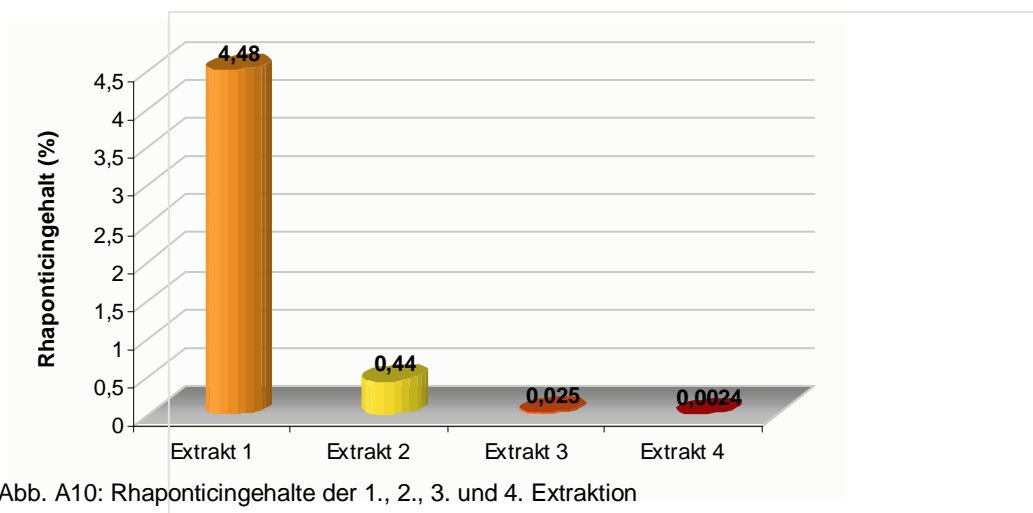


Abb. A10: Rhaponticingehalte der 1., 2., 3. und 4. Extraktion

Die Abbildung A10 zeigt, dass im Extrakt 1, wie zu erwarten, der Rhaponticingehalt mit 4,50 % am größten ist. Weiterhin kann mit diesem Ergebnis nochmals bewiesen werden, dass der Auffüllschritt in der Methode sehr wichtig ist, um höhere Ausbeuten zu erzielen. Denn der gemessene Wert von 4,5 % liegt deutlich unter dem mit Auffüllen erhaltenen Gehalt. Im Extrakt 2 wurden 0,44 % Rhaponticin gefunden, was nahezu der Differenz von 4,93 % und 4,50 % entspricht.

Es stellt sich nun die Frage, wo die Stilbenderivate des 2. Extraktes (0,44 %) lokalisiert waren. Verblieben sie in der festen Matrix der Probe und wurden erst durch die erneute Zugabe von Lösungsmittel herausgelöst? Oder befanden sie sich im zurückbleibenden Extrakt (0,3 ml), bereits in Lösungsmittel gelöst, welches jedoch an die festen Probenbestandteile adsorbiert war?

Berechnet man den theoretischen Rhaponticingehalt in den zurückbleibenden 0,3 ml, so erhält man statt erwartet 0,44 % nur 0,29 % Rhaponticin.

Berechnung:

4,5 % Rhaponticin → 4,7 ml Extrakt

? % Rhaponticin → 0,3 ml Extrakt

$$? = \frac{4,5 \% * 0,3 \text{ ml}}{4,7 \text{ ml}}$$

$$? = 0,29 \%$$

Demnach kann vermutet werden, dass durch die zweite Extraktion auch ein weiteres Herauslösen aus der festen Matrix bewirkt wurde. Laut dieser Berechnung wurde der überwiegende Teil des Rhaponticin jedoch bei der ersten Extraktion im Lösungsmittel gelöst und durch die festen Probenbestandteile zurückgehalten. Der Auffüllschritt konnte dieses Defizit gut ausgleichen, so dass von einer zweiten Extraktion abgesehen werden konnte.

Wie bereits erwähnt, wäre auch der sich einstellende Sättigungseffekt eine Begründung für die niedrigeren Ausbeuten bei geringen Lösungsmittelmengen. Allerdings könnte dieser Effekt durch alleiniges Auffüllen mit Lösungsmittel nicht ausreichend beseitigt werden. Um den Sättigungseffekt aber mit Sicherheit ausschließen zu können, wurde das Standard - Additionsverfahren angewandt.

Wiederfindung (Standard - Additionsverfahren)

Bei der Standard - Addition wurde den Proben Standardsubstanz in verschiedenen Konzentrationen (200 µg, 1 mg, 2 mg) zugesetzt. Als Standard wurde der aufgereinigte Trockenextrakt der Chemisch Pharmazeutischen Fabrik Müller, Göppingen verwendet, der sowohl Rhaponticin als auch Desoxyrhaponticin enthielt.

Wäre eine Sättigungsgrenze vorhanden, würden die Rhaponticinausbeuten ab einer bestimmten Konzentration stagnieren. Wäre keine Sättigung vorhanden, müsste der zugegebene Standard quantitativ wieder gefunden werden.

Bei der Berechnung der Wiederfindungsrate wurden beide Substanzen, Rhaponticin und Desoxyrhaponticin, berücksichtigt. Die durchschnittliche Gesamtkonzentration von Rhaponticin und Desoxyrhaponticin in der Hauptwurzel des Genotyps 21 beträgt 6,76 % (= 3,357 mg/50 mg). Dieser Wert wurde aus den bisher durchgeführten Versuchen ermittelt.

Die nachstehende Tabelle 18 zeigt die jeweiligen Wiederfindungsraten, die bei diesem Verfahren ermittelt wurden.

Tab. A4: Ermittelte Wiederfindungsraten bei der Standardaddition

Std.-Addition	Ø Gesamtmenge in der Probe	erwarteter Wert (mg)	gemessener Wert (mg)	WFR (%)
0,2mg	3,357 mg	3,557mg	3,510mg	76,5
1mg	3,357 mg	4,357mg	4,324mg	96,7
2mg	3,357 mg	5,357mg	5,371mg	100,7

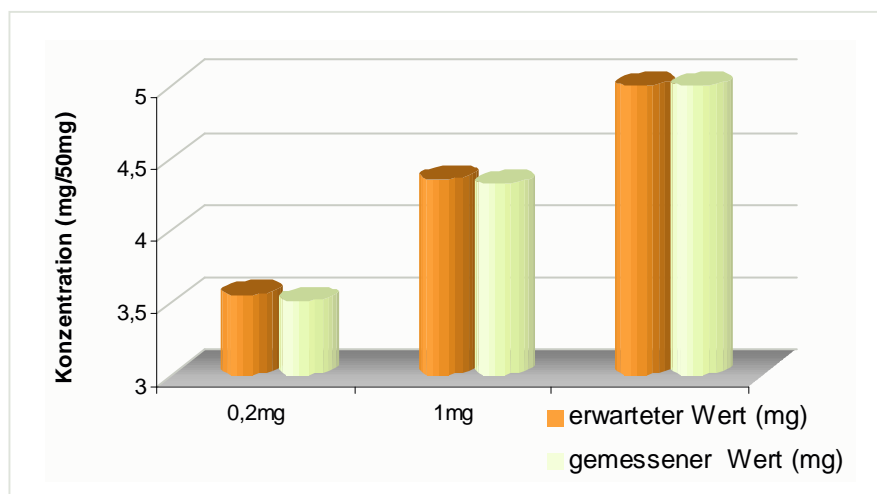


Abb. A11: Darstellung der WFR (Vergleich der Istwerte mit den erwarteten Messwerten)

Die Abbildung A11 zeigt, dass der zugegebene Standard mit Ausnahme der Standardaddition von 0,2 mg nahezu vollständig quantifiziert wurde. Demnach kann eine Sättigung des Lösungsmittels als mögliche Ursache für die niedrigeren Ausbeuten bei geringen Lösungsmittelmengen ausgeschlossen werden. In diesem Konzentrationsbereich liegt keine Sättigung vor.

Die WFR der Standard - Addition 0,2 mg liegt mit 76,5 % nicht im akzeptablen Bereich (vgl. Tabelle A5). Nach KROMIDAS (1999) kann die WFR von der Analytkonzentration abhängig sein. Demnach ist es wichtig, dass der zugegebene Standard etwa der Konzentration in der Probe entspricht. Da 0,2 mg und 1,0 mg nicht dem durchschnittlichen Gesamt - Rhaponticingehalt in der Probe entsprechen, kann die WFR trotzdem als ausreichend akzeptiert werden.

Tab. A5: Richtwerte für Wiederfindungsraten in Abhängigkeit vom Wirkstoffgehalt der Probe [KROMIDAS, 1999]

Wirkstoffkonzentration in %	Akzeptierte WFR
> 10	98,0 – 102,0
1 – 10	97,0 – 103,0
< 1	95,0 – 105,0

Statistische Kenngrößen der Kalibration

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SQS 2000 (Statistische Qualitätssicherung) von Uli Lernhardt, Joachim Kleiner und Gerhard Wachter. Die errechneten Kalibrierfunktionen wurden mittels Anpassungstest nach Mandel auf ihre Linearität geprüft. Für beide Substanzen wurde mit einer statistischen Sicherheit von 95 % eine lineare Kalibrierfunktion als optimal befunden.

Die Kalibriergeraden mit den dazugehörigen Residuen sind in den Abbildungen A12 bis A14 dargestellt.

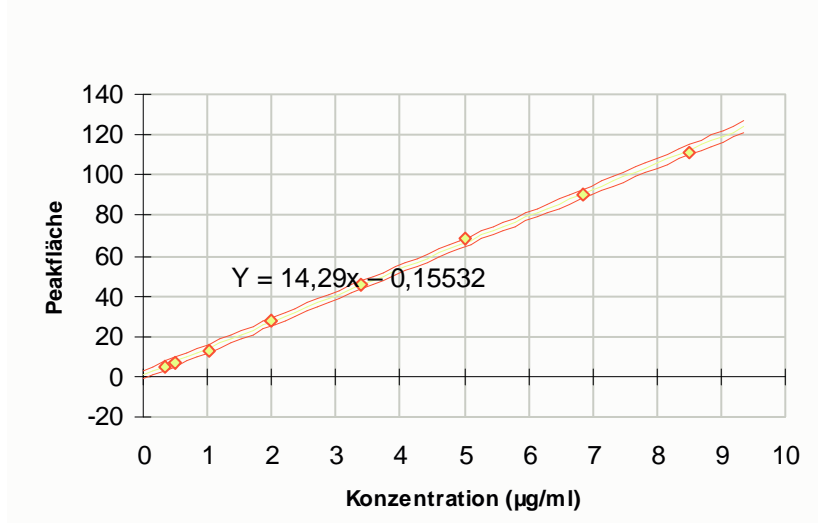


Abb.A12: Lineare Kalibrierfunktion von Desoxyrhaponticin mit Vertrauensbändern

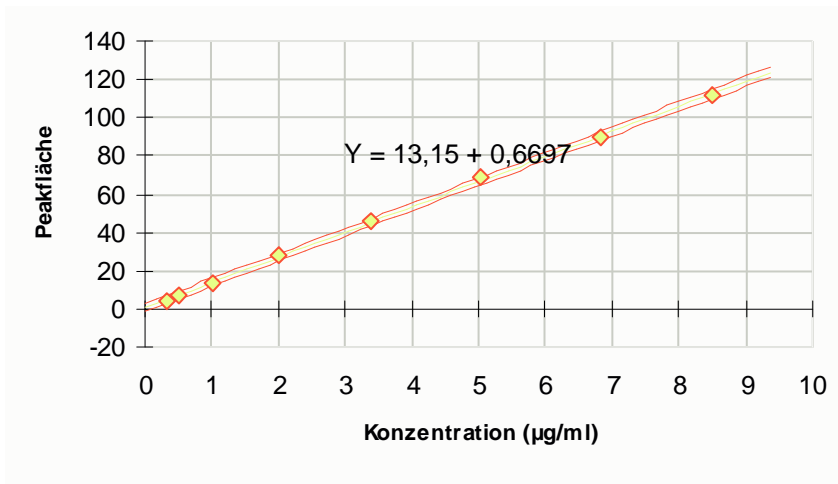


Abb.A13:Lineare Kalibrierfunktion von Rhaponticin mit Vertrauensbändern

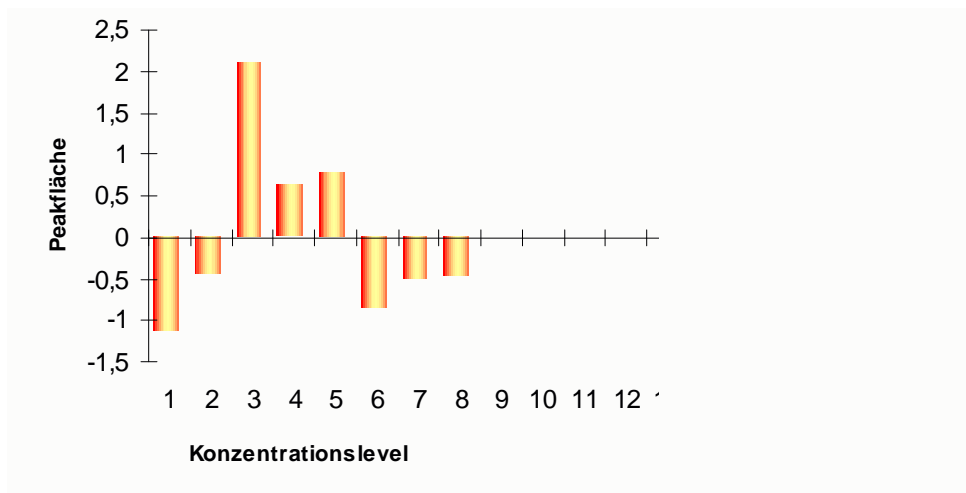


Abb.A14: Residuen der linearen Kalibrierfunktion von Rhaponticin

Die Residuen sollten sich entlang der Kalibriergeraden nach beiden Seiten gleichmäßig verteilen (normalverteilt).



Abb. A15: Zur Samengewinnung eingestetzte Mutterpflanzen

16 *Rheum rhaponticum* L. Kirovsk, UdSSR

18 *Rheum rhaponticum* L. Kirovsk, UdSSR

21 *Rheum rhaponticum* L. Taplozek, Finnland

17 *Rheum rhaponticum* L. Dneprpetrovsk, UdSSR

20 *Rheum rhaponticum* L. Petrograd, UdSSR

34 *Rheum undulatum* L. Pruhonice CSSR.