

## Capillargaschromatographische Bestimmung der Rosmarinsäure in Blattgewürzen

Angelika Reschke

Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover, Wunstorfer Str. 14, D-3000 Hannover 91, Bundesrepublik Deutschland

### Capillary Gas Chromatographic Determination of Rosmarinic Acid in Leafy Spices

**Summary.** A capillary gas chromatographic method for the determination of rosmarinic acid was developed. Leafy spices of the families *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, and *Boraginaceae* were analysed qualitatively and quantitatively by this method. Rosmarinic acid was present in all investigated *Lamiaceae* species and in *Borago*. Concentrations up to 1.66% were found. In spices of the *Asteraceae* and *Apiaceae* rosmarinic acid was not detectable.

**Zusammenfassung.** Zur Bestimmung der Rosmarinsäure wurde eine capillargaschromatographische Methode entwickelt. Blattgewürze aus den Familien der *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae* und *Boraginaceae* wurden diesbezüglich qualitativ und quantitativ untersucht. Rosmarinsäure konnte in allen untersuchten Arten der *Lamiaceen* sowie im Borretsch nachgewiesen werden. Es wurden Gehalte bis zu 1,66% gefunden. In Vertretern der *Asteraceen* und der *Apiaceen* war Rosmarinsäure nicht nachweisbar.

### Einleitung

Ester von Phenolcarbonsäuren sind in höheren Pflanzen weit verbreitet, wie aus einer Übersichtsarbeit von Herrmann [1] und aus letzten Untersuchungen unseres Arbeitskreises hervorgeht [2–5].

In Blattgewürzen entfällt nach Hydrolyse ein überlagernder Anteil der Phenolcarbonsäuren auf die Kaffeesäure [6]. Rosmarinsäure, ein Depsid aus Kaffeesäure und  $\alpha$ -Hydroxyhydrokaffeesäure (2-O-Caffeoyl-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-D-milchsäure), ursprünglich aus *Rosmarinus officinalis* isoliert [7], konnte in weiteren

*Lamiaceen* [8–10] sowie *Apiaceen* und *Boraginaceen* [11] nachgewiesen werden.

Quantitative Untersuchungen wurden in geringem Umfang nach chromatographischer Aufarbeitung spektralphotometrisch [12, 13] durchgeführt. Hier soll eine gaschromatographische Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Rosmarinsäure vorgestellt werden.

### Methodik

#### Allgemeines

Zur Aufarbeitung des Probenmaterials nur schwermetallfreie Lösungsmittel heranziehen, da phenolische Substanzen durch Metallionen komplexiert werden. Arbeiten am (Vakuum-)Rotationsverdampfer generell bei  $\leq 40$  °C Wasserbadtemperatur durchführen.

#### Gewinnung der Extrakte

10 g Gewürz in ca. 200 ml Methanol 5 min am Ultraturrax homogenisieren und zur quantitativen Extraktion viermal mit je 150 ml Methanol bei 40 °C extrahieren. Die Lösung jeweils durch Zentrifugieren abtrennen. Die gesammelten methanolischen Extrakte nach Konzentrierung im Vakuum mit Methanol auf ein Volumen von 100,0 ml bringen. Zur gleichmäßigen Verteilung fester Partikel, wie zusammengeballtes Chlorophyll, die Lösung anschließend 3 min im Ultraschallbad behandeln.

Einen aliquoten Teil dieser Lösung (20 ml) zur Trockne bringen, in Wasser aufnehmen und zweimal mit dem gleichen Volumen Petroläther ausschütteln; die vereinigten Petrolätherextrakte einmal mit Wasser zurückschütteln.

Zur anschließenden Polyamid-Säulenchromatographie der wäßrigen Lösung eine Säule von 30 mm i. D. verwenden, die bis zu einer Füllhöhe von 14 cm mit vorgequollenem, eisenfreiem Polyamid beschickt ist; sie ist nach einer Spülung mit 1 000 ml Wasser gebrauchsfertig. Nach Aufgabe der Probelösung nacheinander mit 500 ml Wasser und 500 ml Methanol waschen, wobei neben Zuckern und Säuren vor allem Flavonoide abgetrennt werden. Die Elution der Rosmarinsäure mit 500 ml 0,5%iger methanolischer Ameisensäure vornehmen. Das Eluat im Vakuum zur Trockne bringen, dabei die vorhandene Ameisensäure durch mehrmaliges Hinzufügen von Methanol azeotrop abziehen. Den Rückstand in 10,0 ml Methanol (Stammlösung) aufnehmen. 1 ml dieser Lösung zur Silylierung einsetzen und Doppelbestimmung durchführen.

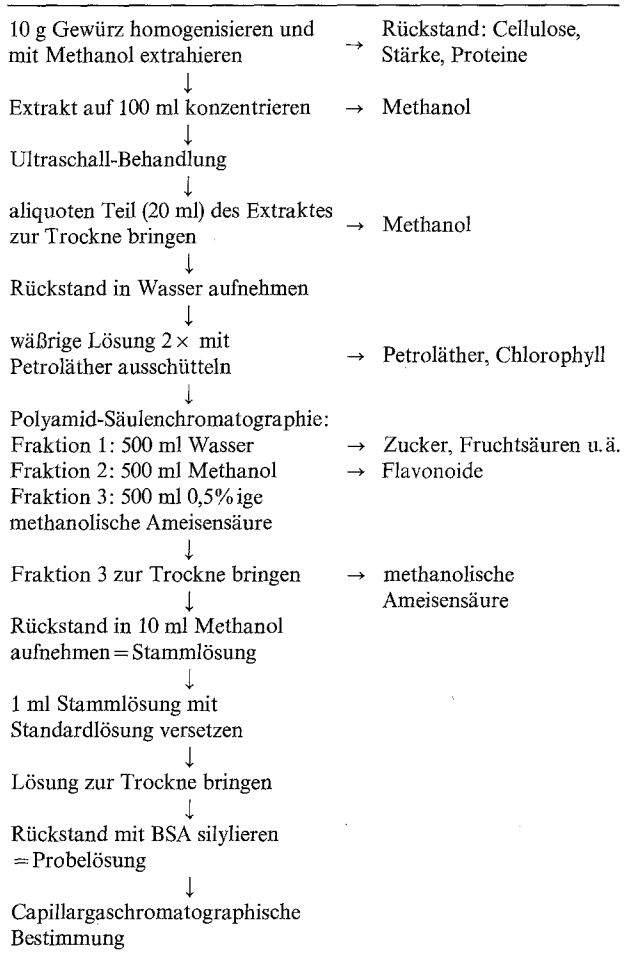


Abb. 1. Schema zur Aufarbeitung

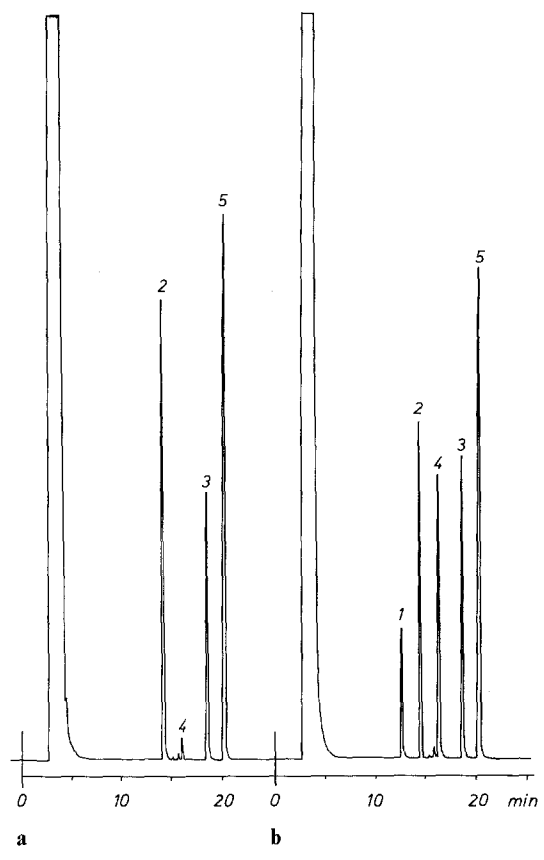


Abb. 2 a, b. Gaschromatogramme der Chlorogen- und Rosmarinsäure vor und nach UV-Bestrahlung. - 1 cis-Chlorogensäure, 2 trans-Chlorogensäure, 3 interner Standard (C<sub>34</sub>), 4 cis-Rosmarinsäure, 5 trans-Rosmarinsäure

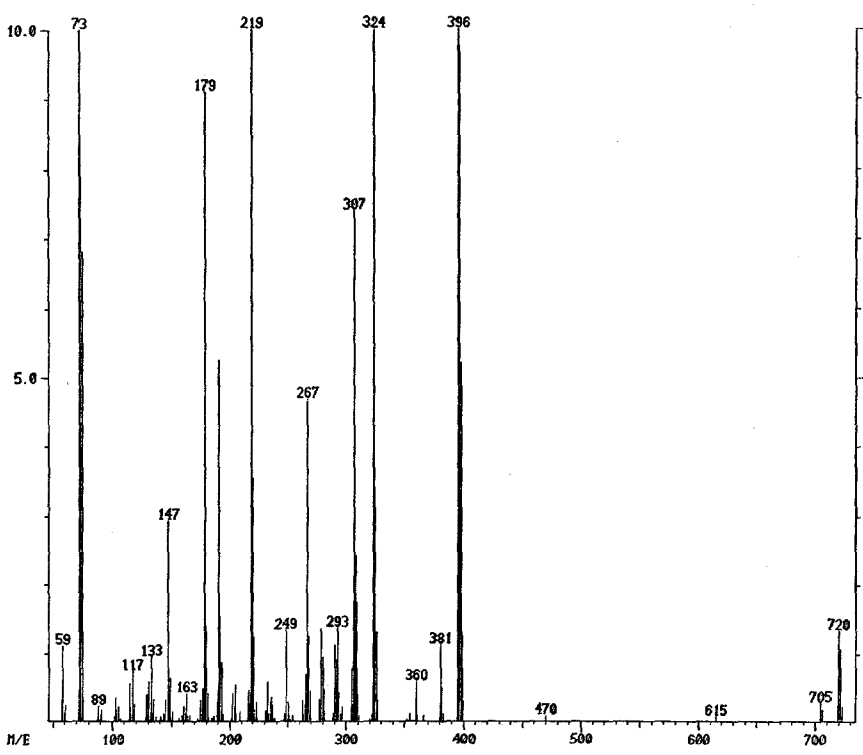


Abb. 3. Massenspektrum der cis-TMS-Rosmarinsäure

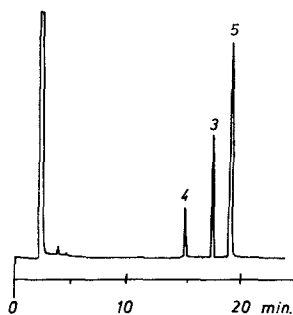


Abb. 4. Gaschromatogramm des Rosmarin-Extraktes. – 3 interner Standard ( $C_{34}$ ), 4 *cis*-Rosmarinsäure, 5 *trans*-Rosmarinsäure

#### Silylierung

1,0 ml Stammlösung mit 1 ml Standardlösung (= 1,0 mg  $C_{34}$ /ml Hexan), bei geringer Konzentration an Rosmarinsäure 0,2 ml Standardlösung, in ein Spitzkölbchen pipettieren und im Vakuum zur Trockne bringen. Den Rückstand mit 0,2 ml BSA und 1 ml Hexan versetzen und die Lösung zur Reaktion 60 min bei 70 °C auf dem Wasserbad belassen. 0,5 µl der silylierten Probe für die gaschromatographische Bestimmung verwenden.

#### Quantitative Bestimmung

Als internen Standard zur gaschromatographischen Rosmarinsäurebestimmung das Alkan  $C_{34}$  einsetzen.

Da uns die Rosmarinsäure nicht als feste Reinsubstanz zur Verfügung stand, mußten die quantitativen Bestimmungen auf die chemisch recht ähnliche *trans*-Chlorogensäure (3-Caffeoylchinasäure) bezogen werden. Die Derivatisierung der Chlorogensäure erfolgte unter Lichtausschluß mit einem BSA/TMCS-Gemisch, um einer Isomerisierung, der Bildung von Struktur- und *cis-trans*-Isomeren, entgegenzuwirken [14]. Als Responsefaktor  $C_{34}$ /Chlorogensäure resp. Rosmarinsäure wurde ein Wert von 0,839 ermittelt. Die Responsefaktoren für die *cis*- und *trans*-Isomeren waren bei der Rosmarinsäure erwartungsgemäß identisch.

Jeden einzelnen Aufarbeitungsschritt auf die vollständige Erfassung der Rosmarinsäure hin prüfen. 10 parallel durchgeführte Aufarbeitungen ergaben eine Standardabweichung von  $\pm 2,5\%$ . Nachweisgrenze bei 5 ppm.

#### Gaschromatographie

Gerät: Carlo Erba Fractovap 2150. – Trennsäule: SE 52-Glascapillare, selbst hergestellt, 34 m, ä. D. = 0,80 mm, i. D. = 0,26 mm. – Probe: 0,5 µl TMS-Derivat. – Temperaturen: Injektor 300 °C, Detektor (FID) 300 °C, Ofen 250 °C (2 min), 6°/min, 295 °C (20 min). – Gase: Träger  $N_2$  2,2 bar = 1,5 ml/min. – Brenngase  $H_2$  0,6 bar = 27 ml/min, Luft 1,2 bar = 300 ml/min, Spülgas  $N_2$  1,3 bar. – Split: 1:30. – Retentionszeiten: *c*-Rosmarinsäure 15,63 min,  $C_{34}$  18,44 min, *t*-Rosmarinsäure 20,42 min. – Integrator: Hewlett Packard 3390 A.

#### Identifizierung

Nach den dünnenschichtchromatographischen und UV-photometrischen Untersuchungen, in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten [7, 12], Identifizierung der chromatographisch gereinigten und isomierten Rosmarinsäure durch GC-MS-Kopplung. Die Massenspektren für die *cis*- und *trans*-Verbindung waren nahezu identisch. Sie enthielten jeweils den charakteristischen Molpeak der TMS-Rosmarinsäure sowie Signale für ihre typischen Zerfallprodukte.

Tabelle 1. Gehalte an Rosmarinsäure (bezogen auf trockene Handelsware)

Nr.	Gewürz	Fa. A (September 1981) %	Fa. B (September 1981) %	Fa. C (lang gelagerte Gewürze) %
<i>Lamiaceae</i>				
1	Rosmarin	1,03	1,35	
2	Thymian	1,35	0,76	0,40 (1977)
3	Salbei	0,58	0,53	1,42 (1978)
4	Melisse	0,99		
5	Bohnenkraut	1,23	0,23	0,32 (1977)
6	Oregano	1,66	1,15	
7	Majoran	0,10	0,94	
8	Basilikum	0,12	0,13	0,06 (1977)
9	Pfefferminze	0,18		
10	Spearmint	0,59		
<i>Asteraceae</i>				
11	Wermut	n.n.		
12	Beifuß	n.n.		
13	Estragon	n.n.	n.n.	
<i>Apiaceae</i>				
14	Dill	n.n.	n.n.	
15	Petersilie	n.n.	n.n.	
16	Kerbel	n.n.		
17	Liebstockel	n.n.	n.n.	
<i>Boraginaceae</i>				
18	Borretsch	0,05		

n.n. = nicht nachweisbar

#### Ergebnisse und Diskussion

Die gebräuchlichsten Blattgewürze aus den Familien der *Lamiaceae* (früher *Labiatae*), *Asteraceae* (*Compositae*), *Apiaceae* (*Umbelliferae*) und *Boraginaceae* wurden untersucht. Obwohl sich alle Familien durch einen hohen Kaffeesäuregehalt (nach der Hydrolyse) auszeichnen, konnte die Rosmarinsäure nur in den *Lamiaceen* und im Borretsch nachgewiesen werden. Vergleiche dazu Tabelle 1.

In der Pflanze kommt allein die *trans*-Rosmarinsäure vor. Erst im Laufe der Aufarbeitung, die nicht unter Lichtausschluß erfolgte, wird auch die *cis*-Verbindung gebildet.

Die z. T. beträchtlichen Schwankungen des Rosmarinsäuregehalts bei einer Blattgewürzart beruhen zum einen auf den unterschiedlichen Verhältnissen von verarbeiteten Blättern zu verarbeiteten Stielen, wobei ein hoher Stielanteil die Erniedrigung des Rosmarinsäuregehaltes bedingt. Zum anderen scheinen auch verschiedene Trocknungsverfahren Einfluß auf das Ergebnis zu nehmen: Ein vergleichsweise niedriger Rosmarinsäuregehalt ging fast immer mit einer Graubraun-Verfä-

bung der Droge einher. Der Einfluß von den Kultivierungsbedingungen und vom Anbaugebiet ist wahrscheinlich. Eine Abhängigkeit vom Alter der Probe geht aus den Untersuchungen nicht hervor.

Der hohe Kaffeesäuregehalt (nach Hydrolyse) scheint sich nach den erhaltenen Chromatogrammen bei den Asteraceen und Apiaceen im Gegensatz zu den Lamiaceen in den Chinasäureestern wiederzufinden, deren Bestimmung jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen war. Durch die gewählten gaschromatographischen Bedingungen gelang eine vollständige Abtrennung der Hydroxycinnamoyl-Chinasäuren von der Rosmarinsäure.

*Dank.* Mein Dank gilt der Firma Worlée/Hamburg und der Firma Gewürzmüller/Stuttgart für die freundliche Bereitstellung der Gewürzproben sowie Frau Gloria Bochmann, TU Berlin, für die Aufnahme der Massenspektren.

## Literatur

1. Herrmann K (1978) Fortschr Chemie Organ Naturstoffe 35:73
2. Reschke A, Herrmann K (1981) Z Lebensm Unters Forsch 173:458
3. Reschke A, Herrmann K (1982) Z Lebensm Unters Forsch 174:5
4. Schäfers FI, Herrmann K (1982) Z Lebensm Unters Forsch 175:117
5. Möller B, Herrmann K (1983) Phytochemistry, im Druck
6. Schulz JM, Herrmann K (1980) Z Lebensm Unters Forsch 171:193
7. Scarpati ML, Oriente G (1958) Ric Scient 28:2329
8. Herrmann K (1960) Arch Pharmaz 293:1043
9. Simonyan AV, Litvinenko VI, Shinkarenko AL (1972) Khim Prir Soedin – Chem Nat Compounds 8:372 (engl), 383 (russ)
10. Simonyan AV, Litvinenko VI (1972) Khim Prir Soedin – Chem Nat Compounds 8:776 (engl), 797 (russ)
11. Harborne JB (1966) Z Naturforsch 21b:604
12. Hiller K (1965) Pharmazie 20:574
13. Hanefeld M, Herrmann K (1976) Dtsch Lebensm-Rundschau 73:383
14. Möller B, Herrmann K (1982) J Chromatogr 241:371

Eingegangen am 13. September 1982