

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
(Direktorin Prof. Dr. med. B. Bockholdt)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: Alkaloide der Pflanze *Mitragyna speciosa* in Kratomzubereitungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Wissenschaften in der Medizin
(Dr. rer. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2011

vorgelegt von:
Oliver Temme
geb. am: 01.09.1966
in: Essen

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. B. Bockholdt

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Daldrup

Disputation: 12.12.2011, 15:30 Uhr

Ort, Raum: Institut für Rechtsmedizin Greifswald, Seminarraum

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Traditionelle Verwendung von Kratom	2
1.2 Die Alkaloide von <i>Mitragyna speciosa</i>	3
1.3 GC/MS-Identifizierung der <i>Mitragyna</i> -Alkaloide	7
1.4 Biogenese und Bedeutung der Indol-Alkaloide	10
1.5 Metabolismus	12
1.6 Wissenschaftliche Untersuchungen zur Wirksamkeit	13
1.7 Aktuelle rechtliche Situation	15
1.8 Kratom als Exportartikel	16
2 Zielstellung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Chemikalien	18
3.2 Probenmaterial	18
3.3 Analysengeräte	20
3.3.1 Das HPLC/DAD-System	20
3.3.2 Das GC/MS-System	20
3.4 Vorbereitende Verfahren	21
3.4.1 Vorbereitung des Blattmaterials für die HPLC-Bestimmung	21
3.4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion	21
3.4.3 Fraktionierung der Alkaloide	22
3.5 GC/MS-Analyse der Alkaloide	23
3.5.1 Identifizierung der Alkaloide in den Fraktionen	23
3.5.2 SIM-Methode zur Erfassung ausgewählter <i>Mitragyna</i> -Alkaloide	23
3.6 Quantitative Analyse ausgewählter Alkaloide	24
3.6.1 Kalibration des HPLC-Systems für die Quantifizierung von <i>Mitragynin</i>	24
3.6.2 Methanolische Auszüge der Pulverproben	25
3.6.3 Ethanolische Auszüge des Blattmaterials	25
3.6.4 Teezubereitungen	26
4 Ergebnisse	27
4.1 HPLC-Bestimmung von <i>Mitragynin</i> aus <i>Mitragynin</i> pikrat	27
4.2 HPLC-Untersuchung des Blattmaterials	28
4.2.1 Der Rohauszug	28
4.2.2 Der Flüssig-Flüssig-Extrakt	28

4.3 Auswahl von Alkaloiden im Flüssig-Flüssig-Extrakt	29
4.4 Alkaloid-Fractionen	31
4.5 GC/MS-Identifizierung der Alkaloide	33
4.5.1 Identifizierung mittels Vergleichsspektren und Literaturangaben	34
4.5.1.1 Fraktion 1	36
4.5.1.2 Fraktion 2	38
4.5.1.3 Fraktion 3	39
4.5.1.4 Fraktion 4	40
4.5.1.5 Fraktion 5	41
4.5.1.6 Fraktion 6	42
4.5.1.7 Fraktion 7	43
4.5.1.8 Fraktion 8	44
4.5.1.9 Fraktion 9	45
4.5.1.10 Fraktion 10	46
4.5.1.11 Fraktion 11	47
4.5.1.12 Fraktion 12	49
4.5.1.13 Fraktion 13	50
4.6 Übersicht der Fraktionen - Erstellung einer SIM-Methode	51
4.7 Konzentrationen der Alkaloide in den Zubereitungen	53
4.7.1 Kalibration des HPLC-Systems für die Quantifizierung von Mitragynin	53
4.7.1.1 Zulässigkeit der Lösemittelkalibration	54
4.7.1.2 Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze	54
4.7.1.3 Wiederfindung von Mitragynin nach Flüssig-Flüssig-Extraktion	55
4.7.2 Methanolische Auszüge der Pulverproben	55
4.7.3 Ethanolische Auszüge des Blattmaterials	58
4.7.4 Teezubereitungen	61
5 Diskussion	64
5.1 Methodenentwicklung	65
5.2 Qualitativer Nachweis von Mitragyna-Alkaloiden	66
5.3 Quantitativer Nachweis der Indol-Alkaloide	68
6 Zusammenfassung	73
7 Literatur	76
8 Danksagung	85

1 Einleitung

Der Mensch verwendet seit Urzeiten Pflanzen nicht nur zur Ernährung, für die Herstellung von Kleidung oder als Baumaterial, sondern - je nach pharmakologischer Wirkung - auch als Heil- oder Rauschmittel oder sogar als Gift. Viele der so genutzten Pflanzen hatten zunächst eine nur auf ihr Herkunftsgebiet beschränkte Bedeutung. Seitdem sich die Kenntnisse über solche Pflanzen unter anderem durch das Internet immer schneller verbreiten können und der weltweite Warenverkehr immer einfacher geworden ist, können diese Pflanzen trotz regional beschränkten Vorkommens global nachgefragt und angeboten werden. Seit langem sucht die Pharmaindustrie weltweit nach neuen Wirkstoffen und damit auch nach Pflanzen mit pharmakologisch bedeutsamen Inhaltsstoffen. Aber auch der individuelle Wunsch, „legale“ Rauschmittel als Alternative zu illegalen Drogen zu konsumieren, führt zu einer Verbreitung von Pflanzen oder deren Zubereitungen über die lokale Bedeutung hinaus. Insbesondere im Zeitalter des Internethandels ist ein wachsendes Angebot an (vermeintlich) bewusstseinsverändernden Pflanz Zubereitungen unterschiedlichster Herkunftsorte zu beobachten, was leicht an der Zahl der dortigen Inserate abzulesen ist.

Eine Pflanze mit einer solchen pharmakologischen Bedeutsamkeit, die ein vergleichsweise kleines Verbreitungsgebiet unter anderem in den Feuchtgebieten Thailands und Malaysias besitzt, ist das Rötengewächs *Mitragyna speciosa*, das Pieter Willem Korthals als offizieller Botaniker der niederländischen Ostindienkompanie Anfang des 19. Jahrhunderts erstbeschrieb [Korthals 1839]. Es handelt sich dabei um einen bis zu 15 m hohen Baum, von dem hauptsächlich die ovalen, etwa 12 cm langen Blätter die für den Konsum relevanten Alkaloide enthalten.



Abbildung 1: Älterer Baum von *Mitragyna speciosa* (Quelle: kratomfarm.com), Blütenstand (Quelle: botanicalspirit.com) und Blatt (Quelle: psychoactiveherbs.com)

1.1 Traditionelle Verwendung von Kratom

In den Ursprungsländern kennt man für diese Pflanze sowie die Zubereitungen daraus zahlreiche Bezeichnungen und Schreibweisen: Krathom (offizielle thailändische Schreibweise in lateinischer Schrift; **กระท่อม** in thailändischer Schrift), Kratom (in Deutschland wohl gebräuchlichste Schreibweise), Kraton, Gra-tom, Kratum, Ketum, Ketom, Katawn, Tawm, Thom, Kutum, Ithang, Kakuam, Mabog, Mambog, Biak, Biak-Biak usw. [Rätsch; Suwanlert 1975].

Die Pflanze wird traditionell in der Naturheilkunde ihrer Herkunftsländer bei Durchfall, Wurmbefall, Opiumsucht, Schmerzen und Husten eingesetzt, aber auch als Stimulans gebraucht. Die Aufnahme erfolgt in den Herkunftsländern dabei in der Regel oral oder inhalativ, wobei sowohl frische als auch getrocknete Blätter direkt oder nach Zubereitung eines Tees beziehungsweise eines durch Einengen gewonnenen Breis verwendet werden.



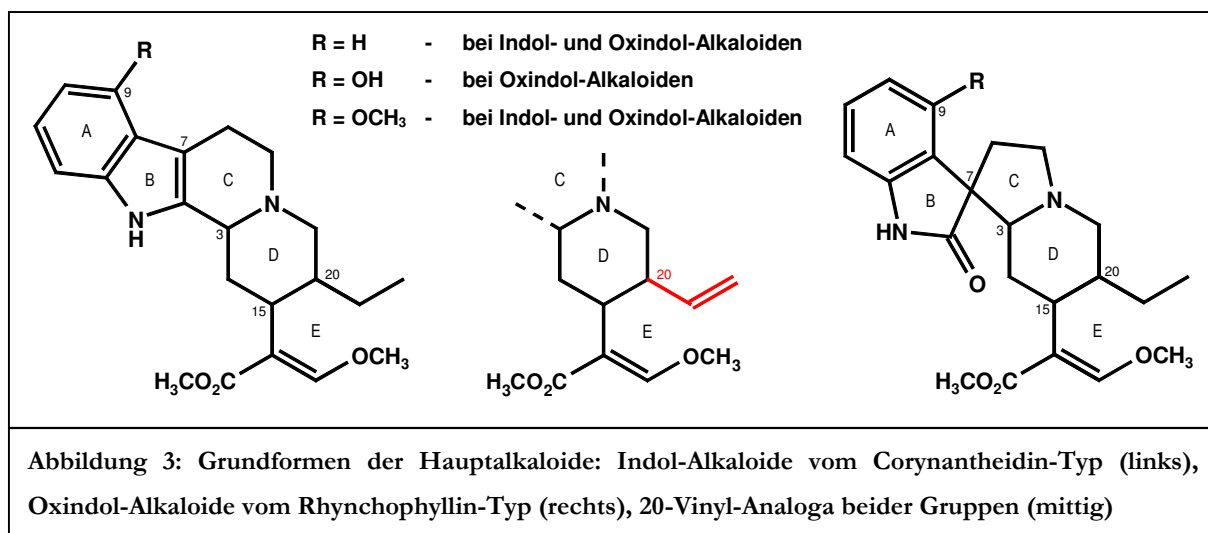
Abbildung 2: Kultivierte Mitragynabäume auf einer „Kratomfarm“ (Quelle: kratomfarm.com) und blühender Baum in Nahansicht (Quelle: ecoyardfarming.com)

In Malaysia zeigte eine Studie, dass die meisten dortigen Anwender Kratom auch in der heutigen Zeit wegen der opioiden Wirkung (als billige Ersatzdroge, um den Opiatkonsum zu verringern) vorwiegend in der traditionellen Weise als Tee (durchschnittlich vier Stunden in Wasser gekochte Blätter) konsumieren, während in Thailand wegen der cocainähnlichen Wirkung (Stärkung der physischen Ausdauer) nach wie vor bevorzugt frische Kratomblätter gekaut werden [Vicknasingam et al. 2009]. Zur typischen Opiat-Substitution in Malaysia werden drei Gläser Kratom-Tee (mit etwa 70 mg Mitragynin) je Tag eingesetzt, während die Dosis zur Stimulation in Thailand bei einer geringeren Kratommenge (etwa 20 mg Mitragynin) je Tag liegt [Vicknasingam et al. 2009]. Diese Menge soll in etwa 20 Blättern enthalten sein, wobei das Blattgewicht mit durchschnittlich etwa 1,7 g (getrocknet etwa 0,40 g) angegeben wird [Amattayakul 1960].

Bei der Verwendung als Stimulans können nicht an Kratom Gewöhnte mit wenigen Blättern eine befriedigende Rauschwirkung erzielen, während daran gewöhnte Anwender mehr Blätter konsumieren müssen, um zur gewünschten Wirkung zu kommen. Etwa 5 - 10 min nach dem Kauen der Blätter fühlt sich der Anwender im Allgemeinen glücklich, stark und aktiv. Langzeitkonsumenten können Symptome wie Anorexie, Gewichtsverlust und Schlaflosigkeit sowie als Absetzphänomene unter anderem Feindseligkeit, Aggressivität, Tränenfluss und Muskelschmerzen zeigen [Suwanlert 1975]. Es sind jedoch keine Hinweise auf ernsthafte medizinische Probleme bei alleinigem Kratomkonsum bekannt; neuere Untersuchungen zeigten keine gesundheitsschädigenden Nebeneffekte bei Langzeitanwendung in Monoeinnahme [Vicknasingam et al. 2009].

1.2 Die Alkaloide von *Mitragyna speciosa*

Die Grundformen der in der Pflanze vorkommenden Alkaloide sind Indol-Alkaloide vom sogenannten Corynantheidin-Typ und davon abgeleitete Oxindol-Alkaloide, Spiro-Verbindungen vom sogenannten Rhynchophyllin-Typ. Von beiden Alkaloid-Typen kommen auch C₍₂₀₎-Vinyl-Analoga vor (eine Kurzübersicht über die Alkaloide findet sich vor dem Literaturverzeichnis).



Eine intensive Erforschung der Alkaloide aus dem Blattmaterial von *Mitragyna speciosa* wurde unter anderem in den 60er Jahren durchgeführt und hatte die Charakterisierung zahlreicher Indol- und Oxindolalkaloide zur Folge [Beckett et al. 1965a, 1965b, 1966a, 1966b].

Das Hauptalkaloid von *Mitragyna speciosa* ist Mitragynin, das in den Blättern adulter thailändischer Pflanzen über die Hälfte des Gesamtalkaloidgehalts von 1-2 % ausmacht. Die Molekülstruktur des Mitragynins wurde 1964 durch eine Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt

[Zacharias et al. 1964]. Es wurde später gezeigt, dass außerdem Stereoisomere des Mitragynins in der Pflanze vorkommen, die sich von diesem nur an den zwei Asymmetriezentren an Position $C_{(3)}$ und Position $C_{(20)}$ (siehe Abbildung 4) unterscheiden.

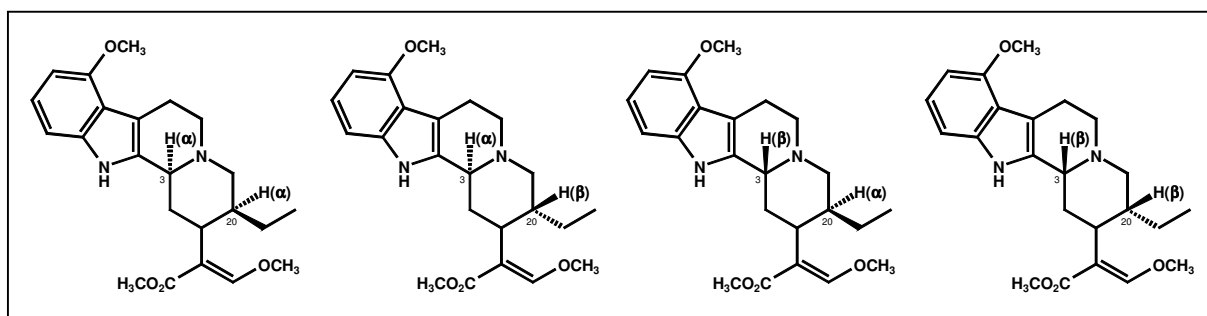


Abbildung 4: Mitragynin und seine Isomere: Es wurden nur Isomere an den Isomeriezentren $C_{(3)}$ und $C_{(20)}$ nachgewiesen: (von links nach rechts) Mitragynin, Speciogynin, Speciociliatin, Mitraciliatin.

Es ergeben sich damit grundsätzlich vier Möglichkeiten zur Bildung von Stereoisomeren. Alle davon abgeleiteten isomeren Formen, die je nach Stellung der H-Atome an $C_{(3)}$ und $C_{(20)}$ als allo-, normal-, epiallo- oder pseudo-Form bezeichnet werden, kommen sowohl bei den Indol-Alkaloiden (siehe Tabelle 1) als auch bei den Oxindol-Alkaloiden vor. Bei letzteren führt ein weiteres Asymmetriezentrum an Position $C_{(7)}$ zur Bildung der in Tabelle 2 aufgeführten A- und B-Formen dieser Spiro-Verbindung [Beckett et al. 1969].

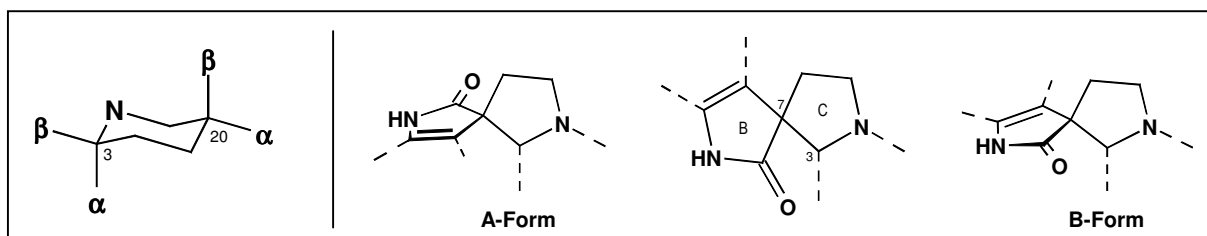


Abbildung 5: Benennung der Stellungen an den Asymmetriezentren: Links ist Ring D mit den Positionen $C_{(3)}$ und $C_{(20)}$ abgebildet, wobei die Stellung des H-Atoms an diesen Positionen (unter- oder oberhalb der Molekülebene) zu der Bezeichnung α oder β führt. Bei der Spiro-Verbindung (Oxindole) ist die A-Form durch die im rechten Teil links und die B-Form durch die im rechten Teil rechts dargestellte Stellung der Ringe B und C (Kontext siehe Abbildung 3 rechts) zueinander definiert.

Die Nomenklatur bezieht sich auf das strukturverwandte Yohimban, so dass der vollständige, ins Deutsche übersetzte systematische Name des Mitragynins 16,17-Didehydro-9,17-dimethoxy-17,18-seco-20- α -yohimban-16-carbonsäuremethylester (nach Angabe in <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) lautet. Es existieren auch Bezeichnungen (zum Beispiel in der verwendeten Spektrenbibliothek (NIST05)), die sich auf das Grundgerüst des Corynantheins beziehen, wo die Stellung am $C_{(20)}$ im Mitragynin als β bezeichnet wird. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch auf die in Abbildung 5 gezeigte Benennung Bezug genommen.

Isomer	Stellung		Substituenten			
	C ₍₃₎ -H	C ₍₂₀₎ -H	C ₍₂₀₎ -CH ₂ -CH ₃		C ₍₂₀₎ -CH=CH ₂	
			C ₍₉₎ -H	C ₍₉₎ -OCH ₃	C ₍₉₎ -H	C ₍₉₎ -OCH ₃
allo	α	α	Corynantheidin	Mitragynin		
normal	α	β	Dihydrocorynanthein	Speciogynin	Corynanthein	Paynanthein
epiallo	β	α	Isocorynantheidin	Speciociliatin		
pseudo	β	β	Hirsutin	Mitraciliatin	Hirsutein	Isopaynanthein

Tabelle 1: Übersicht über die isomeren Verbindungen vom Corynantheidin-Typ. Dargestellt sind die Isomere der Corynantheidine und 9-Methoxy-Corynantheidine mit und ohne Vinylgruppe an C₍₂₀₎.

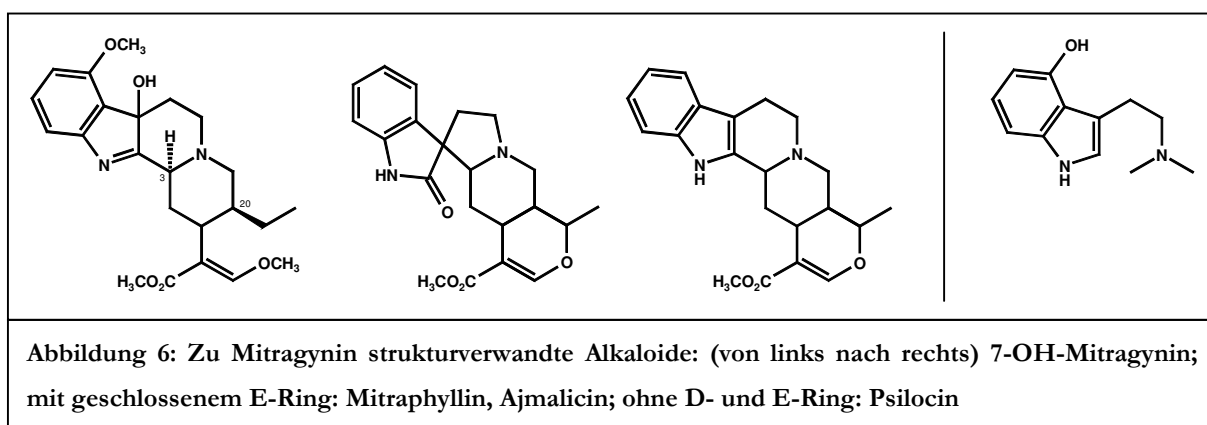
In der Pflanze können jedoch nicht alle denkbaren Stereoisomere aufgefunden werden. Die bislang nachgewiesenen Alkaloide mit offenem E-Ring (E-seco-Formen) sind in Tabelle 1 (Indol-Alkaloide vom Corynantheidin-Typ) und Tabelle 2 (Oxindol-Alkaloide vom Rhynchophyllin-Typ) dargestellt (zusammengestellt nach Angaben von Shellard [Shellard 1974]).

Isomer	Stellung		Form	Substituenten (bei allen C ₍₂₀₎ -CH ₂ -CH ₃)		
	C ₍₃₎ -H	C ₍₂₀₎ -H		C ₍₉₎ -H	C ₍₉₎ -OH	C ₍₉₎ -OCH ₃
allo	α	α	A	Corynoxin A	Mitrafolin	Mitragynin Oxindol A
			B	Corynoxin B	Isomitrafolin	Mitragynin Oxindol B
normal	α	β	A	Rhynchophyllin	Rotundifolin	Rhynchocilin
			B	Isorhynchophyllin	Isorotundifolin	Ciliaphyllin
epiallo	β	α	A		Isospeciofolin	
			B		Speciofolin	
pseudo	β	β	A			
			B		3-epi-Isorotundifolin	

Isomer	Stellung		Form	Substituenten (bei allen C ₍₂₀₎ -CH=CH ₂)		
	C ₍₃₎ -H	C ₍₂₀₎ -H		C ₍₉₎ -H	C ₍₉₎ -OH	C ₍₉₎ -OCH ₃
normal	α	β	A	Isocorynoxein	Rotundifolein	Isospecionoxein
			B	Corynoxein	Isorotundifolein	Specionoxein

Tabelle 2: Übersicht über die isomeren Spiro-Verbindungen vom Rhynchophyllin-Typ. Dargestellt sind die Isomere der Rhynchophylline, 9-Hydroxy-Rhynchophylline und 9-Methoxy-Rhynchophylline.

Neben diesen Alkaloiden wurden auch Vertreter mit geschlossenem E-Ring (E-cyclo-Formen) aufgefunden [Shellard 1974]. Ein solcher Vertreter ist zum Beispiel das Ajmalicin (Synonym: Raubasin), das auch als Inhaltsstoff des indischen Schlangenhurzes (*Rauvolfia serpentina*) bekannt ist und als Antiarrhythmikum sowie Antihypertonikum bei arterieller Hypertonie eingesetzt wird. Eine strukturelle Verwandtschaft zum Yohimbin, einem Inhaltsstoff des Yohimbe-Baumes (*Pausinystalia yohimbe*), der wie *Mitragyna* zur Familie der Rötengewächse (Rubiaceae) gehört, aber in Westafrika beheimatet ist, ist ebenfalls erkennbar. Das Tryptamingrundgerüst findet sich auch im Psilocin, einem Hydrolyseprodukt des Psilocybins, das von Pilzen der *Psilocybe*-Arten produziert wird.



Isomere Verbindungen, die sich durch die Stellung an Position $C_{(15)}$ unterscheiden, sind bisher offenbar nicht gefunden worden. Ein stark antinociceptiv wirkendes Alkaloid, das 7-Hydroxy-Mitragynin, wurde später in den 90er Jahren entdeckt [Ponglux et al. 1994]. In diesem Jahrzehnt gelang in Japan auch erstmals die Synthese von Mitragynin selbst [Takayama et al. 1995].

Neben den zuvor genannten Alkaloiden wurde auch das Triterpenoid Ursolsäure sowie dessen 3-Acetyl-Derivat in Blättern von *Mitragyna speciosa* nachgewiesen [Said et al. 1991].

Mitragynin, Speciognin und Paynanthein sind in älteren Exemplaren von *M. speciosa* ganzjährig die vorherrschenden Alkaloide [Shellard et al. 1978a]. In jungen Pflanzen fehlen diese Hauptalkaloide fast völlig, während andere Alkaloide in deutlich höheren Konzentrationen als in älteren Pflanzen auftreten [Shellard et al. 1978b]. Die Alkaloid-Konzentrationen unterliegen dazu zum Teil jahreszeitlichen Schwankungen. Im Weiteren unterscheiden sich auch die lokalen Formen der Pflanze: Die malaysische Form der *M. speciosa* weist ein anderes Alkaloidmuster als die thailändische Form auf. Der Mitragyningehalt der malaysischen Art ist deutlich geringer, dafür enthält diese auch andere Alkaloide (zum Beispiel Tetrahydromitragynin und Mitralactonal), die hier nicht weiter behandelt werden [Takayama et al. 1998].

1.3 GC/MS-Identifizierung der Mitragyna-Alkaloide

Die Auflistungen (Tabelle 3 und Tabelle 4) zeigen, dass die Moleküllionen in aller Regel zu den dominanten Signalen der Spektren gehören. Durch die Erkennung der Molmasse kann häufig eine Eingrenzung auf einen bestimmten Typ von Alkaloiden vorgenommen werden.

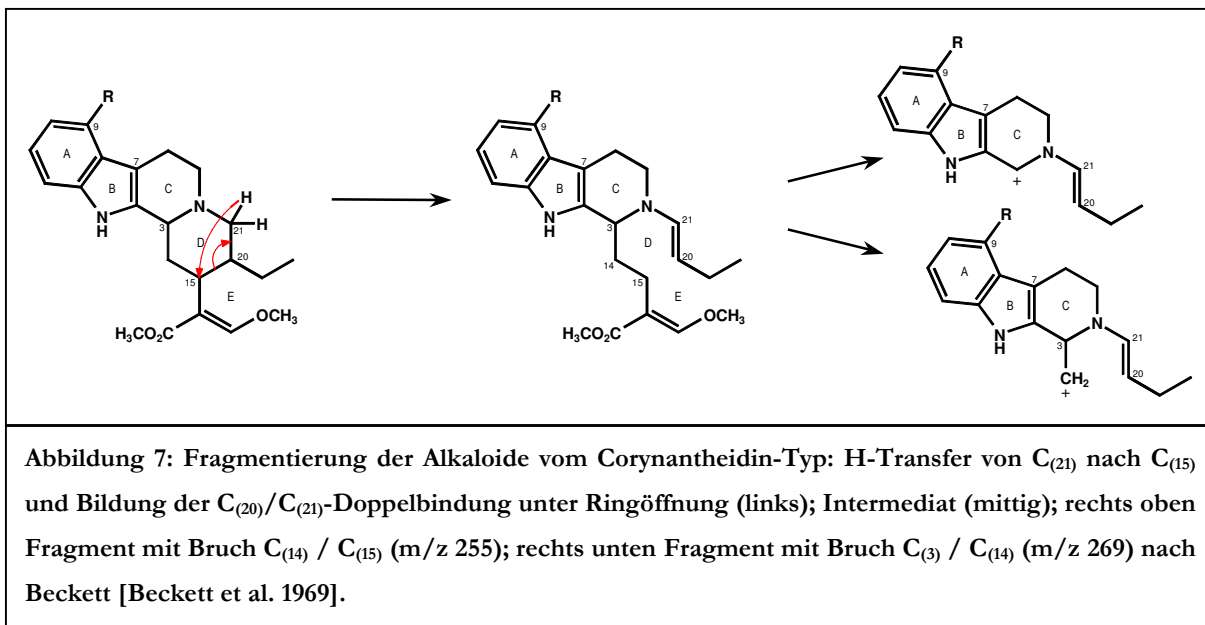
Typ	Substanz	Quelle	EI-MS: m/z (rel. Intensität)
C₉-H	Dihydrocorynanthein (normal)	1	368 (89), 367 (80), 353 (59), 338 (10), 312 (8), 251 (12), 239 (16), 225 (39), 208 (8), 196 (17), 184 (100), 170 (65), 169 (65), 156 (52)
	Corynantheidin (allo)	1	368 (52), 367 (45), 353 (46), 338 (5), 312 (10), 251 (9), 239 (21), 225 (15), 208 (8), 196 (9), 184 (100), 170 (28), 169 (31), 156 (28)
	Isocorynantheidin (epiallo)	1	368 (55), 367 (45), 353 (55), 338 (19), 312 (10), 251 (10), 239 (28), 225 (10), 208 (0), 196 (10), 184 (100), 170 (20), 169 (22), 156 (13)
	Hirsutin (pseudo)	1	368 (100), 367 (98), 353 (100), 338 (8), 312 (9), 251 (18), 239 (15), 225 (37), 208 (0), 196 (24), 184 (99), 170 (57), 169 (58), 156 (57)
C₉-Methoxy	Speciogynin (normal)	1	398 (100), 397 (90), 383 (50), 368 (11), 342 (7), 281 (7), 269 (10), 255 (21), 239 (4), 228 (5), 214 (70), 200 (31), 199 (21), 186 (23)
	Mitragynin (allo)	1	398 (95), 397 (95), 383 (44), 368 (13), 342 (7), 281 (9), 269 (25), 255 (10), 239 (6), 228 (0), 214 (100), 200 (28), 199 (20), 186 (28)
	Speciociliatin (epiallo)	1	398 (48), 397 (42), 383 (64), 368 (15), 342 (10), 281 (9), 269 (28), 255 (9), 239 (0), 228 (5), 214 (100), 200 (27), 199 (20), 186 (23)
	Mitraciliatin (pseudo)	1	398 (100), 397 (75), 383 (97), 368 (17), 342 (13), 281 (8), 269 (9), 255 (25), 239 (0), 228 (9), 214 (82), 200 (29), 199 (21), 186 (28)
C₉-Methoxy C₍₂₀₎-Vinyl	Paynanthein (normal)	2	396, 395, 381, 267, 253, 214, 200, 199, 186
	Isopaynanthein (pseudo)	1	396, 395, 381, 267, 253, 214, 200, 199, 186
Andere	3-Dehydromitragynin	3	397 (34), 396 (100), 381 (97), 367 (42), 349 (45), 335 (13), 281 (12), 251 (7), 239 (8)
	7-OH-Mitragynin	5	414 (20), 368 (75), 352 (55), 336 (25), 320 (15), 240 (50), 225 (30), 220 (20), 196 (25), 190 (40), 184 (100), 169 (65), 156 (75)

Tabelle 3: EI-MS Daten verschiedener Alkaloide vom Corynantheidin-Typ. Quellen: 1 [Beckett et al. 1969], 2 analog zu Isopaynanthein, 3 [Houghton, Said 1986], 4 [Ponglux et al. 1994], 5 [Pingsuthiwong et al. 2007] (1 und 5 teilweise aus einer graphischen Spektrendarstellung entnommen).

Dass die Stereochemie Einfluss auf die Fragmentierung im Massenspektrometer haben kann, wurde bereits Ende der 60er Jahre gezeigt. Die Variation der Höhenverhältnisse einiger Fragmente in Abhängigkeit der Konfiguration wurde von Beckett et al. unter anderem am Beispiel der Alkaloide vom C₉-Methoxy-Corynantheidin-Typ (Mitragynin, Mitraciliatin,

Speciogynin, Speciociliatin) gezeigt. Durch die unterschiedliche räumliche Struktur der Isomere laufen bestimmte Fragmentierungen anderen Fragmentierungen gegenüber bevorzugt ab. Dies drückt sich dann in den Intensitätsverhältnissen aus. [Beckett et al. 1969].

Ein Merkmal der Fragmentierung der Corynantheidine in Abhängigkeit der Stereochemie ist die Bildung von Fragmenten, die nach der Öffnung des Ringes D unter Bildung einer Doppelbindung zwischen $C_{(20)}$ und $C_{(21)}$ durch einen Bruch der Bindung $C_{(3)}$ - $C_{(14)}$ beziehungsweise der Bindung $C_{(14)}$ - $C_{(15)}$ entstehen. In der normal- und der pseudo-Konfiguration ($C_{(20)}$ in β -Stellung führt zur Doppelbindung $C_{(20)}=C_{(21)}$ in trans-Konfiguration) findet der Bruch der Bindung zwischen $C_{(3)}$ und $C_{(14)}$ gegenüber dem zwischen $C_{(14)}$ und $C_{(15)}$ bevorzugt statt; in der allo- und epiallo-Konfiguration ($C_{(20)}$ in α -Stellung führt zur Doppelbindung $C_{(20)}=C_{(21)}$ in cis-Konfiguration) verhält es sich andersherum (siehe Abbildung 7). Am Beispiel des Mitragynins (allo) bedeutet dies, dass der Bruch zwischen $C_{(14)}$ und $C_{(15)}$ bevorzugt abläuft und damit das Ion 269 intensiver im Massenspektrum erscheint als das Ion 255 [Beckett et al. 1969]. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der Stereoisomere stellt die Bildung des Fragmentes dar, bei dem das Molekülion ($[M]$) um eine CH_3 -Gruppe verkleinert ist ($[M]-CH_3$): Dieses ist in der pseudo-Konfiguration intensiver als in der normal-Konfiguration und in der epiallo-Konfiguration intensiver als in der allo-Konfiguration [Beckett et al. 1969].



Für die Alkaloide vom Corynantheidin-Typ ergibt sich damit eine Möglichkeit zur Identifizierung der verschiedenen Stereoisomere anhand des Massenspektrums. Eine solche Unterscheidungsmöglichkeit bieten die Massenspektren der Alkaloide vom Rhynchophyllin-Typ nicht in dieser ausgeprägten Form.

Typ	Substanz	Quelle	EI-MS: m/z (rel. Intensität)
C₍₉₎-H	Isorhynchophyllin (normal A)	1	384 (100), 239 (54), 224 (26), 210 (18), 208 (17), 69 (63)
	Rhynchophyllin (normal B)	1	384 (100), 239 (82), 224 (27), 210 (15), 208 (16), 69 (70)
	Corynoxin (allo A)	1	384 (75), 239 (46), 224 (20), 210 (11), 208 (15), 69 (100)
	Corynoxin B (allo B)	1	384 (100), 239 (71), 224 (33), 210 (20), 208 (26), 69 (68)
C₍₉₎-Hydroxy	Rotundifolin (normal A)	1	400 (100), 239 (100), 224 (40), 210 (24), 208 (29), 69 (67)
	Isorotundifolin (normal B)	1	400 (65), 239 (75), 224 (30), 210 (20), 208 (24), 69 (100)
	Mitrafolin (allo A)	5	400 (100), 239 (74), 238 (15), 224 (17), 210 (5), 208 (10), 184 (2), 146 (10), 110 (10)
	Isomitrafolin (allo B)	5	400 (100), 384 (10), 240 (14), 239 (75), 238 (22), 224 (33), 210 (15), 208 (20)
	Isospeciofolin (epiallo A)	5	400 (100), 384 (12), 240 (20), 239 (65), 238 (18), 224 (29), 210 (13), 208 (19)
	Speciofolin (epiallo B)	5	400 (100), 384 (10), 240 (8), 239 (47), 238 (16), 224 (19), 210 (7), 208 (12)
	3-Epi-Isorotundifolin (pseudo B)	5	400 (100), 385 (3), 369 (10), 240 (12), 239 (68), 238 (20), 224 (19), 210 (10), 208 (12), 162 (3), 161 (3), 160 (4), 146 (7)
C₍₉₎-Methoxy	Rhynchocilin (normal A)	1	414 (80), 239 (100), 224 (35), 210 (25), 208 (30), 69 (75)
	Ciliaphyllin (normal B)	1	414 (78), 239 (100), 224 (40), 210 (22), 208 (23), 69 (50)
	Mitragynin Oxindol A (allo A)	6	414, 239, 224, 210, 208, 69
	Mitragynin Oxindol B (allo B)	1	414 (100), 239 (100), 224 (36), 210 (20), 208 (32), 69 (47)
C₍₉₎-Hydroxy C₍₂₀₎-Vinyl	Rotundifolein (normal A)	5	398 (100), 367 (14), 237 (10), 236 (17), 222 (28), 192 (21), 178 (16), 162 (45), 161 (31), 160 (45), 152 (19), 146 (79), 108 (69)
	Isorotundifolein (normal B)	5	398 (39), 367 (5), 237 (11), 236 (13), 222 (14), 192 (100), 178 (7), 162 (5), 161 (5), 160 (10), 152 (4), 146 (10), 108 (58)

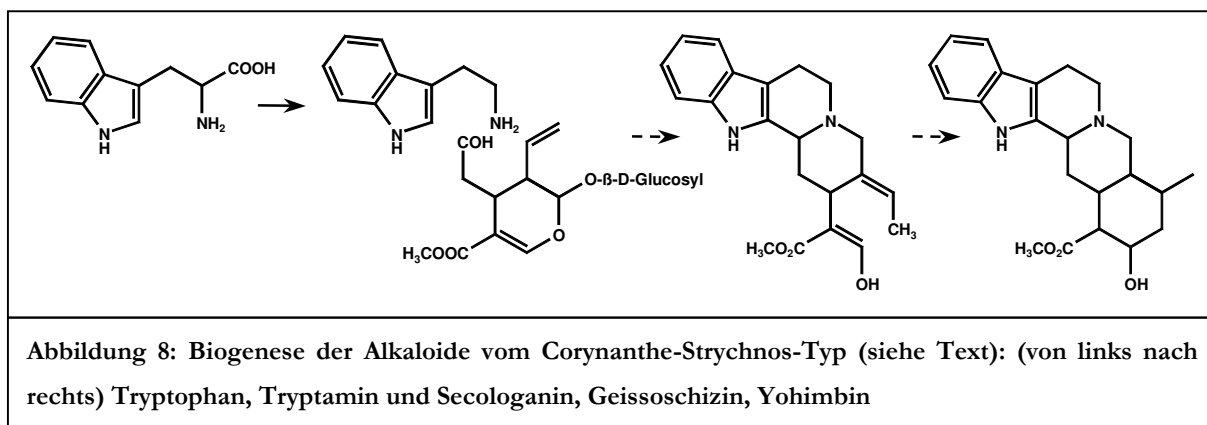
Tabelle 4: EI-MS Daten verschiedener Alkaloide vom Rhynchophyllin-Typ. Quellen: 1 [Beckett et al. 1969], 5 [Hemingway et al. 1975], 6 analog zu Mitragynin Oxindol B.

Die Charakterisierung zahlreicher weiterer Oxindolalkaloide mit Beschreibung der Massenspektren erfolgte in den 70er Jahren [Hemingway et al. 1974]. In den 80er Jahren wurden

für 30 Alkaloide (Indole, Oxindole, N-Oxid-Oxindole) GC/MS-Spektren mit umfangreichen Erklärungen zu Fragmentierungsmustern (Parallelen, Besonderheiten, Strukturhinweise) vorgestellt [Lala 1984]. Auch diese Daten wurden für die Identifizierung herangezogen.

1.4 Biogenese und Bedeutung der Indol-Alkaloide

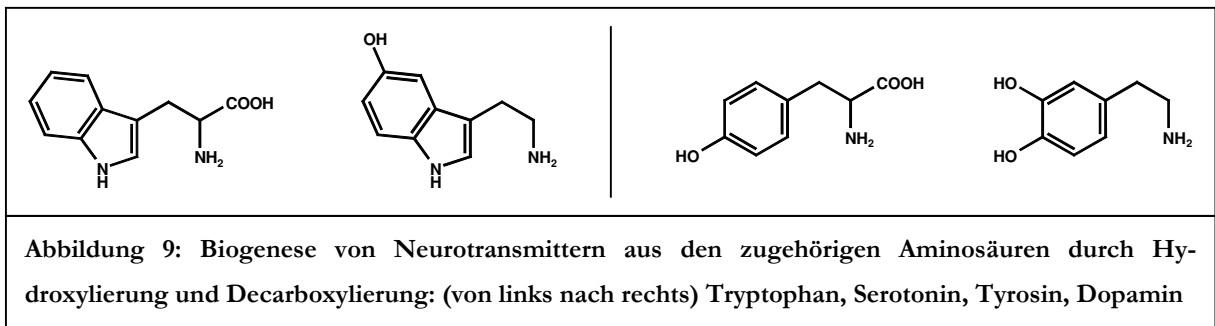
Die Biogenese der Alkaloide vom sogenannten Corynanthe-Strychnos-Typ erfolgt nach Schneider über die Verbindung von Tryptamin mit einem Monoterpen. So kondensiert Tryptamin, das über die Decarboxylierung der Aminosäure Tryptophan gebildet wird, in einer Mannich-Reaktion mit dem Monoterpen-Aldehyd Secologanin zu Strictosidin, aus dem zum Beispiel Ajmalicin gebildet wird. Ein anderer Reaktionsweg führt vom Strictosidin zum Geissoschizin, das seinerseits zu Alkaloiden wie zum Beispiel dem Yohimbin umgesetzt wird (siehe Abbildung 8). Durch intramolekulare Cyclisierung und weitere Reaktionsschritte, wie sie beispielsweise in der Brechnusspflanze (*Strychnos nux-vomica*) vorkommen, kann aus dem Geissoschizin auch das Strychnin abgeleitet werden [Schneider 2004]. Es ist zu vermuten, dass die Bildung der Mitragyna-Alkaloide, zu denen auch das vorgenannte Ajmalicin gehört, analog zu dem unten dargestellten Schema abläuft.



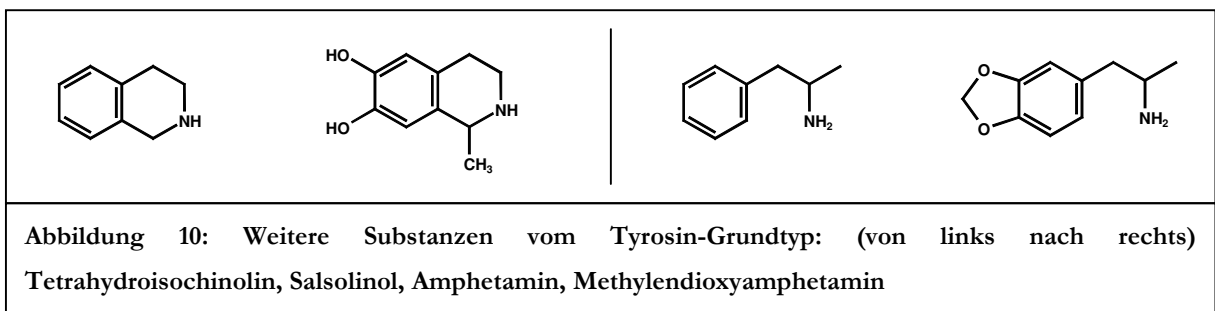
Die Einbeziehung von Tryptophan beziehungsweise dem daraus durch Decarboxylierung gebildeten Tryptamin in das Grundgerüst kommt insofern eine besondere Stellung zu, als dass bei bestimmten Derivaten dieser Substanz eine Wirkung auf das zentrale Nervensystem bekannt ist, wie zum Beispiel bei dem vom Tryptamin abgeleiteten Neurotransmitter Serotonin.

Die große Bedeutung solcher strukturell verwandter Substanzen wird auch bei Betrachtung weiterer Neurotransmitter, wie zum Beispiel der vom Tyrosin abgeleiteten Verbindungen (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin) deutlich. Es ist bekannt, dass Drogen mit Abhängigkeitspotential (zum Beispiel Opioide und Ethanol) das dopaminerge Reward-System

aktivieren [Milkman, Sunderwirth 1984; Kornetsky et al. 1988]. Dies geschieht durch die ständige Aufrechterhaltung hoher Dopamin-Konzentrationen im limbischen System. Die Beeinflussung bestimmter Gehirnregionen, insbesondere der dopaminergen Systeme, sowohl durch Opioide als auch durch strukturanaloge Alkohol-Folgeprodukte werden als bedeutsam für die Entstehung der Suchtsymptomatik diskutiert (Wise, 1980; Kuschinsky, 1981). Zu diesen Substanzen zählen unter anderem das Tetrahydroisochinolin (THIQ) und seine Derivate (zum Beispiel das Alkaloid Salsolinol). Bekannt ist, dass Dopamin in einer Mannich-Reaktion zum Beispiel mit Acetaldehyd (dem Oxydationsprodukt des Ethanol) und Formaldehyd (dem Oxydationsprodukt des Methanol) zu Kondensationsprodukten vom Tetrahydroisochinolin-Typ reagieren kann. Solche THIQ's werden tatsächlich auch im menschlichen Organismus gebildet (nachweisbar in Blut, Urin, Gehirn) und als hinweisgebend für das Vorliegen einer Alkoholsucht diskutiert [Musshoff 1995, Temme 1996].



Eine weitere Substanzklasse, die strukturelle Ähnlichkeit zu einigen Neurotransmittern (hier Dopamin) aufweist, ist die der Stimulantien vom Amphetamin-Typ (siehe Abbildung 10). Diese Beispiele zeigen, dass Alkaloide vom Tyrosin- und vom Tryptophan-Grundtyp neuronale Vorgänge beeinflussen können.

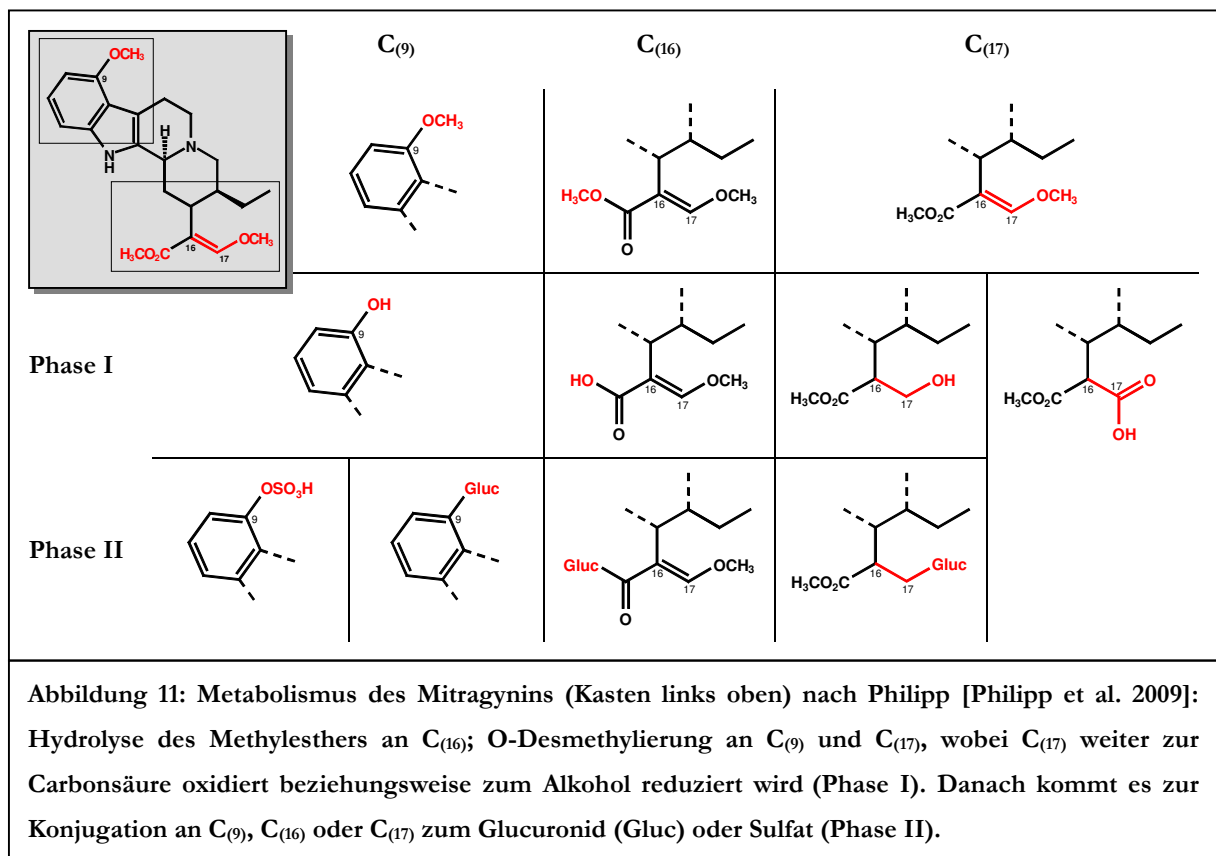


Aufgrund der Strukturähnlichkeit der Mitragyna-Alkaloide zu Neurotransmittern vom Tryptophan-Grundtyp ist anzunehmen, dass diese ebenfalls eine Fähigkeit zur Bindung an Rezeptoren des (zentralen) Nervensystems besitzen und damit eine Wirkung auf dieses ausüben können. Neuere Untersuchungen (siehe Kapitel 1.6) erbrachten den Nachweis, dass dies tatsächlich der Fall ist.

1.5 Metabolismus

Der Metabolismus von Mitragynin wurde zunächst mit Hilfe des Pilzes *Helminthosporium* untersucht. Hierbei konnten zwei Metabolite (Pseudoindoxyl-Mitragynin (siehe Abbildung 12) und Hydroxy-Pseudoindoxyl-Mitragynin) isoliert und bestimmt werden [Zarembo et al. 1974]. Weitere Metabolismusstudien mit Hilfe von Hasenlebermikrosomen zeigen, dass der Hauptabbauweg von vier Corynantheidin-Alkaloiden über eine O-Desmethylierung abläuft [Beckett, Morton 1966].

Im Urin von Menschen wurden bei Metabolismusstudien vier Phase-1-Metabolite und drei Glucuronid- sowie drei Sulfatkonjugate aufgefunden, die wahrscheinlich durch die Kombination einiger der in Abbildung 11 gezeigten Schritte gebildet werden [Philipp et al. 2009].



Untersuchungen wurden weiterhin auch zur Nachweisbarkeit eines chronischen Kratomkonsums durchgeführt. Dazu wurde der Urin eines Langzeitkonsumenten analysiert, wobei als Marker zwei der Hauptalkaloide (Mitragynin und Speciogynin) vorgeschlagen, jedoch keine Abbauprodukte bestimmt und in die Betrachtung einbezogen wurden [Pingsuthiwong et al. 2007].

1.6 Wissenschaftliche Untersuchungen zur Wirksamkeit

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts berichtete Burkill, dass Kratom zur Opiumsubstitution in Malaysia verwendet wird [Burkill 1935]. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieb Wray, dass unabhängig von der Konsumform (Rauchen, Kauen der Blätter, Trinken eines Tees) eine opiatähnliche Wirkung zu beobachten sei [Wray 1907]. Neuen Ergebnissen zufolge zeigen sich jedoch bei unterschiedlichen Konsumzubereitungen unterschiedliche Wirkungen - so zum Beispiel auf die Hemmung der Glutathiontransferasen bei Ratten [Azizi et al. 2010], die unter anderem bei der Entgiftung von Zellen eine Rolle spielen.

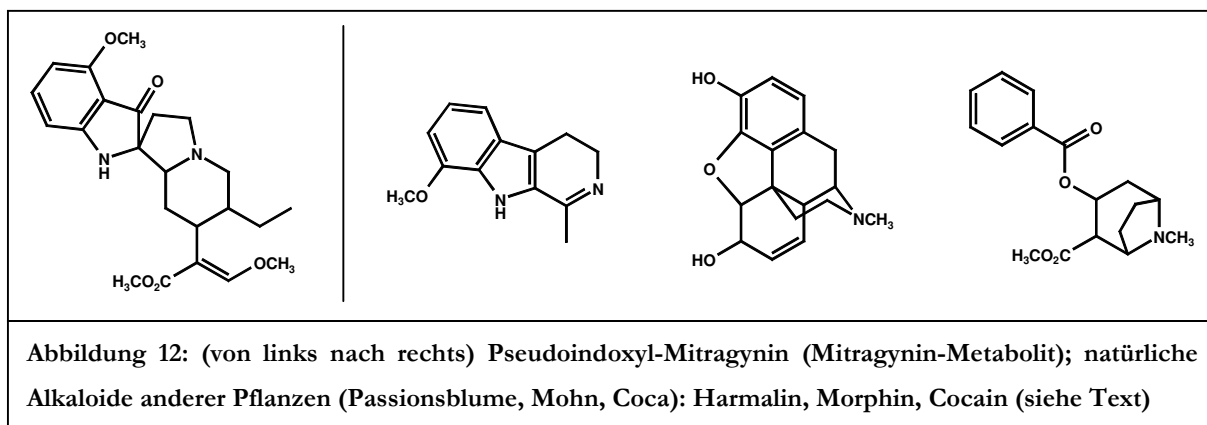
Zahlreiche Untersuchungen, die einen Vergleich von Opiaten und Mitragyna-Alkaloiden zum Inhalt hatten, wurden inzwischen veröffentlicht. So wurde eine morphinähnliche Wirkung dieser Alkaloide auf die Magensäuresekretion von Ratten belegt [Tsuchiya et al. 2002]. Weiterhin zeigte ein Kratomextrakt im Rattenversuch bei Einzelgabe eine durchfallhemmende Wirkung [Chittrakarn et al. 2007]. Die analgetische Wirkung wurde mit Mäuseversuchen nachgewiesen [Idid et al. 1998; Reanmongkol et al. 2007].

Neben der analgetischen Wirkung wurde eine hustenstillende Wirkung bei Hunden festgestellt, wobei weder Dyspnoe oder Erbrechen noch Abhängigkeitssymptome beobachtet wurden [Jansen, Prast 1988]. Laut Matsumoto et al. ist die antinociceptive Wirkung von Mitragynin etwa 5fach stärker als die von Morphin [Matsumoto et al. 2006] und wird hauptsächlich über die μ - und die δ -Opioidrezeptoren vermittelt. Die Selektivität der supraspinalen Opioidrezeptor-Subtypen auf Mitragynin unterscheidet sich jedoch von der auf Morphin [Thongpradichote et al. 1998]. Das 9-Desmethoxy-Derivat des Mitragynins, Corynantheidin, das selbst keine opioidagonistische Wirkung besitzt, bindet Takayama zufolge aber selektiv an die μ -Opioidrezeptoren und dient somit als Opioid-Antagonist [Takayama 2004].

Der Mitragynin-Metabolit Pseudoindoxyl-Mitragynin (siehe Abbildung 12) besitzt laut Yamamoto et al. eine deutlich höhere pharmakologische Wirksamkeit als Mitragynin und Morphin [Yamamoto et al. 1999]. In Versuchen mit Mäusen wurde bei 7-Hydroxy-Mitragynin ebenfalls eine höhere antinociceptive Aktivität als bei Morphin festgestellt, wobei dies - anders als bei Morphin - sehr gut über eine orale Aufnahme funktioniert [Matsumoto et al. 2004]. Mitragynin wirkt auch auf die Opioidrezeptoren im Meerschweinchendarm [Watanabe et al. 1997]. Nach Horie ist die Wirkung auf die Opioidrezeptoren des Meerschweinchenileums (Kontraktionstest) beim 7-Hydroxy-Mitragynin 30mal stärker als beim Mitragynin und etwa 17mal stärker als bei Morphin [Horie et al. 2005]. Die wiederholte Injektion reinen 7-OH-

Mitragynins führt nach Matsumoto et al. bei Mäusen zu einer Toleranzentwicklung sowie einer Kreuztoleranz zu Morphin. Bei Gabe von Naloxon können nach wiederholter Gabe von 7-OH-Mitragynin Entzugssymptome auftreten [Matsumoto et al. 2005]. Auf die antinociceptive Wirkung von Mitragynin hingegen wirkt Naloxon anders als bei Morphin nicht antagonistisch [Takayama 2004].

Die isomeren Konfigurationen des Mitragynins (siehe Abbildung 4) sind im Gegensatz zu Mitragynin selbst pharmakologisch unwirksam. Die Konfiguration hat den Untersuchungen von Shellard zufolge einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit dieser Verbindungen [Shellard 1989]. Einige strukturverwandte Verbindungen wurden auf ihren Effekt auf die α -Adrenoceptoren getestet, wobei sich zeigte, dass zum Beispiel das Dihydrocorynanthein selektiv auf die α_1 -Rezeptoren wirkt [Ito et al. 1990]. Bei Yohimbin (siehe Abbildung 8) wurde ein selektiver antagonistischer Effekt auf α_2 -adrenerge Rezeptoren und eine schwache blockierende Wirkung auf Calciumkanäle festgestellt [Watanabe et al. 1987]. Mitragynin hat nach Tohda jedoch keinen Einfluss auf α_2 -adrenerge Rezeptoren, die ebenfalls an einer Antinocipation beteiligt sind [Tohda et al. 1997]. Takayama wies bei der Überprüfung der pharmakologischen Wirksamkeit einiger synthetisierter Mitragyninderivate auf die Methoxy-Gruppe am C₍₉₎ als wesentliches gemeinsames Merkmal der aktiven Derivate hin [Takayama et al. 2002].



Bei Untersuchungen an der Universität Cambridge wurde festgestellt, dass das Hauptalkaloid Mitragynin auch eine stimulierende Wirkung besitzt. Bei Verabreichung an fünf Testpersonen wurden cocainähnliche Wirkungen beobachtet [Grewal 1932], was die traditionelle Verwendung als Stimulans erklären dürfte. Bei Ratten führte die tägliche Gabe eines Kratomextrakts zu einer Verminderung von Durst und Hunger und damit verbunden einer verlangsamten Gewichtszunahme [Kumarnsit et al. 2006].

Ein ähnlich paradox anmutendes Wirkprofil besitzt auch das strukturverwandte Harmalin (Alkaloid unter anderem der Passionsblume - *Passiflora incarnata*, siehe Abbildung 12). Es hat in

therapeutischen Dosen nach anfänglich zentralstimulierender Wirkung einen sedierenden Effekt und wird insbesondere bei Einschlafstörungen verwendet [Teuscher 1990].

Parthasarathy et al. zeigten, dass Kratom zusätzlich eine antioxidative und antimikrobielle Wirkung besitzt [Parthasarathy et al. 2009]. Weiterhin konnten bei Mäusen die Symptome eines Alkoholentzugs durch die Gabe eines wässrigen Pflanzenextraktes signifikant verringert werden, was möglicherweise auf einen antidepressiven Effekt des Kratom zurückzuführen ist [Kumarnsit et al. 2007].

1.7 Aktuelle rechtliche Situation

In Thailand ist die Pflanze seit den frühen 40er Jahren verboten [Suwanlert 1975]. Kratom ist in Burma seit 1974 im *Narcotic Drug's Amendment* (Betäubungsmittelgesetz) gelistet, da es bei exzessivem Konsum psychische Abhängigkeit verursachen kann [U Win Pe 1980]. In Malaysia wurde Mitragynin im Jahr 2003 in das *Poisons Act* (Betäubungsmittelgesetz) aufgenommen, wird aber trotzdem unter anderem in Getränkzubereitungen, als Blattmaterial oder Pulver weiter gehandelt [Chan et al. 2005]. In den Herkunftsländern erscheint ein Verbot schwer durchsetzbar, da die Pflanze dort weit verbreitet und insbesondere in den ländlichen Gebieten für jedermann zugänglich ist. Kratom hatte den Ergebnissen einer universitären Multi-Center-Studie zufolge in Thailand zumindest in den letzten Jahren, nachdem eine intensive Politik der Drogenbekämpfung betrieben wurde, aufgrund seiner ubiquitären Verfügbarkeit eine deutlich weitere Verbreitung als Cannabis und Amphetamin. Bei der im Jahr 2007 durchgeführten Erhebung wurde von etwa zwei Dritteln der Personen, die überhaupt den Konsum unerlaubter Substanzen zugaben, ein Konsum von Kratom genannt [Assanangkornchai et al. 2008].

In Europa wurde die Pflanze im Jahr 2008 der Europäischen Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht gemeldet. Im Jahresbericht 2009 ist angegeben, dass die Pflanze und bestimmte Inhaltsstoffe in Dänemark und Litauen bereits kontrolliert werden [Europäischer Drogenbericht 2009]. In Finnland ist die Pflanze seit Ende 2009 dem Arzneimittelgesetz und in Rumänien seit Februar 2010 dem Betäubungsmittelgesetz unterstellt. Der Sachverständigenausschuss für Betäubungsmittel in Deutschland hat in seiner 35. Sitzung am 03.05.2010 die Beschlussfassung zur Frage der Unterstellung der Pflanze sowie bestimmter Inhaltsstoffe unter die Anlage I des Betäubungsmittelgesetzes vertagt.

1.8 Kratom als Exportartikel

Zahlreiche Arbeiten über Kratom beschäftigten sich mit der Identifizierung verschiedener Alkaloide in den Blättern der Pflanze *Mitragyna speciosa*, wobei in der Regel frisches Blattmaterial (in großen Mengen) verwendet wurde. Außerhalb der Herkunftsgebiete sind meist nur getrocknetes Blattmaterial (gerieben oder pulverisiert, siehe Abbildung 13) oder Konzentrate erhältlich. Teilweise werden auch konsumfertige Zubereitungen angeboten. Der Handel erfolgt typischerweise über das Internet oder sogenannte Head-Shops, die auch BtM-szenetypische Utensilien und Kräuter sowie Zubereitungen anbieten.

Eine Überprüfung der Echtheit solchen Pflanzenmaterials beispielsweise anhand blattanatomischer Merkmale [Shellard, Lees 1965] ist bei den vorgenannten Handelsformen nur begrenzt möglich, so dass hierfür auf andere Methoden wie zum Beispiel die chemische Analyse der Inhaltsstoffe zurückgegriffen werden muss. Eine Unterscheidung von Blättern mit roten oder grünen („weißen“) Blattnerve(n) (letzteren wird eine stärkere Wirkung nachgesagt [Suwanlert 1975]) ist an gepulvertem Material jedenfalls nicht mehr möglich.

Eine Untersuchung von auf dem japanischen (Drogen-) Markt erhältlichen Zubereitungen (getrocknete Blätter, Pulver, Harze) ergab, dass in 11 von 13 Produkten Mitragynin nachgewiesen werden konnte, wobei die Mitragyningehalte bei 1-6 % lagen [Kikura-Hanajiri et al. 2009]. Bei einer Untersuchung von auf dem deutschen Markt erhältlichen Räucherwaren wurden in 41 Proben (21 % der untersuchten Proben) Kratom-Alkaloide als Beimengung nachgewiesen, wobei der maximale Gehalt an Mitragynin in diesen Mischungen bei etwa 6 % lag [Schröfel et al. 2011].

2 Zielstellung

In einem forensisch-chemischen Labor wird man häufig mit der Fragestellung konfrontiert, ob in asservierten oder angeblich aufgenommenen Zubereitungen (Pulver, Rauchwaren, Getränke usw.) Inhaltsstoffe enthalten sind, die eine bewusstseinsverändernde Wirkung haben könnten und ob diese Substanzen in Körperflüssigkeiten oder anderen Asservaten bestimmbar sind. Oftmals wird auch gefragt, welche Mengen der fraglichen Zubereitungen aufgenommen worden sein könnten und in welcher Dosierung welche Wirkungen zu erwarten sind. Die aktuelle Bedeutung von Kratom wird unter anderem durch das derzeitige Auftreten von Kratom in Kräutermischungen und steigende Sicherstellungsmengen belegt.

Bei einer polizeilichen Sicherstellung von unbekanntem Blattmaterial im Raum Nordrheinwestfalen (NRW), bei dem es sich um Kratom handeln sollte, ergab sich die Frage nach der strafrechtlichen Bewertung des Besitzes und Handels mit diesem Material. Über den Nachweis des Hauptalkaloids Mitragynin mittels einer gaschromatographisch-massenpektrometrischen Untersuchung (GC/MS) im kriminaltechnischen Institut des Landeskriminalamtes NRW wurde bestätigt, dass es sich bei dem sichergestellten Material tatsächlich um Kratom handelte. Da diese „Droge“ bis dahin in strafrechtlicher Hinsicht in Deutschland nicht in Erscheinung getreten ist, waren weitere Fragen - wie zu deren Dosierung und Wirksamkeit - zu klären. Eine Studie an Probanden konnte aus Gründen der ethischen Vertretbarkeit (vor allem wegen fehlender klinischer Daten) nicht durchgeführt werden, so dass Ziel dieser Arbeit die Untersuchung von Pflanzenmaterial und daraus hergestellten Zubereitungen ist. Hierbei sollen sowohl traditionelle Zubereitungen (zum Beispiel als Tee) als auch bislang nicht als Konsumzubereitungen erwähnte Extrakte (wie alkoholische Auszüge) auf ausgesuchte Inhaltsstoffe überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zum Einen geklärt werden, wie hoch die Gehalte bestimmter Alkaloide in den auf dem deutschen Markt erhältlichen Handelsprodukten sowie in daraus unter „haushaltsüblichen“ Bedingungen hergestellten Konsumzubereitungen sind und zum Anderen, inwieweit eine Zuordnung von Kratomprodukten zu bestimmten Herkunftsgebieten über die Bestimmung des Alkaloidmusters möglich ist. Weiterhin soll ermittelt werden, ob die im hiesigen Labor verwendeten Standard-Screening-Methoden geeignet sind, Mitragyna-Alkaloide auch im Routine-Betrieb zu erfassen. Da Untersuchungen von Blut- oder auch Haarproben auf Kratom-Inhaltsstoffe bislang im Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf nicht durchgeführt wurden, soll ferner der Nachweis dieser Alkaloide durch die Entwicklung einer empfindlichen GC/MS-Single Ion Monitoring Methode vorbereitet werden.

3 Material und Methoden

Neben der allgemeinen Laborgrundausrüstung und Standardverfahren in einem akkreditierten forensisch-toxikologischen Labor wurden die im Folgenden angegebenen Chemikalien, Probenmaterialien, Geräte und Methoden bei den Arbeiten verwendet. Die statistische Auswertung der für die Validierung erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm Valistat (Version 1.0 - Revision A, Arvecon GmbH, Walldorf).

3.1 Chemikalien

Wasser, Methanol, Acetonitril, Dichlormethan (alle für die Flüssigchromatographie); Diethylether, Ethanol (absolut), H_3PO_4 (85 %), Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Na_2SO_4 , KH_2PO_4 , NaOH (alle pro analysi) - Merck KGaA, Darmstadt

N_2 (5.0) Linde AG, Pullach

Mitragyninpicrat - AApin Chemicals LTD, 43rd Milton Park, Abingdon, Oxon, OX14 4RU, UK

Camazepam - aus Altbeständen des Instituts

3.2 Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde über das Internet bezogen. Es handelt sich dabei um gerebeltes Blattmaterial (50 g) der Firma *Hierbas del Peru S. A.*, sowie um 12 Proben gepulverten Materials (jeweils 3 oder 5 g), das durch die Firma *Thai-Kratom* (www.thai-kratom.de) unentgeltlich zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt wurde (siehe Abbildung 13). Zu dem Blattmaterial (VIII) waren keine weiteren Angaben (über Herkunftsort, Erntezeit oder Baumalter usw.) verfügbar. Die Pulver waren bezeichnet als (die interne Nummerierung findet sich in römischen Zahlen hinter den jeweiligen Namen in Klammern): Thai Commercial Kratom (I), Super Thai Kratom (II), Thai Premium Kratom (III), Thai Pimp (Maeng Da) Kratom (IV), Kratom Extrakt 10x (V), Malaysisches Green Kratom (VI), Malaysisches Premium Kratom (VII), Indo Commercial Kratom (IX), Indonesian Green Kratom (X), Indonesian Premium Kratom (XI), Super Enhanced Indo Kratom (XII), Indonesisches Meniti Kratom (XIII).

Die Pulver waren zum Zeitpunkt der Beschaffung als Fußbad-Zusatz deklariert und werden derzeit als ethnobotanisches Anschauungsmaterial angeboten.



Abbildung 13: Im Bild sind die untersuchten Kratomzubereitungen zu sehen. Es wurden vier thailändische, fünf indonesische und zwei malaysische Zubereitungen sowie Blattmaterial unbekannter Herkunft und ein angereicherter Extrakt (10x) untersucht.

3.3 Analysengeräte

Die vorbereitenden Untersuchungen und die quantitative Bestimmung ausgewählter Alkaloide wurden mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Diodenfelddetektor-System (HPLC/DAD) durchgeführt. Die qualitative Bestimmung der Mitragyna-Alkaloide wurde mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) realisiert.

3.3.1 Das HPLC/DAD-System

Für die HPLC/DAD-Bestimmungen wurde ein System der Firma Waters (Waters GmbH, Eschborn) mit einer Trennsäule der Firma Merck (Merck KGaA, Darmstadt) verwendet.

Probengeber:	Waters 717 Plus Autosampler
Pumpe:	Waters 1515 Isocratic HPLC Pump
Säulenofen:	Waters Column-Thermostat Jetstream 2 Plus
Detektor:	Waters 2996 Photodiode Array Detector
Trennsäule:	Merck LiChroCART 250-4, LiChrospher 60 RP-select B (5 µm)
Software:	Waters Empower Pro SP-K auf Microsoft Windows 2000 SP-4
Fließmittel:	312 g Acetonitril + 688 g Phosphatpuffer (6,66 g KH_2PO_4 + 4,8 g H_3PO_4 (85 %) ad 1000 g H_2O eingestellt auf pH 2,3 mit 85 % H_3PO_4 beziehungsweise 6 N NaOH)
Fluss:	1 ml/min
Injektion:	10 µl
DAD:	190-420 nm; Auflösung 1,2 nm; Aufnahmezeit 1 Spektrum/Sekunde

3.3.2 Das GC/MS-System

Für die GC/MS-Bestimmung wurde ein System der Firma Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet.

Probengeber:	Agilent 7683 Series Autosampler mit Agilent 7683 B Injector
GC:	Agilent 7890 A Gaschromatograph
Detektor:	Agilent 5975C Massenspektrometer
Trennsäule:	Agilent HP-5MS (30 m Länge; 0,250 mm I.D.; 0,25 µm Film)
Trägergas:	Helium
Software:	HP Enhanced ChemStation E.02.00.493 auf Microsoft XP SP-2
Library:	NIST 05 Spectral Library Revision D.05.00
Parameter:	Inlet 270 °C; Flow 0,9 ml/min Ofen: Start 60 °C, 2 min isotherm; 40 °C/min auf 110 °C, 0 min isotherm; 13 °C/min auf 300 °C, 25 min isotherm Scan range 33-550

3.4 Vorbereitende Verfahren

Zunächst wurde das hiesige HPLC/DAD-Screening auf seine Eignung zur Erfassung des Mitragynins und gegebenenfalls auch weiterer Mitragyna-Alkaloide überprüft. Als interner Standard (**IS**) wurde das hier üblicherweise benutzte Camazepam verwendet. Das HPLC/DAD-Screening-Verfahren besteht aus der Probenvorbereitung und der eigentlichen instrumentellen Analytik, das heißt der Injektion in das Analysengerät und der Auswertung der Messergebnisse.

3.4.1 Vorbereitung des Blattmaterials für die HPLC-Bestimmung

Der aktuellen Literatur [Azizi et al. 2010] folgend wurde ein methanolischer Auszug des Blattmaterials beziehungsweise Pulvers als Totalalkaloid- und somit Referenzextrakt verwendet. Zur Herstellung dieses Rohauszugs wurden zunächst 2,5 g des Blattmaterials (VIII) im Mörser gepulvert, in einem Glasgefäß mit 10 ml Methanol überschichtet und nach Durchmischen auf einem Vibrationsmischer (1 min) unter mehrmaligem Umschwenken etwa 24 Stunden ziehen gelassen. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und der Vorgang drei weitere Male wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand mit Methanol auf 2,5 ml aufgefüllt.

Von dem Rohauszug wurden 2 ml entnommen, eingeeengt, in 2 ml Wasser aufgenommen, einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (siehe Abschnitt 3.4.2) unterzogen und der so erhaltene Extrakt in 2 ml Methanol aufgenommen. Der Rohauszug und der durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnene Extrakt wurden zunächst mit einem HPLC/DAD-Screeningverfahren untersucht. Hierdurch sollten sowohl die gesamten Alkaloide als auch die extrahierbaren Alkaloide in ihrer Qualität erfasst werden.

3.4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion dient zur Entfernung störender Bestandteile im Untersuchungsmaterial und soll die Extrakte einheitlich für die Verwendung sowohl im HPLC/DAD-System als auch im GC/MS-System vorbereiten. Bei der HPLC/DAD-Analytik könnten zwar wässrige Proben prinzipiell auch direkt analysiert werden, was jedoch bei der GC/MS-Analytik nicht möglich ist. Für diese müssen die Analyten letztlich in einem leichtflüchtigen Lösemittel gelöst vorliegen. Weiterhin müssen die Analytkonzentrationen in den zu messenden Lösungen auf den Messbereich der Analysengeräte angepasst werden.

Das Untersuchungsmaterial, das der Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen werden soll, muss zuvor mindestens auf die nachfolgend genannten Standardbedingungen eingestellt werden: Die Probe muss soweit wie möglich frei von organischen Lösemitteln sein, um definierte Phasenverhältnisse (organisch/wässrig) zu erhalten. Der pH-Wert soll ungepuffert im Bereich zwischen pH 5 und 9 liegen und das Probenmaterial soll, sofern es sich nicht um eine Lösung handelt, homogenisiert beziehungsweise fein zerkleinert und in Wasser aufgeschlämmt vorliegen.

Von dem zu untersuchenden, auf Standard-Bedingungen eingestellten Material werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß

- 600 µl Probenmaterial mit
- 100 µl Carbonatpuffer (1,70 g Na₂CO₃ + 15,48 g NaHCO₃ ad 200 ml H₂O, pH 8,6) und
- 20 µl Camazepam-Lösung auf dem Vibrationsmischer gemischt und dann mit
- 1000 µl Extraktionsmittel (Dichlormethan/Diethylether 70/30 v/v) ausgeschüttelt.

Das Extraktionsgemisch wird mit 14.000 U/min zentrifugiert. Der erhaltene Unterstand wird abgelassen, indem das Gefäß mit einer Präpariernadel senkrecht durch Deckel und Boden durchstoßen und die Nadel soweit wieder zurückgezogen wird, dass durch die untere Öffnung der Unterstand in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß abfließt. Zur Belüftung wird zuvor ein weiteres Loch im Deckel angebracht. Nach dem Ablassen der gewünschten Menge des Unterstandes wird ein weiteres Abfließen durch Verschließen des Loches mit der Nadel verhindert. Der Extrakt wird mit einer Spatelspitze wasserfreiem Natriumsulfat versetzt und erneut zentrifugiert. Der so erhaltene wasserfreie Extrakt wird in ein Probengebergefäß überführt, bei etwa 50 °C unter einem Stickstoffstrom eingengt und in 50 µl Methanol aufgenommen. Diese Lösung kann für beide Chromatographiesysteme (GC und HPLC) verwendet werden. Für größere Mengen an Untersuchungsmaterial wird ein entsprechendes Vielfaches in einem ausreichend großen Reaktionsgefäß (Reagenzglas) angesetzt. Der Unterstand wird mit einer Pasteur-Pipette, ohne dass Teile der wässrigen Phase mitgenommen werden, abgenommen und wie bei der vorbeschriebenen Methode weiterbehandelt.

3.4.3 Fraktionierung der Alkaloide

Nach der Vorauswahl wurden 120 µl einer Verdünnung des Flüssig-Flüssig-Extrakts (1:25) in 12 Portionen in das HPLC/DAD-System injiziert. Am Detektorausgang wurden separat diejenigen Tropfen gesammelt, die während der Detektion der jeweiligen Peaks austraten. Aufgrund der schlechten Trennung der Peaks 7 und 7a sowie der Peaks 8 und 8a wurden diese jeweils gemeinsam als Peak 7 beziehungsweise Peak 8 aufgefangen. Weiterhin wurde in einem Bereich, in keine Signale erhalten wurden (bei einer Retentionszeit von etwa 19 min) einige

Tropfen des am Detektor austretenden Fließmittels zur Herstellung des Leerextraktes gesammelt. Diese 12 Portionen wurden nach Fraktionen getrennt vereinigt, die pH-Werte neutral eingestellt, das Acetonitril soweit wie möglich unter N₂ abgedampft und diese Lösungen anschließend einer Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen. Die so erhaltenen Extrakte wurden zunächst erneut in das HPLC-System injiziert.

3.5 GC/MS-Analyse der Alkaloide

Sowohl der Flüssig-Flüssig-Extrakt, als auch die Extrakte der einzelnen Fraktionen sowie der Extrakt des Leerextraktes wurden mit dem GC/MS-Screeningverfahren (siehe Abschnitt 3.3.2) untersucht. Weiterhin wurde eine empfindliche SIM-Methode zur Erfassung ausgewählter Mitragyna-Alkaloide entwickelt.

3.5.1 Identifizierung der Alkaloide in den Fraktionen

Zur Identifizierung der verbleibenden Peaks wurde zunächst die Spektrenbibliothek (NIST05) herangezogen. Die Spektren, für die sich dort keine Übereinstimmung fand, wurden anhand von Literaturdaten eingeordnet. Hierzu wurden die aus diversen Quellen zusammengetragenen, meist in Textform angegebenen Spektrencharakteristika mit Hilfe eines von uns eigens für diesen Zweck entwickelten Excel-Programms in die im Ergebnisteil abgebildeten graphische Spektren übersetzt, um diese optisch mit den durch die hier beschriebenen Experimente erhaltenen Spektren vergleichen zu können.

Zusätzlich wurden die in der Literatur angegebenen Charakteristika der Fragmentierung in Abhängigkeit von der Stereochemie der Alkaloide zur Unterscheidung der verschiedenen Isomere herangezogen.

3.5.2 SIM-Methode zur Erfassung ausgewählter Mitragyna-Alkaloide

Nach der qualitativen Bestimmung der enthaltenen Substanzen wurde eine sensitivere Messmethode erstellt, die statt kompletter Massenspektren nur ausgewählte Massen erfasst. Durch die Beschränkung auf wenige Massen wird eine deutlich höhere Empfindlichkeit erzielt. Diese Single-Ion-Monitoring (SIM) Methode wurde mit dem gleichen Temperaturprogramm wie bei der qualitativen Analyse erstellt.

Alkaloid-Typ	Ausgewählte Massen (m/z)
9-H-Corynantheidin-Typ	368, 353, 239, 225
9-Methoxy-Corynantheidin-Typ	398, 383, 269, 255
9-Methoxy-20-Vinyl-Corynantheidin-Typ	396, 381, 267, 253
9-H-Rhynchophyllin-Typ	384, 239, 224, 210
9-Hydroxy-Rhynchophyllin-Typ	400, 239, 224, 210
9-Methoxy-Rhynchophyllin-Typ	414, 239, 224, 210
9-Hydroxy-20-Vinyl-Rhynchophyllin-Typ	398, 192, 162, 146

Tabelle 5: Auswahl der Massen für die SIM-Methode

Erfasst werden sollen jeweils vier charakteristische Vertreter jeder Alkaloidgruppe (siehe Tabelle 5). Dies sind zusammengefasst: m/z 146, 162, 192, 210, 224, 225, 239, 253, 255, 267, 269, 353, 368, 381, 383, 384, 396, 398, 400, 414. Bei einer dwell-time von 20 ms je Ion ergibt sich daraus eine Datenaufnahmerate von 2,29 cycles/s, so dass auch bei schmaleren Peaks (< 10 s) eine ausreichende Auflösung gewährleistet ist.

3.6 Quantitative Analyse ausgewählter Alkaloide

Zunächst musste das für die Quantifizierung vorgesehene Analysengerät (HPLC/DAD) für die Messung kalibriert werden.

3.6.1 Kalibration des HPLC-Systems für die Quantifizierung von Mitragynin

Zum Einen wurde eine „Lösemittelkalibration“ verwendet, bei der die Referenzsubstanz in methanolischer Lösung direkt in verschiedenen Konzentrationen injiziert wurde. Zum Anderen wurden wässrige Lösungen der Referenzsubstanz einer Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen und dann injiziert. Allen Proben wurde zur Ermittlung der Extraktionsverluste und zur Kontrolle der Retentionszeiten als interner Standard Camazepam hinzugefügt.

Die hierzu hergestellten Kalibratoren entsprachen Proben, die nach Standardaufarbeitung (Flüssig-Flüssig-Extraktion von 600 µl Untersuchungsmaterial, siehe Abschnitt 3.4.2) die Mitragyninkonzentrationen 0 / 7,5 / 12,5 / 20 / 40 / 75 / 125 / 200 und 400 ng/ml zeigen.

Für beide Modelle wurden die Linearität, der Korrelationskoeffizient der linearen Regression, die Bestimmungs- und Nachweisgrenze sowie aus beiden zusammen die Übereinstimmung von „Lösemittelkalibration“ und „extrahierter Kalibration“ und die

Extraktionswiederfindung bestimmt. Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels Verwendung der für die Validierung vorgesehenen Software Valistat.

3.6.2 Methanolische Auszüge der Pulverproben

Zunächst wurde in einem Vorversuch der Mitragyningehalt im methanolischen Rohauszug des Blattmaterials (VIII) bestimmt. Es wurden jeweils etwa 20 mg des gepulverten Blattmaterials einmal mit dem 1000fachen Volumen Methanol und einmal mit dem 1000fachen Volumen eines 80 %igen Methanol/Wasser-Gemischs (MeOH/H₂O) ausgezogen. Dieses Methanol-Wasser-Gemisch erzielte nach Kikura-Hanajiri zumindest in Bezug auf das 7-OH-Mitragynin die höchste Extraktions-Ausbeute [Kikura-Hanajiri et al. 2009]. Hier wurde das überschichtete Blattmaterial 15 min in einem Ultraschallbad und anschließend 45 min auf einem Rollenmischer ausgezogen.

Die Alkaloidkonzentrationen in den weiteren Pulverproben wurden mit Hilfe der Auszugsmethode bestimmt, die bei dem Vorversuch die höhere Ausbeute zeigte. Dies war der vorgenannte Auszug mit einem 80 %igen Methanol/Wasser-Gemisch.

Neben den rein methanolischen Auszügen (Rohauszug, siehe Abschnitt 3.4.1) wurden auch Auszüge mit „konsumfähigen“ Mitteln hergestellt: also mit Extraktionsmitteln (Wasser und Trinkalkohol), die in vergleichbarer Form für jedermann verfügbar sind und mit denen Extrakte herzustellen sind, die den Zubereitungen zumindest von sich aus keine ungenießbaren beziehungsweise giftigen Substanzen hinzufügen. Dies soll Bedingungen nachstellen, die auch für Laien realisierbar sind. Hierzu zählen das Kochen von Tee sowie das alkoholische Ausziehen von Kräutern in Form eines „Aufgesetzten“. Es soll geprüft werden, welche Wiederfindungen für die einzelnen Alkaloide bei den verschiedenen Auszugsmethoden erreicht werden können und ob die Art des Auszugs einen Einfluss auf das Alkaloidmuster hat.

3.6.3 Ethanolische Auszüge des Blattmaterials

Zunächst wurde geprüft, welches Ethanol/Wasser-Gemisch die am Besten geeigneten Bedingungen für einen Auszug aus dem Pflanzenmaterial besitzt. Hierzu wurden Ethanol/Wasser-Gemische mit Ethanol-Gehalten von 20 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % (v/v) sowie reines Wasser und reines Ethanol getestet.

Etwa 20 mg des im Mörser gepulverten Blattmaterials (VIII) wurden mit dem 100fachen Volumen des eingewogenen Gewichts (etwa 2 ml) der bereitgestellten Lösungen (0 % - 100 % Ethanol in Wasser, siehe oben) überschichtet und unter mehrmaligem Umschwenken etwa 24 Stunden stehen gelassen. Diese ethanolischen Auszüge wurden nach Verdünnung (1:10) mit Wasser einer Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen und die Extrakte in das HPLC-System injiziert. Als Referenzwert wurde ein gleichartig hergestellter methanolischer (100 % Methanol) Auszug verwendet.

Für die weiteren Versuche wurde das Auszugsmittel auf 80 Volumen-% Ethanol in Wasser - analog zum Methanol-Wasser-Gemisch - festgelegt. Mit diesem Auszugsmittel wurden die verbleibenden Pulverproben (I - VII und IX - XIII) identisch zu den methanolischen Auszügen (siehe Abschnitt 3.6.2) extrahiert und in das HPLC-DAD-System injiziert.

3.6.4 Teezubereitungen

Etwa 20 mg des im Mörser gepulverten Blattmaterials (VIII) wurden mit dem 100fachen Volumen des eingewogenen Gewichts (etwa 2 ml) Wasser überschichtet und verschlossen im Wasserbad für 2, 4, 6 und 8 Stunden siedend gekocht. 2 Stunden werden von Yachay als typische Kochzeit angegeben [Yachay 2006], wobei eine mögliche Ausbeuteverbesserung durch längere Kochzeiten geprüft werden sollte.

Parallel dazu wurden in gleicher Weise vorbereitete Proben bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Ablauf der jeweiligen Einwirkzeiten wurden die Überstände abgenommen. Zusätzlich wurde eine weitere Probe nach Überschichtung mit kaltem Wasser kurz auf dem Vibrationsmischer gemischt und der Überstand direkt abgenommen.

Von den Überständen wurden je 60 µl mit 540 µl Wasser versetzt und diese Verdünnung einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (siehe Abschnitt 3.4.2) unterzogen.

4 Ergebnisse

4.1 HPLC-Bestimmung von Mitragynin aus Mitragyninpikrat

Die Injektion von Mitragyninpikrat ergab zwei Signale im HPLC/DAD-System.

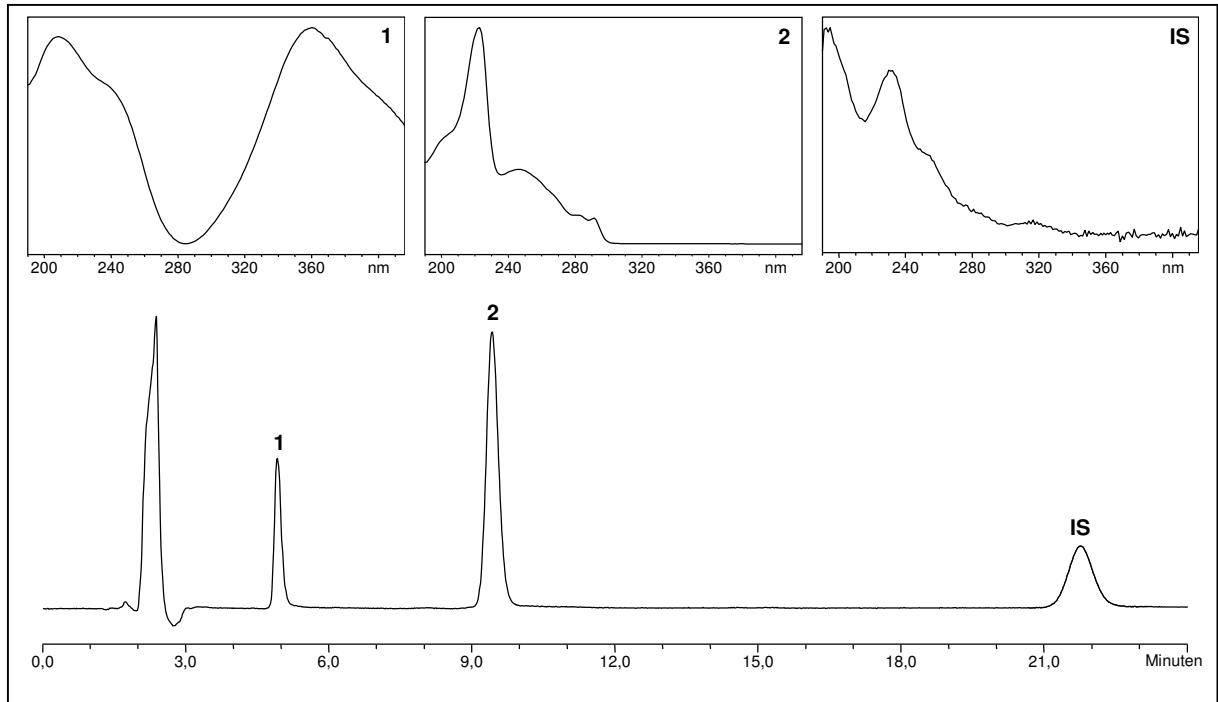


Abbildung 14: Chromatogramm (220 nm) einer Injektion von Mitragyninpikrat und Camazepam in methanolischer Lösung (unten). Die Spektren der erhaltenen Signale sind oben dargestellt: Pikrinsäure (Peak 1, links), Mitragynin (Peak 2, mittig), Camazepam (Peak IS, rechts).

Die Identität des Spektrums von Peak 2 als Mitragynin (**MG**) konnte durch Vergleich mit Literaturangaben [Kikura-Hanajiri et al. 2009] bestätigt werden.

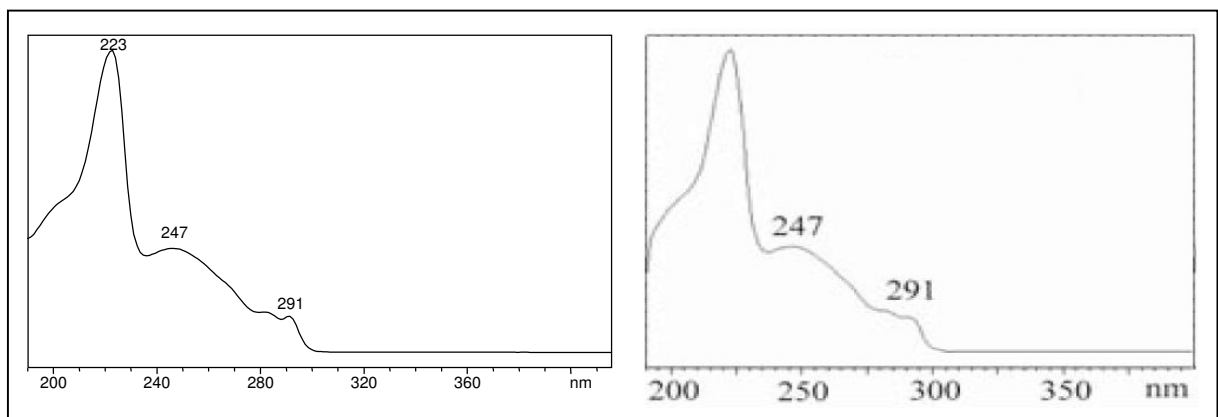


Abbildung 15: Spektrum des Peaks 2 (siehe Abbildung 14) im Vergleich zu einem Literaturspektrum (nach einer Abbildung) [Kikura-Hanajiri et al. 2009].

4.2 HPLC-Untersuchung des Blattmaterials

Sowohl die Injektion des Rohauszuges als auch die Injektion des daraus hergestellten Flüssig-Flüssig-Extraktes wiesen auf eine Vielzahl von Inhaltsstoffen hin.

4.2.1 Der Rohauszug

Die Einspritzung des Rohauszugs zeigte zahlreiche Peaks im Chromatogramm, wobei jedoch aufgrund der Matrixbelastung gerade im frühen Bereich die Signale deutlich überlagert waren.

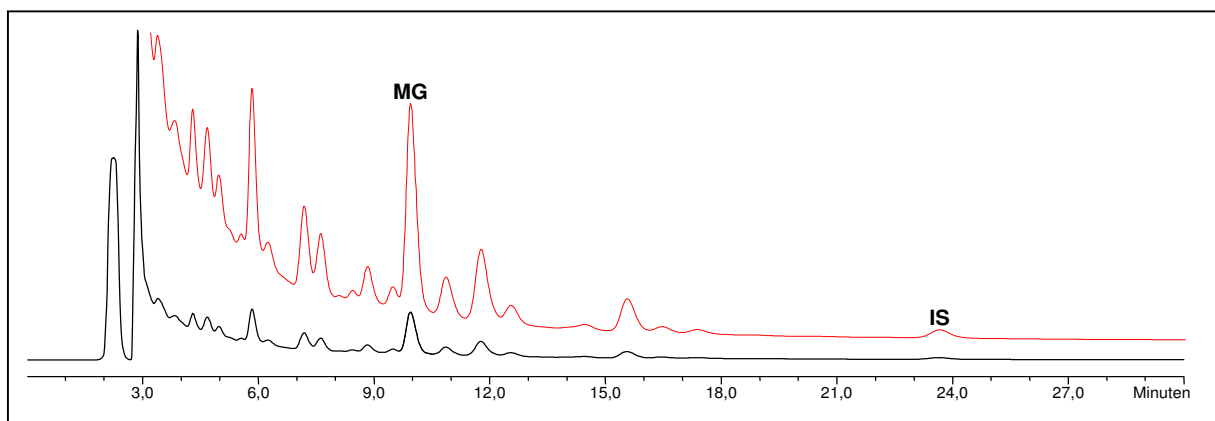


Abbildung 16: Chromatogramm (220 nm) einer Injektion des Rohauszuges. Mitragynin (MG) und der interne Standard (IS) konnten sofort zugeordnet werden. Rot über dem Chromatogramm befindet sich eine Ausschnittvergrößerung der darunter liegenden Kurve.

4.2.2 Der Flüssig-Flüssig-Extrakt

Nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion war eine deutliche Aufreinigung besonders im vorderen Bereich des Chromatogramms zu erkennen.

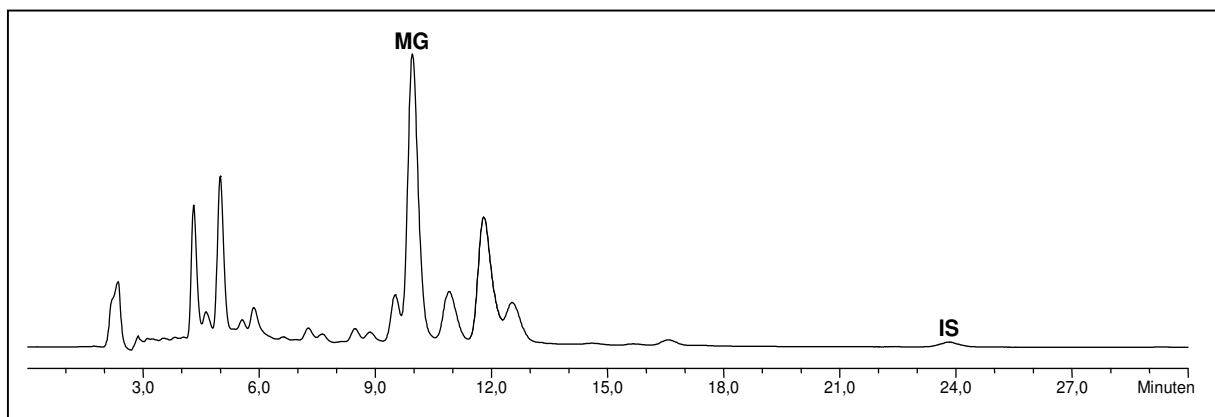


Abbildung 17: Chromatogramm (220 nm) einer Injektion des Flüssig-Flüssig-Extraktes.

4.3 Auswahl von Alkaloiden im Flüssig-Flüssig-Extrakt

Da zur Identifizierung der Alkaloide eine Fraktionierung erfolgen sollte, wurden diejenigen Substanzen ausgewählt, die nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion noch eine ausreichende Wiederfindung zeigten und bei denen aufgrund von Gemeinsamkeiten in den UV-Spektren eine Gruppierung vorgenommen werden konnte. Abbildung 18 zeigt eine Vergrößerung des relevanten Ausschnitts aus Abbildung 17.

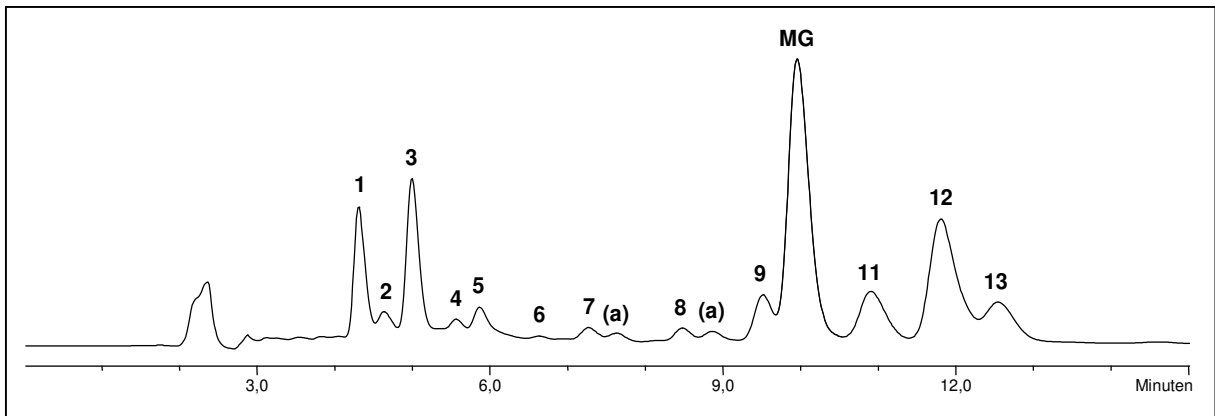


Abbildung 18: Ausschnitt eines Chromatogramms (220 nm) einer Injektion des Flüssig-Flüssig-Extraktes. Als fraktionierbar wurden 13 Peaks eingestuft. Peak 7 und 8 hatten je einen nicht sicher abgetrennten Nachbarpeak; diese sind als 7a und 8a bezeichnet. Mitragynin (MG) ist Peak 10.

Nicht in die weiteren Betrachtungen einbezogen wurden drei Peaks, die im Chromatogramm bei 14,6 min, 15,7 min und 16,6 min erkennbar waren. Die Signale waren nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion nur noch sehr klein und die Spektren wichen stark von den übrigen Spektren ab (siehe Abbildung 19). Ebenfalls nicht weiter betrachtet wurde das Signal zu Beginn des Chromatogramms (etwa 2 bis 2,5 min), das erfahrungsgemäß durch mehrere, nicht bei den gewählten Bedingungen aufgetrennten Substanzen erzeugt wird. Eine Auftrennung unter veränderten Bedingungen wurde nicht durchgeführt.

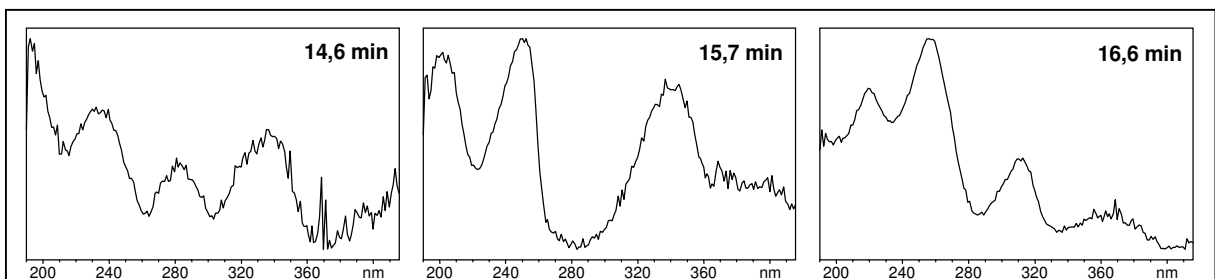
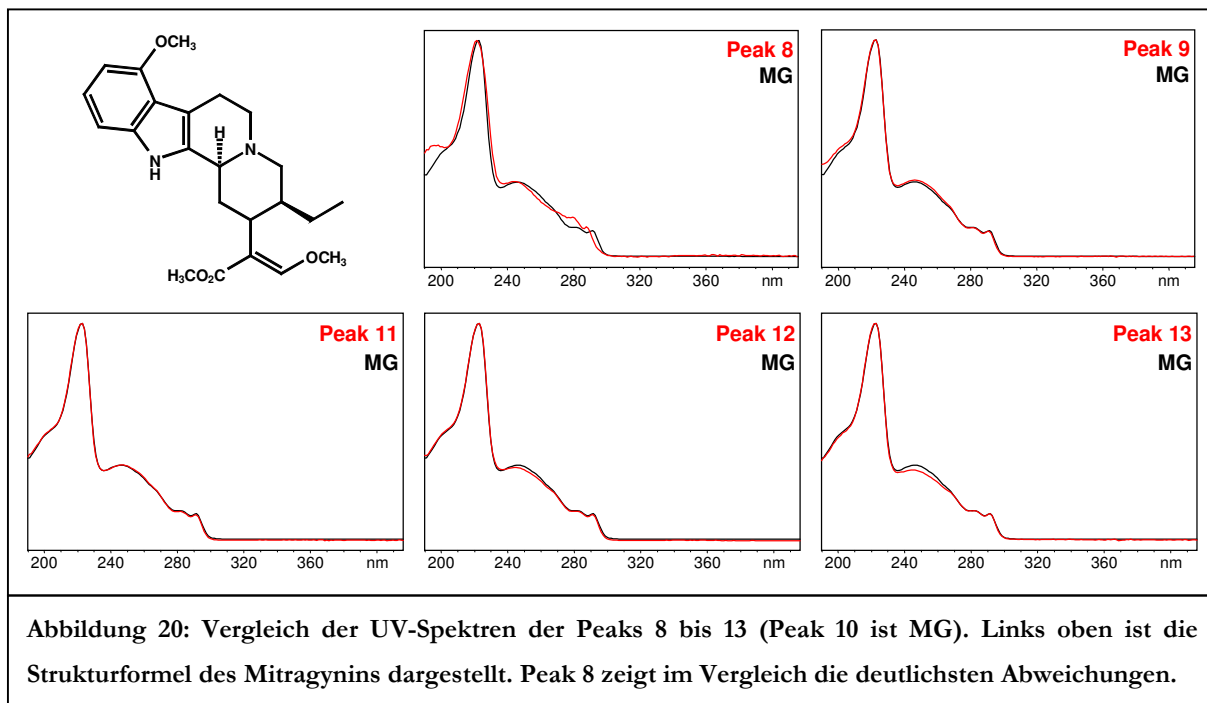
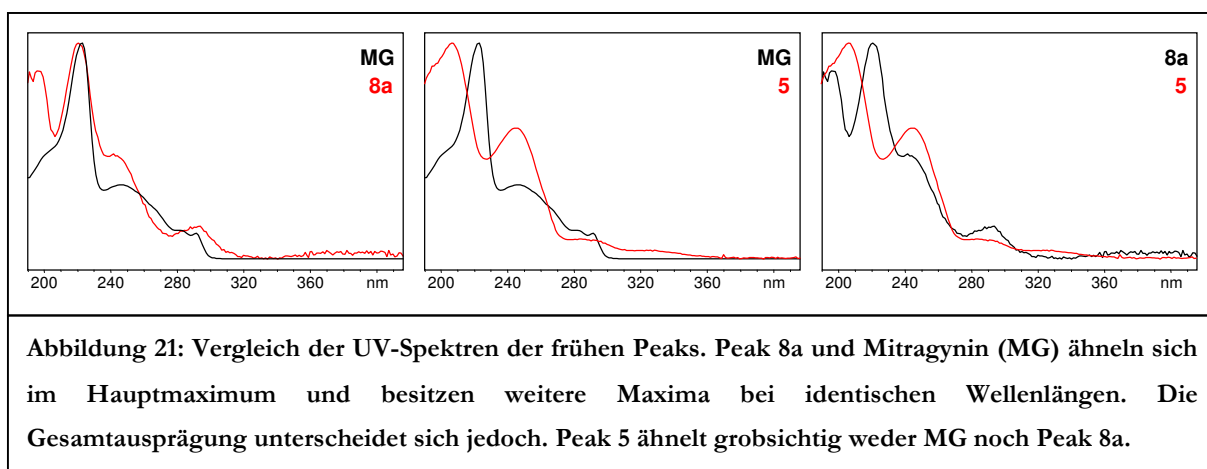


Abbildung 19: Darstellung der Spektren der nicht weiter beachteten Signale nach 14 min.

Zunächst wurden die Peaks ausgewählt, die ein dem Mitragynin vergleichbares Spektrum zeigten. Es handelt sich hierbei um die Peaks 8 bis 13, wobei Peak 10 das Spektrum des Mitragynins selbst ist. Das Hauptmaximum des Mitragyninspektrums (in den Spektren in Abbildung 20 schwarz hinterlegt) liegt bei 223 nm, weitere Maxima liegen bei 246, 282 und 291 nm.

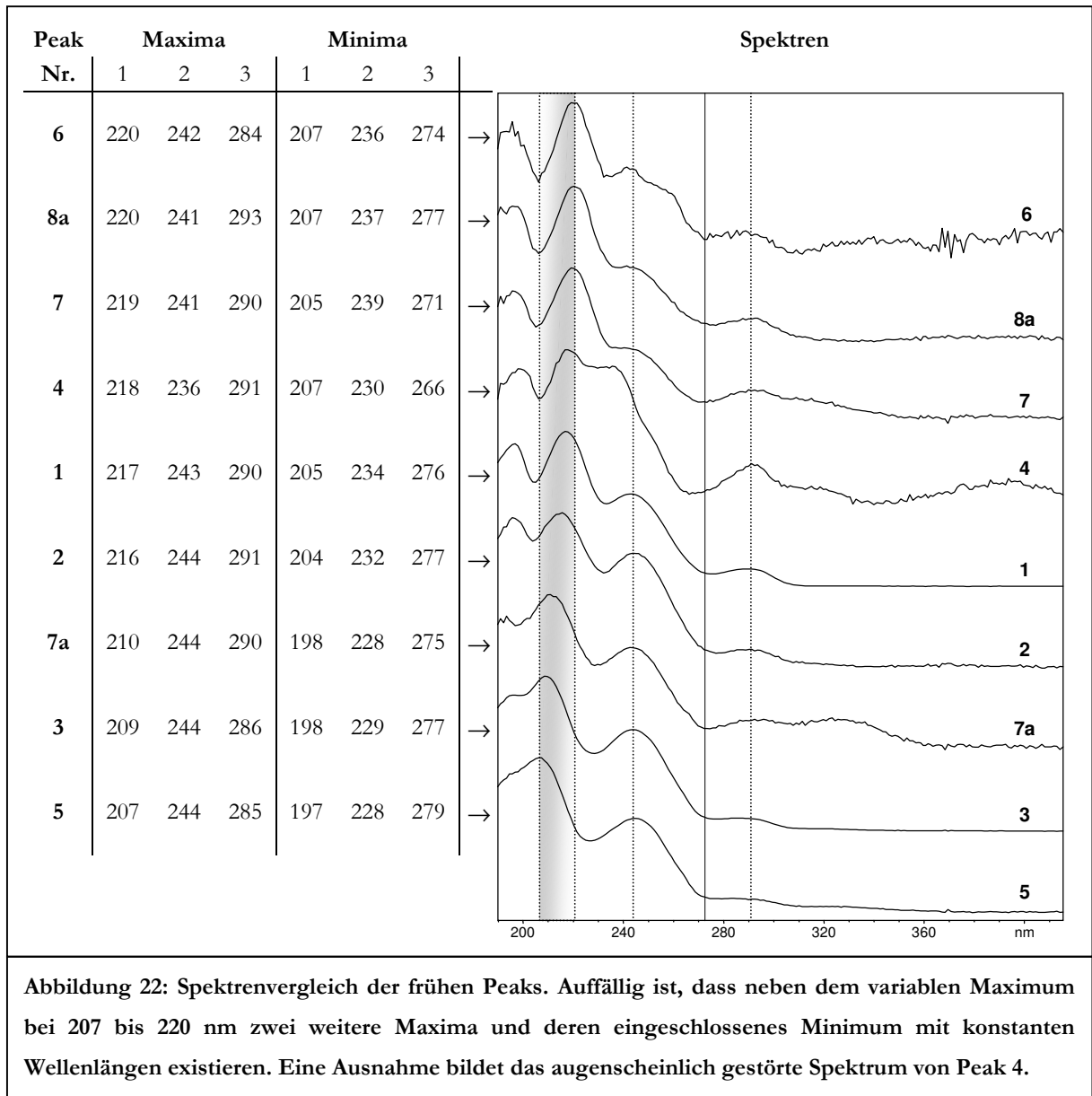


Es verblieben dann noch sieben (Peaks 1-7) beziehungsweise neun (inklusive Peaks 7a und 8a) Signale, die in die weiteren Untersuchungen einbezogen wurden. Die Spektren dieser Peaks ähnelten zum Teil dem Mitragyninspektrum, andere wichen aber deutlich davon ab. Bei näherer Betrachtung zeigten sie aber zueinander Gemeinsamkeiten, so dass diese in einer weiteren großen Gruppe zusammengefasst wurden.



Der Vergleich dieser Spektren ergab untereinander vergleichbare Maxima bei höheren Wellenlängen, was auf eine gewisse strukturelle Verwandtschaft hinweisen könnte, aber

Unterschiede bei dem stärker ausgeprägten Maximum im kurzwelligen Bereich des Spektrums. Dieses Hauptmaximum findet sich in den dargestellten Spektren bei Wellenlängen zwischen 207 und 220 nm. Weitere Abweichungen finden sich in den Spektren 4, 6 und 7a, die eine insgesamt schlechtere Spektrenqualität zeigen und von den kleinsten Signalen im Chromatogramm stammen.



4.4 Alkaloid-Fractionen

Die Injektion der Flüssig-Flüssig-Extrakte der am HPLC-System gewonnenen Fraktionen zeigte in jedem Fall als Hauptkomponente ein Signal zu den Retentionszeiten, zu denen die

jeweiligen Fraktionen gewonnen wurden, sofern das Signal zu Beginn des Chromatramms (2 bis 2,5 min) unberücksichtigt bleibt (siehe oben). Der Leerextrakt war frei von größeren Signalen.

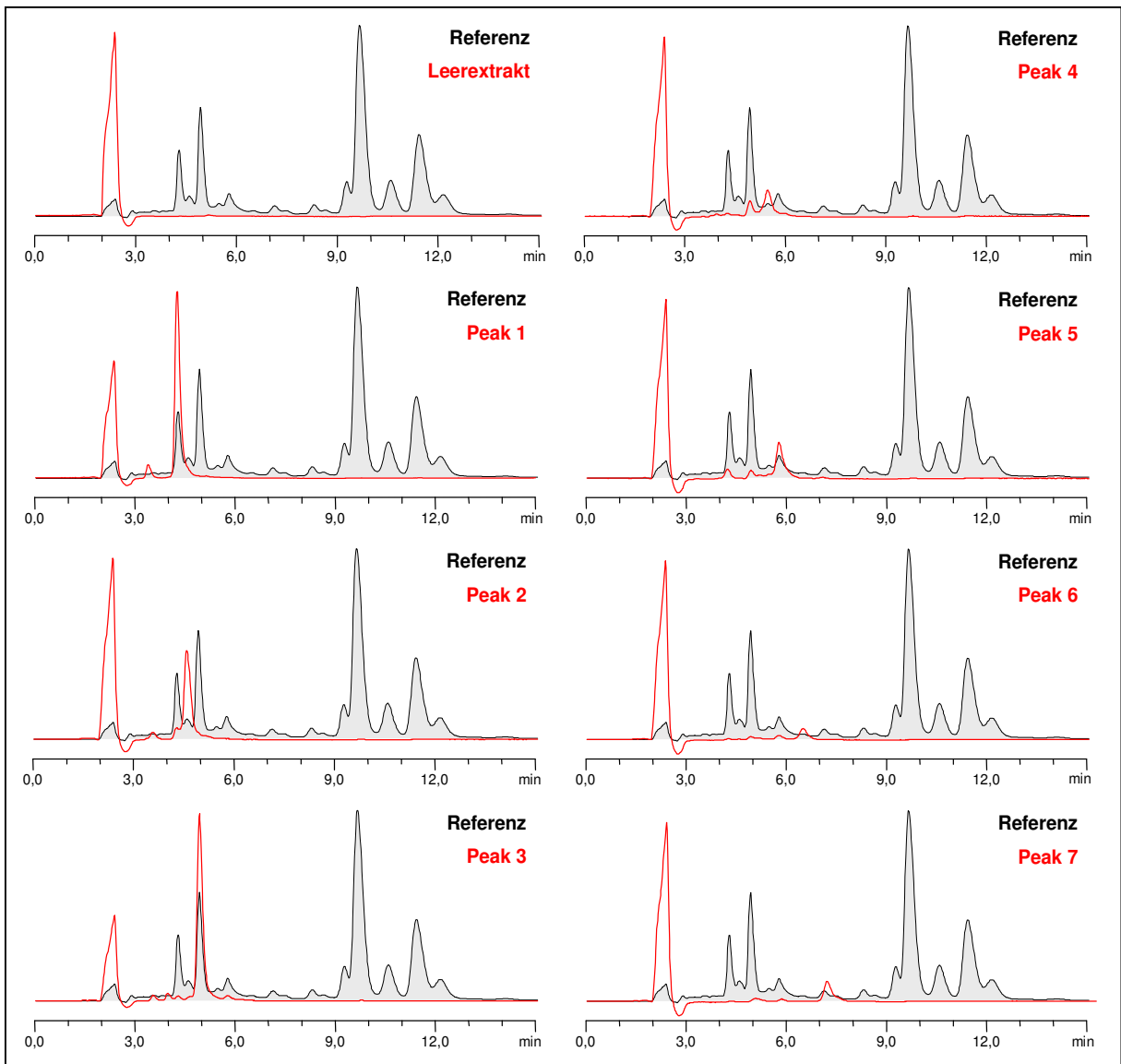
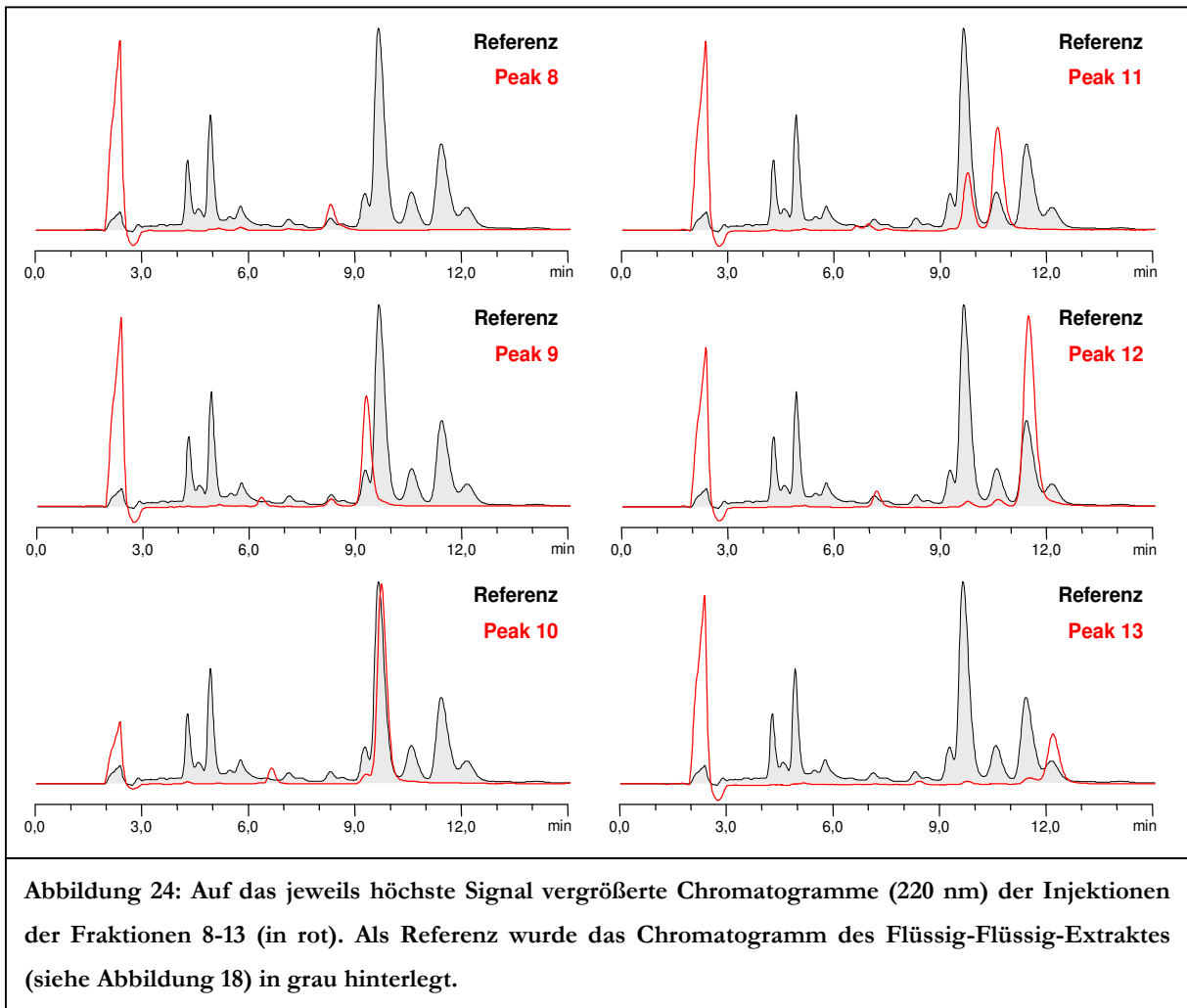


Abbildung 23: Auf das jeweils höchste Signal vergrößerte Chromatogramme (220 nm) der Injektionen der Fraktionen 1-7 sowie eines Leerextraktes (in rot). Als Referenz wurde das Chromatogramm des Flüssig-Flüssig-Extraktes (siehe Abbildung 18) in grau hinterlegt.

Die Hauptsignale zeigten Spektren, die identisch zu den Spektren der korrespondierenden Signalen in der Injektion des vor der Fraktionierung injizierten Flüssig-Flüssig-Extraktes waren. Neben den Hauptsignalen erscheinen auch weitere, meist kleinere Signale.

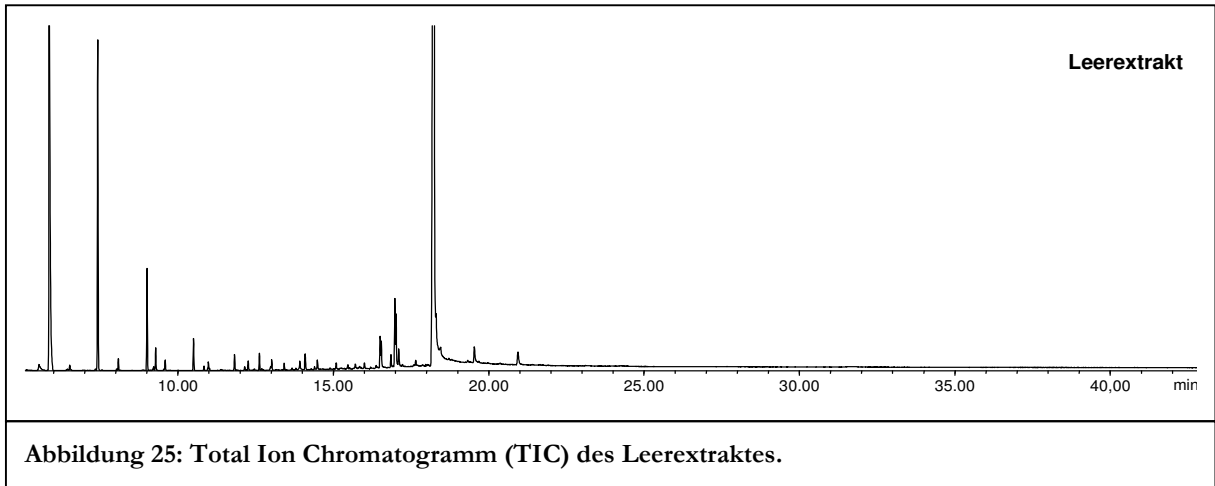


4.5 GC/MS-Identifizierung der Alkaloide

Da die Quantifizierung der Alkaloide mittels HPLC vorgenommen werden sollte, mussten die Substanzen in den Fraktionen 1-13 zunächst identifiziert werden. Die Identifizierung erfolgte im GC/MS-System, wozu die den einzelnen Peaks zugrundeliegenden Substanzen getrennt eingespritzt wurden, um sie den Peaks in beiden Systemen richtig zuordnen zu können. Hierzu wurden die Extrakte der zuvor mit Hilfe des HPLC/DAD-Systems gewonnenen Fraktionen verwendet. Zudem wurde ein Extrakt einer Fraktion hergestellt, die im HPLC/DAD-System an einer Stelle des Chromatogramms gesammelt wurde, an der keine Substanzen durch das Photometer detektiert wurden (Leerextrakt, siehe Abschnitt 3.4.3).

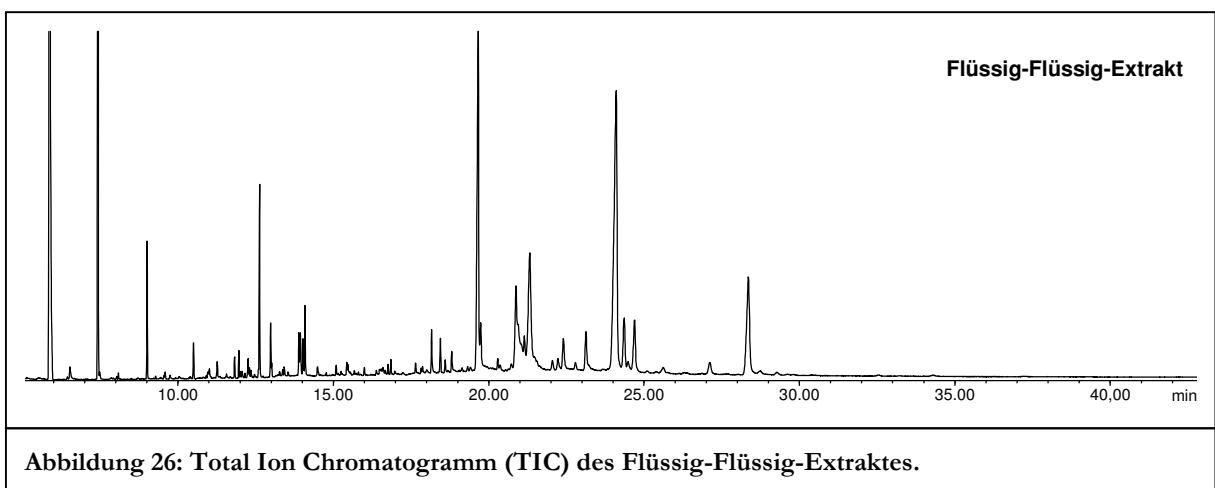
4.5.1 Identifizierung mittels Vergleichsspektren und Literaturangaben

Bei der Injektion des Leerextraktes in das GC/MS-System zeigten sich zahlreiche Signale, die dem Fließmittel oder der Aufarbeitung entstammen.



Die erhaltenen Spektren wurden zunächst mit den Spektren einer Software-Library (NIST05) verglichen, um die den Peaks zugrundeliegenden Substanzen zu identifizieren.

Bei den Signalen handelt es sich vorwiegend - soweit identifizierbar - um Fettsäuren oder Fettsäurederivate, Säulenmaterial (Siloxane) und Weichmacher (Phthalate). Im Vergleich zum Leerextrakt finden sich in dem Flüssig-Flüssig-Extrakt des Blattauszugs weitere Peaks vorrangig zu späteren Retentionszeiten.



Nach der Überprüfung der Signale, die nicht bereits im Leerextrakt vorhanden waren, wurde der Retentionszeitenbereich der Übersichtlichkeit halber auf den Bereich von 19 bis 26 Minuten eingegrenzt. Die zusätzlichen Peaks im vorderen Retentionszeitenbereich waren hauptsächlich weitere Fettsäuren. Das große Signal bei 28,4 min, das außerhalb der gewählten Ausschnittvergrößerung lag, wurde per Spektrenvergleich mit der Bibliothek mit einer

Übereinstimmungsqualität von 92 (100 beziehungsweise 99 steht für ein identisches Spektrum) als Ursolsäurederivat (siehe Abschnitt 1.2) erkannt; das kleinere Signal davor (27,1 min), auch außerhalb des gewählten Bereichs, zeigt in seinem Spektrum ebenfalls Ähnlichkeiten zu diesem Ursolsäurederivat.

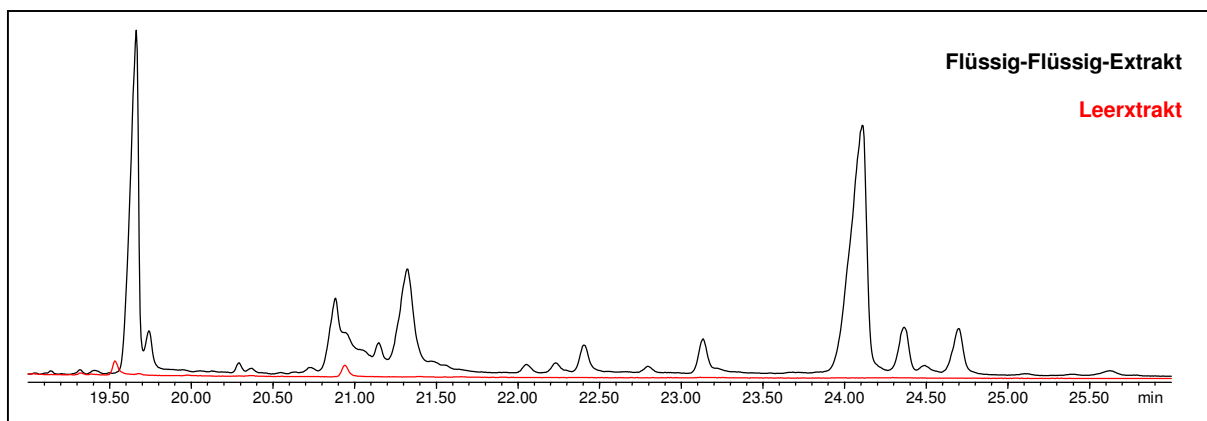


Abbildung 27: Total Ion Chromatogramm (TIC) des Flüssig-Flüssig-Extraktes und des Leerextraktes im Bereich von 19 bis 26 Minuten. Beide Chromatogramme sind im gleichen Maßstab dargestellt.

Die Peaks, die bei 20,94 min und bei 19,53 min im Leerextrakt erscheinen und in fast allen Extrakten auftauchen, sofern sie nicht überlagert sind, wurden bei der späteren Betrachtung der Einzelpeaks (die aufgrund der Aufarbeitung keine definierte Verdünnung des methanolischen Extraktes mehr darstellen) als Zeit- und Größenmaßstab herangezogen.

Durch Darstellung des Chromatogramms aus Abbildung 27 in Form der Ionenspuren der Molekülmassen von ausgewählten (Ox-)Indolen werden potentielle Alkaloide angezeigt (siehe Abbildung 28).

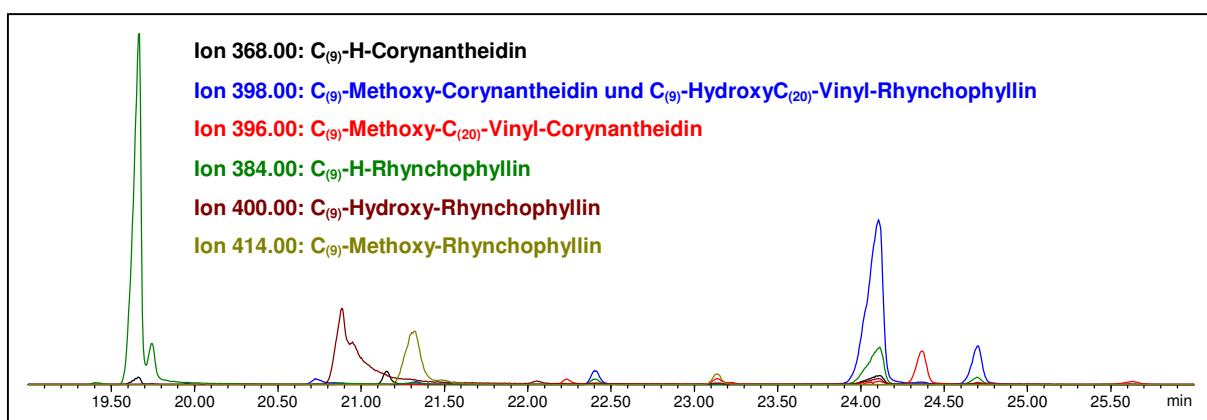


Abbildung 28: Extracted Ion Chromatogramm (EIC) des methanolischen Extraktes. Abgebildet sind die Molekülmassen der Vertreter der ausgewählten (Ox-)Indole (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4).

Es finden sich im GC/MS-Chromatogramm in fast allen Peaks des Chromatogramms Signale, die die Molmassen von Corynantheidinen oder Rhynchophyllinen beinhalten.

4.5.1.1 Fraktion 1

Im GC/MS-Chromatogramm finden sich neben den beiden Peaks, die auch im Leerextrakt vorkommen (x, y), drei weitere Signale, von denen das größte Signal bei 20,87 min (b) zu finden ist.

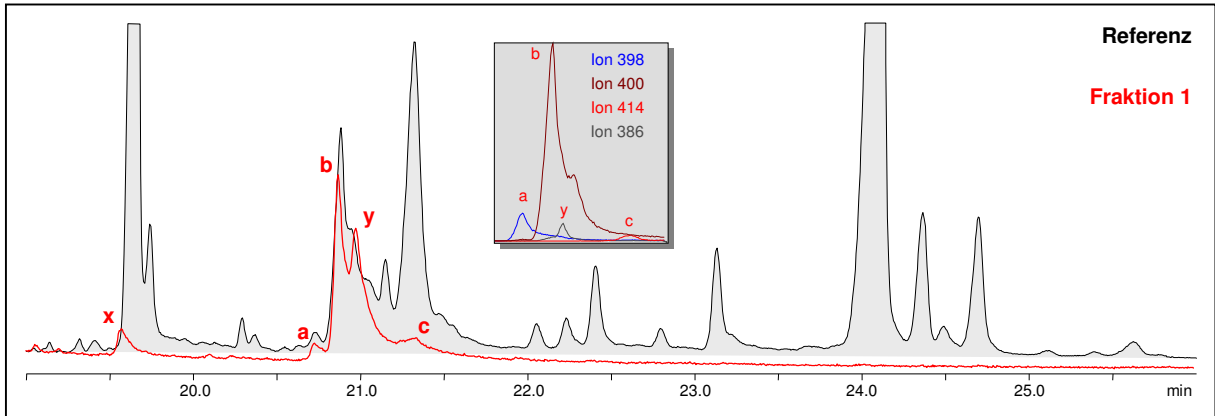


Abbildung 29: GC/MS-Chromatogramm (TIC) der 1. Fraktion. Als Referenz wurde das Chromatogramm des methanolischen Extraktes grau hinterlegt (Maßstäbe verändert). Die Spuren der angegebenen Ionen im Bereich der Peaks a-c und y wurden im Kasten hervorgehoben dargestellt.

Da auch Peak y bei etwa 21 min Ionen enthält, die nicht zum Spektrum dieses Peaks, wohl aber zu den gesuchten Substanzen gehören, kann nicht ausgeschlossen werden, dass darunter auch ein weiteres Signal zu finden ist.

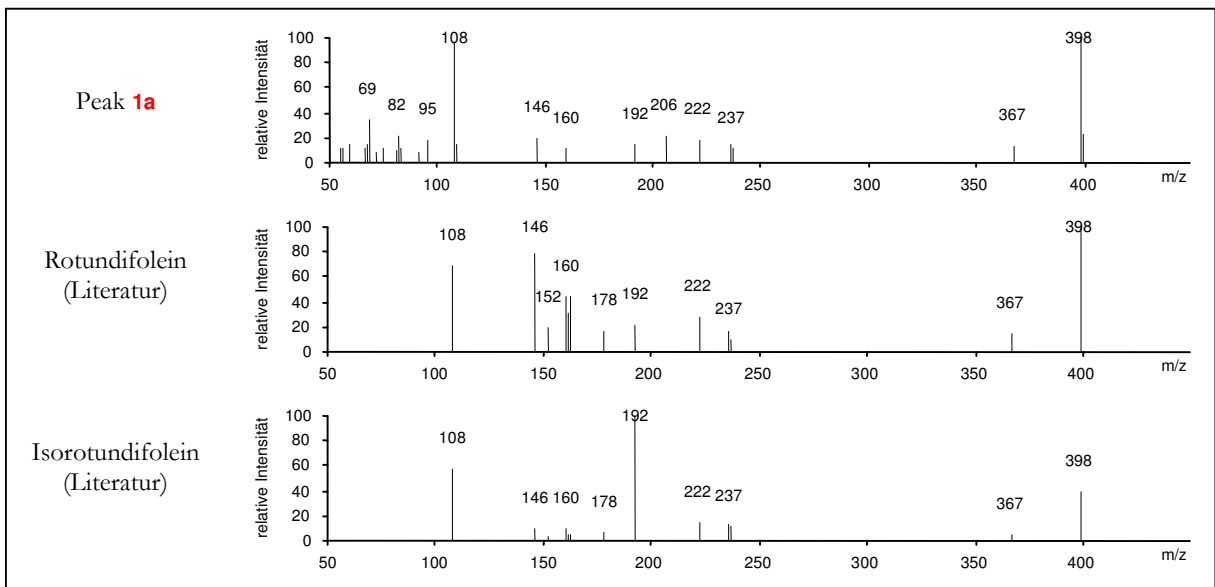
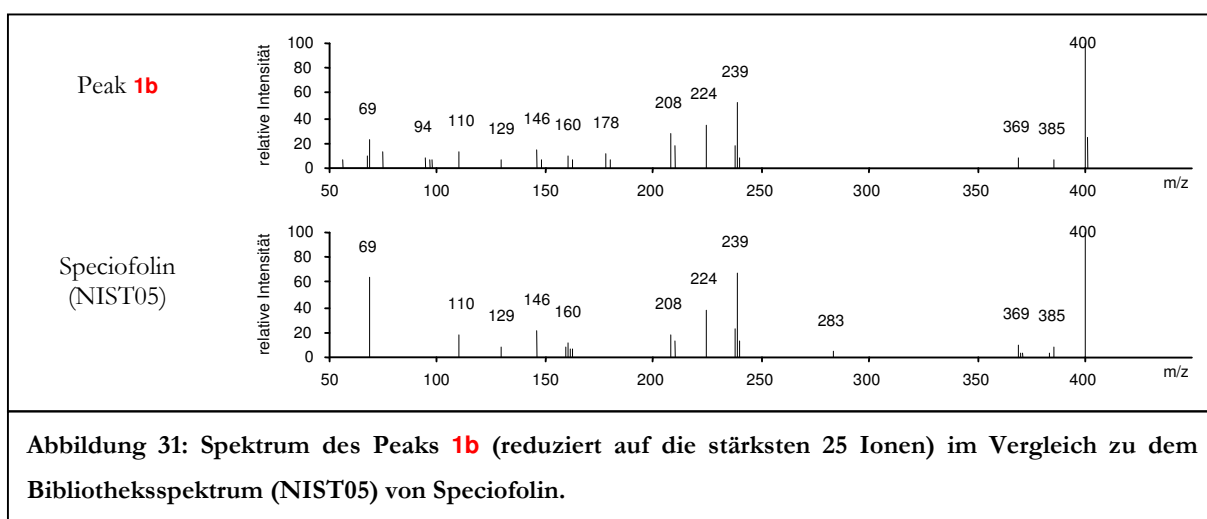
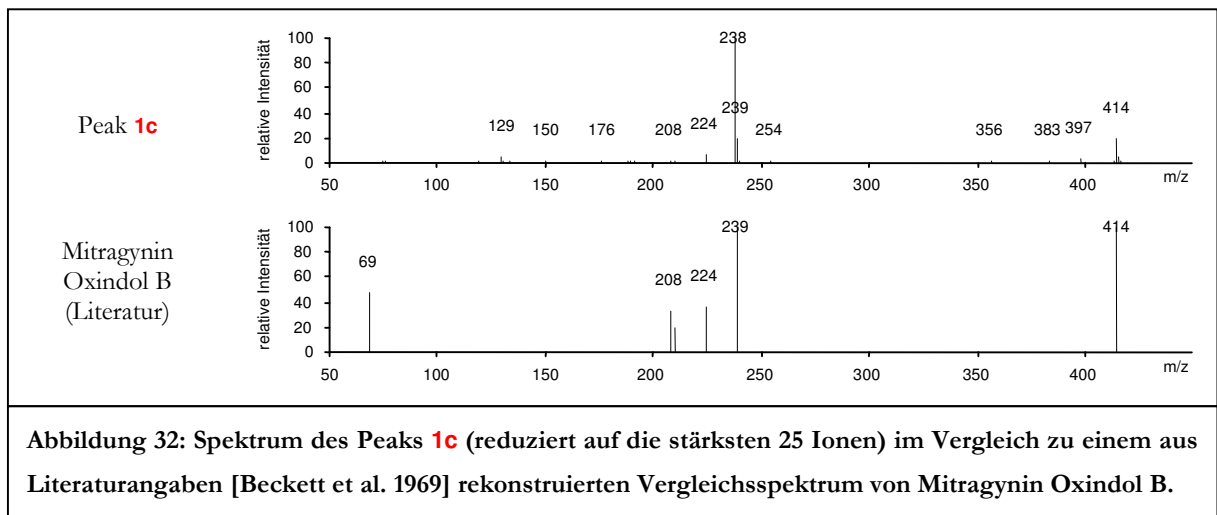


Abbildung 30: Spektrum des Peaks 1a (reduziert auf die stärksten 25 Ionen) im Vergleich zu zwei aus Literaturangaben [Hemingway et al. 1975] rekonstruierten Vergleichsspektren von Rotundifolein und Isorotundifolein.

Das Spektrum zu Peak **1a** zeigte als mögliche Molmasse das Ion 398 an, was zugleich die Molmasse der Alkaloide vom $C_{(9)}$ -Hydroxy- $C_{(20)}$ -Vinyl-Rhynchophyllin-Typ und der vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Corynantheidin-Typ ist (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4). Die von uns verwendete elektronische Bibliothek (siehe oben) führte zu keinem brauchbaren Substanzvorschlag. Durch den Vergleich des Spektrums mit den Literaturdaten konnte es auf den erstgenannte Typ eingeschränkt werden. Eine eindeutige Zuordnung konnte jedoch nicht vorgenommen werden. Das Spektrum zu Peak **1b** (das größte Signal im betrachteten Teil des Chromatogramms) weist auf eine Molmasse 400 hin, welche gemäß Tabelle 4 die der Alkaloide vom $C_{(9)}$ -Hydroxy-Rhynchophyllin-Typ ist. In der Spektrenbibliothek sind vier Spektren dieser Gruppe enthalten (Mitrafolin, Isomitrafolin, Speciociliatin, 3-Epi-Isorotundifolein), von denen Speciofolin die beste Übereinstimmungsqualität (90) zeigte. Es ist jedoch anzumerken, dass die drei anderen genannten Substanzen in der Bibliothek nur mit außerordentlich stark reduzierten Spektren (wenige Massen) hinterlegt sind. Zudem unterscheiden sich diese Spektren nicht wesentlich. Die anderen vier Isomere dieser Gruppe sind überhaupt nicht in der Bibliothek enthalten, so dass der Bibliotheksvorschlag nicht eindeutig erscheint.



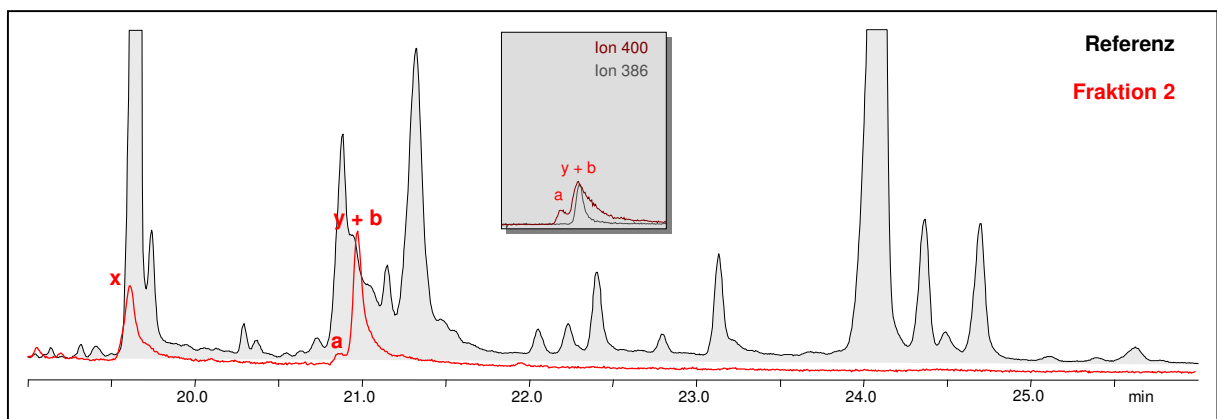
Peak **1c** weist im Spektrum auf eine Molmasse 414 hin, was die Molmasse der Alkaloide vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Rhynchophyllin-Typ ist. Aus dieser Gruppe sind keine Vertreter in der verwendeten Bibliothek enthalten. Der Vergleich mit dem Literaturspektrum (siehe Abbildung 32) erbrachte auch keine brauchbare Übereinstimmung. Die weiteren dort verlangten Massen sind nur ansatzweise vorhanden.



Insgesamt finden sich somit in der Fraktion 1 neben dem Hauptbestandteil, einem Vertreter der Alkaloide vom $C_{(9)}$ -Hydroxy-Rhynchophyllin-Typ (mit acht beschriebenen Isomeren) Hinweise auf die Anwesenheit geringer Mengen eines Alkaloids vom $C_{(20)}$ -Vinyl-Rhynchophyllin-Typ (zwei beschriebene Isomere).

4.5.1.2 Fraktion 2

Neben den beiden Peaks, die auch im Leerextrakt vorkommen (**x**, **y**), findet sich augenscheinlich nur ein weiteres Signal im GC/MS-Chromatogramm. Peak **y** bei etwa 21 min ist jedoch von einem Peak überlagert, der wie der kleine Peak davor (**a**), die Masse 400 beinhaltet.



Das Spektrum des Peaks **2a** ist identisch zu dem des Peaks **1b** und ist vermutlich durch eine nicht vollständige Trennung von Fraktion 1 und Fraktion 2 bei der Fraktionierung zu erklären.

Peak **2b** zeigt ein Mischspektrum mit dem überlagernden Peak **y**. Durch Subtraktion des normierten Spektrums von **y** der Leerextraktion wurde ein Spektrum gewonnen, das wiederum dem der Alkaloide vom C₉-Hydroxy-Rhynchophyllin-Typ ähnelt.

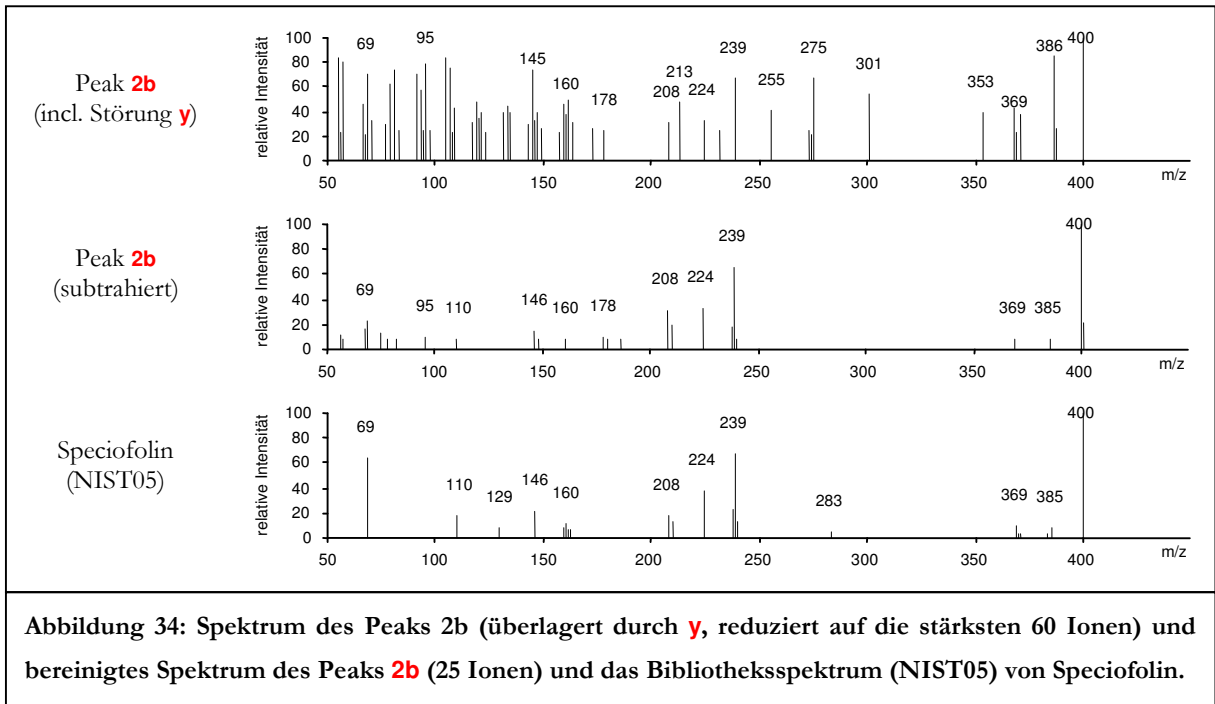


Abbildung 34: Spektrum des Peaks 2b (überlagert durch **y**, reduziert auf die stärksten 60 Ionen) und bereinigtes Spektrum des Peaks 2b (25 Ionen) und das Bibliotheksspektrum (NIST05) von Speciofolin.

Somit befindet sich in Fraktion 2 sehr wahrscheinlich im Wesentlichen ein Alkaloid vom C₉-Hydroxy-Rhynchophyllin-Typ.

4.5.1.3 Fraktion 3

In dieser Fraktion finden sich zwei Gruppen von Peaks. Die Peaks **x** und **y** sind von anderen Peaks überlagert.

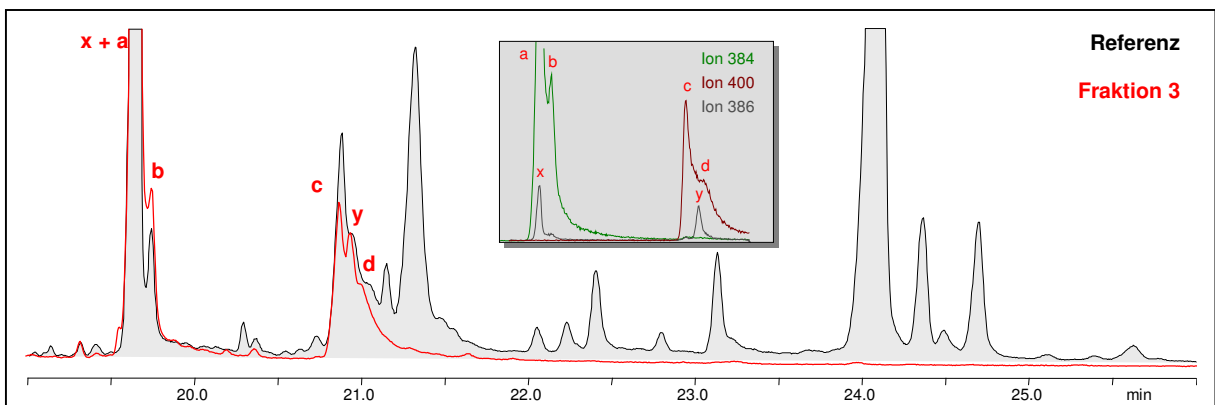
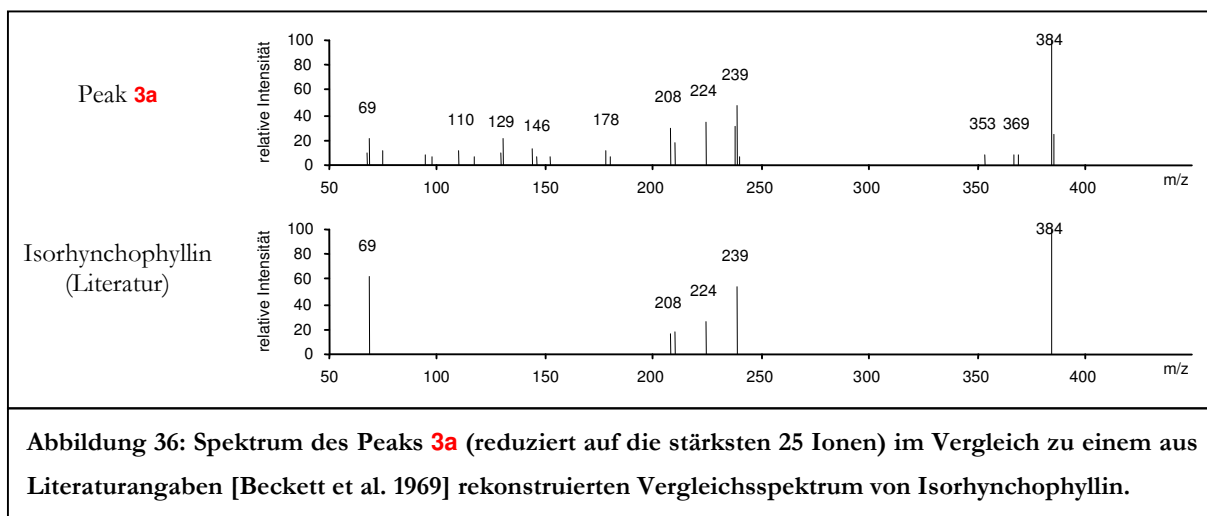


Abbildung 35: GC/MS-Chromatogramm (TIC) der 3. Fraktion. Als Referenz wurde das Chromatogramm des methanolischen Extraktes grau hinterlegt (Maßstäbe verändert). Die Spuren der angegebenen Ionen im Bereich der Peaks **a-d** und **y** wurden im Kasten hervorgehoben dargestellt.

Auf der rechten Flanke des größten Signals (a) sitzt ein kleinerer Peak identischen Spektrums (b) auf. Der spektrale Anteil an Peak x im Peak a ist vernachlässigbar gering. Die Gruppe c/d ähnelt in ihrem Aufbau dem Peak 1b.

Die Spektren der Peaks 3c und 3d entsprechen dem Spektrum des Peaks 1b. Fraktion 3 zeigte auch im HPLC/DAD-Chromatogramm bereits ein kleines Signal bei der Retentionszeit von Peak 1 (siehe Abbildung 23). Die Spektren der Peaks 3a und 3b sind identisch und weisen auf Alkaloide vom C₍₉₎-H-Rhynchophyllin-Typ hin. Zu diesen Substanzen liegen keine Bibliotheksspektren vor.



Beim Vergleich dieses Spektrums mit den Spektren aus der Literatur [Beckett et al. 1969] ergibt sich die beste Übereinstimmung mit dem dargestellten Isorhynchophyllin. Die Literaturspektren der anderen Isomere zeigen stärkere Abweichungen als das ausgewählte Spektrum. Eine eindeutige Zuordnung ist jedoch nicht möglich.

4.5.1.4 Fraktion 4

Das GC/MS-Chromatogramm zeigt neben den Peaks x und y noch einige andere Signale, die als Nicht-Alkaloide erkannt werden konnten. Es verbleiben 2 Peaks, die auf Mitragyna-Alkaloide hinweisen.

In Bezug auf Peak a zeigen sich im Spektrum und der Retentionszeit Hinweise darauf, dass auch hier eine ausreichende Trennung der Fraktionen 3 und 4 nicht erfolgt ist. Dies deutet auch das HPLC/DAD-Chromatogramm an (siehe Abbildung 23).

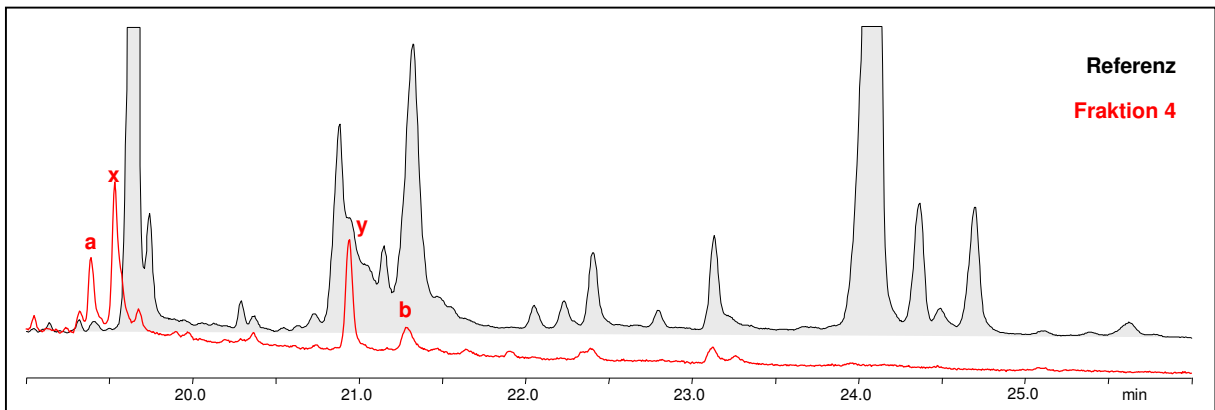


Abbildung 37: GC/MS-Chromatogramm (TIC) der 4. Fraktion. Als Referenz wurde das Chromatogramm des methanolischen Extraktes grau hinterlegt (Maßstäbe verändert).

Das Spektrum des Peaks **4b** entspricht dem Spektrum des Peaks **1c** und kann somit nicht identifiziert werden. Insgesamt kann damit in dieser Fraktion kein Alkaloid aufgefunden werden, das allein dem Peak 4 zuzuordnen ist.

4.5.1.5 Fraktion 5

Als mögliche Mitragyna-Alkaloide wurden in dieser Fraktion 4 Peaks (**a** bis **d**) eingestuft.

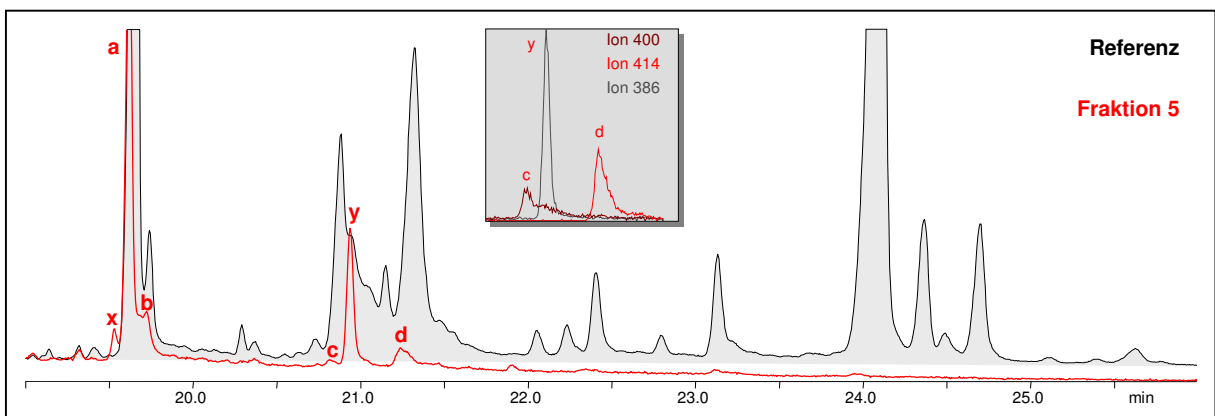
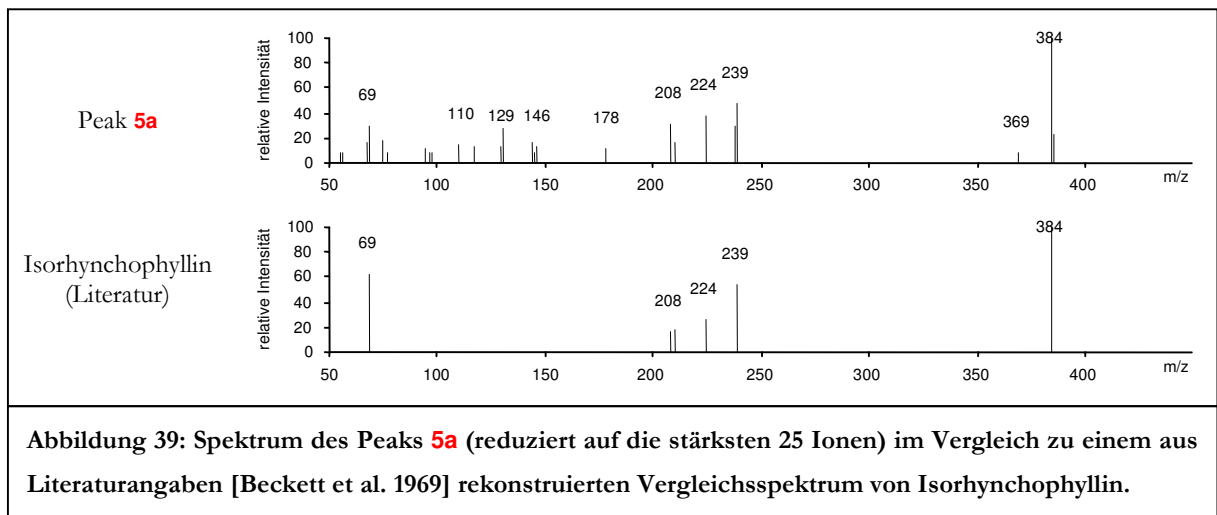


Abbildung 38: GC/MS-Chromatogramm (TIC) der 5. Fraktion. Als Referenz wurde das Chromatogramm des methanolischen Extraktes grau hinterlegt (Maßstäbe verändert). Die Spuren der angegebenen Ionen im Bereich der Peaks **c/d** und **y** wurden im Kasten hervorgehoben dargestellt.

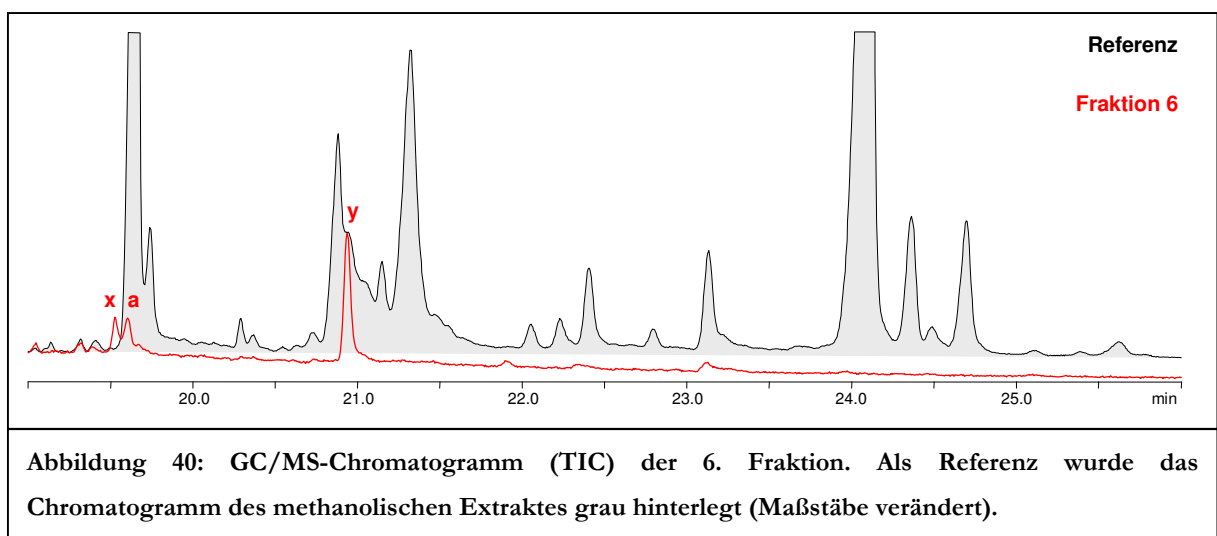
Bei Peak **5a** und **5b** verhält es sich wie auch bei Peak **3a** und **3b** zuvor. Die Spektren dieser Peaks sind fast identisch und deuten wahrscheinlich Alkaloide vom $C_{(9)}$ -H-Rhynchophyllin-Typ an. Die Retentionszeit dieser Peaks liegt im Bereich der Retentionszeit der Peaks der Fraktion 3. Bei gleicher Retentionszeit im GC/MS-System trennen sich diese Peaks im HPLC/DAD-System deutlich auf.



Peak **c** weist von seinem Spektrum wieder auf ein Alkaloid vom $C_{(9)}$ -Hydroxy-Rhynchophyllin-Typ und Peak **d** auf das Spektrum eines Alkaloids vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Rhynchophyllin-Typ hin.

4.5.1.6 Fraktion 6

Das Spektrum von Peak **a**, der neben den Peaks **x** und **y** im Chromatogramm auftaucht, weist auf eine Molmasse von 384 hin, was für ein Alkaloid vom $C_{(9)}$ -H-Rhynchophyllin-Typ spricht.



Auch Peak **6a** dürfte durch eine unzureichende Trennung der Fraktion 6 von der Vorfraktion zu erklären sein, so dass Peak 6 kein Alkaloid zuzuordnen ist.

4.5.1.7 Fraktion 7

Im GC/MS-Chromatogramm finden sich neben den Peaks **x** und **y** einige weitere Peaks, die jedoch nicht näher identifiziert werden konnten oder wiederum Fettsäurederivate oder Säulenmaterial darstellten. Peak **a** versteckt sich in der rechten Flanke des frühen Peaks **x** und zeigt das Spektrum eines Alkaloides vom $C_{(9)}$ -H-Rhynchophyllin-Typ.

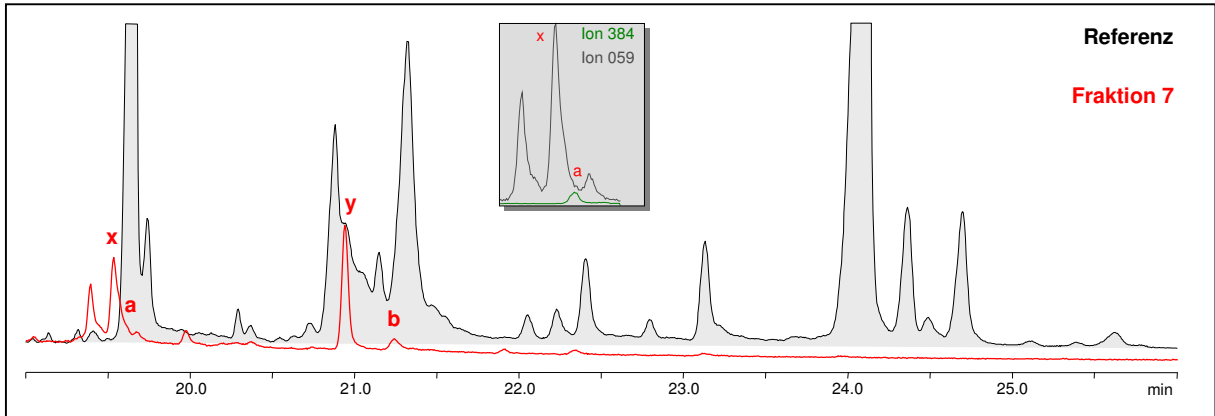


Abbildung 41: GC/MS-Chromatogramm (TIC) der 7. Fraktion. Als Referenz wurde das Chromatogramm des methanolischen Extraktes grau hinterlegt (Maßstäbe verändert). Die Spuren der angegebenen Ionen im Bereich der Peaks **a** und **x** wurde im Kasten hervorgehoben dargestellt.

Peak **b** zeigt bei der Darstellung der Ionenspuren der Molekülmassen das Ion 414, das auf ein Alkaloid vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Rhynchophyllin-Typ hinweist (siehe Tabelle 4).

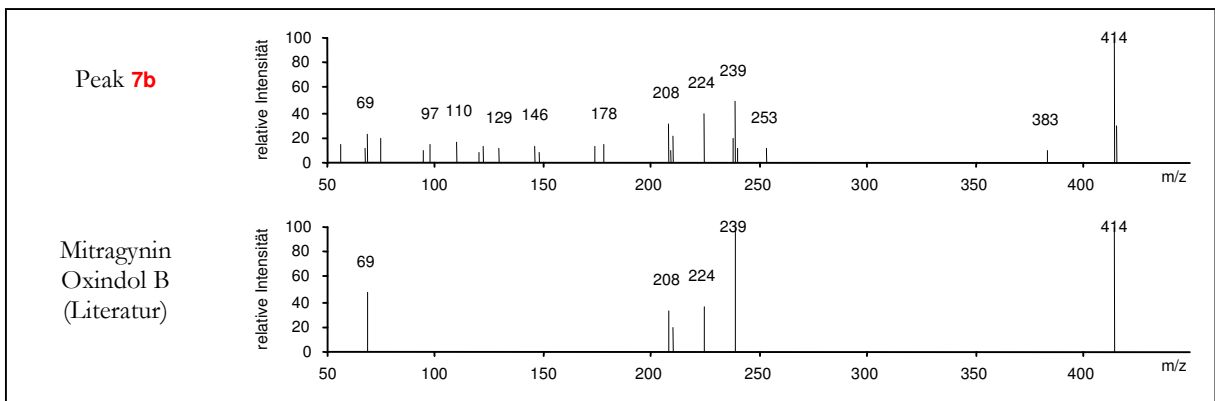


Abbildung 42: Spektrum des Peaks **7b** (reduziert auf die stärksten 25 Ionen) im Vergleich zu einem aus Literaturangaben [Beckett et al. 1969] rekonstruierten Vergleichsspektrum von Mitragynin Oxindol B.

Der Vergleich mit dem Literaturspektrum zeigt eine deutliche Ähnlichkeit zu Mitragynin Oxindol B und spricht dafür, dass es sich bei Peak **7b** tatsächlich um ein Alkaloid vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Rhynchophyllin-Typ handelt. Zu der A-Form des hier dargestellten Oxindol B liegen keine Literaturdaten vor. Die Spektren der beiden weiteren in der Literatur beschriebenen Alkaloide vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Rhynchophyllin-Typ (Rhynchocilin und Ciliaphyllin) zeigen jedoch

höhere Intensitäten beim Ion 239 als beim Ion 414. Demnach könnte es sich um das dargestellte Mitragynin Oxindol B oder dessen A-Form (Mitragynin Oxindol A) handeln.

4.5.1.8 Fraktion 8

Wie in Fraktion 7 konnte in diesem Chromatogramm in der Flanke von Peak **x** ein Peak **(a)** gefunden werden, der das Spektrum eines Alkaloides vom $C_{(9)}$ -H-Rhynchophyllin-Typ trägt. Rechts neben Peak **y** zeigen sich zwei weitere Peaks **(b, c)**.

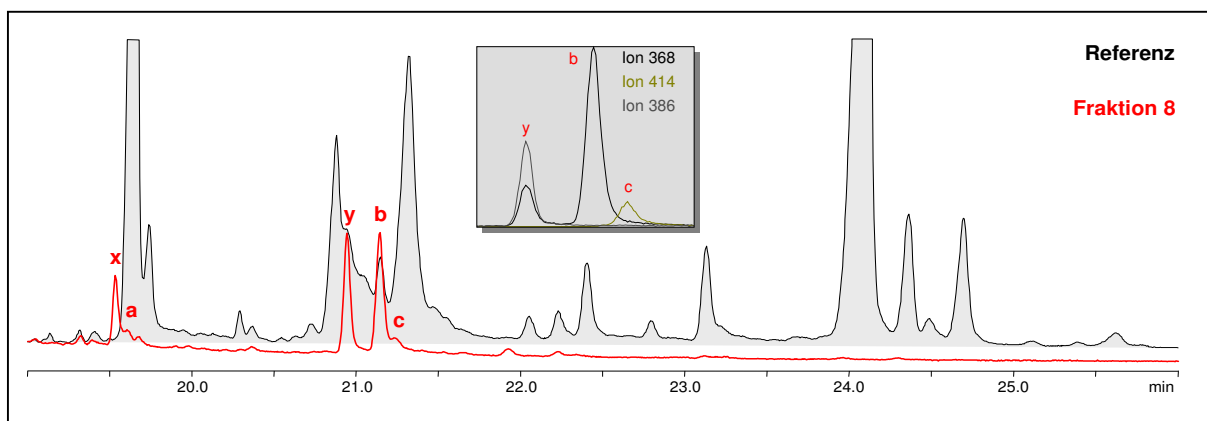


Abbildung 43: GC/MS-Chromatogramm (TIC) der 8. Fraktion. Als Referenz wurde das Chromatogramm des methanolischen Extraktes grau hinterlegt (Maßstäbe verändert). Die Spuren der angegebenen Ionen im Bereich der Peaks **b, c** und **y** wurden im Kasten hervorgehoben dargestellt.

Peak **b** weist mit den Massen 368, 367 und 184 auf ein Alkaloid vom $C_{(9)}$ -H-Corynantheidin-Typ hin; Peak **c** zeigt wie auch schon Peak **7b** das Spektrum eines Alkaloides vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Rhynchophyllin-Typ.

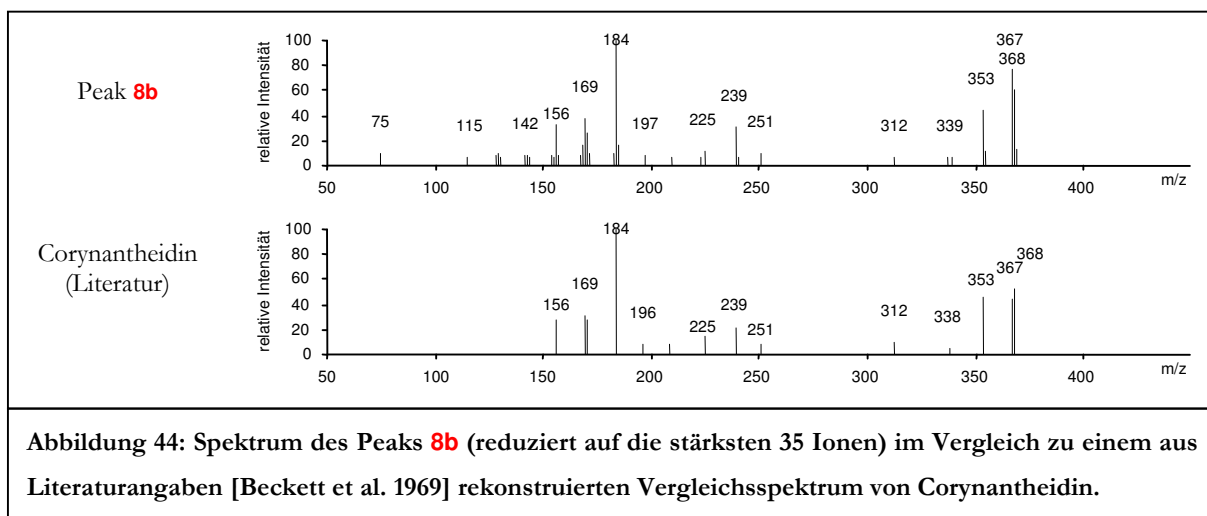


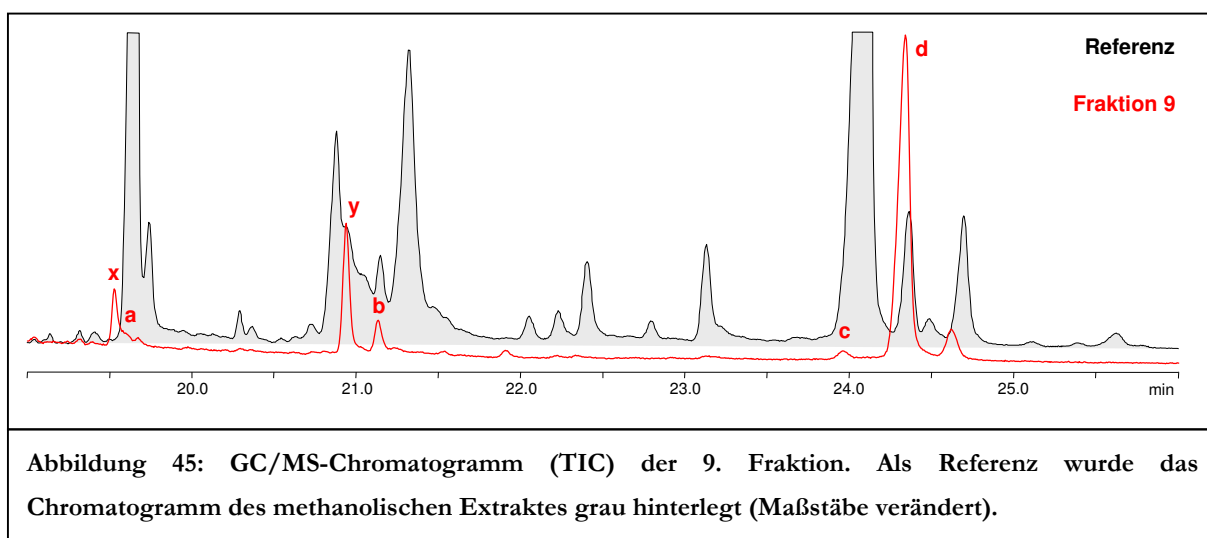
Abbildung 44: Spektrum des Peaks **8b** (reduziert auf die stärksten 35 Ionen) im Vergleich zu einem aus Literaturangaben [Beckett et al. 1969] rekonstruierten Vergleichsspektrum von Corynantheidin.

Der Vergleich mit dem Literaturspektrum zeigt eine deutliche Ähnlichkeit und spricht dafür, dass es sich bei Peak **8b** um ein Alkaloid vom $C_{(9)}$ -H-Corynantheidin-Typ handelt. Den

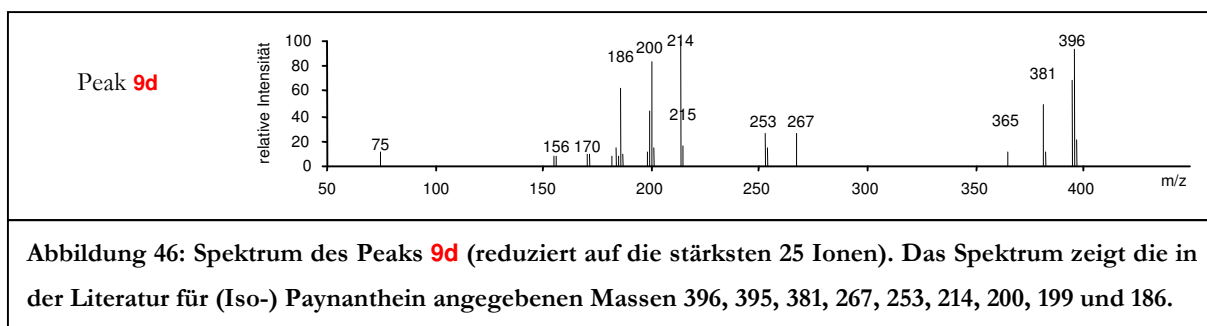
Unterscheidungskriterien im Absatz vor Abbildung 7 zufolge weist das Höhenverhältnis der Ionen 225/239 auf die allo- beziehungsweise epiallo-Konfiguration hin. Demnach dürfte es sich bei der Substanz in Peak **8b** um Corynantheidin oder Isocorynantheidin handeln. Eine genauere Eingrenzung würde allerdings die Gegenüberstellung beider Formen erfordern.

4.5.1.9 Fraktion 9

Auch im GC/MS-Chromatogramm dieser Fraktion kann wie in Fraktion 7 und 8 ein Peak (**a**) in der Flanke von Peak **x** mit dem Spektrum eines Alkaloides vom $C_{(9)}$ -H-Rhynchophyllin-Typ gefunden werden.



Neben Peak **y** zeigt sich wie in Fraktion 8 ein Peak (**b**) mit dem Spektrum eines Alkaloides vom $C_{(9)}$ -H-Corynantheidin-Typ. Peak **c** konnte als Mitragynin von der Bibliothek erkannt werden und ist möglicherweise durch eine unzureichende Trennung von Fraktion 9 und 10 zu erklären, da Peak 9 im HPLC/DAD-Chromatogramm Peak 10 aufsitzt (siehe Abbildung 17).



Gemäß den Literaturangaben ist die vorwiegend auftretende Form der Alkaloide vom $C_{(9)}$ -Methoxy- $C_{(20)}$ -Vinyl-Corynantheidin-Typ das Paynanthein. Zudem tritt die Masse 381 in erkennbar geringerem Ausmaß als die Molmasse 396 auf. Analog zu der Gruppe der Alkaloide

vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Corynantheidin-Typ, in der die Intensität des $[M]-CH_3$ -Fragments in der normal-Konfiguration nur 50 % des M^+ -Signals ausmacht (in der pseudo-Konfiguration ist es fast gleich intensiv), dürfte es sich auch hier um die normal-Konfiguration handeln. Beides spricht dafür, dass es sich bei Peak 9 um Paynanthein handelt.

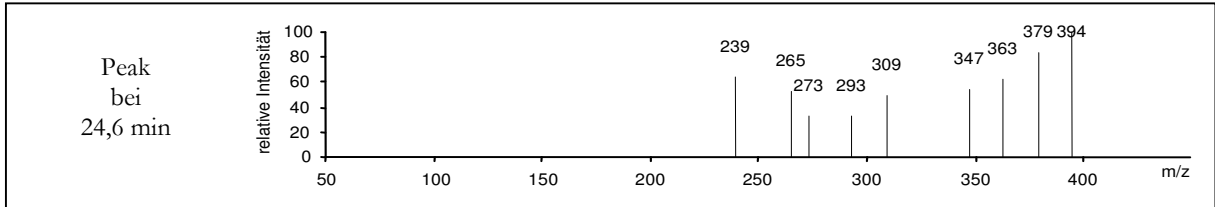


Abbildung 47: Peak bei 24,6 min. Das Spektrum beinhaltet einige Massen, die im Fragmentierungsmuster der Indol-Alkaloide vorkommen. Weiterhin erscheinen Massen, die gegenüber denen des Paynantheins um 2 reduziert sind. Eine Identifizierung konnte nicht erfolgen.

Dem kleinen Peak bei 24,6 min konnte kein Spektrum aus der Bibliothek oder der Literatur zugeordnet werden.

4.5.1.10 Fraktion 10

In Abbildung 48 fällt zunächst der sehr große (hier oben abgeschnitten dargestellt) Peak (a) auf. Dem kleinen Peak bei 24,7 min konnte kein Spektrum aus der Bibliothek oder der Literatur zugeordnet werden. Dieser ähnelte auch nicht dem Peak bei dieser Retentionszeit der Fraktion 9. Er enthielt als intensivste Ionen 398, 397, 393, 392, 391 und 383. Nicht als Peaks bezeichnet wurden ein Signal mit dem Spektrum eines Alkaloides vom $C_{(9)}$ -H-Rhynchophyllin-Typ in der rechten Flanke des Peaks x (wie auch in den Fraktionen zuvor) und ein Signal bei etwa 21,25 min, das inmitten einer Gruppe von mindestens drei Peaks liegt und das Spektrum eines Alkaloides vom $C_{(9)}$ -Methoxy-Rhynchophyllin-Typ zeigt.

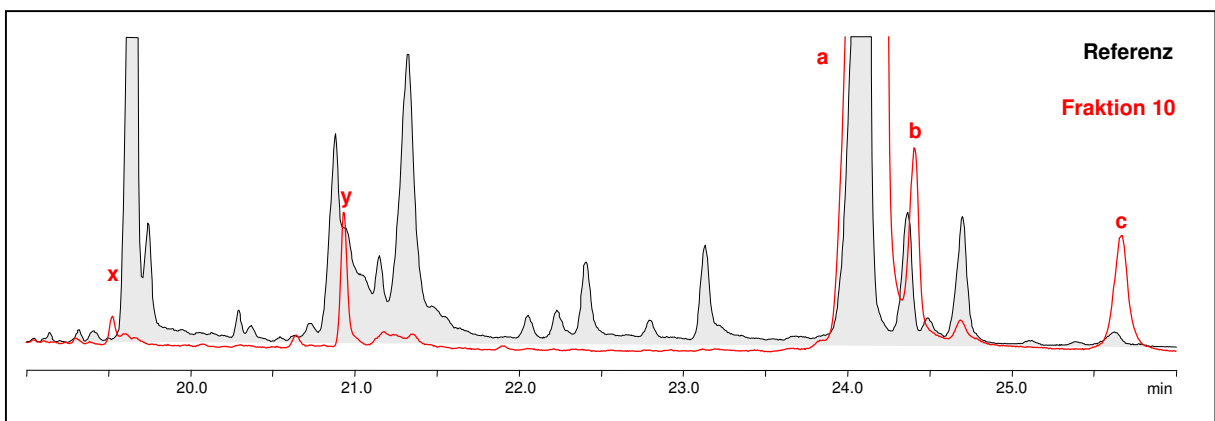
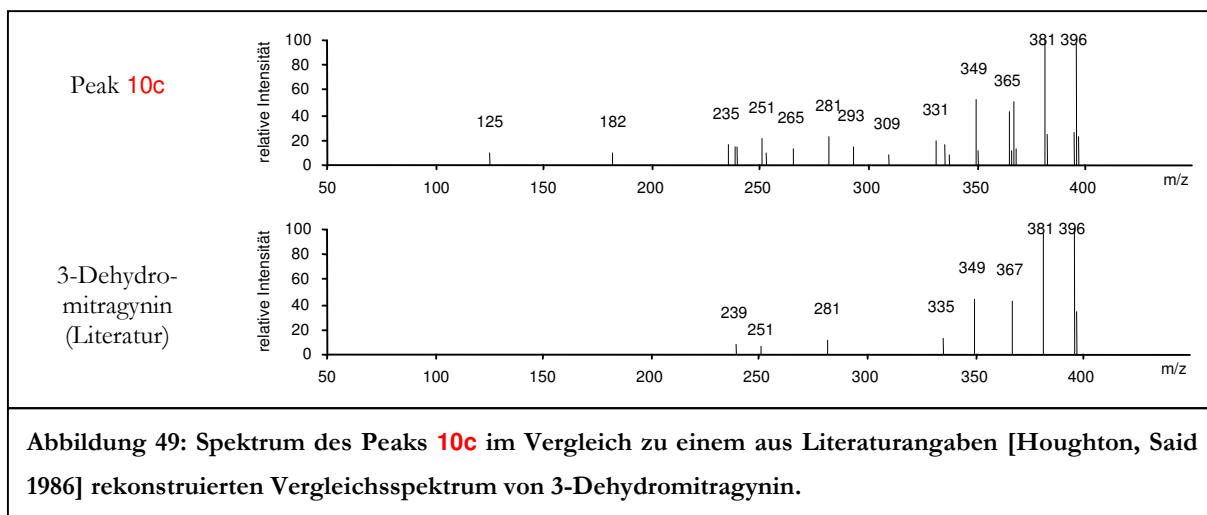


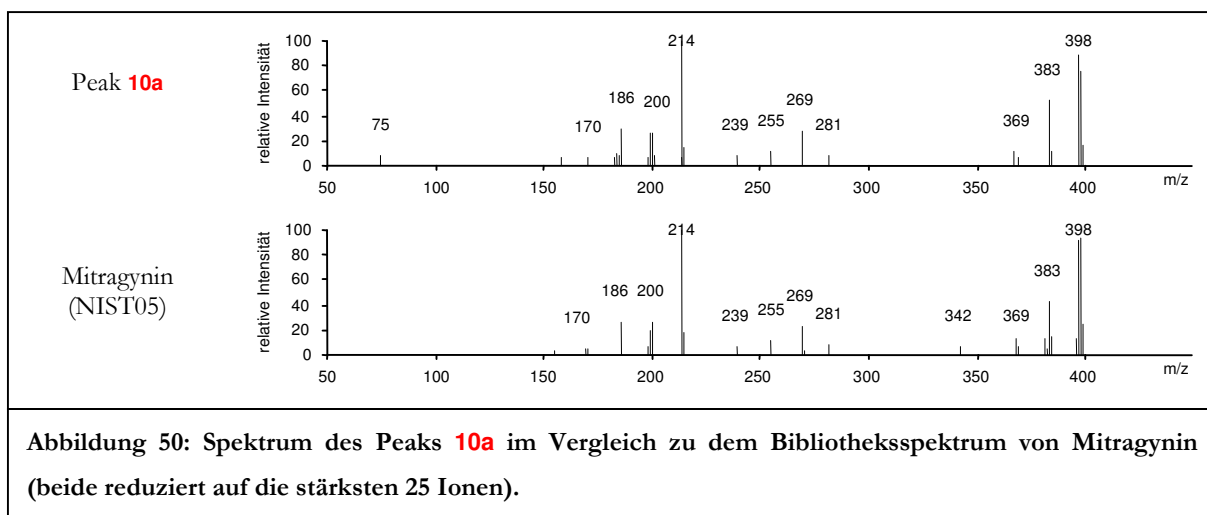
Abbildung 48: GC/MS-Chromatogramm (TIC) der 10. Fraktion. Als Referenz wurde das Chromatogramm des methanolischen Extraktes grau hinterlegt (Maßstäbe verändert).

Peak **b** konnte als identisch zu Peak **9d** erkannt werden und stellt vermutlich einen Übertrag aus Fraktion 9 in Fraktion 10 dar.

Peak **c** besitzt zum Teil die gleichen Massen wie Peak **b**, wobei aber unter anderem die wichtigen Fragmente 186, 200 und 214 komplett fehlen. Das Spektrum ähnelt eher dem 3-Dehydromitragynin.



Peak **a** konnte dagegen ohne Schwierigkeiten durch die NIST05-Spektrenbibliothek als Mitragynin identifiziert werden. Der Hauptpeak der Fraktion 10 im HPLC/DAD-Chromatogramm war ebenfalls das Mitragynin, was dort bereits durch Vergleich mit der Reinsubstanz abgesichert wurde.



4.5.1.11 Fraktion 11

In Fraktion 11 findet sich wieder in der rechten Flanke von Peak **x** ein Signal mit dem Spektrum eines Alkaloides vom C₉-H-Rhynchophyllin-Typ. Auch hier weist der Peak bei etwa

25,6 min das Spektrum von 3-Dehydromitragynin auf. Zusätzlich können neben den üblichen Peaks **x** und **y** vier weitere Peaks erkannt werden, die dem Spektrum nach in die Gruppe der Mitragyna-Alkaloide fallen könnten.

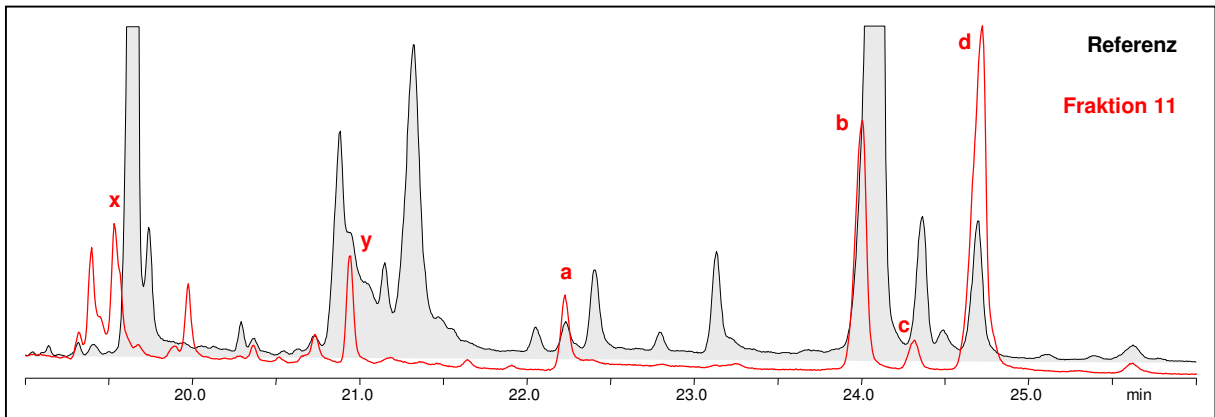


Abbildung 51: GC/MS-Chromatogramm (TIC) der 11. Fraktion. Als Referenz wurde das Chromatogramm des methanolischen Extraktes grau hinterlegt (Maßstäbe verändert).

Peak **b** zeigt das Mitragyninspektrum und dürfte aus der unzureichenden Trennung der Fraktionen 10 und 11 resultieren. Auffallend ist Peak **c**, der mit identischem Spektrum und identischer Zeit zu Peak **9d** erscheint, aber sicher keine Verschleppung aus Peak 9 in Peak 11 ist.

Das Signal **a** beinhaltet ein Spektrum, das wie schon Peak **9d** in die Gruppe der Alkaloide vom $C_{(9)}$ -Methoxy- $C_{(20)}$ -Vinyl-Corynantheidin-Typ gehört, weist aber eine Besonderheit auf: Das $[M]-CH_3$ -Fragment ist deutlich intensiver als die Molmasse. Dies dürfte von daher die pseudo-Form (Isopaynanthein) und damit Peak **9d** tatsächlich die normal-Form (Paynanthein) sein.

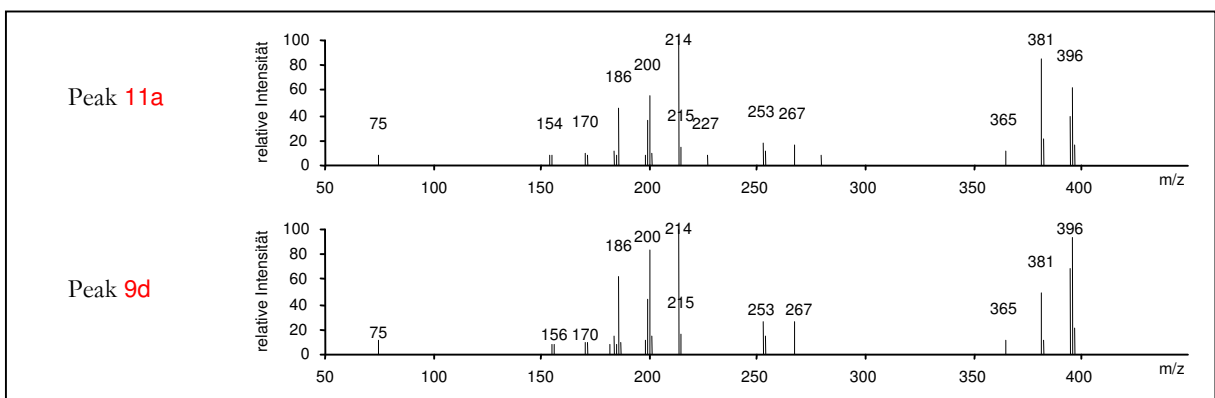
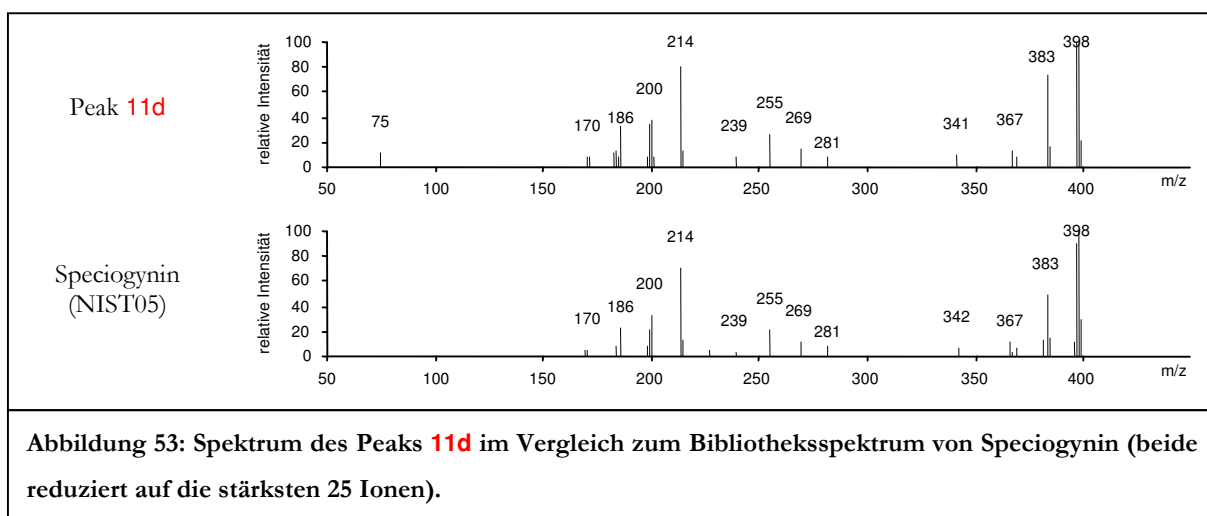


Abbildung 52: Spektrum des Peaks **11a** im Vergleich zu dem als Paynanthein identifizierten Peak **9d** (beide reduziert auf die stärksten 25 Ionen).

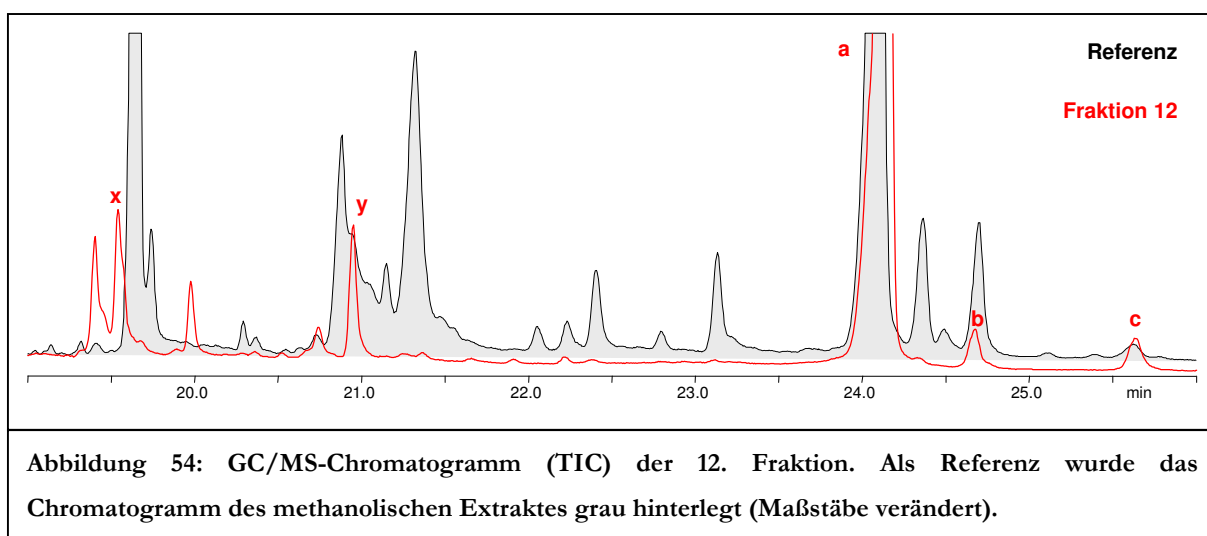
Peak **d** weist die gleichen Massen im Spektrum wie Peak **b** auf, jedoch unterscheiden sich die Höhenverhältnisse der Fragmente. Ein Abgleich mit der Spektrenbibliothek NIST05 bestätigt das Spektrum als Speciognin.



4.5.1.12 Fraktion 12

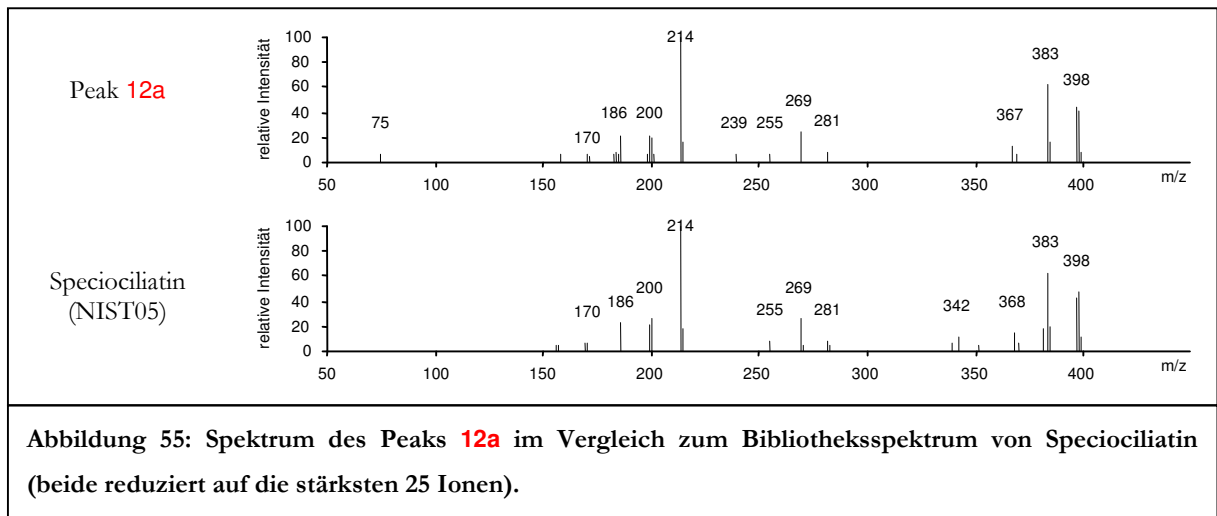
Das Chromatogramm der Fraktion 12 zeigt, wie das Chromatogramm zuvor, einige Signale, die nicht zugeordnet werden konnten, die Peaks **x** und **y** sowie ein großes Signal (**a**) zur Retentionszeit von Mitragynin mit dessen Massen.

Ein weiteres Signal, in dem charakteristische Massen der Mitragyna-Alkaloide vorkommen, wurde als Peak **b** bezeichnet. Peak **c** zeigt wie Peak **10c** das Spektrum von 3-Dehydromitragynin.



Peak **a** konnte durch Vergleich mit der Spektrenbibliothek als Speciociliatin erkannt werden. Peak **b** hingegen zeigte das Spektrum von Speciognin und dürfte durch die

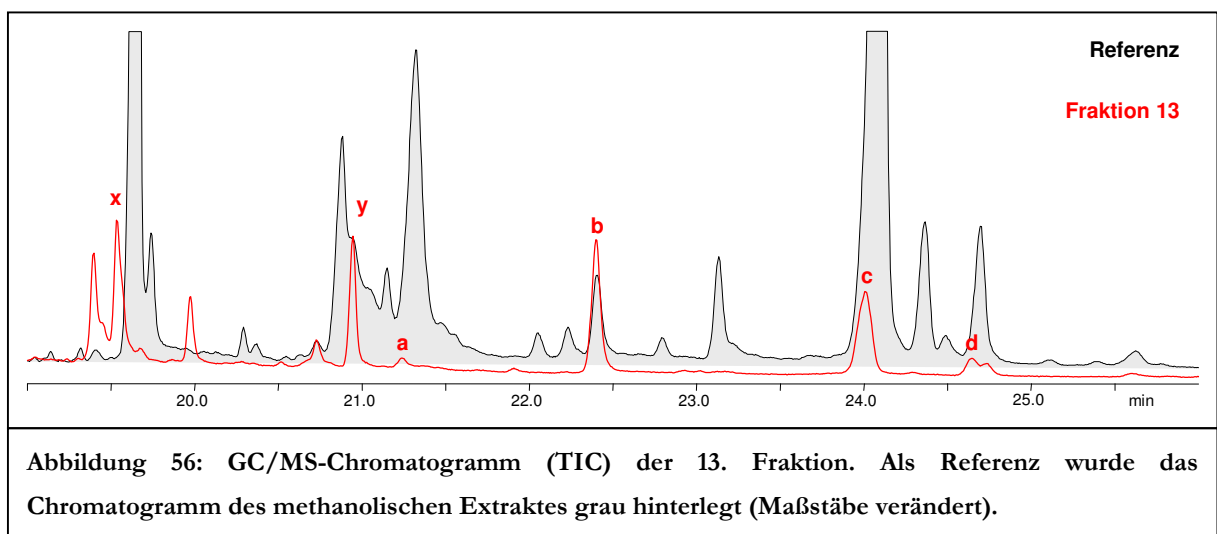
unzureichende Trennung von Fraktion 11 und Fraktion 12 hervorgerufen sein. In den kleineren Peaks, die über das Chromatogramm verteilt erscheinen, sind Spektren weiterer Mitragyna-Alkaloide angedeutet, aber hier nicht gesondert ausgewertet.



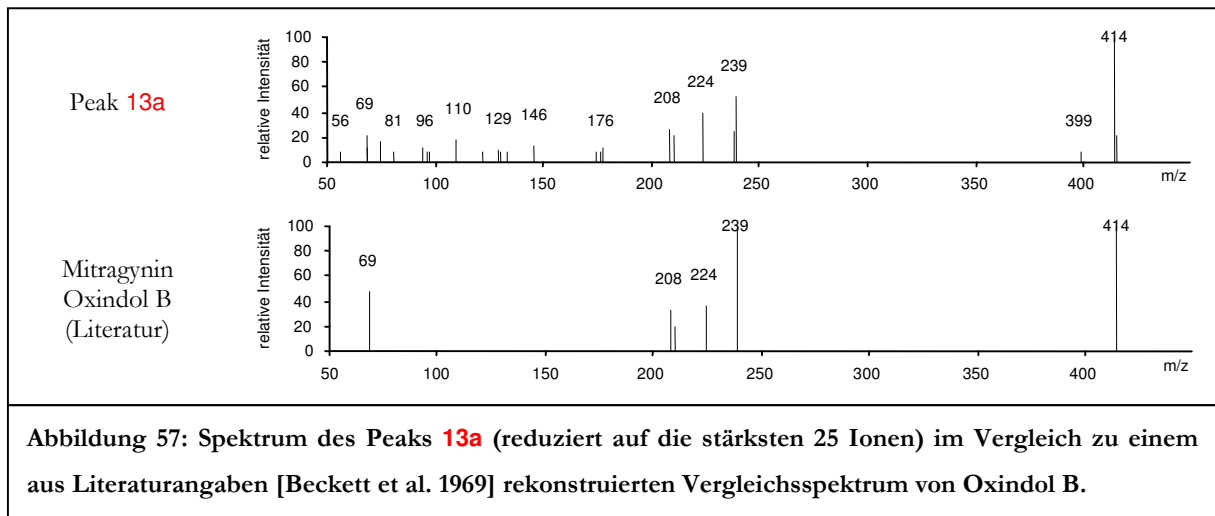
4.5.1.13 Fraktion 13

In diesem Chromatogramm finden sich neben den Peaks **x** und **y** vier weitere Signale, die als Mitragyna-Alkaloide eingestuft werden können. Bei Peak **c** dürfte es sich wieder um einen Übertrag aus der Vorfraktion handeln; das Spektrum kann als Speziociliatin erkannt werden. Peak **d** erscheint zur Retentionszeit und mit dem Spektrum von Speziogynin, kann aber kein Übertrag aus Fraktion 11 sein.

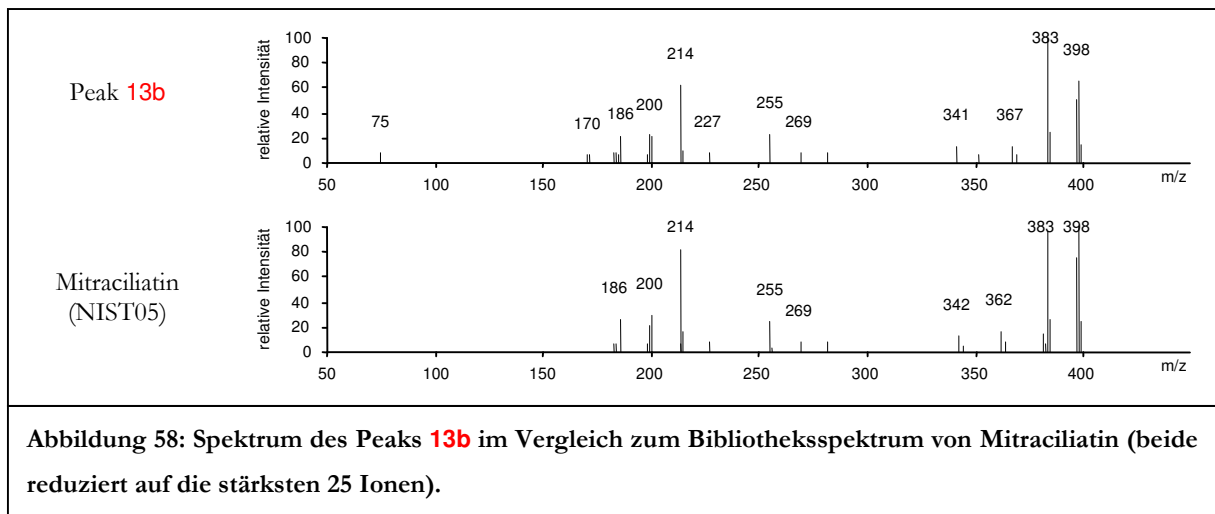
Im Chromatogramm der Fraktion 13 taucht neben dem Peak bei etwa 25,6 min ein weiterer Peak (hinter Peak **d**) auf, der das Spektrum von 3-Dehydromitragynin zeigt.



Das Spektrum **a** zeigt Massen, die auf die Gruppe der Alkaloide vom C₉-Methoxy-Rhynchophyllin-Typ verweist. Die Retentionszeit entspricht der des vergleichbaren Signals aus Fraktion 7 (Peak **7b**).



Peak **b** kann aufgrund des Vergleichs mit der Spektrenbibliothek als das vierte Isomer der Alkaloide vom C₉-Methoxy-Corynantheidin-Typ (Mitraciliatin) erkannt werden.



4.6 Übersicht der Fraktionen - Erstellung einer SIM-Methode

Die Untersuchung der Fraktionen erbrachte eine weitgehende Identifizierung der im HPLC/DAD-System detektierten Substanzen. Fünf Substanzen konnten konkret bezeichnet, zwei weitere mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert und die übrigen Substanzen, bis auf die der Fraktionen 4 und 6, zumindest bis zum Alkaloid-Typ erkannt werden.

Zusätzlich zu diesen Substanzen wurden auch Hinweise auf Alkaloide erhalten, die Rotundifolein (Fraktion 1), 3-Dehydromitragynin (Fraktion 10) und Isopaynanthein (Fraktion 11) ähneln.

Fraktion	Größter Peak bei RT		[M] ⁺	Alkaloid	
	HPLC/DAD	GC/MS	m/z	Typ	Bezeichnung
1	4,26	20,88	400	C ₉ -Hydroxy-Rhynchophyllin	(Speciofolin oder isomere Verbindung?)
2	4,57	20,97	400	C ₉ -Hydroxy-Rhynchophyllin	(Speciofolin oder isomere Verbindung?)
3	4,92	19,66	384	C ₉ -H-Rhynchophyllin	(Isorhynchophyllin oder isomere Verbindung?)
4	5,46	(19,64)	(384)	(C ₉ -H-Rhynchophyllin)	
5	5,76	19,64	384	C ₉ -H-Rhynchophyllin	(Isorhynchophyllin oder isomere Verbindung?)
6	6,48	(19,64)	(384)	(C ₉ -H-Rhynchophyllin)	
7	7,07	21,31	414	C ₉ -Methoxy-Rhynchophyllin	Mitragynin Oxindol (A/B)?
8	8,29	21,17	368	C ₉ -H-Corynantheidin	(Iso-) Corynantheidin?
9	9,28	24,36	396	C ₉ -Methoxy-C ₍₂₀₎ -Vinyl-Corynantheidin	Paynanthein
10	9,71	24,06	398	C ₉ -Methoxy-Corynantheidin	Mitragynin
11	10,58	24,70	398	C ₉ -Methoxy-Corynantheidin	Speciogynin
12	11,45	24,05	398	C ₉ -Methoxy-Corynantheidin	Speciociliatin
13	12,15	22,43	398	C ₉ -Methoxy-Corynantheidin	Mitraciliatin

Tabelle 6: Nach Bibliotheks- und Literaturangaben wahrscheinlichste Zuordnung der Alkaloide in den einzelnen Fraktionen. Angegeben ist jeweils nur der größte Peak im Chromatogramm der jeweiligen Injektion mit der Retentionszeit (RT) in der HPLC und der GC sowie dem Molekülion ([M]⁺). Die Zuordnung der GC/MS-Peaks zu den HPLC/DAD-Peaks in den Fraktionen 4 und 6 ist unklar.

Die charakteristischen Ionen der so identifizierten Alkaloide wurden in einem Single-Ion-Monitoring-Programm (SIM) für das GC/MS-System zusammengefasst (siehe Abschnitt 3.5.2). Eine Injektion des gleichen Flüssig-Flüssig-Extraktes, der auch in Abbildung 27 (Total Ion Chromatogramm) und Abbildung 28 (Extracted Ion Chromatogramm) einer Injektion im Full Scan Modus dargestellt ist, ergab im SIM-Programm ein identisches Bild (siehe dort), jedoch mit deutlich größeren Peakflächen. Exemplarisch sei hier die Hauptkomponente aus Fraktion 13

(Mitraciliatin) erwähnt, die im Scan-Modus eine Peakfläche von 887.786 Einheiten erzeugte, während der gleiche Peak im SIM-Modus mit 6.748.217 Einheiten mehr als 7,5x so groß ausfällt. Für die anderen Peaks gilt dies gleichermaßen.

4.7 Konzentrationen der Alkaloide in den Zubereitungen

Das HPLC-System wurde für die Quantifizierung der Alkaloide kalibriert. Eine Validierung der Methode wurde unter anderem durch die Ermittlung der Bestimmungs- und Nachweisgrenze sowie der Wiederfindung nach Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt. Mit der so erstellten HPLC/DAD-Methode konnten die Konzentrationen ausgewählter Alkaloide in methanolischen sowie ethanolischen Extrakten und Teezubereitungen bestimmt werden.

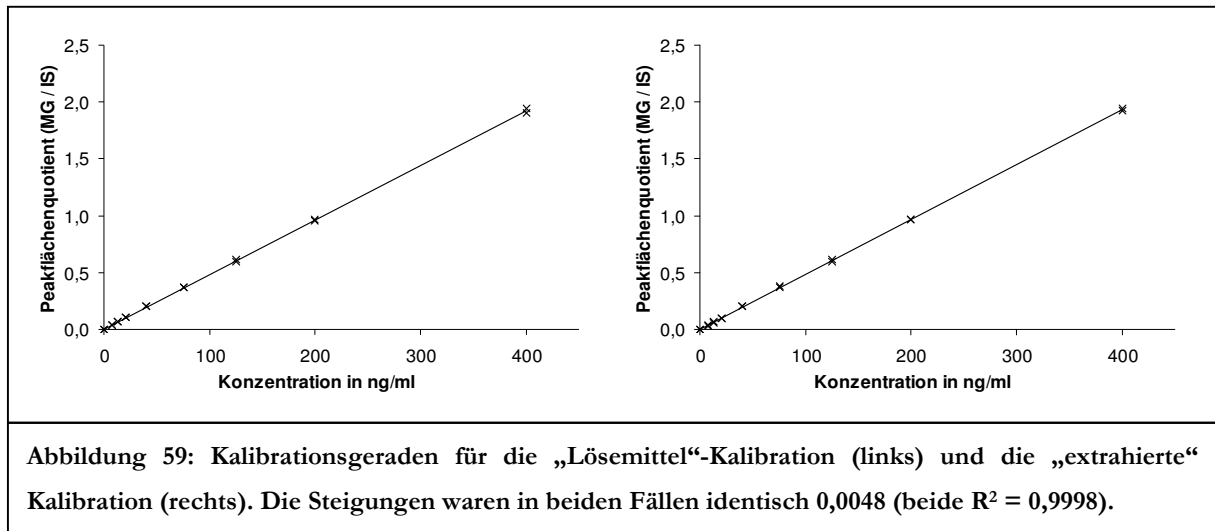
4.7.1 Kalibration des HPLC-Systems für die Quantifizierung von Mitragynin

Nachfolgend sind die Kalibrationsdaten für sowohl die Lösemittelkalibration als auch die Kalibration mit extrahierten Kalibratoren aufgeführt.

Kalibrations-Stufe		Injektion ng (in 10 µl)	Lösemittel-Kalibratoren			Extrahierte Kalibratoren		
Nr.	ng/ml		Peakflächen		Quotient	Peakflächen		Quotient
			MG	IS	MG / IS	MG	IS	MG / IS
0	0,0	0,0	45	159751	0,000	40	168527	0,000
			19	166709	0,000	36	187043	0,000
1	7,5	0,9	6724	165151	0,041	5775	172206	0,034
			6324	169597	0,037	6795	186317	0,036
2	12,5	1,5	11331	168535	0,067	11486	179251	0,064
			11548	176005	0,066	10388	189799	0,055
3	20	2,4	18070	170562	0,106	16658	169809	0,098
			18324	176993	0,104	16543	167444	0,099
4	40	4,8	34511	170699	0,202	35104	170946	0,205
			36519	179471	0,203	37263	182153	0,205
5	75	9,0	63562	170639	0,372	69937	185005	0,378
			67115	180669	0,371	68296	181717	0,376
6	125	15	103992	169738	0,613	109784	182969	0,600
			108943	182371	0,597	116334	190398	0,611
7	200	24	164836	171289	0,962	184277	191120	0,964
			174883	182569	0,958	172640	179014	0,964
8	400	48	334569	172051	1,945	348532	181444	1,921
			358944	188145	1,908	356598	183954	1,939

Tabelle 7: Kalibration: Die Kalibrationsstufen (in ng/ml) entsprechen dotierten Kalibratoren. Die Quotienten wurden aus den Peakflächen von Mitragynin (MG) und Camazepam (IS) gebildet.

Die Quotienten der Flächen der erhaltenen Signale für das Mitragynin und den internen Standard Camazepam in den einzelnen Kalibrationsstufen wurden gegen die eingesetzten Mitragynin-Konzentrationen graphisch aufgetragen. In beiden Fällen ergab sich ein linearer Zusammenhang im geprüften Bereich von 7,5 bis 400 ng/ml mit einer Steigungsfunktion $y = 0,0048 x$ bei einem Bestimmtheitsmaß nahe 1 ($R^2 = 0,9998$).



4.7.1.1 Zulässigkeit der Lösemittelkalibration

Die Kalibrationen mit Lösemittel- und extrahierten Kalibratoren erbrachten nahezu identische Ergebnisse. Die Wiederfindungsfunktion wurde als $X_m = 1,008 X_0 - 0,002$ bei einem R von 0,9999 (X_m = Werte der extrahierten Kalibration; X_0 = Werte der Lösemittelkalibration) ermittelt. Die Verwendung einer Lösemittelkalibration ist somit zulässig; der Matrixeffekt ist vernachlässigbar.

4.7.1.2 Bestimmungsgrenze und Nachweisgrenze

Bei der Verwendung von 5 Kalibratoren im Bereich der angestrebten Bestimmungs- und Nachweisgrenze (hier 7,5 bis 75 ng/ml) ergibt sich bei einem Signifikanzniveau von 99 % und einem k-Wert von 3 eine Bestimmungsgrenze von 7,2 ng/ml. Die Nachweisgrenze wurde rechnerisch bei einem Signifikanzniveau von 90 % und einem k-Wert von 3 mit 0,7 ng/ml ermittelt (die Berechnungsgrundlagen sind den Richtlinien zur Qualitätssicherung der GTFCh - Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie - entnommen). Es ist anzumerken, dass bei dieser berechneten Nachweisgrenze kein verwertbares UV-Spektrum mehr erhalten wird. Ein vollständig auswertbares UV-Spektrum, das durch einen Bibliotheksvergleich identifiziert werden

kann, wird erst im Bereich des untersten verwendeten Kalibrators erhalten. Von daher ist es sinnvoll, die Nachweisgrenze auf den Wert der Bestimmungsgrenze anzuheben.

4.7.1.3 Wiederfindung von Mitragynin nach Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Wiederfindung des Mitragynins nach Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde für zwei Konzentrationen (7,5 ng/ml und 400 ng/ml) bestimmt. Es wurden jeweils zwei Messungen zugrundegelegt. Die Wiederfindung bei einer Konzentration von 7,5 ng/ml lag bei 96,3 % (bei einer relativen Standardabweichung von 15,25 %). Die Wiederfindung bei einer Konzentration von 400 ng/ml wurde mit 101,7 % (bei einer relativen Standardabweichung von 3,41 %) berechnet. Die Wiederfindung des internen Standards über 10 Injektionen (Kalibratoren 7,5 bis 75 ng/ml) lag bei 103,3 % mit einer relativen Standardabweichung von 4,83 %. Die gewählte Methode ist somit für die Quantifizierung von Mitragynin in wässrigen Extrakten geeignet.

4.7.2 Methanolische Auszüge der Pulverproben

Mit dem 80 %igen Methanol/Wasser-Gemisch konnten für alle Indolalkaloide über doppelt so hohe Ausbeuten erzielt werden, wie für den rein methanolischen Auszug.

		Peak					
		9 ¹	10 ²	11	12	13	IS
Auszug mit Methanol	Peakfläche	31657	253007	40486	93464	12253	157207
	Q _{Peak/IS}	0,201	1,609	0,258	0,595	0,078	Gesamt
	c [mg/g]	0,5	4,0	0,7	1,5	0,2	0,7 %
Auszug mit MeOH/H ₂ O	Peakfläche	64881	561933	92417	271107	29571	153090
	Q _{Peak/IS}	0,424	3,671	0,604	1,771	0,193	Gesamt
	c [mg/g]	1,1	9,2	1,5	4,4	0,5	1,7 %

Tabelle 8: Konzentrationen der Alkaloide im Rohauszug in mg/g Blattmaterial (VIII). ¹Die für Peak 9 (Paynanthin) angegebene Konzentration liegt aufgrund des geringeren Molekulargewichts um etwa 0,5 % niedriger. ²Im HPLC/DAD-System eluieren mehrere Alkaloide zur gleichen Retentionszeit wie das Hauptalkaloid Mitragynin. Die angegebene Konzentration ist daher die Summenkonzentration. Die Angabe „Gesamt“ stellt den Mengenanteil der hier erfassten Indolalkaloide am Blattmaterial dar. Die Stereoisomere des Mitragynins wurden analog zu Mitragynin in ihren Konzentrationen bestimmt.

Der Gesamt-Indol-Alkaloidgehalt des Blattmaterials lag bei etwa 1,7 %. Peak 10 (vor allem Mitragynin) hat daran einen Anteil von etwa 55 %.

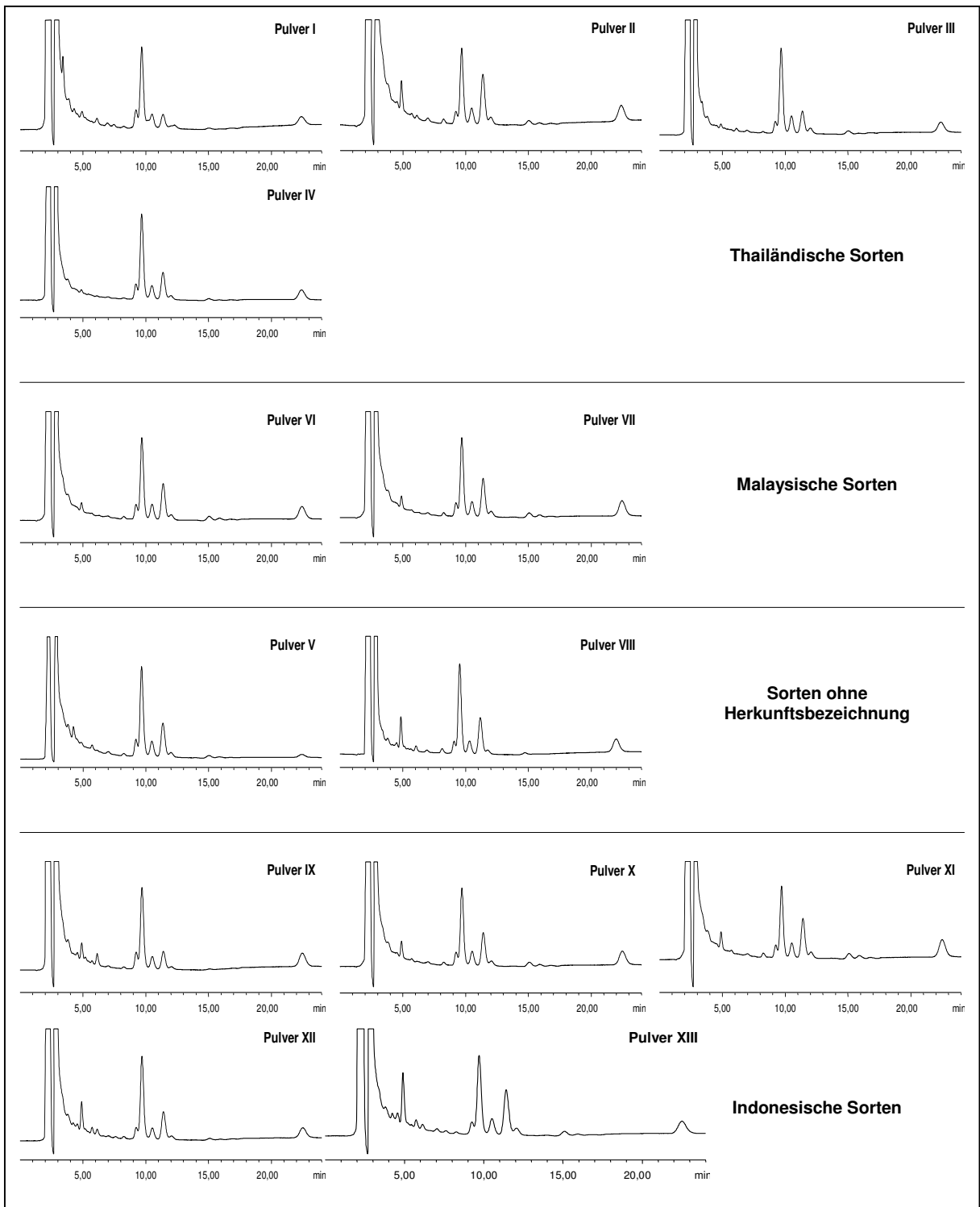


Abbildung 60: Chromatogramme der methanolischen Rohextrakte der Pulverproben: Thai Commercial Kratom (I), Super Thai Kratom (II), Thai Premium Kratom (III), Thai Pimp (Maeng Da) Kratom (IV), Kratom Extrakt 10x (V), Malaysisches Green Kratom (VI), Malaysisches Premium Kratom (VII), Indo Commercial Kratom (IX), Indonesian Green Kratom (X), Indonesian Premium Kratom (XI), Super Enhanced Indo Kratom (XII), Indonesisches Meniti Kratom (XIII).

Die Chromatogramme (siehe Abbildung 60) zeigen unterschiedliche Alkaloidmuster an, wobei ein für das Herkunftsland typisches Alkaloidmuster („Fingerprint“) nicht erkennbar ist.

Flächen- verhältnis	Kratomprobe												
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Peak 3 / MG	5 %	21 %	3 %	2 %	1 %	6 %	8 %	21 %	11 %	11 %	13 %	19 %	36 %
Peak 12 / MG	21 %	78 %	30 %	36 %	43 %	51 %	57 %	48 %	25 %	49 %	65 %	38 %	66 %

Tabelle 9: Peakflächenverhältnisse der variabelsten Alkaloide. Die Flächen von Peak 3 und Peak 12 wurden zu dem Mitragyninpeak (MG) ins Verhältnis gesetzt.

Die charakteristischsten Unterschiede finden sich im Vergleich der Peaks 3 (bei ~ 5 min) und 12 (bei ~ 11,5 min). Die übrigen Peaks zeigen vergleichsweise konstante Flächenverhältnisse zum Mitragynin an (Peak 8: 1-4 %; Peak 9: 11-18 %; Peak 11: 14-24 %; Peak 13: 3-11 %).

Probe		Peak							IS
		3	8	9 ¹	10 ²	11	12	13	
I	Peakfläche	18098	5120	70192	385006	93385	82606	23881	162320
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,432	2,372	0,575	0,509	0,147	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,1	5,9	1,4	1,3	0,4	1,0 %
II	Peakfläche	66873	13626	45733	319050	72898	248781	34861	121470
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,376	2,627	0,600	2,048	0,287	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	0,9	6,6	1,5	5,1	0,7	1,5 %
III	Peakfläche	17787	7682	80418	693625	145425	207929	50873	153587
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,524	4,516	0,947	1,354	0,331	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,3	11,3	2,4	3,4	0,8	1,9 %
IV	Peakfläche	11525	6260	106255	707316	120500	258149	34060	157526
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,675	4,490	0,765	1,639	0,216	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,7	11,2	1,9	4,1	0,5	1,9 %
V	Peakfläche	28296	50509	364569	2413096	436186	1035366	138022	155727
	Q _{Peak/IS}	-	-	2,341	15,496	2,801	6,649	0,886	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	5,9	38,7	7,0	16,6	2,2	7,0 %
VI	Peakfläche	28715	11179	80199	521218	103369	268416	36917	153054
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,524	3,405	0,675	1,754	0,241	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,3	8,5	1,7	4,4	0,6	1,7 %
VII	Peakfläche	35028	12992	61388	433724	87389	246774	33875	153002
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,401	2,835	0,571	1,613	0,221	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,0	7,1	1,4	4,0	0,6	1,4 %

Tabelle 10: Konzentrationen der Alkaloide in den Rohauszügen der Pulverproben in mg/g (Proben I-VII). Gesamt: Mengenanteil der erfassten Indolalkaloide am Pulvergewicht. Die Legende sowie Daten der Probe VIII siehe Tabelle 8. Daten der Proben VIII-XIII siehe Tabelle 11. Eine Berechnung für die Peaks 3 und 8 entfällt aufgrund der nicht eindeutigen Identifizierung.

Die Angaben in Tabelle 10 und Tabelle 11 beziehen sich auf Rohextrakte, die durch einen Auszug mit einem 80 %igen Methanol/Wasser-Gemisch gewonnen wurden. Die Konzentrationen im Blattmaterial unbekannter Herkunft (Probe VIII) finden sich in Tabelle 8.

Die Peakflächen wurden lediglich für die Peaks 3, 8 und 9-13 berechnet, da die übrigen Peaks im Rohauszug (ohne Flüssig-Flüssig-Extraktion) zum Teil nicht eindeutig auswertbar waren (siehe hierzu auch Abbildung 60). Konzentrationen wurden nur für die identifizierten Alkaloide (Peaks 9-13) berechnet.

Probe	Peak								
	3	8	9 ¹	10 ²	11	12	13	IS	
IX	Peakfläche	56525	9215	85789	503179	79551	123399	17009	155867
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,550	3,228	0,510	0,792	0,109	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,4	8,1	1,3	2,0	0,3	1,3 %
X	Peakfläche	51501	12218	61580	448493	84421	221289	31078	142692
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,432	3,143	0,592	1,551	0,218	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,1	7,9	1,5	3,9	0,5	1,5 %
XI	Peakfläche	41350	13698	46796	321432	69741	208339	30457	141086
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,332	2,278	0,494	1,477	0,216	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	0,8	5,7	1,2	3,7	0,5	1,2 %
XII	Peakfläche	139263	14978	84524	752042	107048	286886	34416	164181
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,515	4,581	0,652	1,747	0,210	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,3	11,5	1,6	4,4	0,5	1,9 %
XIII	Peakfläche	200350	9839	71233	562255	120253	369803	54866	160959
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,443	3,493	0,747	2,297	0,341	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,1	8,7	1,9	5,7	0,9	1,8 %

Tabelle 11: Konzentrationen der Alkaloide in den Rohauszügen der Pulverproben in mg/g (Proben VIII-XIII). Gesamt: Mengenanteil der erfassten Indolalkaloide am Pulvergewicht. Die Legende sowie Daten der Probe VIII siehe Tabelle 8. Daten der Proben I-VII siehe Tabelle 10. Eine Berechnung für die Peaks 3 und 8 entfällt aufgrund der nicht eindeutigen Identifizierung.

4.7.3 Ethanolische Auszüge des Blattmaterials

In dem Vorversuch zur Festlegung der geeignetsten Methode für den ethanolischen Auszug wurden erhebliche Änderungen der Wiederfindung in Abhängigkeit vom Ethanolgehalt des Auszugsmittels festgestellt.

In der nachfolgenden Tabelle ist die Auswertung zweier HPLC/DAD-Signale stellvertretend für alle erfassten Alkaloide dargestellt: ein Alkaloid vom Oxindol-Typ (Peak 1) und ein Alkaloid vom Indol-Typ (Mitragnin, Peak 10). Die beste Ausbeute ist den Austestungen zufolge mit Ethanol/Wasser-Gemischen bei 70-80 Volumen-% Ethanol zu erzielen.

		Flächenwerte der Peaks des Referenzauszugs und der ethanolischen Auszüge								
Peak	Auszug	MeOH-Referenz	Ethanolgehalt des Auszugsmittels (Volumen-%)							
			0 %	20 %	40 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %
1	1	118195	19403	48399	96694	112439	111168	112033	94729	57470
	2		20533	57756	98157	107549	110882	109970	101156	61035
MG	1	551606	44140	128358	362921	483349	495624	481486	386727	255749
	2		54151	150344	371847	446875	483596	491375	415744	265986

EtOH-Gehalt	Ausbeute, MW (%)	
	Peak 1	MG
0 %	17 %	9 %
20 %	45 %	25 %
40 %	82 %	67 %
60 %	93 %	84 %
70 %	94 %	89 %
80 %	94 %	88 %
90 %	83 %	73 %
100 %	50 %	47 %

The graph plots 'Ausbeute (%)' on the y-axis (0 to 100) against 'Ethanol-Gehalt (Vol.-%)' on the x-axis (0 to 100). Two data series are shown: Peak 1 (black line with 'x' markers) and Mitragnin (MG) (red line with 'x' markers). Peak 1 starts at ~17% at 0% ethanol, rises to a peak of ~94% between 70% and 80% ethanol, and then drops to 50% at 100% ethanol. MG starts at ~9% at 0% ethanol, rises to a peak of ~89% between 70% and 80% ethanol, and then drops to 47% at 100% ethanol.

Tabelle 12: Ausbeutebestimmung bei Verwendung verschieden konzentrierter Ethanol/Wasser-Gemische. Es wurden jeweils 2 getrennte Ansätze gemacht (Auszug 1/2). Als Referenz diente ein Auszug mit 100 % Methanol (MeOH-Referenz). Die Mittelwerte der Ausbeuten (MW (%)) wurden im Diagramm gegen den Ethanol-Gehalt (EtOH-Gehalt) abgetragen.

Die Bestimmung der Konzentrationen in den ethanolischen Auszügen der Kratomproben wurden nachfolgend - wie auch bei den methanolischen Auszügen - mit einem 80 %igen Ethanol/Wasser-Gemisch durchgeführt. Die Angaben in Tabelle 13 beziehen sich auf Auszüge mit diesem Gemisch.

Die höchste Alkaloidkonzentration (7,7 %) ist in der als „Extrakt 10x“ bezeichneten Kratomprobe gemessen worden. Den niedrigsten Alkaloidgehalt (1,0 %) wies die als „Thai Commercial“ bezeichnete Kratomprobe auf.

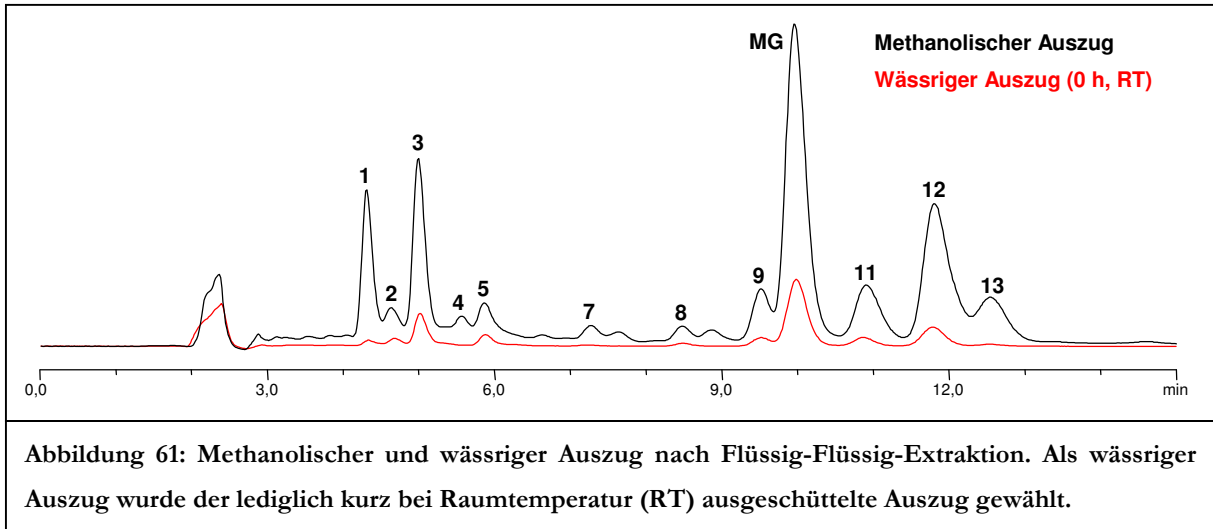
Ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Methanol/Wasser- und der Ethanol/Wasser-Auszüge ist nicht erkennbar. Eine deutliche Verschiebung des Alkaloid-Musters oder der Alkaloid-Konzentrationen konnte nicht festgestellt werden.

Probe	Peak								IS
	3	8	9 ¹	10 ²	11	12	13		
I	Peakfläche	23592	5246	73866	393747	74848	65467	23775	152209
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,485	2,587	0,492	0,430	0,156	Gesamt
	c [mg/g]	-	-	1,2	6,5	1,2	1,1	0,4	1,0 %
II	Peakfläche	77300	14648	44983	355261	76172	258795	33819	164070
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,274	2,165	0,464	1,577	0,206	Gesamt
	c [mg/g]			0,7	5,4	1,2	3,9	0,5	1,2 %
III	Peakfläche	21830	8986	77139	706717	149491	208819	54944	165938
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,465	4,259	0,901	1,258	0,331	Gesamt
	c [mg/g]			1,2	10,6	2,3	3,1	0,8	1,8 %
IV	Peakfläche	15304	6567	110832	754348	124886	256015	27302	161739
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,685	4,664	0,772	1,583	0,169	Gesamt
	c [mg/g]			1,7	11,7	1,9	4,0	0,4	2,0 %
V	Peakfläche	32147	49419	363150	2404993	432429	1031406	134145	142447
	Q _{Peak/IS}	-	-	2,549	16,883	3,036	7,241	0,942	Gesamt
	c [mg/g]			6,4	42,2	7,6	18,1	2,4	7,7 %
VI	Peakfläche	31308	10501	73416	506434	95627	257041	33674	160491
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,457	3,156	0,596	1,602	0,210	Gesamt
	c [mg/g]			1,1	7,9	1,5	4,0	0,5	1,5 %
VII	Peakfläche	37653	13599	62601	444745	87655	250017	33175	167289
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,374	2,659	0,524	1,495	0,198	Gesamt
	c [mg/g]			0,9	6,6	1,3	3,7	0,5	1,3 %
VIII	Peakfläche	131739	21907	70314	623247	99396	309233	34483	154141
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,456	4,043	0,645	2,006	0,224	Gesamt
	c [mg/g]			1,1	10,1	1,6	5,0	0,6	1,8 %
IX	Peakfläche	61014	7428	82357	493309	78359	114830	14948	120470
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,684	4,095	0,650	0,953	0,124	Gesamt
	c [mg/g]			1,7	10,2	1,6	2,4	0,3	1,6 %
X	Peakfläche	56593	12058	64562	466438	87618	226605	32635	169051
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,382	2,759	0,518	1,340	0,193	Gesamt
	c [mg/g]			1,0	6,9	1,3	3,4	0,5	1,3 %
XI	Peakfläche	47054	15787	48126	352471	72936	224056	31021	155678
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,309	2,264	0,469	1,439	0,199	Gesamt
	c [mg/g]			0,8	5,7	1,2	3,6	0,5	1,2 %
XII	Peakfläche	159999	12933	80619	743500	106205	285901	34879	166056
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,485	4,477	0,640	1,722	0,210	Gesamt
	c [mg/g]			1,2	11,2	1,6	4,3	0,5	1,9 %
XIII	Peakfläche	223467	8963	70573	586357	120573	387067	56754	134282
	Q _{Peak/IS}	-	-	0,526	4,367	0,898	2,882	0,423	Gesamt
	c [mg/g]			1,3	10,9	2,2	7,2	1,1	2,3 %

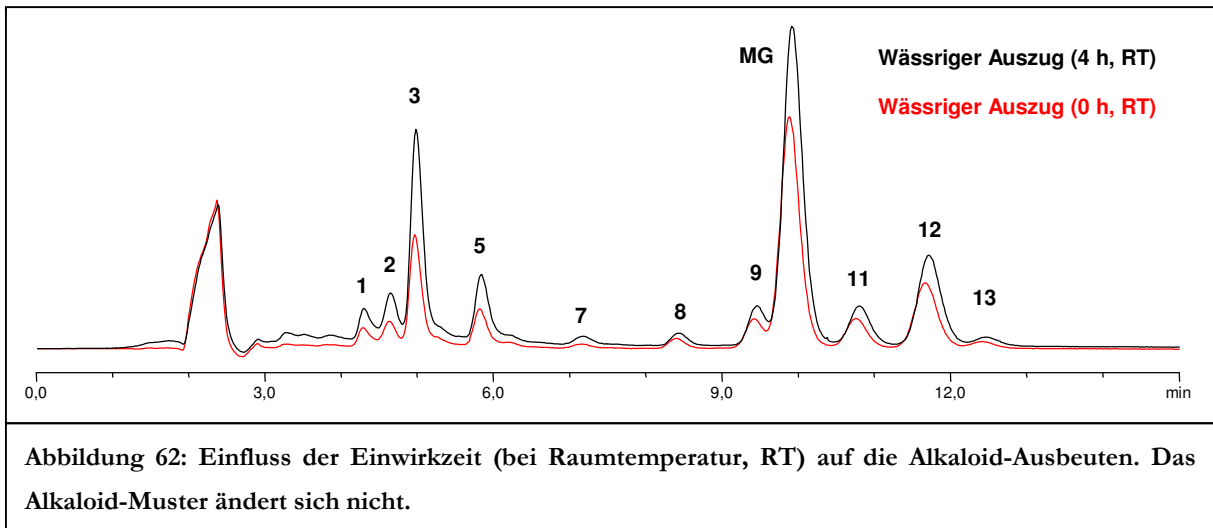
Tabelle 13: Konzentrationen der Alkaloide (Proben I-VII und VIII-XIII). Zur Legende siehe Tabelle 8.

4.7.4 Teezubereitungen

Die Gesamtausbeute ist vergleichsweise gering. Die Peaks 4 und 6 sind im HPLC/DAD-Chromatogramm nicht oder nur als Schulter auf den Peaks 3 und 5 zu erkennen.



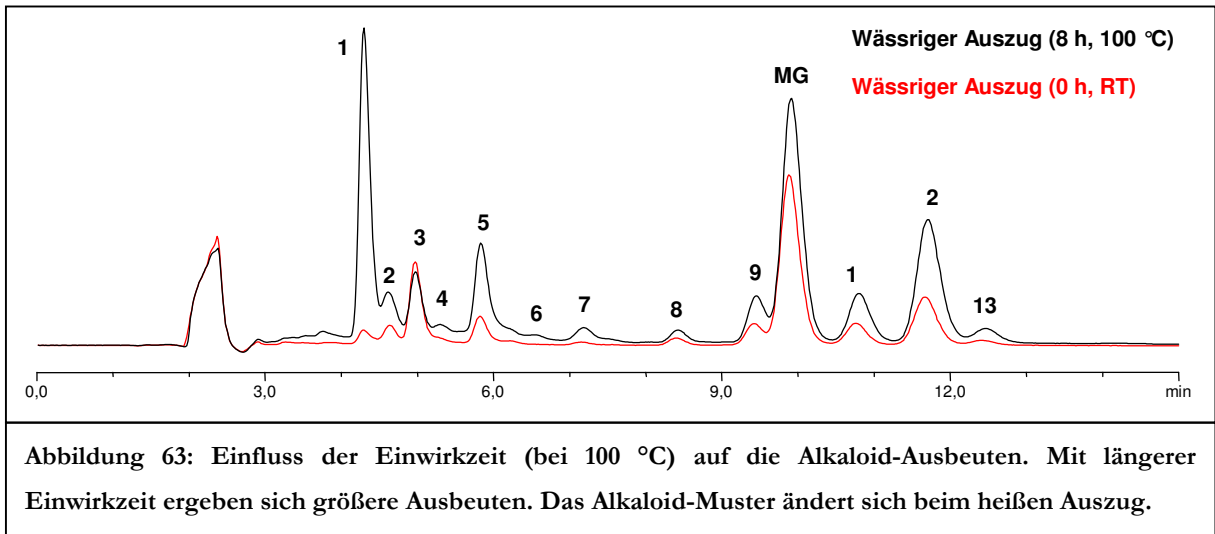
Die mit längerer Einwirkzeit kalt extrahierten wässrigen Auszüge zeigen gegenüber dem nur kurz ausgeschüttelten Auszug eine Verbesserung der Ausbeuten über alle Alkaloide. In den nur kalt ausgezogenen Aufarbeitungen erscheint Peak 1 in seiner Intensität stärker vermindert als die übrigen Peaks. Eine nennenswerte Verschiebung im übrigen Alkaloidmuster ist nicht zu erkennen.



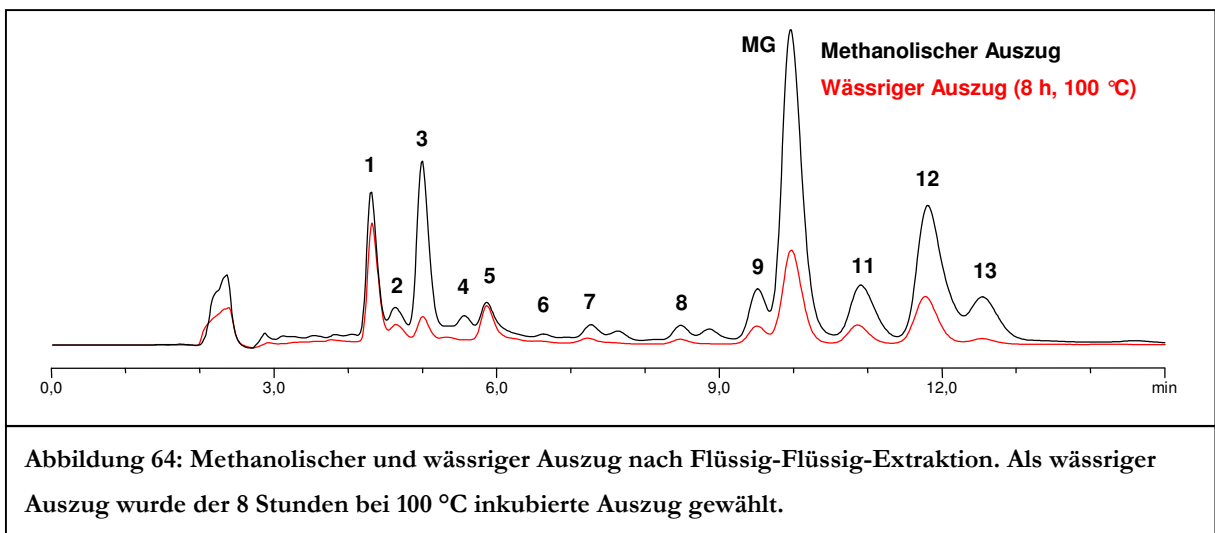
Die Ausbeuten bei Einwirkzeiten über 2 Stunden ändern sich nur unwesentlich.

Die mit heißem Wasser gefertigten Auszüge zeigen wie die kalten Auszüge eher geringe Ausbeuten. Es sind jedoch zwei Besonderheiten zu erkennen: Peak 1 wird deutlich überhöht und erreicht die Ausbeute des methanolischen Auszugs, während Peak 3 keine Ausbeuteverbesserung

erfährt beziehungsweise weniger intensiv auftritt. Die übrigen Alkaloide werden etwas besser ausgezogen als bei Raumtemperatur.



Durch diese Ausbeuteerhöhung erreicht Peak 1 in seiner Fläche etwa 70 % des Flächenwerts des Hauptalkaloids Mitragynin und zählt damit zu den dominanten Substanzen in der Tee-Zubereitung. Das Mitragynin selber erreicht auch bei Verwendung heißen Wassers lediglich eine Wiederfindung von einem Drittel gegenüber der Wiederfindung bei Verwendung von Methanol.



Deutlich wird im direkten Vergleich mit dem methanolischen Auszug auch, dass Peak 5 ähnlich wie Peak 1, besser ausgezogen wird als beispielsweise die Indol-Alkaloide (Peaks 9-13).

Die Ausbeuten der Peaks 1 und 10 (MG) sind exemplarisch in der folgenden Tabelle angegeben, wobei zu erkennen ist, dass die Ausbeute des Oxindols zu Peak 1 bei den heißen Auszügen sich gegenüber dem kalten Auszug verzehnfacht und damit auf dem Niveau des methanolischen Auszugs liegt.

	Dauer	Peakfläche			Q _{Peak/IS}		Relative Intensität	
		Peak 1	MG	IS	Peak 1	MG	Peak 1	MG
	Ref.	1064323	4850401	160302	6,639	30,258	100 %	100 %
Raumtemperatur	0 h	49142	1014342	141876	0,346	7,149	5 %	24 %
	2 h	98708	1263760	151279	0,652	8,354	10 %	28 %
	4 h	98855	1420682	144048	0,686	9,863	10 %	33 %
	6 h	105487	1068435	148050	0,713	7,217	11 %	24 %
	8 h	95678	1168977	156239	0,612	7,482	9 %	25 %
100 °C	2 h	1051016	1567591	142171	7,393	11,026	111 %	36 %
	4 h	974253	1267660	144030	6,764	8,801	102 %	29 %
	6 h	854753	1172619	144258	5,925	8,19	89 %	27 %
	8 h	1055083	1500025	140271	7,522	10,694	113 %	35 %

Tabelle 14: Ausbeuten der wässrigen Auszüge bei verschiedenen Temperaturen und Einwirkzeiten. Als Referenz (Ref.) dient der Flüssig-Flüssig-Extrakt des methanolischen Auszugs. Angegeben sind die Flächen der Peaks 1, 10 (Mitragnin, MG) und des internen Standards (IS).

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war zu klären, ob Mitragyna-Alkaloide mit den im hiesigen Labor verwendeten Standard-Screening-Verfahren (auch in geringen Konzentrationen) erfassbar sind, welche Konzentrationen bestimmter Alkaloide in verschiedenen Kratomprodukten vorliegen und ob anhand des Alkaloid-Musters eine Zuordnung von Kratomprodukten zu dem Herkunftsgebiet des zugrundeliegenden Pflanzenmaterials möglich ist.

Der Nachweis von zentralwirksamen Substanzen stellt eine wesentliche Aufgabe in einem forensisch-toxikologischen Labor dar. Ein solches Labor muss sich somit dem ständig wachsenden Umfang der als Rauschmittel in Frage kommenden Substanzen anpassen. Dass Kratom einen berauschenden Charakter besitzt, ist durch zahlreiche Forschungsergebnisse wie allein auch schon durch die Tatsache des traditionell etablierten Missbrauchs von Kratom als Aufputsch- und Drogensatzmittel in den Herkunftsländern belegt (siehe Abschnitt 1.1 und Abschnitt 1.6). In Thailand wird Kratom bis in die heutige Zeit als Aufputschmittel konsumiert; es besitzt jedoch auch eine opioide Wirkung, die traditionell unter anderem im malaysischen Raum genutzt wird [Tsuchiya et al. 2002; Takayama 2004; Matsumoto et al. 2004; Horie et al. 2005; Vicknasingam et al. 2009].

Da Untersuchungen an authentischen Blutproben, also Probenmaterial, das nach dem Konsum von Kratom gewonnen wurde, hier nicht durchgeführt werden konnten, wurden die Untersuchungen auf 13 in Deutschland frei erhältliche Kratomprodukte beschränkt. Es wurden nur Kratomprodukte in die Untersuchungen einbezogen, die gemäß ihrer Deklaration lediglich aus Mitragynapflanzen hergestellt waren und keine Mischprodukte verschiedener Pflanzen darstellen. Im Gegensatz dazu wird Kratom aktuell auch als Beimengung zu Räucherwaren verwendet. Bei einer Untersuchung von solchen Räucherwaren fanden Schröfel et al. in 41 von 194 untersuchten sogenannten „Kräutermischungen“ Mitragyna-Alkaloide [Schröfel et al. 2011]. Diese Kräutermischungen (zum Beispiel „Spice“), die in der Regel durch Rauchen konsumiert werden, wurden bis zur Unterstellung der teilweise als Wirksubstanzen beigemengten synthetischen Cannabinoide unter das Betäubungsmittelgesetz als legaler Cannabisersatz verwendet.

Über das Rauchen von Kratom wird auch in Internetforen berichtet; die hauptsächlich traditionellen Konsumarten (Kauen der Blätter, Trinken von Teezubereitungen) in den Herkunftsländern weisen jedoch darauf hin, dass das Rauchen eine eher untergeordnete Rolle

spielt. Anhand von Untersuchungen mit „Rauchapparaturen“ konnte allerdings gezeigt werden, dass Mitragynina-Alkaloide auch im Kondensat des Rauchs von verbrennenden Mitragynablättern enthalten sind [Dömkes 2007].

Angaben zu Mitragyninkonzentrationen im Blut nach Kratomkonsum unabhängig von der Konsumform sind in der überschaubaren Literatur bislang nicht veröffentlicht. Eine Methode zur Extraktion von zuvor zugesetztem Mitragynin aus Blutproben wurde von Klein beschrieben [Klein 2008]. Hierbei handelte es sich jedoch um eine gezielte Untersuchung auf Mitragynin und nicht wie hier vorgesehen die Absicht, Mitragynina-Alkaloide auch im Standard-Screeningverfahren zu erfassen. Über die nach einem Kratomkonsum im Blut zu erwartenden Konzentrationen liegen daher bislang keine Erkenntnisse vor.

5.1 Methodenentwicklung

Ausgangspunkt der Methodenentwicklung war das im hiesigen Labor verwendete Screeningverfahren mit einem HPLC/DAD-System. Die verwendeten Messparameter (siehe Abschnitt 3.3.1) stellen eine Optimierung zur Detektion zahlreicher, häufig bei forensisch-toxikologischen Fragestellungen in Erscheinung tretenden Substanzen - darunter auch Alkaloide - dar. Die Injektion der Reinsubstanz (Mitragyninpicrat) erbrachte ein deutliches Signal für das Mitragynin bei einer Retentionszeit von etwa 9 Minuten. Der Peak zeigte eine annähernd ideale Form und ein Spektrum, das die Anwesenheit der Substanz auch bei der standardmäßig verwendeten Wellenlänge von 220 nm (das Spektrum besitzt ein Maximum bei 223 nm) erlaubt. Das Spektrum konnte durch Vergleich mit Literaturangaben [Kikura-Hanajiri et al. 2009] identifiziert werden. In den hier benutzten Spektrensammlungen in elektronischer wie auch gedruckter Form ist das Mitragyninspektrum dagegen nicht hinterlegt. Durch die Untersuchungen konnten das Spektrum von Mitragynin sowie der weiteren identifizierten Substanzen nunmehr in die Benutzerbibliothek der Analysengeräte-Software aufgenommen werden und stehen damit für zukünftige Untersuchungen zur Verfügung.

Zur Vorbereitung des HPLC/DAD-Systems auf die Quantifizierung von Mitragynin wurde eine Kalibration durchgeführt, mit der gleichzeitig auch die Linearität der verwendeten Methode, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie auch die Zulässigkeit einer „Lösemittel-Kalibration“ geprüft wurde. Auch diese Untersuchungen führten zu Ergebnissen, die die Eignung des Standardverfahrens bestätigten. Die Bestimmungsgrenze wurde im Bereich unter 10 ng/ml (7,2 ng/ml) liegend berechnet. Das entspricht einem Mitragyningehalt von weniger als

10 µg (7,2 µg) Mitragynin je Gramm Probenmaterial (hier Pulver beziehungsweise gerebeltes Blattmaterial) bei der Injektion einer nach dem Standardverfahren extrahierten Lösung mit 1 mg Blatt je ml Lösemittel. Damit ist die verwendete Methode geeignet, Mitragyningehalte von etwa 0,001 % bezogen auf das Blattgewicht zu erfassen, was um einen Faktor von über 500 empfindlicher ist, als es für die zu erwartenden Gehalte von über 0,5 % [Amattayakul 1960; Vicknasingam et al. 2009; Kikura-Hanajiri et al. 2009] nötig wäre. Weiterhin wäre die Methode geeignet, Mitragyninkonzentrationen von unter 10 ng/ml in zu untersuchenden Körperflüssigkeiten (wie zum Beispiel Blut oder Urin) zu erfassen und liegt somit deutlich niedriger, als die in der von Klein speziell für diese Fragestellung entwickelte Methode zur Erfassung von Mitragynin in Blut [Klein 2008], die mit 41,9 ng/ml angegeben wurde. In Bezug auf die Quantifizierung von Mitragynin in wässrigen Medien war bei der Messung der Extrakte des Pflanzenmaterials in der vorliegenden Arbeit eine Störung durch Matrixeffekte nicht festzustellen. Weiterhin wurde eine nahezu vollständige Wiederfindung ermittelt. In weiteren Untersuchungen wäre allerdings noch zu klären, welchen Einfluss die Extraktion des Mitragynins aus Blut im Vergleich zu dem hier verwendeten wässrigen Ausgangsmaterial hat.

5.2 Qualitativer Nachweis von Mitragyna-Alkaloiden

Da im Hinblick auf weitere Untersuchungen auch Mitragyna-Alkaloide in komplexeren Matrices als dem verwendeten Pflanzenmaterial (zum Beispiel in Blut) erfasst werden sollen und eine Aufreinigung des Probenmaterials diesbezüglich unumgänglich ist, wurde ermittelt, welche der im Pflanzenmaterial vorkommenden Alkaloide nach der verwendeten Flüssig-Flüssig-Extraktion noch detektiert werden können. Der qualitative Nachweis beziehungsweise die Identifizierung der Alkaloide stellt die Grundlage für die spätere Quantifizierung der Substanzen dar. Die UV-Spektren können Hinweise auf bestimmte Strukturelemente der gemessenen Substanzen geben, die einen Einfluss auf die UV-Absorption haben (Chromophore). Eine Identifizierung kann jedoch insbesondere dann nicht vorgenommen werden, wenn Vergleichssubstanzen und Vergleichsspektren nicht vorhanden sind. Deswegen wurden diejenigen Substanzen ausgewählt, die auch nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion noch detektierbar waren und bei denen die Vermutung nahe lag, dass es sich bei diesen um Mitragyna-Alkaloide handelte. Dies war bei den Indol-Alkaloiden vom Mitragynin-Typ vergleichsweise eindeutig, da diese untereinander fast identische UV-Spektren zeigen.

In einer zweiten Gruppe wurden die vermutlichen Oxindole zusammengefasst. Der Vergleich der Spektren dieser Substanzen ergab übereinstimmende Maxima und Minima bei höheren Wellenlängen, was auf eine gewisse strukturelle Verwandtschaft hinweist, aber auch ein bei den verschiedenen Substanzen unterschiedlich gelegenes kurzwelliges Maximum, das im Bereich zwischen 207 und 220 nm lag. Eine Verschiebung des Maximums in diesem Bereich wurde in der Literatur beschrieben [Shellard, Alam 1968].

Nach der Fraktionierung des Flüssig-Flüssig-Extraktes in 13 Portionen, die jeweils den Hauptanteil der ausgewählten 13 Peaks enthielten, wurden die einzelnen Fraktionen mittels GC/MS untersucht. Ziel war die Identifizierung beziehungsweise korrekte Zuordnung anhand der Massenspektren der fraglichen Substanzen. Bei den Indol-Alkaloiden Mitragynin, Mitraciliatin, Speciogynin, Speciociliatin und Paynanthein (Fraktionen 9-13) war dies unter anderem deswegen möglich, da für die vier erstgenannten Substanzen Spektren in einer elektronischen Vergleichsbibliothek (NIST05) vorhanden waren und deren Fragmentierungsmuster in der Literatur (siehe Abschnitt 4.5.1) ausführlich beschrieben wurden. Im Falle der übrigen Fraktionen konnten Vorschläge zur Grundstruktur erarbeitet werden. Für diese Substanzen waren keine Bibliotheksspektren als Vergleich verfügbar und auch die Literaturangaben [Beckett et al. 1969; Hemingway et al. 1975] erlaubten keine genaue Identifizierung. Wir schlagen aufgrund der Fragmentierungsmuster folgende Zuordnung vor: Speciofolin oder Isomer (Fraktion 1 und Fraktion 2), Isorhynchophyllin oder Isomer (Fraktion 3 und Fraktion 5), Mitragynin Oxindol A/B (Fraktion 7) und (Iso-) Corynantheidin (Fraktion 8). Insgesamt konnten aufgrund der vorliegenden Arbeit demnach auch ohne das Vorliegen der entsprechenden Vergleichssubstanzen (mit Ausnahme des Mitragynins) für elf Alkaloide Vorschläge für die Identität beziehungsweise die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Grundstruktur gemacht werden, die somit für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang, dass es neben den in dieser Arbeit untersuchten Alkaloid-Gruppen weitere Gruppen von Mitragyna-Alkaloiden gibt, die nicht in die Betrachtungen mit einbezogen wurden (siehe Abschnitt 1.2). Weiterhin ergibt sich als Schwierigkeit, dass die zahlreichen Isomere der jeweiligen Grundformen sich durch die angewendeten HPLC- und GC-Methoden nicht zwangsläufig trennen lassen, wie dies beispielsweise für die vier Stereoisomere Mitragynin, Mitraciliatin, Speciogynin und Speciociliatin der Fall ist. Einige flüssigchromatographisch koeluiierende Substanzen konnten immerhin fraktioniert aufgefangen und anschließend gaschromatographisch getrennt werden. Hierdurch ist erklärbar, dass in einigen Fraktionen mehr als ein Signal im GC/MS-System erhalten wurde.

Ebenso waren einige gaschromatographisch gleichzeitig eluierende Mitragyna-Alkaloide zwanglos flüssigchromatographisch zu trennen. Es konnte demnach gezeigt werden, dass mit den verwendeten Standardmethoden eine gute Trennung und Detektierbarkeit auf beiden verwendeten Systemen erzielt werden kann.

Die nach den Ergebnissen der qualitativen Analysen entwickelte SIM-Methode eignet sich als empfindliche Messmethode für weitere Untersuchungen wie zum Beispiel an Körperflüssigkeiten von Kratom-Konsumenten, in denen die Konzentrationen deutlich niedriger sein dürften. Durch eine Einschränkung auf wenige Alkaloide beziehungsweise wenige Massen je Zeiteinheit (zum Beispiel durch Nutzung von Zeitfenstern, in denen jeweils nur die dem dort erwarteten Peak zugeordneten Massen aufgenommen werden) ließe sich eine zusätzliche Empfindlichkeitssteigerung gegenüber der in Abschnitt 4.7.1 dargestellten Methode erzielen. Eine Optimierung und Validierung dieser SIM-Methode wurde allerdings zurückgestellt, da die Untersuchungen an authentischem Probenmaterial von uns bisher nicht durchgeführt werden konnten (siehe Abschnitt 2).

5.3 Quantitativer Nachweis der Indol-Alkaloide

Bei den Vorversuchen stellte sich heraus, dass das am Besten geeignete Auszugsmittel ein 80 %iges Methanol/Wasser-Gemisch war. Dies steht im Einklang mit den Angaben von Kikura-Hanajiri, denen zufolge die Maximalausbeute beim Auszug insbesondere von 7-Hydroxy-Mitragynin mit eben diesem Gemisch erzielt werden konnte [Kikura-Hanajiri et al. 2009]. In weiteren Versuchen wurde geprüft, mit welchem Ethanol/Wasser-Wasser-Gemisch die höchsten Ausbeuten zu erzielen sind. Auch hier erwies sich ein 80 %iges Gemisch als das Geeignetste. Die uns zur Verfügung gestellten Kratom-Proben wie auch das zuvor im regulären Handel erworbene Blattmaterial wurden mit diesem Gemisch ausgezogen und die Konzentrationen des Mitragynins bestimmt. Eine Verwendung der Mitragynin-Kalibration für die übrigen Indol-Alkaloide erschien zulässig, da es sich bei Mitraciliatin, Speciogynin und Speciociliatin um Stereoisomere des Mitragynins handelt. Das Paynanthein wurde ebenfalls mittels der Kalibration für Mitragynin abgeschätzt, wobei hier zu beachten ist, dass der erhaltene Wert wegen des niedrigeren Molekulargewichts (396 statt 398 g/mol) geringfügig (etwa 0,5 %) verringert werden müsste. Für weitere, zum Teil nicht sicher identifizierte Alkaloide eignete sich die Kalibration nicht. Die Summe der ermittelten Konzentrationen der Indol-Alkaloide wurde als Gesamt-Indolalkaloidgehalt angegeben. Dies stellt jedoch nicht den Gesamtalkaloidgehalt dar. Zu diesem

wären noch die darin nicht berücksichtigten Oxindole sowie die in der HPLC nicht erfassten Alkaloide (unter Umständen auch weitere hier nicht erfasste Indol-Alkaloide) mit einzubeziehen. Der Gesamtalkaloidgehalt hätte für einen direkten Vergleich mit den Angaben in der Fachliteratur tatsächlich durch Wägung bestimmt werden müssen. Eine Gewichtsbestimmung der Alkaloide war jedoch nicht Teil der angestrebten Ziele dieser Arbeit und wurde auch nicht durchgeführt.

Der Alkaloidgehalt, der durch die Bestimmung des Peaks 10 ermittelt wurde, ist als Mitragyninegehalt definiert worden. Es kann aufgrund der Fraktionierungsversuche nicht ganz ausgeschlossen werden, dass geringe Anteile anderer Alkaloide zur gleichen Zeit eluieren. Da diese den Ergebnissen der GC/MS-Analyse dieser Fraktion zufolge jedoch nur einen vernachlässigbaren Anteil an der Gesamtmenge haben dürften (siehe Abschnitt 4.5.1.10), erscheint die gewählte Vorgehensweise vertretbar. Die Mitragyninegehalte der Pulverproben im Methanol/Wasser-Auszug (in der Tabelle unten mit „Methanol“ überschrieben) und im Ethanol/Wasser-Auszug (in der Tabelle unten mit „Ethanol“ überschrieben) waren im Einzelnen (Werte gerundet):

Her- kunft	Probe	Name	Mitragyninegehalt in %	
			Methanol	Ethanol
Thailand	I	Thai Commercial Kratom	0,6 %	0,7 %
	II	Super Thai Kratom	0,7 %	0,5 %
	III	Thai Premium Kratom	1,1 %	1,1 %
	IV	Thai Pimp (Maeng Da) Kratom	1,1 %	1,2 %
?	V	Kratom Extrakt 10x	3,9 %	4,2 %
Malaysia	VI	Malaysisches Green Kratom	0,9 %	0,8 %
	VII	Malaysisches Premium Kratom	0,7 %	0,7 %
?	VIII	Blattmaterial unbekannter Herkunft	0,9 %	1,0 %
Indonesien	IX	Indo Commercial Kratom	0,8 %	1,0 %
	X	Indonesian Green Kratom	0,8 %	0,7 %
	XI	Indonesian Premium Kratom	0,6 %	0,6 %
	XII	Super Enhanced Indo Kratom	1,2 %	1,1 %
	XIII	Indonesisches Meniti Kratom	0,9 %	1,1 %

Tabelle 15: Mitragyninegehalte der untersuchten Kratomproben bei unterschiedlichen Auszugsmethoden. Die Herkunft der Pflanzen, die Ausgangsmaterial der Proben V und VIII waren, ist unklar.

Anhand dieser Daten für gepulvertes Blattmaterial kann gezeigt werden, dass in nicht angereicherten Proben der Mitragyningehalt zwischen 0,6 und 1,2 % des Pulvergewichts und damit des Gewichts der getrockneten Blätter (sofern die Händlerangabe, dass es sich um gepulvertes Blattmaterial handelt, glaubwürdig ist) liegt. Dies steht im Einklang mit den Literaturangaben, dass etwas über die Hälfte des Gesamtalkaloidgehaltes, der 1-2 % betragen soll (siehe Abschnitt 1.2), auf das Mitragynin entfällt. Das als 10fach Konzentrat verkaufte Produkt V enthielt einen deutlich höheren Anteil (3,9 %). Lediglich aufs Mitragynin bezogen wäre damit aber eher von einem 6,5fach-Konzentrat gegenüber dem „Commercial-Produkt“ zu sprechen, jedoch wurde, wie eingangs erwähnt, der Gesamtalkaloidgehalt nicht bestimmt, der möglicherweise höher liegt.

Bei einer Untersuchung von Kräutermischungen in Deutschland wurden Mitragyningehalte von bis zu 6 % festgestellt [Schröfel et al. 2011], was eindeutig nicht für eine Beimengung von Kratompulver zu einer Kräutermischung, sondern für eine Beimengung von Konzentraten zu dieser Mischung spricht. Dies dürfte ebenso für die auf dem japanischen Markt befindlichen Kratomprodukte gelten, bei denen Mitragyningehalte von 1-6 % ermittelt wurden, wobei diese zum Teil auch als Harze bezeichnet waren [Kikura-Hanajiri et al. 2009].

Bei der Betrachtung der Chromatogramme fällt auf, dass die Alkaloidmuster in den einzelnen Aufarbeitungen sich voneinander unterscheiden. Insbesondere die Intensitäten der Peaks 3 und 12 im Verhältnis zum Mitragynin unterscheiden sich beträchtlich zwischen den Auszügen. Aufgrund der erheblichen Unterschiede insbesondere bei Probe II (Super Thai Kratom) kann aber nicht sicher festgestellt werden, dass ein bestimmtes Alkaloidmuster einer bestimmten Herkunftsangabe zugeordnet werden kann. Es kann andererseits jedoch auch nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob Probe II tatsächlich unverfälscht und thailändischer Herkunft ist. Blicke diese Probe unberücksichtigt, ergäben sich folgende Vorschläge zur Zuordnung:

Flächenverhältnis	Herkunftsland		
	Thailand	Malaysia	Indonesien
Peak 3 / MG	<= 5 %	<= 8 %	>= 11 %
Peak 12 / MG	<= 36 %	>= 51 %	>= 25 %

Tabelle 16: Vorschläge zur Bestimmung des Herkunftslandes anhand des Peakflächenverhältnisses ausgewählter Alkaloide.

Probe V (10fach Extrakt) müsste somit dem Flächenverhältnis von Peak 3 zum Mitragyninpeak (1 %) zufolge als thailändische oder malaysische Sorte eingestuft werden. Eine Entscheidung anhand des Flächenverhältnisses von Peak 12 zum Mitragyninpeak (43 %) kann

ohne eine definiertere Grenzziehung zwischen den beiden Kategorien nicht getroffen werden. Das Blattmaterial unbekannter Herkunft (Probe VIII; Peak 3: 21 %, Peak 12: 48 %) ließe sich zwanglos in die indonesischen Kategorie einordnen. Die Einordnung ist jedoch nicht nur vor dem Hintergrund der deutliche unterschiedlichen Probe II sehr kritisch zu betrachten, da keine ausreichend große Zahl an Proben mit gesichertem Herkunftsnachweis untersucht wurde und darüber hinaus weitere das Alkaloidmuster beeinflussende Faktoren wie Erntezeit, Baumalter usw. (siehe Abschnitt 1.2) hinzukommen.

Durch die Wahl eines Ethanol/Wasser-Gemischs wäre prinzipiell die Möglichkeit der Herstellung einer konsumfähigen Kratomzubereitung gegeben. Eine geänderte Selektivität gegenüber den untersuchten Alkaloiden im Vergleich zum Methanol/Wasser-Gemisch zeigte sich nicht. Die Konzentrationen lagen in der gleichen Größenordnung und weisen damit auf einen nahezu vollständigen Auszug auch mit diesem Lösemittel hin. Ein solcher „Aufgesetzter“ beinhaltet einen rund drei- bis viermal höheren Gehalt an Indolalkaloiden als eine Teezubereitung. Die Versuche an Teezubereitungen haben gezeigt, dass das Mitragynin, sofern der Auszug mit Wasser vorgenommen wird, mit einer Ausbeute von lediglich 24-36 % gewonnen werden kann, wobei diese Ausbeute weder durch die Auszugszeit noch durch die Temperatur verbessert wird. Anders verhält es sich bei der als Oxindol identifizierte Substanz, die Peak 1 zugrunde liegt. Die Wiederfindung liegt beim kalten Auszug lediglich bei 5-11 %, steigt aber bei Temperaturerhöhung auf einen Wert zwischen 89 und 113 % (verglichen mit einem rein methanolischen Auszug). Dies deutet an, dass das Kochen der Blätter, wie es in Malaysia betrieben wird, durchaus einen Einfluss auf das Alkaloidmuster im Konsumgut hat, das letztlich zum Verzehr angeboten wird. Der Anteil bestimmter Oxindol-Alkaloide ist im Tee im Vergleich zum eigentlichen Hauptalkaloid höher als im alkoholisch ausgezogenen Probenmaterial (siehe Abschnitte 4.7.2 bis 4.7.4). Inwieweit dies einen Einfluss auf die Wirkung des Tees hat, der dort bevorzugt wegen seiner opioiden Wirkung getrunken wird, wäre in weiteren Untersuchungen zu klären.

Da nur etwa ein Drittel des Mitragynins in den Tee gelangt, müsste eine Teezubereitung, die 70 mg Mitragynin (dies ist nach Vicknasingam die typische Dosierung bei Opiat-Substitution [Vicknasingam et al. 2009]) enthalten soll, aus 30 g Blattmaterial mit einem Mitragyningehalt von 7 mg/g gefertigt werden. Da dies auf drei Gläser über den Tag verteilt aufgenommen werden soll, ergäbe sich daraus, dass je Glas 10 g Kratom verwendet werden müssten. Diese Berechnungen bestätigen in der Größenordnung die Angaben von Vicknasingam (siehe oben). Inwieweit sich die Wirkung eines Tees dadurch ändert, dass statt nur des reinen wässrigen

Überstandes auch der Bodensatz mitgetrunken wird, wodurch die Menge der aufgenommenen Alkaloide erhöht würde, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Eine Simulation der in Thailand bevorzugten Konsumvariante des Kauens der Blätter, die zu einer stimulierenden Wirkung führen soll, nämlich der Auszug des Blattmaterials mit Speichel, wurde hier nicht durchgeführt. Die stimulierende Wirkung soll bereits nach dem Genuss weniger Blätter eintreten. Ein Blatt wiegt nach den Angaben von Amattayakul typischerweise 1,7 g [Amattayakul 1960], worin bei einem Mitragyningehalt von 7 mg/g etwa 12 mg Mitragynin enthalten sind. Da nach Vicknasingam (siehe oben) 20 mg Mitragynin für die stimulierende Wirkung ausreichend sein sollen, wäre diese Mitragyninmenge tatsächlich bereits durch das Kauen zweier Blätter erreicht, sofern hierbei der Hauptanteil aus den Blättern ausgezogen und in den Körper aufgenommen werden kann. Dies unterstellt, kann bezüglich der in der Zielstellung formulierten Frage der Dosierung und Wirksamkeit von Kratom mit einem stimulierenden Effekt bereits beim Konsum eines ethanolischen Auszugs von etwa 3,4 g Blattmaterial (Pulver) gerechnet werden. Gleiches gälte für einen Teeaufguss von etwa 10 g, sofern der Bodensatz nicht mit eingenommen wird.

Eine Methode zur Quantifizierung mittels GC/MS, die einen bedeutenden Gewinn in Bezug auf die Nachweisempfindlichkeit und Identifizierungssicherheit erbringen könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht erstellt, da die verwendete HPLC/DAD-Methode für die bearbeitete Fragestellung völlig ausreichend war. Eine höhere Nachweisempfindlichkeit wäre eventuell beim Nachweis von Mitragyna-Alkaloiden in Körperflüssigkeiten und Geweben von Bedeutung. Hierzu kann die vorbereitete SIM-Methode verwendet werden. Deren Empfindlichkeit kann zusätzlich weiter gesteigert werden, wenn für die Messung von ausgewählten Alkaloiden durch Einrichten von Zeitfenstern die Anzahl der erfassten Ionen je Zeiteinheit gesenkt werden kann.

6 Zusammenfassung

Die Pflanze *Mitragyna speciosa* Korth. ist ein Rötengewächs, das vorwiegend in den Sumpfgebieten Thailands und Malaysias vorkommt. Die Pflanze wie auch die Zubereitungen aus den Blättern der Pflanze werden in Thailand als Kratom bezeichnet. Die Blätter dieses Baumes werden traditionell in der Naturheilkunde, aber auch als Rauschmittel verwendet. Die Wirkung der darin enthaltenen Alkaloide, die sich wie der Neurotransmitter Serotonin von der Aminosäure Tryptophan ableiten, werden als einerseits stimulierend und andererseits sedierend/analgesierend beschrieben, was in zahlreichen Studien auch belegt wurde.

In der vorliegenden Arbeit werden Methoden zum Auszug von Alkaloiden aus Blattmaterial, zur Extraktion dieser Alkaloide aus diversen Lösungen und zu deren Detektion in einem HPLC/DAD- sowie einem GC/MS-System beschrieben. Weiterhin werden Möglichkeiten zur Identifizierung von *Mitragyna*-Alkaloiden ohne das Vorliegen von Vergleichssubstanzen gezeigt. Für die Indol-Alkaloide Mitragynin, Mitraciliatin, Speciogynin, Speciociliatin waren für die vier erstgenannten Substanzen Spektren in einer elektronischen Vergleichsbibliothek (NIST05) vorhanden. Das Paynanthein konnte aufgrund seines Fragmentierungsmusters identifiziert werden. Im Falle der übrigen ausgewählten Alkaloide konnten Vorschläge zur Grundstruktur erarbeitet werden. Für diese Substanzen waren keine Bibliotheksspektren als Vergleich verfügbar und auch die Literaturangaben erlaubten keine genaue Identifizierung. Wir schlagen aber aufgrund der Fragmentierungsmuster folgende Zuordnung vor: Speciofolin oder Isomer, Isorhynchophyllin oder Isomer, Mitragynin Oxindol A/B und (Iso-) Corynantheidin.

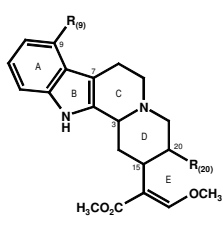
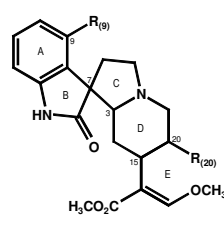
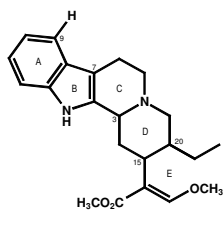
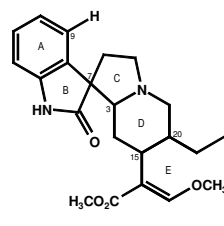
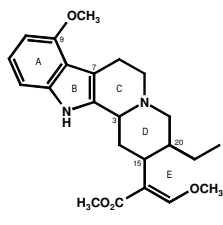
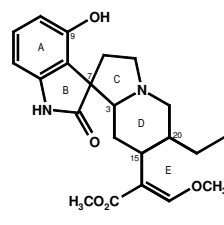
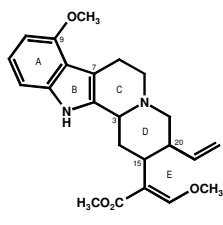
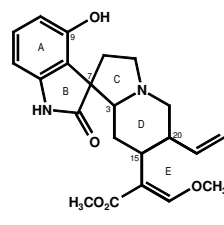
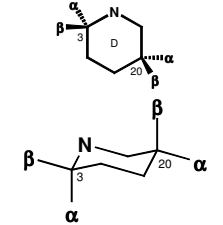
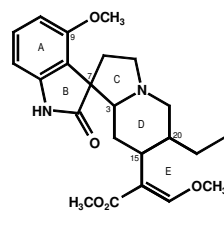
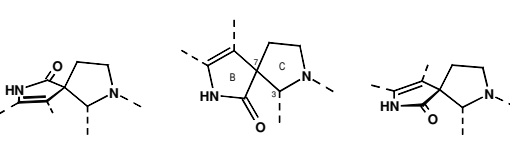
Der Gehalt der identifizierten Alkaloide in 11 verschiedenen Kratomprodukten wurde ermittelt und der so erhaltene Alkaloid-Fingerprint zu den Herkunftsangaben dieser Produkte ins Verhältnis gesetzt. Zwei unbekannte Proben wurden mit diesen Daten verglichen.

Als effektivstes Auszugsmittel erwies sich ein 80 %iges Methanol/Wasser-Gemisch, das zur Bestimmung der Alkaloidgehalte verwendet wurde. Die Mitragynin-Gehalte der untersuchten Kratomprodukte lagen zwischen 0,6 und 1,2 %; in einem als „10x-Extrakt“ angebotenen Produkt bei 3,9 %. Die benutzte Extraktionsmethode zeigt eine nahezu vollständige Wiederfindung der betrachteten Alkaloide und erlaubt eine Quantifizierung von Mitragynin in einer Konzentration, die weit unterhalb der von uns angestrebten Nachweisgrenze in Kratomprodukten (0,001 % des Blattmaterials) liegt.

Es sollten jedoch auch prinzipiell für jedermann zugängliche Auszugsmethoden zur Anwendung gebracht werden, so dass darüber hinaus Teezubereitungen und Auszüge mit Trinkalkohol gefertigt und untersucht wurden. Der Auszug mit einem 80 %igen Ethanol/Wasser-Gemisch zeigte vergleichbare Ergebnisse zum methanolischen Auszug, wohingegen in den Teezubereitungen eine Ausbeuteverschlechterung und Verschiebung im Alkaloidmuster zu erkennen war. Die hier verwendete Standard-Methode wurde durch die ermittelten Parameter (Spektren, Retentionszeiten, Kalibration) so erweitert, dass eine Quantifizierung von Mitragynin im Routinebetrieb möglich ist.

Eine Zuordnung der Produkte zu den angegebenen Herkunftsgebieten anhand des Alkaloid-Fingerprints erwies sich als nur begrenzt möglich.

Eine GC/MS-SIM-Methode zur qualitativen Erfassung von Alkaloiden wurde erstellt und kann für weitere Untersuchungen (Quantifizierung) an Körperflüssigkeiten erweitert werden.

Indol-Alkaloide	Oxindol-Alkaloide															
 <p style="text-align: center;">R₍₉₎ H OCH₃ R₍₂₀₎ CH₂-CH₃ CH=CH₂</p> <p style="text-align: center;">Corynantheidin-Typ</p>	 <p style="text-align: center;">R₍₉₎ H OH OCH₃ R₍₂₀₎ CH₂-CH₃ CH=CH₂</p> <p style="text-align: center;">Rhynchophyllin-Typ (Oxindol)</p>															
 <p>a Corynantheidin n Dihydrocorynanthein e Isocorynantheidin p Hirsutin</p> <p style="text-align: center;">C₍₉₎-H-Corynantheidin-Typ</p>	 <p>aA Corynoxin A aB Corynoxin B nA Rhynchophyllin nB Isorhynchophyllin</p> <p style="text-align: center;">C₍₉₎-H-Rhynchophyllin-Typ</p>															
 <p>a Mitragynin n Speciogynin e Speciociliatin p Mitraciliatin</p> <p style="text-align: center;">C₍₉₎-Methoxy-Corynantheidin-Typ</p>	 <p>aA Mitrafolin aB Isomitrafolin nA Rotundifolin nB Isorotundifolin eA Isospeciofolin eB Speciofolin pB 3-epi-Isorotundifolin</p> <p style="text-align: center;">C₍₉₎-Hydroxy-Rhynchophyllin-Typ</p>															
 <p>n Paynanthein p Isopaynanthein</p> <p style="text-align: center;">C₍₉₎-Methoxy-C₍₂₀₎-Vinyl-Corynantheidin-Typ</p>	 <p>nA Rotundifolein nB Isorotundifolein</p> <p style="text-align: center;">C₍₉₎-Hydroxy-C₍₂₀₎-Vinyl-Rhynchophyllin-Typ</p>															
 <p style="text-align: center;">Legende</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Stellung</th> <th>C₍₉₎</th> <th>C₍₂₀₎</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>a</td> <td>allo</td> <td>α</td> </tr> <tr> <td>n</td> <td>normal</td> <td>β</td> </tr> <tr> <td>e</td> <td>epiallo</td> <td>α</td> </tr> <tr> <td>p</td> <td>psudo</td> <td>β</td> </tr> </tbody> </table> <p>...A (a,n,e,p) - A-Form ...B (a,n,e,p) - B-Form</p> <p style="text-align: center;">Stereoisomere Formen der (Ox-) Indole</p>	Stellung	C ₍₉₎	C ₍₂₀₎	a	allo	α	n	normal	β	e	epiallo	α	p	psudo	β	 <p>aA Mitragynin Oxidol A aB Mitragynin Oxidol B nA Rhynchocilin nB Ciliaphyllin</p> <p style="text-align: center;">C₍₉₎-Methoxy-Rhynchophyllin-Typ</p>
Stellung	C ₍₉₎	C ₍₂₀₎														
a	allo	α														
n	normal	β														
e	epiallo	α														
p	psudo	β														
<p style="text-align: center;">Zusätzliche Formen der Oxindole</p>  <p>A-Form Ringe B und C B-Form</p>	<p style="text-align: center;">Untersuchte Kratom-Sorten</p> <table border="0"> <tr> <td>(VII) Malaysia Premium</td> <td>(VII) Malaysia Premium</td> </tr> <tr> <td>(I) Thai Commercial</td> <td>(VIII) unbek. Herkunft</td> </tr> <tr> <td>(II) Thai Super</td> <td>(IX) Indo Commercial</td> </tr> <tr> <td>(III) Thai Premium</td> <td>(X) Indo Green</td> </tr> <tr> <td>(IV) Thai Pimp</td> <td>(XI) Indo Premium</td> </tr> <tr> <td>(V) 10x Extrakt</td> <td>(XII) Indo Super</td> </tr> <tr> <td>(VI) Malaysia Green</td> <td>(XIII) Indo Meniti</td> </tr> </table>	(VII) Malaysia Premium	(VII) Malaysia Premium	(I) Thai Commercial	(VIII) unbek. Herkunft	(II) Thai Super	(IX) Indo Commercial	(III) Thai Premium	(X) Indo Green	(IV) Thai Pimp	(XI) Indo Premium	(V) 10x Extrakt	(XII) Indo Super	(VI) Malaysia Green	(XIII) Indo Meniti	
(VII) Malaysia Premium	(VII) Malaysia Premium															
(I) Thai Commercial	(VIII) unbek. Herkunft															
(II) Thai Super	(IX) Indo Commercial															
(III) Thai Premium	(X) Indo Green															
(IV) Thai Pimp	(XI) Indo Premium															
(V) 10x Extrakt	(XII) Indo Super															
(VI) Malaysia Green	(XIII) Indo Meniti															

Formeln gestaltet nach Darstellungen von Beckett und Morton sowie Beckett et al. [Beckett, Morton 1966 und Beckett et al. 1969].

7 Literatur

- [Amattayakul 1960]
Amattayakul T., The kraton leaves, J. Department of Medical Sciences, Thailand 2(2) (1960) 104-108.
- [Assanangkornchai et al. 2008]
Assanangkornchai S., Aramrattana A., Perngparn U., Kanato M., Kanika N., Sirivongs Na Ayudhya A., Current situation of substance related problems in thailand, J. Psychiatr. Assoc. Thailand 53 Suppl. (2008) 24S-36S.
- [Azizi et al. 2010]
Azizi J., Ismail S., Mordi M. N., Ramanathan S., Said M. I. M., Mansor S. M., In vitro and in vivo effects of three different *Mitragyna speciosa* Korth. leaf extracts on phase II drug metabolizing enzymes - glutathione transferases (GSTs), *Molecules* 15 (2010) 432-441.
- [Beckett et al. 1965a]
Beckett A. H., Shellard E. J., Tackie A. N., The *Mitragyna* Species of Asia - Part IV. The Alkaloids of the Leafes of *Mitragyna speciosa* Korth.: Isolation of Mitragynine and Speciofoline, *Planta Medica* 13 (2) (1965) 241-246.
- [Beckett et al. 1965b]
Beckett A. H., Shellard E. J., Phillipson J. D., Lee C. M., Alkaloids from the leafes of *Mitragyna speciosa* (Korth.), *J. Pharm. Pharmacol.* 17 (1965) 753-255.
- [Beckett et al. 1966a]
Beckett A. H., Shellard E. J., Phillipson J. D., Lee C. M., The *Mitragyna* Species of Asia - Part VI. Oxindole alkaloids from the leafes of *Mitragyna speciosa* Korth., *Planta Medica* 14(3) (1966) 266-276.
- [Beckett et al. 1966b]
Beckett A. H., Shellard E. J., Phillipson J. D., Lee C. M., The *Mitragyna* Species of Asia - Part VII. Indole Alkaloids from the leafes of *Mitragyna speciosa* Korth., *Planta Medica* 14(3) (1966) 275-288.
- [Beckett et al. 1969]
Beckett A. H., Dwuma-Badu D., Haddock R. E., Some new mitragyna-type indoles and oxindoles; the influence of stereochemistry on mass spectra, *Tetrahedron* 25 (1969) 5961-5969.
- [Beckett, Morton 1966]
Beckett A. H., Morton D. M., The in vitro metabolism of mitragyna alkaloids of corynantheidine structure, *J. Pharmac.* 18 Suppl. (1966) 88S-91S.
- [Burkill 1935]
Burkill I. H., A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula, A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula Vol II (1-2) (1935) 1508.

- [Chan et al. 2005]
Chan K. B., Pakiam C., Rahim R. A., Psychoactive plant abuse: the identification of mitragynine in ketum and in ketum preparations, *Bulletin on Narcotics* 57 (1, 2) (2005) 249-256.
- [Chittrakarn et al. 2008]
Chittrakarn S., Sawangjaroen K., Prasettho S., Janchawee B., Keawpradub N., Inhibitory effects of kratom leaf extract (*Mitragyna speciosa* Korth.) on the rat gastrointestinal tract, *Journal of Ethnopharmacology* 116 (2008) 173-178.
- [Dömkes 2007]
Dömkes H., Charakterisierung von Alkaloiden aus den Blättern von *Mitragyna speciosa* Korth. (Kratom) und deren Folgeprodukten, Diplomarbeit (2007).
- [Duke 1992]
Duke J. A., Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical Databases, Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical Databases (1992).
- [Europäischer Drogenbericht 2009]
Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EBDD), Stand der Drogenproblematik in Europa, Jahresbericht 2009 (2009).
- [Grewal 1932]
Grewal K. S., Observations on the pharmacology of mitragynine, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 46 (1932) 251-271.
- [Hemingway et al. 1974]
Hemingway S. R., Houghton P. J., Phillipson J. D., Shellard E. J., 9-Hydroxyrhynchophylline-type oxindole alkaloids, *Phytochemistry* 14 (1975) 557-563.
- [Horie et al. 2005]
Horie S., Koyama F., Takayama H., Ishikawa H., Aimi N., Ponglux D., Matsumoto K., Murayama T., Indole alkaloids of a thai medicinal herb *Mitragyna speciosa* that has opioid agonistic effect in guinea-pig ileum, *Planta Med* 71 (2005) 231-236.
- [Houghton et al. 1991]
Houghton P. J., Latiff A., Said I. M., Alkaloids from *Mitragyna speciosa*, *Phytochemistry* 30 (1) (1991) 347-350.
- [Houghton, Said 1986]
Houghton P. J., Said I. M., 3-Dehydromitragynine: an alkaloid from *Mitragyna speciosa*, *Phytochemistry* 25 (12) (1986) 2910-2912.
- [Idid et al. 1998]
Idid S. Z., Saad L. B., Yaacob H., Shahimi M. M., Evaluation of analgesia induced by mitragynine morphine and paracetamol on mice, *ARBEC* (1998) 1-7.

- [Ito et al. 1990]
Ito Y., Yano S., Watanabe K., Yamanaka E., Aimi N., Sakai S.-I., Structure-activity relationship of yohimbine and its related analogs in blocking alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors: a comparative study of cardiovascular activities, *Chem. Pharm. Bull.* 38(6) (1990) 1702-1706.
- [Jansen, Prast 1988]
Jansen K. L. R., Prast C. J., Ethnopharmacology of kratom and the *Mitragyna* alkaloids, *Journal of Ethnopharmacology* 23 (1988) 115-119.
- [Kikura-Hanajiri et al. 2009]
Kikura-Hanajiri R., Kawamura M., Maruyama T., Kitajima M., Takayama H., Goda Y., Simultaneous analysis of mitragynine, 7-hydroxymitragynine, and other alkaloids in the psychotropic plant "kratom" (*Mitragyna speciosa*) by LC-ESI-MS, *Forensic Toxicol.* 27 (2009) 67-74.
- [Klein 2008]
Klein O. N., Die Isolation des Indolalkaloides Mitragynin aus der Pflanze *Mitragyna speciosa* und sein Nachweis in humanem Blutserum, Dissertation (2008).
- [Kornetsky et al. 1988]
Kornetsky C., Bain G., Unterwald E., Lewis M., Brain stimulation reward: effects of ethanol, *Alcohol Clin Exp Res* 12 (1988) 609-616.
- [Korthals 1839]
Korthals P. G., *Observationes de Nucleis indicis, Bonnae, Typis Caroli Georgii* (1839).
- [Kumarnsit et al. 2006]
Kumarnsit E., Keawpradub N., Nuankaew W., Acute and long-term effects of alkaloid extract of *Mitragyna speciosa* on food and water intake and body weight in rats, *Fitoterapia* 77 (2006) 339-345.
- [Kumarnsit et al. 2007]
Kumarnsit E., Vongvatcharanon U., Keawpradub N., Intasaro P., Fos-like immunoreactivity in rat dorsal raphe nuclei induced by alkaloid extract of *Mitragyna speciosa*, *Neuroscience Letters* 416 (2007) 128-132.
- [Kumarnsit et al. 2007]
Kumarnsit E., Keawpradub N., Nuankaew W., Effect of *Mitragyna speciosa* aqueous extract on ethanol withdrawal symptoms in mice, *Fitoterapia* 78 (2007) 182-185.
- [Kuschinsky 1981]
Kuschinsky K., Psychic dependence on opioids: mediated by dopaminergic mechanisms in the striatum?, *Trends Pharmacol. Sci.* 2 (1981) 287.
- [Lala 1984]
Lala P. K., Mass spectroscopy of the alkaloids of *Mitragyna* (Rubiaceae), *J. Inst. Chemists (India)* 56 (1984) 42-47.

- [Matsumoto et al. 1996a]
Matsumoto K., Mizowaki M., Suchitra T., Takayama H. Sakai S-I., Aimi N., Watanabe H., Antinociceptive action of mitragynine in mice: evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors, *Life Sciences* 59 (1996) 1149-1155.
- [Matsumoto et al. 1996b]
Matsumoto K., Mizowaki M., Suchitra T., Murakami Y., Takayama H. Sakai S-I., Aimi N., Watanabe H., Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems, *European Journal of Pharmacology* 317 (1996) 75-81.
- [Matsumoto et al. 1997]
Matsumoto K., Mizowaki M., Takayama H. Sakai S-I., Aimi N., Watanabe H., Suppressive effect of mitragynine on the 5-methoxy-N, N-dimethyltryptamine-induced head-twitch response in Mice, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 57 (1/2) (1997) 319-323.
- [Matsumoto et al. 2004]
Matsumoto K., Horie S., Ishikawa H., Takayama H., Aimi N., Ponglux D., Watanabe K., Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: discovery of an orally active opioid analgesic from the thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*, *Life Sciences* 74 (2004) 2143-2155.
- [Matsumoto et al. 2005]
Matsumoto K., Horie S., Takayama H., Ishikawa H., Aimi N., Ponglux D., Murayama T., Watanabe K., Antinociception, tolerance and withdrawal symptoms induced by 7-hydroxymitragynine, an alkaloid from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*, *Life Sciences* 78 (2005) 2-7.
- [Matsumoto et al. 2006]
Matsumoto K., Hatori Y., Murayama T., Tashima K., Wongseripipatana S., Misawa K., Kitajima M., Takayama H., Horie S., Involvement of μ -opioid receptors in antinociception and inhibition of gastrointestinal transit induced by 7-hydroxymitragynine, isolated from thai herbal medicine *Mitragyna speciosa*, *European Journal of Pharmacology* 549 (2006) 63-70.
- [Milkman, Sunderwirth 1984]
Milkman A., Sunderwirth S., Warum werden wir süchtig?, *Psychologie heute* 11 (1984) 34-40.
- [Mußhoff 1995]
Mußhoff F., Formaldehyd-Neuroamin-Kondensationsprodukte bei chronischen Alkoholikern, *Wissenschaftliche Schriftenreihe Medizin* 1(1995).
- [Parthasarathy et al. 2009]
Parthasarathy S., Bin Azizi J., Ramanathan S., Ismail S., Sasidharan S., Said M. I. M., Mansor S. M., Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae family) leaves, *Molecules* 14 (2009) 3964-3974.

- [Philipp et al. 2009]
 Philipp A. A., Wissenbach D. K., Zoerntlein S. W., Klein O. N., Kanogsunthornrat J., Maurer H. H., Studies on the metabolism of mitragynine, the main alkaloid of the herbal drug kratom, in rat and human urine using liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 44 (2009) 1249-1261.
- [Pingsuthiwong et al. 2007]
 Pingsuthiwong C., Krisitakneong A., Intrarachai A., Matra N., Analysis of *Mitragyna speciosa* (kratom) alkaloids in human urine as a marker of chronic kratom abuse: preliminary results, ICADTS/TIAFT meeting T2007 26.-30.08.2007 Proceedings (2007) Poster.
- [Ponglux et al. 1994]
 Ponglux D., Wongseripipatana S., Takayama H. Kikuchi M., Kurihara M., Kitajima M., Aimi N., Sakai S-I., A new indole alkaloid, 7a-Hydroxy-7H-mitragynin, from *Mitragyna speciosa* in Thailand, *Planta Med.* 60 (1994) 580-581.
- [Rätsch]
 Rätsch C., *Mitragyna speciosa* Korth., *Enzyklopädie der psychoaktiven Substanzen* 366-368.
- [Reanmongkol et al. 2007]
 Reanmongkol W., Keawpradup N., Sawangjaroen K., Effects of the extracts from *Mitragyna speciosa* Korth. leaves on analgesic and behavioural activities in experimental animals, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29 Suppl. (2007) 39-48.
- [Said et al. 1991]
 Said I. M., Chun N. C., Houghton P. J., Ursolic acid from *Mitragyna speciosa*, *Planta Med.* 57 (1991) 398.
- [Seaton et al. 1960]
 Seaton J. C., Nair M. D. Edwards O. E., Marion L., The structure and stereoisomerism of three *Mitragyna* alkaloids, *Canadian Journal of chemistry* 38 (1960) 1035-1042.
- [Schneider 2004]
 Schneider G., Dingermann T., Hiller K., Zündorf I., Alkaloide, die sich vom L-Tryptophan ableiten, *Arzneidrogen* 5. Auflage (2004) 476-499.
- [Schröfel et al 2011]
 Schröfel S., Hupp A., Auwärter V., Arndt T., Zur Verbreitung von Kratom (*Mitragyna speciosa*) in (il)legalen Kräutermischungen, *Toxichem Krimtech* 78(1) (2011) 45-51.
- [Shellard 1974]
 Shellard E. J., The alkaloids of *Mitragyna* with special reference to those of *Mitragyna speciosa* Korth., *Bulletin on Narcotics* XXVI (2) (1974) 41-55.
- [Shellard 1989]
 Shellard E. J., Ethnopharmacology of kratom and the *Mitragyna* alkaloids, *Journal of Ethnopharmacology* 25 (1989) 123-124.

- [Shellard et al. 1978a]
Shellard E. J., Houghton P. J., Masechaba R., The *Mitragyna* Species of Asia - Part XXXI. The Alkaloids of *Mitragyna speciosa* Korth. From Thailand, *Planta Medica* 34 (1978) 26-36.
- [Shellard et al. 1978b]
Shellard E. J., Houghton P. J., Masechaba R., The *Mitragyna* Species of Asia - Part XXXII. The distribution of alkaloids in young plants of *Mitragyna speciosa* Korth. grown from seed obtained from Thailand, *Planta Medica* 34 (1978) 253-263.
- [Shellard, Alam 1968]
Shellard E. J., Alam M. Z., The quantitative determination of some *Mitragyna* oxindole alkaloids, *Planta Medica* 2 (1968) 127-136.
- [Shellard, Lees 1965]
Shellard E. J., Lees M. D., The *Mitragyna* Species of Asia - Part V. The anatomy of the leafes of *Mitragyna speciosa* Korth., *Planta Medica* 13(3) (1965) 280-290.
- [Shellard, Walker 1969]
Shellard E. J., Walker M. D., The *Mitragyna* Species of Asia - Part XVI. The morphology and anatomy of the flowers and fruits of *Mitragyna speciosa* Korth., *Planta Medica* 3 (1969) 245-260.
- [Suwanlert 1975]
Suwanlert S., A study of kratom eaters in Thailand, *Bulletin on Narcotics* 27 (3) (1975) 21-28.
- [Teuscher 1990]
Teuscher E., Alkaloide vom β -Carbolin-Typ, *Pharmazeutische Biologie* 4. Auflage (1990) 432-433.
- [Takayama 2004]
Takayama H., Review: Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceous plant *Mitragyna speciosa*, *Chem. Pharm. Bull.* 52 (8) (2004) 916-928.
- [Takayama et al. 1995]
Takayama H., Moriyoshi M., Ohbayashi S., Kitajima M., Sakai S.-I., Aimi N., The first total synthesis of (-)-Mitragynine, an analgesic indole alkaloid in *mitragyna speciosa*, *Tetrahedron* 36 (51) (1995) 9337-9340.
- [Takayama et al. 1998]
Takayama H., Kurihara M., Kitajima M., Said I. M., Aimi N., New indole alkaloids from the leaves of malaysian *Mitragyna speciosa*, *Tetrahedron* 54 (1998) 8433-8440.
- [Takayama et al. 2000a]
Takayama H., Kurihara M., Kitajima M., Said I. M., Aimi N., Isolation and asymmetric-total synthesis of a new indole alkaloid, (-)-Mitralactonine, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 1772-1773.

[Takayama et al. 2000b]

Takayama H., Kurihara M., Kitajima M., Said I. M., Aimi N., Structure elucidation and chiral-total synthesis of a new indole alkaloid, (-)-9-Methoxymitralactonine, isolated from *Mitragyna speciosa* in Malaysia, *Tetrahedron* 56 (2000) 3145-3151.

[Takayama et al. 2001]

Takayama H., Ishikawa H., Kurihara M., Kitajima M., Sakai S-I., Aimi N., Seki H., Yamaguchi K., Said I. M., Houghton P. J., Structure revision of mitragynaline, an indole alkaloid in *Mitragyna speciosa*, *Tetrahedron* 42 (2001) 1741-1743.

[Takayama et al. 2002]

Takayama H., Ishikawa H., Kurihara M., Kitajima M., Aimi N., Ponglux D., Koyama F., Matsumoto K., Moriyama T., Yamamoto L. T., Watanabe K., Murayama T., Horie S., Studies of the synthesis and opioid agonistic activities of mitragynine-related indole alkaloids: discovery of opioid agonists structurally different from other opioid ligands, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 1949-1956.

[Temme 1996]

Temme O., Methodenentwicklung zur Bestimmung von Tetrahydroisochinolininen in menschlichen Körperflüssigkeiten und Geweben, Diplomarbeit (1996).

[Thongpradichote et al. 1998]

Thongpradichote S., Matsumoto K., Tohda M., Takayama H., Aimi N., Sakai S-I., Watanabe H., Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice, *Life Sciences* 62 (16) (1997) 1371-1378.

[Tohda et al. 1997]

Tohda M., Thongpradichote S., Matsumoto K., Murakami Y., Sakai S-I., Aimi N., Takayama H., Tongroach P., Watanabe H., Effects of mitragynine on cAMP formation mediated by delta opiate receptors in NG108-15 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 20 (1997) 338-340.

[Tsuchiya et al. 2002]

Tsuchiya S., Miyashita S., Yamamoto M., Horie S., Sakai S-I., Aimi N., Takayama H., Watanabe K., Effect of mitragynine derived from Thai folk medicine on gastric acid secretion through opioid receptor in anesthetized rats, *European Journal of Pharmacology* 443 (2002) 185-188.

[U Win Pe 1980]

U Win Pe, A short note on the identification of mitragynine, *Forensic Science International* 15 (1980) 149-151.

[Vicknasingam et al. 2010]

Vicknasingam B., Narayanan S., Beng G. T., Mansor S. M., The informal use of ketum (*Mitragyna speciosa*) for opioid withdrawal in the northern states of peninsular Malaysia and implications for drug substitution therapy, *International Journal of Drug Policy* (2010) 1-6.

[Watanabe et al. 1987]

Watanabe K., Yano S., Horiuchi H., Yamanaka E., Aimi N., Sakai S., Ca²⁺ channel-blocking effect of the yohimbine derivatives, 14β-benzoyloxyyohimbine and 14β-p-nitrobenzoyloxyyohimbine, *J. Pharm. Pharmacol.* 39 (1987) 439-443.

[Watanabe et al. 1997]

Watanabe K., Yano S., Horie S., Yamamoto L. T., Inhibitory effect of mitragynine an alkaloid from thai medicinal plant *Mitragyna speciosa* on electrically stimulated contraction of isolated guinea-pig ileum through the opioid receptor, *Life Sciences* 60 (12) (1997) 933-942.

[Wise 1980]

Wise R., Actions of drugs of abuse on brain reward systems, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (Suppl. 1) (1980) 213.

[Wray 1907]

Wray L., Notes on the anti-opium remedy, *The Pharmaceutical Journal* 78 (1907) 453.

[Yachay 2006]

Yachai I., Kratom, *Murple's Wiki* (2006) 1-23.

[Yamamoto et al. 1999]

Yamamoto L. T., Horie S., Takayama H., Aimi N., Sakai S-I., Yano S., Shan J., Pang P. K. T., Ponglux D., Watanabe K., Opioid receptor agonistic characteristics of mitragynine pseudoindoxyl in comparison with mitragynine derived from thai medical plant *Mitragyna speciosa*, *General Pharmacology* 33 (1999) 73-81.

[Zacharias 1964]

Zacharias E., Rosenstein R. D., Jeffrey G. A., The structure of Mitragynine Hydroiodide, *Acta Cryst.* 18 (1965) 1039-1043.

[Zarembo et al. 1974]

Zarembo J. E., Douglas B., Valenta J., Weisbach J. A., Metabolites of mitragynine, *J. Pharm. Sci.* 63 (1974) 1407-1414.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher an keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

8 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. rer. nat. Th. Daldrup für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit der Durchführung der Untersuchungen in der chemisch-toxikologischen Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf danken.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. med. B. Bockholdt für die Betreuung und die Möglichkeit der Promotion im Institut für Rechtsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

Frau Dr. rer. nat. E. Below und Frau Dr. rer. nat. C. Heller danke ich für den Ansporn zur Promotion sowie die fachliche Beratung, die Begleitung und die wertvollen Hinweise während der Phase der Untersuchungen und der Erstellung der Dissertation.

Für ihre Bereitschaft zum Arrangement bezüglich der Arbeits- und Messeinrichtungen danke ich dem technischen Personal der chemisch-toxikologischen Abteilung des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf und insbesondere Frau Maja Ruderisch für die praktischen Hilfestellungen.

Meiner Frau danke ich für das Korrekturlesen und die Kritik. Ihr und meinen Kindern möchte ich zudem dafür Dank aussprechen, dass sie mir die Zeit für die Erstellung dieser Arbeit eingeräumt haben.