



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Phyto-chemische Untersuchung der Sekundärstoffe in Wurzeln
von *Metaxya rostrata*“

Verfasserin

Natalie Schmidt

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin: ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Mein Dank richtet sich an Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie, für die zur Verfügungstellung eines Arbeitsplatzes zur Durchführung der praktischen Tätigkeiten.

Weiters danke ich Frau a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die Bereitstellung eines Diplomarbeitsthemas sowie die herzliche Betreuung während meiner gesamten Arbeitszeit.

Mein besonderer Dank geht auch an Frau Dr. Kerstin Kainz für ihre Hilfe in allen Fragen und ihr stets offenes Ohr.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, welche mir während meiner gesamten Studienlaufbahn sowohl finanziell als auch moralisch den Rücken gestärkt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Material.....	6
2.2	Methoden.....	8
2.2.1	Solid Phase Extraction (SPE)	8
2.2.2	Säulenchromatographie (SC).....	9
2.2.3	Dünnschichtchromatographie (DC).....	10
2.2.3.1	Stationäre und mobile Phasen.....	10
2.2.3.2	Detektionsmethoden.....	11
2.2.4	Lyophilisation	11
2.2.5	High Performance Liquid Chromatographie (HPLC).....	12
2.2.6	Massenspektrometrie (MS).....	13
3	Ergebnisse	14
3.1	DC-Kontrolle der Fraktionen aus <i>Metaxya rostrata</i>.....	14
3.2	SPE 1.....	15
3.2.1	Überprüfung von Fraktion 2 mittels Reversed-Phase DC	15
3.2.2	Durchführung der SPE 1	16
3.3	SPE 2.....	17
3.3.1	Durchführung der SPE 2	18
3.3.2	DC-Kontrolle der Sammelfraktion o	20
3.3.3	Strukturaufklärung von Substanz O	21
3.4	SPE 3.....	23
3.5	SPE 4.....	25
3.5.1	Durchführung der SPE 4	25
3.5.2	Dünnschichtchromatographische Vergleiche.....	28
3.5.2.1	Sammelfraktion a von SPE 4	28
3.5.2.2	Sammelfraktion b von SPE 4	31
3.5.2.3	Sammelfraktion c aus SPE 4	33
3.5.2.4	Sammelfraktion i von SPE 4	34
3.6	SPE 5.....	35
3.6.1	Durchführung der SPE 5	36
3.6.2	Dünnschichtchromatographische Vergleiche von Substanz B.....	38
3.6.3	HPLC-Analyse der Substanz B.....	40
3.6.4	Strukturaufklärung der Substanz B	43
3.7	SC 1.....	45

3.7.1	Durchführung der SC 1	45
3.7.2	Dünnschichtchromatographische Vergleiche.....	47
3.7.2.1	Sammelfraktion I von SC 1	47
3.7.2.2	Sammelfraktion i aus SC 1	48
3.7.3	HPLC-Analyse der Sammel fraktion i aus SC 1	49
4	Diskussion der Ergebnisse	52
5	Zusammenfassung	54
6	Summary	55
7	Abkürzungsverzeichnis	56
8	Abbildungsverzeichnis	57
9	Tabellenverzeichnis	60
10	Literaturverzeichnis	61
11	Curriculum vitae	63
12	Anhang	64

1 Einleitung und Problemstellung

Metaxya rostrata (Kunth C. Presl), ein Baumfarn aus der Familie der Metaxyaceae, ist in den Flachlandregenwäldern Mittelamerikas und in Teilen des nordwestlichen Südamerikas einheimisch.

In der costaricanischen Ethnomedizin wird *Metaxya rostrata* als Heilmittel bei Geschwüren und Ulcera des Magen-Darm-Traktes eingesetzt. Es werden hierbei wässrige Suspensionen des getrockneten Rhizoms oral verabreicht [1].



Abb. 1: *Metaxya rostrata* (Kunth C. Presl) [3]

Auf Grund ihrer ethnomedizinischen Verwendung wurde *Metaxya rostrata* in vorangegangenen Dissertationen und Diplomarbeiten auf ihre Inhaltsstoffe und Wirkungsmechanismen untersucht.

In in vitro Tests konnte ein zytotoxischer Effekt auf Dickdarmkrebszelllinien durch Komponenten des Rhizomes aufgezeigt werden.

Neben Sterolen, phenolischen Verbindungen und Sacchariden konnten zwei trimere Proanthocyanidine, Aesculitannin B und Cinnamtannin B-1, als zytotoxische Komponenten identifiziert werden [2].

Weiters konnten 2-Deprenyl-rheediaxanthon B und Betulinsäure als stark zytotoxisch wirkende Reinsubstanzen isoliert werden [3].

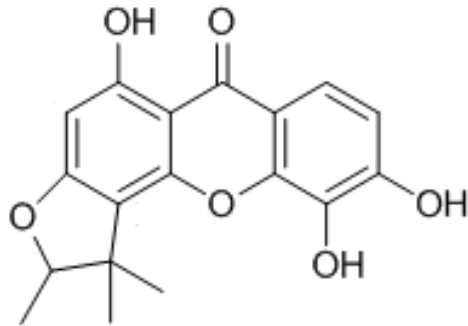


Abb. 2: 2-deprenyl-rheediaxanthon B [3]

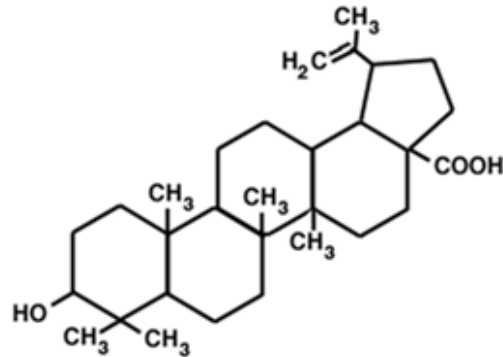


Abb. 3: Betulinsäure [3]

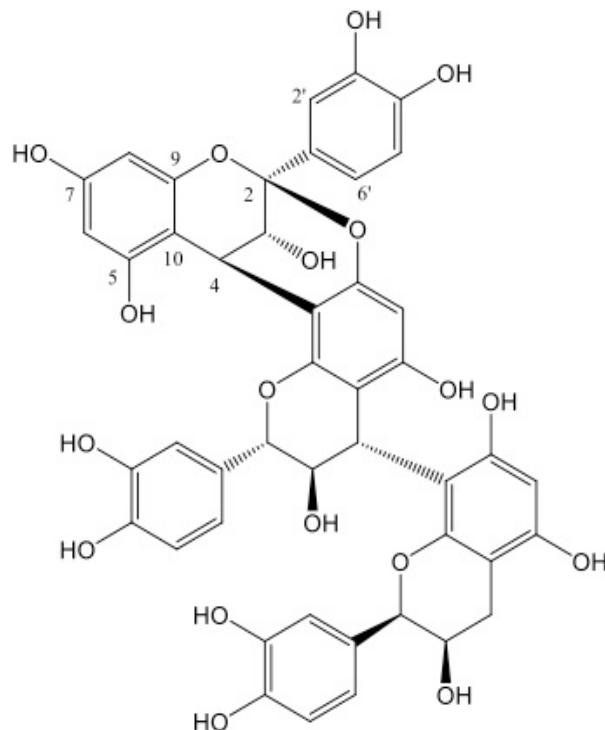


Abb. 4: Aesculitannin B [2]

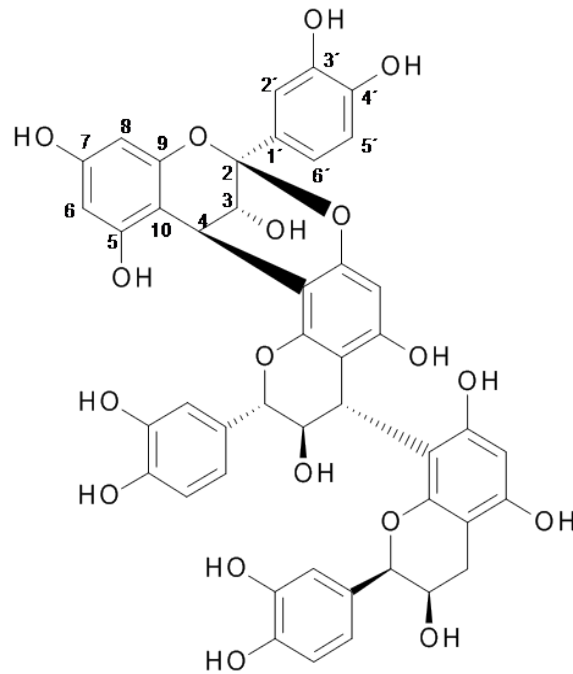


Abb. 5: Cinnamtannin B-1 [2]

Da *Metaxya rostrata* auch bezüglich ihrer pharmakologisch nicht aktiven Inhaltsstoffe kaum erforscht ist, war es naheliegend, sich auch dieser Thematik zu widmen.

Bisher wurden (2E)-2-(6-hydroxyhexyliden)-cyclopropyl- β -glucopyranosid und (6E)-6-[2-(β -glucopyranosyloxy)-cyclopropyliden]-hexansäure sowie Methyl- α -fructofuranosid, 4-O- β -D-glucopyranosyl-p-trans-coumarsäure und 4-O- β -D-glucopyranosyl-kaffeesäure identifiziert [3].

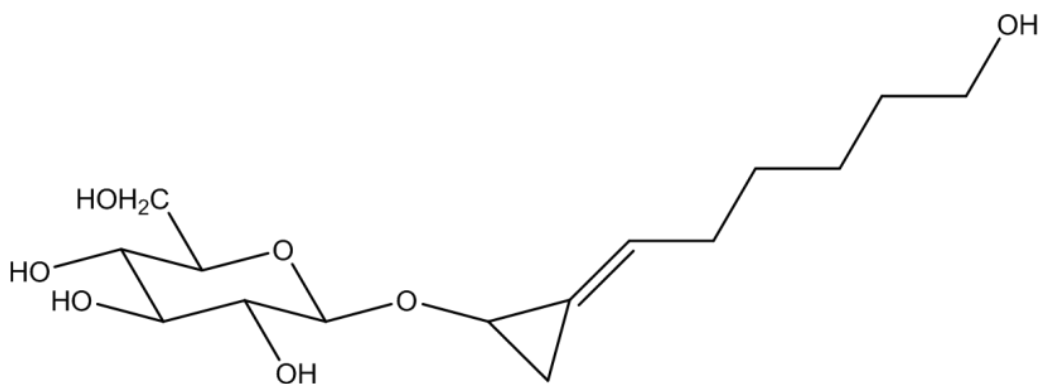


Abb. 6: (2E)-(6-hydroxyhexyliden)cyclopropyl- β -glucopyranosid [3]

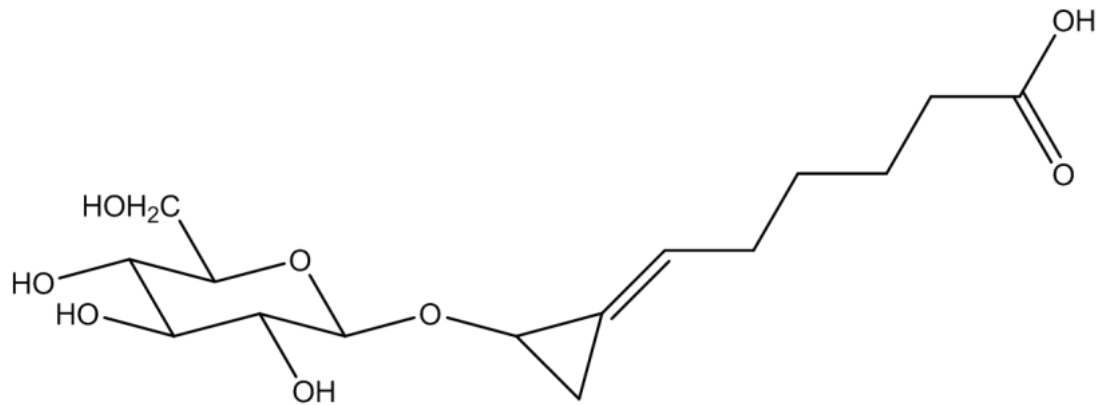


Abb. 7: (6E)-6[2-(β-glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]hexansäure [3]

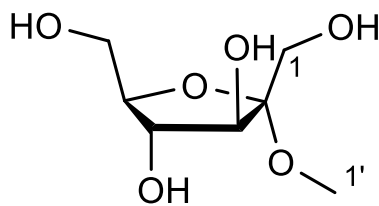


Abb. 8: Methyl-α-fructofuranosid [3]

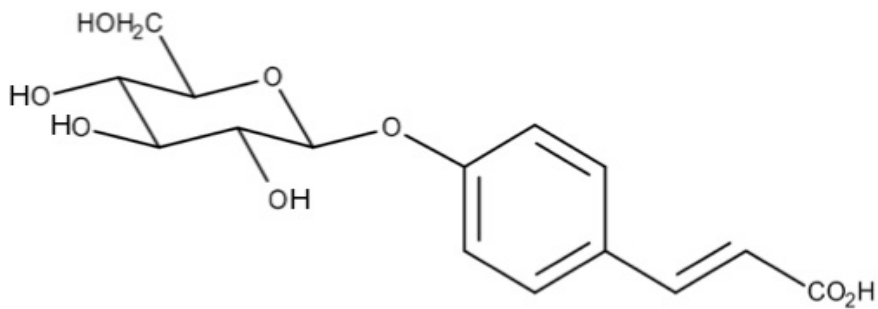


Abb. 9: 4-O-β-D-glucopyranosyl-p-trans-coumarsäure

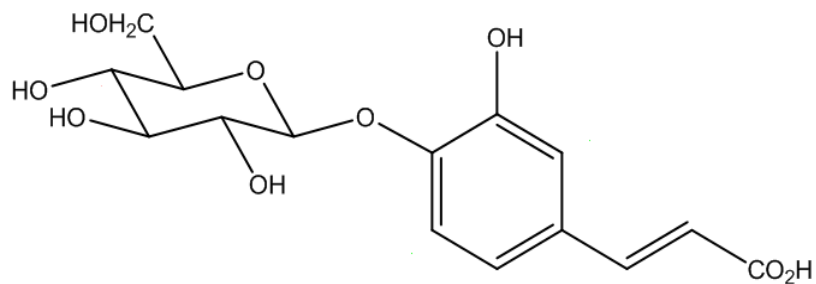


Abb. 10: 4-O-β-D-glucopyranosyl-kaffeesäure

Weiters konnten die Triterpene Squalen und Fern-9(11)-en [4] und das Proanthocyanidin A-2 als Komponenten des Rhizomes nachgewiesen werden [5].

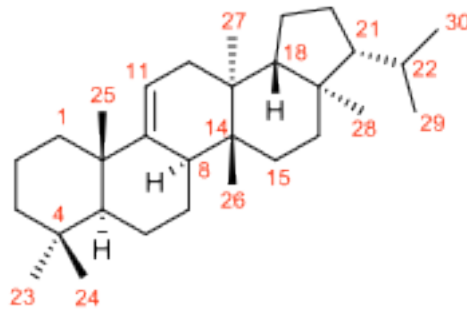


Abb. 11: Fern-9(11)-en [4]

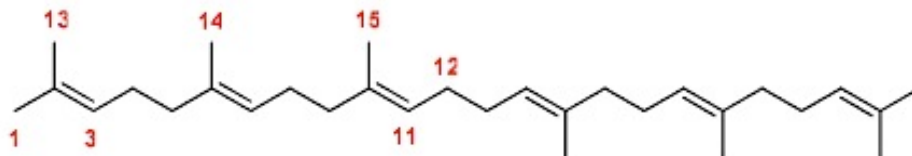


Abb. 12: Squalen [4]

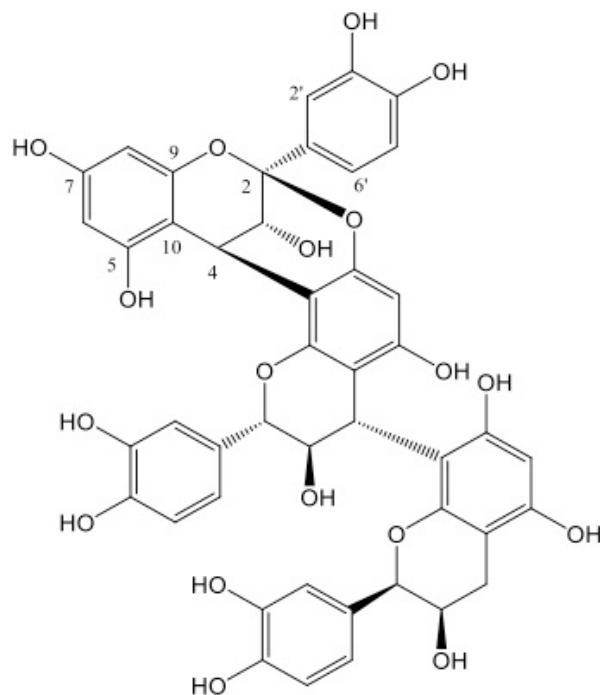


Abb. 13: Proanthocyanidin A-2 [5]

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit war zur phytochemischen Untersuchung ein Ethylacetat-Extrakt aus den Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata* hergestellt worden [5].



Abb. 14: Nebenwurzeln der *Metaxya rostrata* [3]

Dieser Extrakt war mittels Säulenchromatographie aufgetrennt und einzelne Fraktionen bezüglich ihrer Inhaltsstoffe analysiert worden.

Einige Fraktionen waren aus zeitlichen Gründen nicht untersucht worden. Diese boten sich auf Grund ihrer Zusammensetzung sowie ihrer ausreichenden quantitativen Ausbeute für weitere Analysen an.

Fraktion 2	62,5 mg
Fraktion 3	85,0 mg
Fraktion 4	67,5 mg
Fraktion 7	100,0 mg
Fraktion 8	105,0 mg
Fraktion 12	55,3 mg
Fraktion 13	109,1 mg
Fraktion 17	175,0 mg
Fraktion 19/9	21,7 mg

Tab. 1: Fraktionen aus dem Ethylacetat-Extrakt für weitergehende Untersuchungen

Diese Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb.18 und 19, S.14) und man entschloss sich, mit der Untersuchung der Fraktionen 2, 3, 4, 7, 13 und 17 fortzufahren.

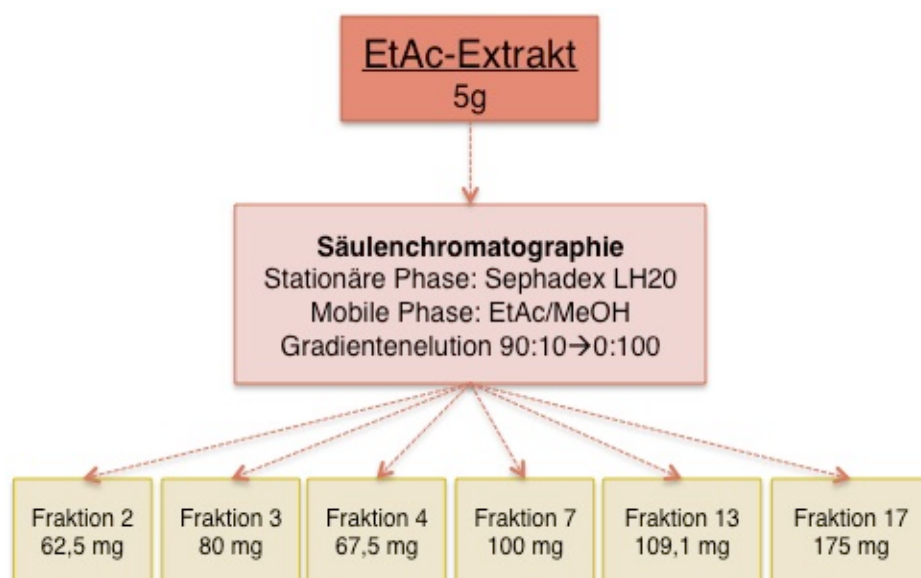


Abb. 15: Trennschema des Ethylacetat-Extraktes der Nebenwurzeln

Ziel dieser Diplomarbeit war es somit, die Fraktionen 2, 3, 4, 7, 13 und 17 mittels Solid Phase Extraktion bzw. Säulenchromatographie weiter zu fraktionieren, um Reinsubstanzen zu isolieren und identifizieren.

2.2 Methoden

2.2.1 Solid Phase Extraction (SPE)

Die Fraktionen 2, 3, 4, 7 und 13 wurden mittels der Solid Phase Extraction fraktioniert, mit dem Ziel, einzelne Komponenten in ausreichender Menge zu isolieren, um sie identifizieren zu können.

Es wurden Megabond Elut® C18 Kartuschen (Varian Inc., Germany) mit einem Fassungsvermögen von 6ml bzw. 12ml verwendet. Als Elutionsmittel dienten Methanol-Wassermischungen.

Vor Gebrauch wurde jede Kartusche in drei Schritten konditioniert. Anschließend wurde die gelöste Fraktion auf die Kartusche aufgetragen und trocknen gelassen. Es folgte eine Gradientenelution mit Methanol-Wasser (siehe Tab.2, S.8). Jede Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft und jeder Elutionsschritt so oft wiederholt bis kein Analyt mehr im Eluat detektierbar war.

Ähnliche Fraktionen wurden zu Sammelfraktionen vereinigt.

Elutionsmittel		% Wasser	% Methanol
Konditionierung	Schritt 1	100	0
	Schritt 2	0	100
	Schritt 3	50	50
Gradientenelution	Schritt 1	50	50
	Schritt 2	40	60
	Schritt 3	30	70
	Schritt 4	20	80
	Schritt 5	15	85
	Schritt 6	10	90
	Schritt 8	5	95
	Schritt 9	2	98
	Schritt 10	0	100

Tab. 2: Elutionsmittelzusammensetzung der SPE



Abb. 16: SPE-Apparatur

2.2.2 Säulenchromatographie (SC)

Fraktion 17 wurde wegen ihrer komplexen Zusammensetzung und der vorhandenen Menge von 175 mg mittels Säulenchromatographie aufgetrennt.

Es wurden folgende chromatographische Parameter eingesetzt:

Stationäre Phase	Sephadex® LH-20
Mobile Phase	Fraktion 1-335: Methanol - Wasser (50:50)
	Fraktion 336-400: Methanol - Wasser (60:40)
Dimension	Durchmesser: 2cm Länge: 90cm
Durchflussrate	7ml/h

Tab. 3: Bedingungen der SC

Jede zehnte Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Übereinstimmende Fraktionen konnten danach zu Sammelfractionen vereinigt werden.



Abb. 17: SC an Sephadex LH-20

2.2.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung wurden unterschiedliche mobile und stationäre Phasen sowie verschiedene Detektionsmethoden verwendet. Diese waren der Polarität und den chemischen Eigenschaften der Inhaltstoffe angepasst.

2.2.3.1 Stationäre und mobile Phasen

Stationäre Phasen	Kieselgel 60 F ₂₅₄ Fertigplatten (Merck, Darmstadt)
	Kieselgel 60 RP-18 F ₂₅₄ Fertigplatten (Merck, Darmstadt)
	Kieselgel 60 RP-8 F ₂₅₄ Fertigplatten (Merck, Darmstadt)
	Polyamid 11 F ₂₅₄ Fertigplatten (Merck, Darmstadt)

Mobile Phasen	A: Ethylacetat – Ameisensäure _{conc.} – Methanol – Wasser (70:8:4:4)
	B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure _{conc.} (5:4:1)
	C: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure _{conc.} – Methanol (5:4:1:1)
	D: Methanol – Wasser (8:2)
	E: Methanol
	F: Methanol – Essigsäure _{conc.} – Wasser (18:1:1)
	G: Ethylacetat – Ameisensäure _{conc.} – Eisessig – Ethylmethyleton – Wasser (50:7:3:30:10)

Tab. 4: Stationäre und mobile Phasen der DC

2.2.3.2 Detektionsmethoden

- *Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AASS)*

Es wurden 85ml Methanol, 10ml Eisessig, 5ml konzentrierte Schwefelsäure mit 0,5ml Anisaldehyd vorsichtig gemischt. Nach Besprühen der DC-Platte wurde 5-10 Minuten im Trockenschrank bei ca. 105°C getrocknet. Ausgewertet wurde die DC-Platte bei Tageslicht.

- *Naturstoffreagens A–Polyethylenglycol 400 (NS/PEG)*

Zunächst wurde die DC-Platte mit einer 1%igen methanolischen Naturstoffreagenslösung besprüht. Nach dem Trocknen wurde mit einer 5%igen ethanolischen Polyethylenglycol 400 Lösung nachbesprüht. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 360nm.

2.2.4 Lyophilisation

Die Lyophilisation wurde angewendet, um Wasserreste aus Fraktionen schonend und effizient zu entfernen.

Mit dem VaCo 5-11 (Zirbus technology, Germany) wurden bei ca. -8°C und 0,025 bar die tiefgekühlten Fraktionen gefriergetrocknet.

2.2.5 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Im Zuge der SPE und der SC konnten einzelne Substanzen isoliert werden. Vor der Strukturaufklärung mittels Massenspektrometrie (MS) musste die Reinheit der Verbindung bestimmt und davon ein geeignetes System für die HPLC-MS ausgearbeitet werden.

Die HPLC erfolgte an einem LC-20AD Flüssigchromatographen mit DGU-20A5 Degasser, SIL-20AC HAT Autosampler, CTO-20AC Säulenofen und CBM-20A Communication Bus Module (Shimadzu, Wien).

Es wurden folgende HPLC-Parameter angewendet:

Säule	LiChroCART® RP-18e (250x4mm), 5 µm
Mobile Phase	A: 1% Ameisensäure B: Acetonitril
Durchflussrate	1ml/min
Temperatur	25°C

Tab. 5: HPLC-Parameter

Es wurden verschiedene Gradienten, Injektionsvolumen und Probenkonzentrationen angewandt, die in den entsprechenden Kapiteln angeführt werden.

Die Detektion erfolgte mittels SPD-M20A Diode Array Detector (Shimadzu, Wien) bei den Wellenlängen 360nm und 290nm bzw. mittels ELSD-LT, Low Temperature Evaporative Light Scattering Detector (Shimadzu, Wien), um auch Substanzen ohne chromophorem System zu erfassen.

2.2.6 Massenspektrometrie (MS)

Für die Strukturaufklärung wurde die High Performance Liquid Chromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) angewandt. Hierzu wurde ein UltiMate 3000 RSLC-series System (Dionex) gekoppelt an ein HCT 3D Quadrupol Ion Trap Mass Spectrometer, ausgestattet mit einer orthogonalen ESI Quelle (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland), verwendet. Es wurden die gleichen HPLC-Parameter wie zuvor beschrieben eingesetzt.

Das Elutionsgemisch wurde vor der ESI Ionenquelle in dem Verhältnis 1 : 8 gesplittet. Die Einstellungen der ESI Ionenquelle waren folgende: Kapillare Spannung: $\pm 3,7\text{kV}$ (positiver und negativer Ionenmodus), Nebulizer: 26 psi (N_2), Gasflussrate: 9L/min (N_2), Temperatur: 340°C .

Es wurde eine automatische Datenerfassung, data-dependent acquisition (DDA) Modus, eingesetzt. Dabei folgten auf jeden MS scan weitere MS^2 scans von den intensivsten Precursor-Ionen, sowie MS^3 scans von den intensivsten Fragment-Ionen aus jedem MS^2 scan. Als Kollisionsgas wurde Helium eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 DC-Kontrolle der Fraktionen aus *Metaxya rostrata*

Die zu Verfügung stehenden Fraktionen (siehe Tab.1, S.7), welche für weitere Fraktionierungen und Untersuchungen eingesetzt werden sollten, wurden dünnsschichtchromatographisch auf ihre Komponenten überprüft.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten als stationäre Phase sowie die mobilen Phasen A und B eingesetzt (siehe Tab.4, S.11).

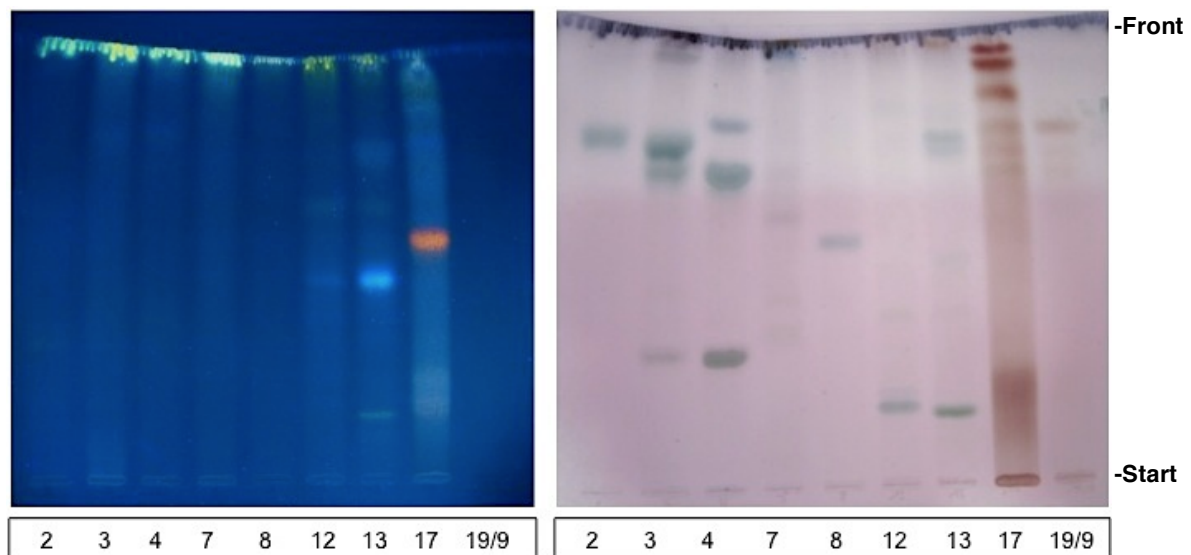


Abb. 18: DC der Fraktionen mit mobiler Phase A, Detektion mit NS/PEG (1) und AASS (2)

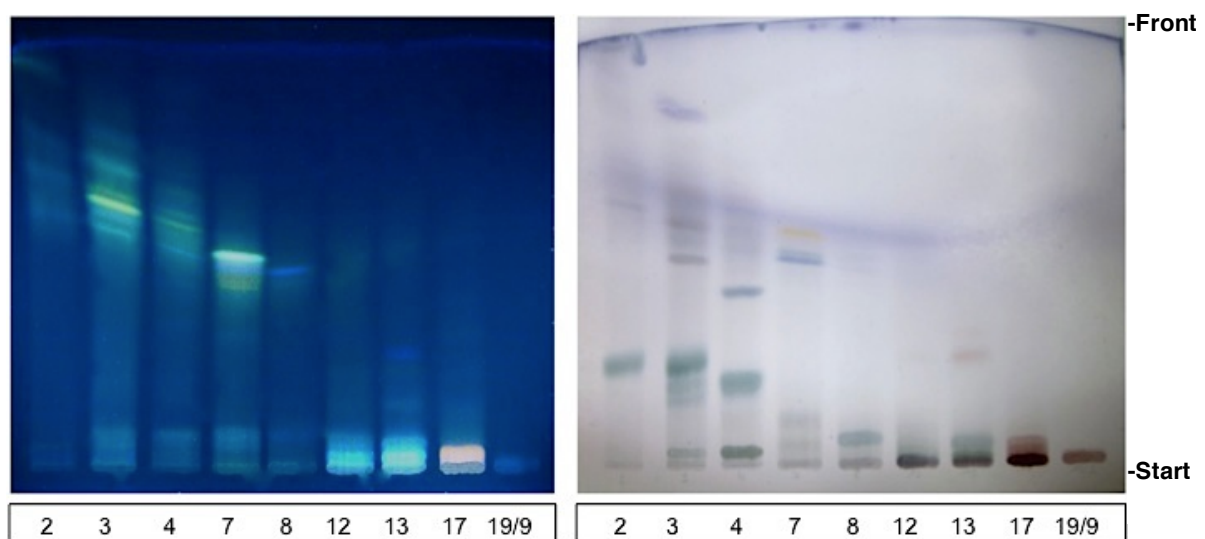


Abb. 19: DC der Fraktionen mit mobiler Phase B, Detektion mit NS/PEG (1) und AASS (2)

Auf Grund der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung wurden die Fraktionen 2, 3, 4, 7, 13 und 17 für weitere Analysen ausgewählt (Abb.18 und 19, S.14).

3.2 SPE 1

3.2.1 Überprüfung von Fraktion 2 mittels Reversed-Phase DC

Aus Fraktion 2 sollte eine mit AASS blau-grünliche Hauptkomponente mit R_f ca. 0,3 isoliert werden (siehe Abb.19, S.14). Es standen 62,5 mg zur Verfügung die mittels SPE aufgetrennt werden sollten.

Da die Bande mit R_f ca. 0,3 (Abb.19 (2), S.14) sehr breit erschien, stellte sich die Frage, ob es sich um mehrere unzureichend getrennte Substanzen handeln könnte. Um dies zu überprüfen, wurde die Fraktion 2 auf einer Kieselgel 60 RP-18 F₂₅₄ Fertigplatte mit der mobilen Phase E (siehe Tab.4, S.11) chromatographiert.

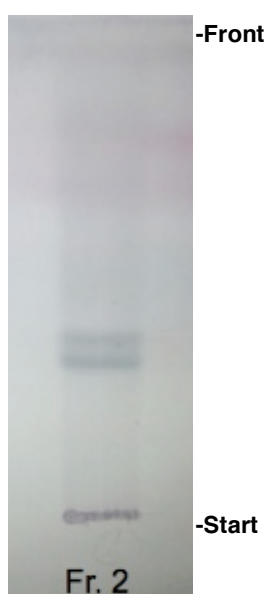


Abb. 20: RP-DC von Fraktion 2, Detektion mit AASS

Durch die effizientere Trennung auf der RP-DC Platte konnten zwei Substanzen detektiert werden (Abb.20, S.15), wobei die Komponente mit R_f 0,26 offensichtlich in höherer Konzentration vorlag als die Substanz mit R_f 0,3.

3.2.2 Durchführung der SPE 1

Bei der SPE der Fraktion 2 wurde wie im Methoden-Teil beschrieben vorgegangen (siehe 2.2.1, S.8). Es wurde eine 6 ml Kartusche benutzt, auf welche die gesamten 62,5 mg der Fraktion 2 aufgetragen wurden. Die Fraktion wurde hierzu in ca. 0,5 ml Methanol-Wasser (50:50) sorgfältig gelöst.

Die Sammelfractionen nach SPE 1 wurden ebenfalls dünn-schicht-chromatographisch auf einer Kieselgel 60 RP-18 F₂₅₄ Fertigplatte aufgetragen und in der mobilen Phase E (siehe Tab.4, S.11) chromatographiert (Abb.21, S.16).

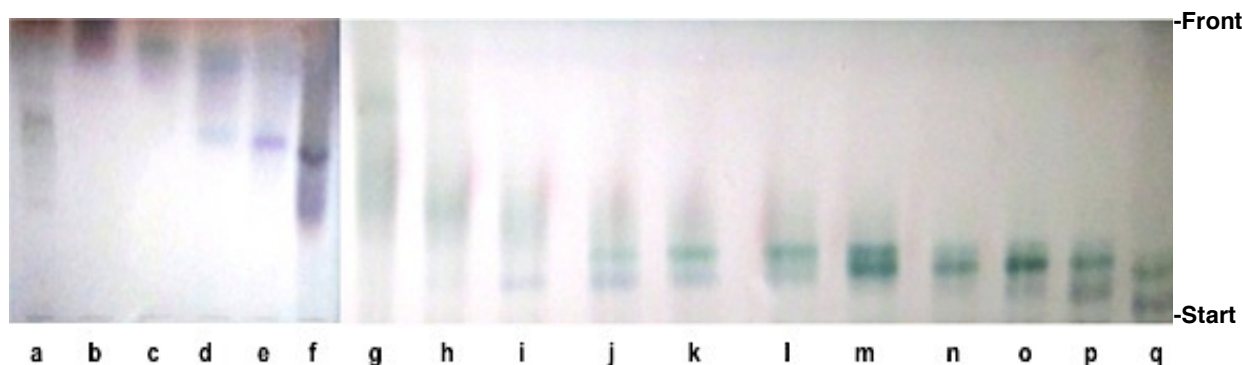


Abb. 21: DC der Sammelfractionen von SPE 1, Detektion mit AASS

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Gradient (Methanol: Wasser)	Menge
a	1-3	50:50	10,3 mg
b	4-6	60:40	0,6 mg
c	7-9	70:30	1,0 mg
d	10-13	80:20	1,7 mg
e	14-16	85:15	14,6 mg
f	17-20	90:10	2,3 mg
g	21-23	95:5	3,0 mg
h	24	95:5	0,6 mg
i	25-26	95:5	1,3 mg
j	27-28	95:5	1,0 mg

k	29	95:5	0,2 mg
l	30	98:2	2,6 mg
m	31-33	98:2	5,8 mg
n	34	98:2	1,1 mg
o	35	100:0	1,5 mg
p	36-37	100:0	1,1 mg
q	38-40	100:0	1,5 mg

Tab. 6: Sammelfractionen der SPE 1

Mengenmäßig wurde der Hauptanteil von Fraktion 2 in Sammelfraktion a mit R_f 0,95 und in Sammelfraktion e mit R_f 0,6 zusammen mit relativ polaren Begleitstoffen eluiert.

Die mit AASS blau-grünlichen Komponenten konnten zum Großteil von den restlichen Substanzen getrennt werden. Die Sammelfractionen j bis m enthielten das Gemisch der beiden Substanzen. In den Sammelfractionen m bis o überwog die stärker apolare Komponente mit R_f 0,26, wobei diese besonders in der Sammelfraktion o angereichert war. Es gelang allerdings nicht die zwei Verbindungen völlig von einander zu trennen bzw. enthielten alle Fraktionen noch Anteile von Begleitstoffen.

Bedingt durch die sehr geringe quantitative Ausbeute der einzelnen Sammelfractionen (siehe Tab.6, S.17) war eine weitere Fraktionierung nicht möglich.

Die Anwesenheit von Zuckern (Glucose, Saccharose und Fructose) konnte durch dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgeschlossen werden.

3.3 SPE 2

In der Fraktion 3 erschien als Hauptkomponente eine mit AASS blau-grünliche Substanz mit R_f 0,75 mit ähnlicher Polarität wie die Hauptkomponente aus Fraktion 2 (siehe Abb.18, S.14).

Daneben konnte man ein bis zwei ebenfalls blau-grünliche Substanzen mit etwas höherer Polarität bei R_f ca. 0.7 (siehe Abb.18 (2), S.14) erkennen.

Zudem enthielt die Fraktion 3 eine mit NS/PEG stark gelblich fluoreszierende Substanz mit R_f ca. 0,7 (siehe Abb.19 (1), S.14).

Diese Komponenten wollte man aus den 85 mg, die von Fraktion 3 zur Verfügung standen, isolieren.

3.3.1 Durchführung der SPE 2

Die SPE der Fraktion 3 wurde wie im Methoden-Teil beschrieben durchgeführt (siehe 2.2.1, S.8).

Allerdings wurden zwei zusätzliche Elutionsschritte eingeführt. Es wurde zu Beginn mit Methanol-Wasser (20:80) und Methanol-Wasser (40:60) eluiert, um sehr polare Komponenten, mit R_f ca. 0,3 (siehe Abb.19 (2), S.14), abzutrennen.

Auf die 6 ml Kartusche wurden 85 mg der Fraktion 3, in Methanol-Wasser (20:80) gelöst, aufgetragen.

Die erhaltenen Sammelfraktionen wurden auf Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten mit der mobilen Phase B (siehe Tab.4, S.11) entwickelt und mit AASS und NS/PEG besprüht (siehe Abb.22 und 23, S.18-19).

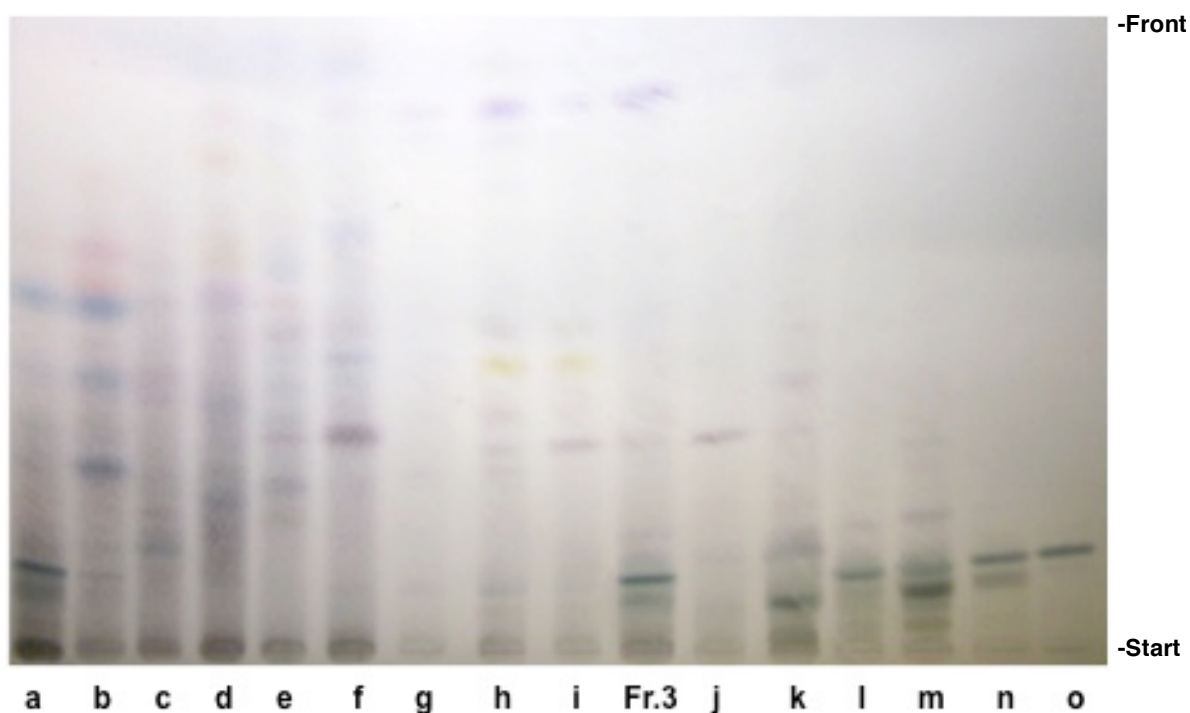


Abb. 22: DC der Sammelfraktionen von SPE 2, Detektion mit AASS

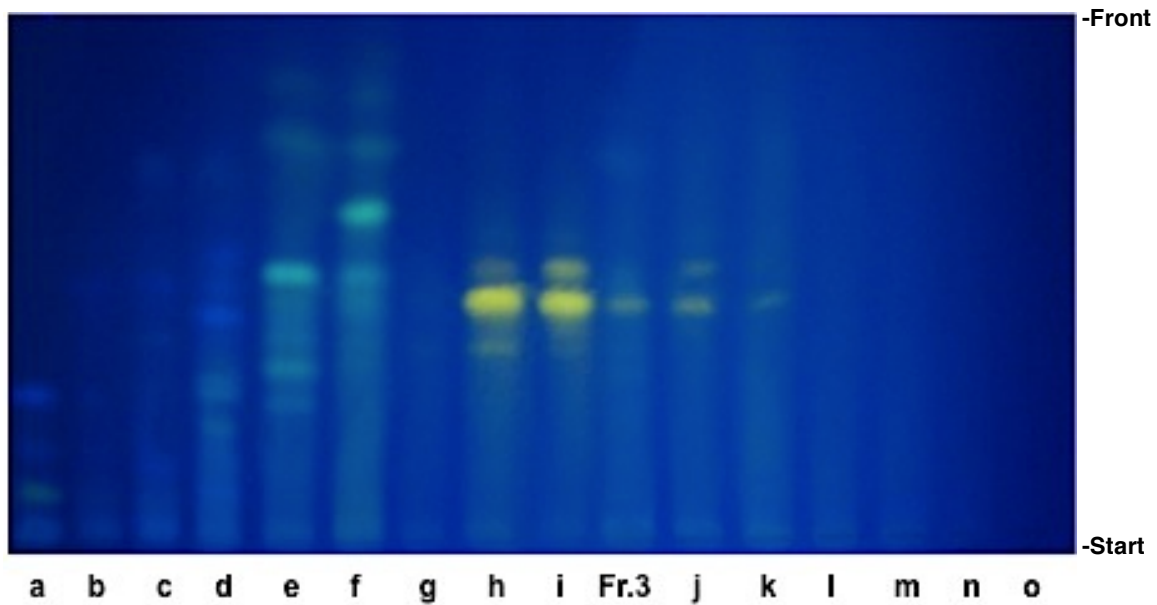


Abb. 23: DC der Sammelfractionen von SPE 2, Detektion mit NS/PEG (UV_{360nm})

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Gradient (Methanol: Wasser)	Menge
a	1	20:80	2,0 mg
b	2	40:60	1,4 mg
c	3-5	50:50	0,9 mg
d	6-8	60:40	1,3 mg
e	9-11	70:30	1,9 mg
f	12-14	80:20	2,8 mg
g	15-16	80:20	2,0 mg
h	17	85:15	2,9 mg
i	18	85:15	0,7 mg
j	19	90:10	1,4 mg
k	20-21	90:10	3,3 mg
l	22	95:5	1,9 mg
m	23-26	95:5	6,7 mg
n	27	98:2	2,6 mg
o	28-29	98:2	4,3 mg
	30-36	100:0	

Tab. 7: Sammelfractionen der SPE 2

Die DC-Analyse der Sammelfractionen zeigte deutlich, wie komplex die Zusammensetzung der Fraktion 3 war.

Vor allem die Sammelfractionen b bis f enthielten zahlreiche unterschiedlich gefärbte Substanzen mit R_f 0,3 bis 0,6 (Abb.22, S.18).

Die stark gelb fluoreszierenden Bestandteile wurden in den Sammelfractionen h bis j eluiert, mit R_f ca. 0.5 (Abb.23, S.19). Diese Substanzen waren auch mit AASS besprüht als gelbe Zonen bei R_f 0,5 erkennbar (Abb.22, S.18). Auf Grund der niedrigen Ausbeute der Sammelfractionen (siehe Tab.7, S.19) erschienen weitere Fraktionierungsschritte nicht zielführend.

Ein ungetrennter Anteil der Fraktion 3 wurde mit der Sammelfraction a eluiert.

Die mit AASS blau-grünlichen Komponenten wurden in den Sammelfractionen k bis o bei R_f 0,15 und 0,2 detektiert (Abb.22, S.18).

3.3.2 DC-Kontrolle der Sammelfraction o

In der Sammelfraction o wurde die Hauptkomponente der Fraktion 3, die stärker apolare der zwei grün-bläulichen Banden mit R_f 0,2, isoliert (Abb.22, S.18).

Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich mit Glucose, Saccharose und Fructose bestätigte, dass es sich um keine dieser Verbindungen handelte. Mittels DC von Sammelfraction o auf einer Kieselgel 60 RP-8 F₂₅₄ DC-Platte und mit der mobilen Phase E (Tab.4, S.11), konnte sicher gestellt werden, dass die Substanz mit R_f ca. 0,46 in chromatographisch einheitlicher Form vorlag (siehe Abb. 24, S.20).

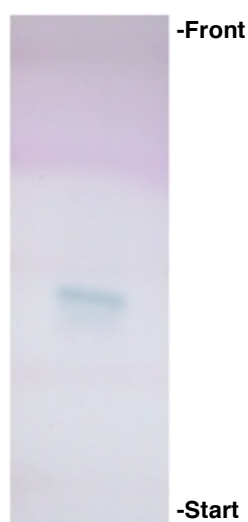


Abb. 24: DC von Sammelfraction o, Detektion mit AASS

Es standen 4,3 mg von Substanz O aus Sammelfraction o für die Strukturaufklärung zur Verfügung.

3.3.3 Strukturaufklärung von Substanz O

Von Substanz O wurden ^1H - und ^{13}C -NMR-, sowie HSQC-, COSY-, TOCSY-, NOESY- und HMBC-Spektren aufgenommen.¹

Aus den NMR-Daten konnte das Vorliegen eines Glucocerebrosides abgeleitet werden. Die Signale der Glucose wurden eindeutig zugeordnet. Die Fettsäurekomponente des Ceramides ist gesättigt und trägt in Position 2' eine Hydroxylgruppe. Die Verschiebungen der Substanz aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Experimenten korrelierten sehr gut mit den Literaturdaten [7, 8] (siehe Anhang 1 bis 7, S.64-68).

Im Sphingosinteil konnten zehn C-Atome mittels detaillierten zweidimensionalen NMR-Experimenten zugeordnet werden. Dieser Strukturteil enthält zwei Doppelbindungen in den Positionen 4' und 8'. Neun weitere CH_2 -Gruppen waren nicht eindeutig zuzuordnen (siehe Tab. 8, S.22). Aufgrund der geringen Menge der Substanz war die Stereochemie nicht aufzuklären.

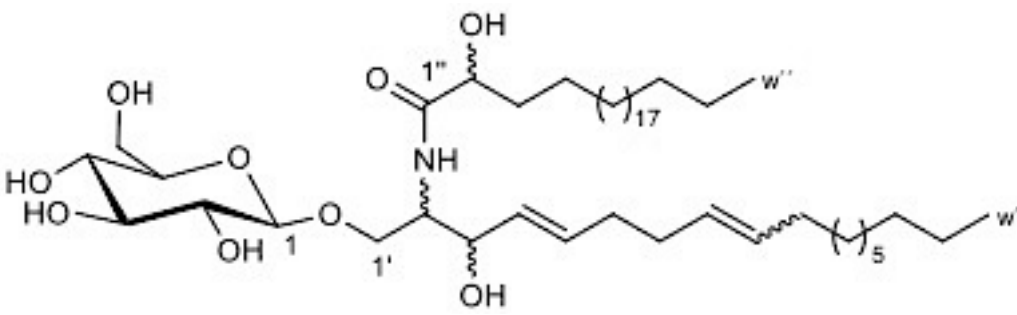
Um weitere strukturelle Informationen zu den Seitenketten des Cerebrosides zu erhalten, wurde Substanz O mittels MS fragmentiert (siehe 2.2.6 S.13).²

Das Fragmentierungsmuster korrelierte mit der Literatur [9] und zeigte das Glucocerebrosid bei einem Massenpeak von 823,8 m/z. Anschließende MS/MS-Experimente ließen die Ceramidteilstruktur mit einem Peak bei 670 m/z und die mit der Fettsäure veresterte Glucose mit einem Peak bei 466,3 m/z erkennen. Weitere Fragmentierungsschritte zeigten, dass der Fettsäurerest 24 Kohlenstoffatome beinhaltet und gesättigt ist. Der Sphingosinrest ist zweifach ungesättigt und umfasst 18 Kohlenstoffatome (siehe Anhang 8, S.69).

Soweit uns bekannt, handelt es sich mit Substanz O um das erste Cerebrosid, das aus einem Farn isoliert wurde.

¹ Mein Dank geht an Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für Organische Chemie der Universität Wien, für die Durchführung der NMR-Messungen.

² Genauso danke ich Herrn Dr. Martin Zehl für die Durchführung der MS-Analysen.



		^1H (ppm)	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	^{13}C (ppm)
Glucose				
1	CH	4.269	d 7.8	104.73
2	CH	3.193	d 7.8 / d 9.2	74.99
3	CH	3.355	d 9.2 / d 8.9	77.90
4	CH	3.276	d 8.9 / d 9.8	71.56
5	CH	3.274	d 9.8 / d 1.8 / d 5.6	77.99
6	CH ₂	3.869	d 1.8 / d 11.9	62.67
		3.670	d 5.6 / d 11.9	
1'	CH ₂	4.118	d 5.5 / d 10.4	69.75
		3.715	d 3.6 / d 10.4	
2'	CH	3.992	d 3.6 / d 5.5 / d 7.9	54.62
3'	CH	4.148	d 7.9 / 7.4	72.84
4'	CH	5.492	d 15.4 / d 7.4 / t 1.4	131.38
5'	CH	5.738	d 15.4 / t 6.5 / d 0.8	134.39
6'	CH ₂	2.078	m	33.70
7'	CH ₂	2.133	m	27.89
8'	CH	5.376	m	a 129.96
9'	CH	5.376	m	a 131.37
10'	CH ₂	2.042	m	28.29
w'-2	CH ₂	1.290	m	d 33.12
w'-1	CH ₂	1.331	m	c 23.78
w'	CH ₃	0.903 b	t 7.0	b 14.46
1''	C	-	-	177.24
2''	CH	4.118	d 10.3 / d 5.5	73.06
3''	CH ₂	1.717	m	35.88
		1.557	m	
4''	CH ₂	1.417	m	26.21
w''-2	CH ₂	1.290	m	d 33.10
w''-1	CH ₂	1.331	m	c 23.76
w''	CH ₃	0.906 b	t 7.0	b 14.49
Weitere CH ₂ Gruppen im ^{13}C (ppm): 30.89, 30.82, 30.80, 30.77, 30.74, 30.72, 30.53, 30.49, 30.46				

Tab. 8: NMR-Daten von Substanz O

3.4 SPE 3

Aus der Fraktion 4 sollten die blau-grünlichen, Substanzen mit R_f 0,3, 0,7 und 0,75 rein dargestellt werden (siehe Abb.18 (2), S.14).

Zudem wollte man die grünlich fluoreszierenden Komponenten mit R_f ca. 0,7 isolieren (siehe Abb.19 (1), S.14).

Von der Fraktion 4 standen 67,5 mg für die SPE bereit.

Die SPE der Fraktion 4 folgte dem Fraktionierungsschema (siehe 2.2.1 S.8). Die in ca. 0,5 ml Methanol-Wasser (50:50) gelöste Fraktion 4 wurde auf eine 12 ml Kartusche aufgetragen.

Die Sammelfractionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten mit der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11) analysiert.

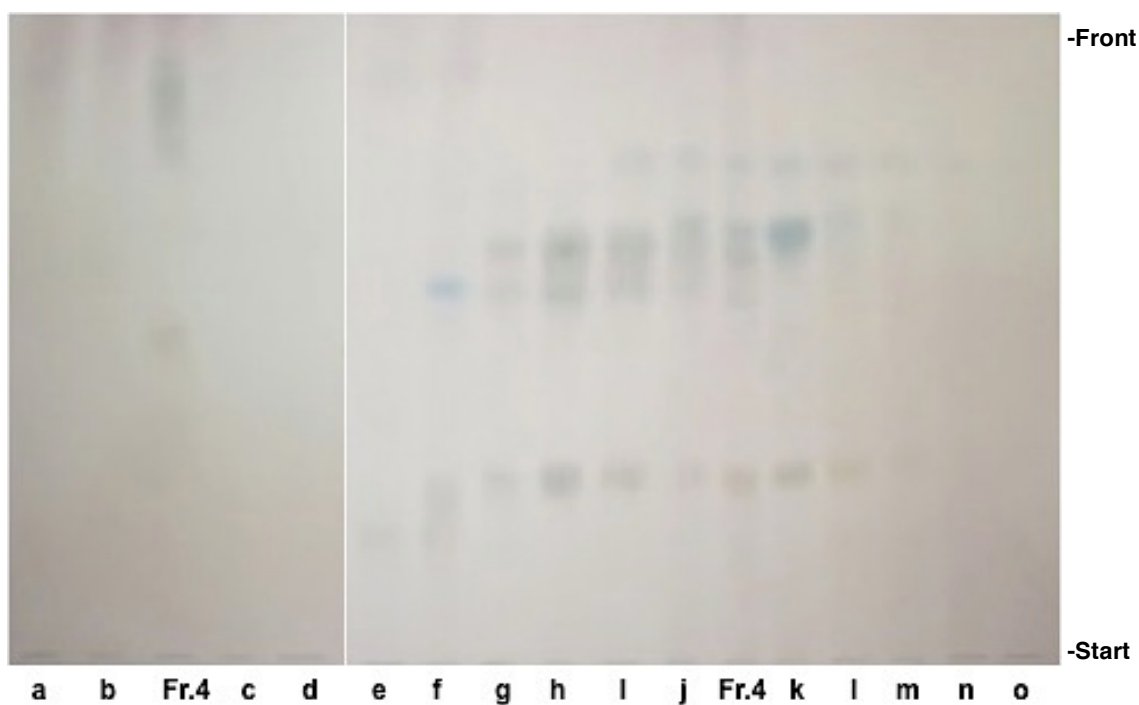


Abb. 25: DC der Sammelfractionen von SPE 3, Detektion mit AASS

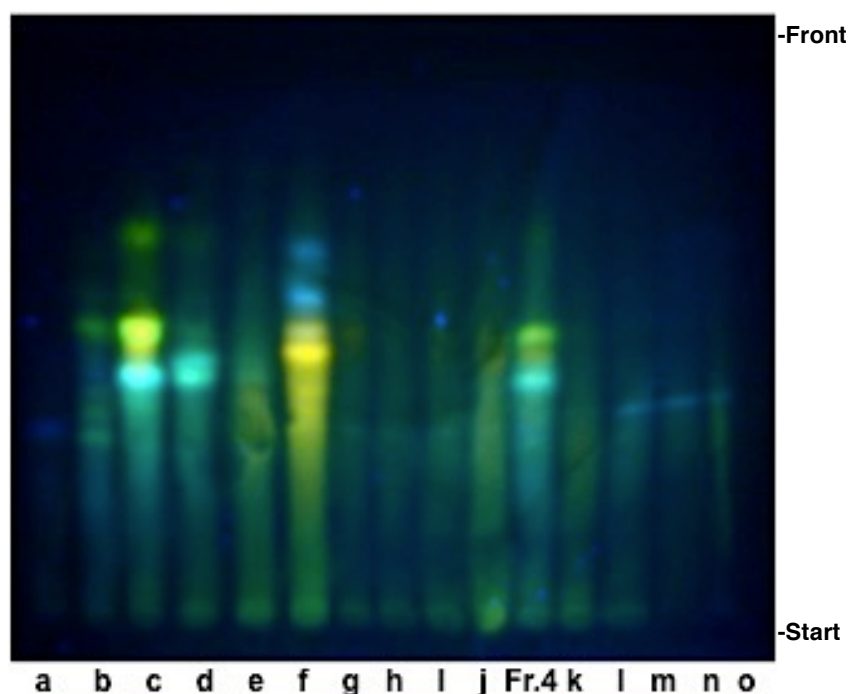


Abb. 26: DC der Sammelfractionen von SPE 3, Detektion mit NS/PEG (UV_{360nm})

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Gradient (Methanol: Wasser)	Menge
a	1-3	50:50	4,9 mg
b	4-6	60:40	3,1 mg
c	7-9	70:30	2,2 mg
d	10-13	80:20	4,8 mg
e	14	85:15	1,4 mg
f	15-16	85:15	4,2 mg
g	17	90:10	2,0 mg
h	18	90:10	6,4 mg
i	19	90:10	6,0 mg
j	20-21	90:10	5,0 mg
k	22-24	95:5	9,7 mg
l	25	95:5	1,3 mg
m	26	95:5	1,2 mg
n	27-32	98:2	10,1 mg
o	33-39	100:0	1,3 mg

Tab. 9: Sammelfractionen der SPE 3

Die dünnschichtchromatographische Auswertung zeigte die komplexe Zusammensetzung der einzelnen Sammelfractionen.

Die blau-grünlichen Substanzen mit R_f 0,3, 0,7 und 0,75 waren in den Sammelfractionen f bis m gemeinsam mit anderen Begleitstoffen zu finden (Abb.25, S.23).

In der Sammelfraction c waren eine stark grün und eine hellblau fluoreszierende Komponente bei R_f 0,5 und 0,55 angereichert. In der Sammelfraction f befanden sich ein kräftig gelb fluoreszierender Inhaltsstoff mit R_f 0,5 und zwei stärker apolare, blau fluoreszierende Substanzen mit R_f 0,6 und 0,67 (Abb.26, S.24).

Es gelang nicht, einzelne Substanzen zu isolieren. Die quantitativen Ausbeuten der Sammelfractionen waren zu gering, um weitere Schritte der Fraktionierung durchzuführen (siehe Tab.9, S.24).

3.5 SPE 4

Hauptkomponenten in der Fraktion 13 waren eine mit AASS grün gefärbte, stark polare und eine bläuliche Substanz mit R_f 0,18 bzw. 0,8 (siehe Abb.18 (2), S.14), sowie ein stark blau fluoreszierender Inhaltsstoff mit R_f 0,55 (siehe Abb.18 (1), S.14).

Man wollte diese beiden Komponenten aus den zu Verfügung stehenden 109,1 mg isolieren.

3.5.1 Durchführung der SPE 4

Die SPE wurde auch für die Auftrennung der Fraktion 13 eingesetzt, wobei wieder die gleichen SPE-Parameter benutzt wurden (siehe 2.2.1 S.8).

Es wurde eine 12 ml Kartusche verwendet, auf welche die gesamte, in Methanol-Wasser (50:50) gelöste Fraktion aufgetragen wurde.

Die Durchführung der DC erfolgte auf Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten mit der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11).

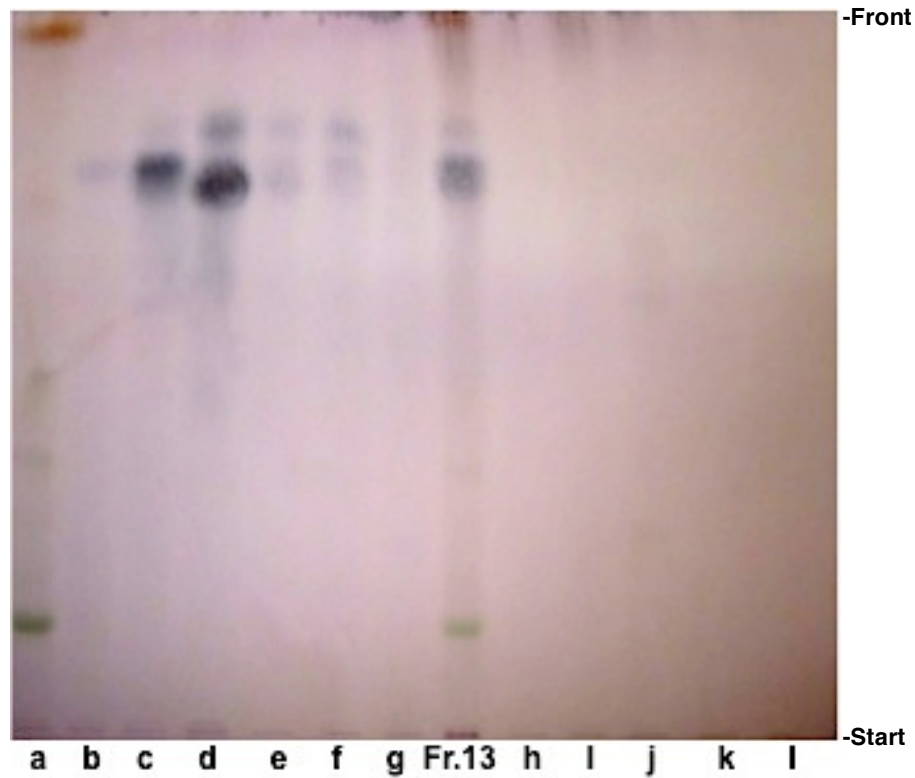


Abb. 27: DC der Sammelfractionen von SPE 4, Detektion mit AASS

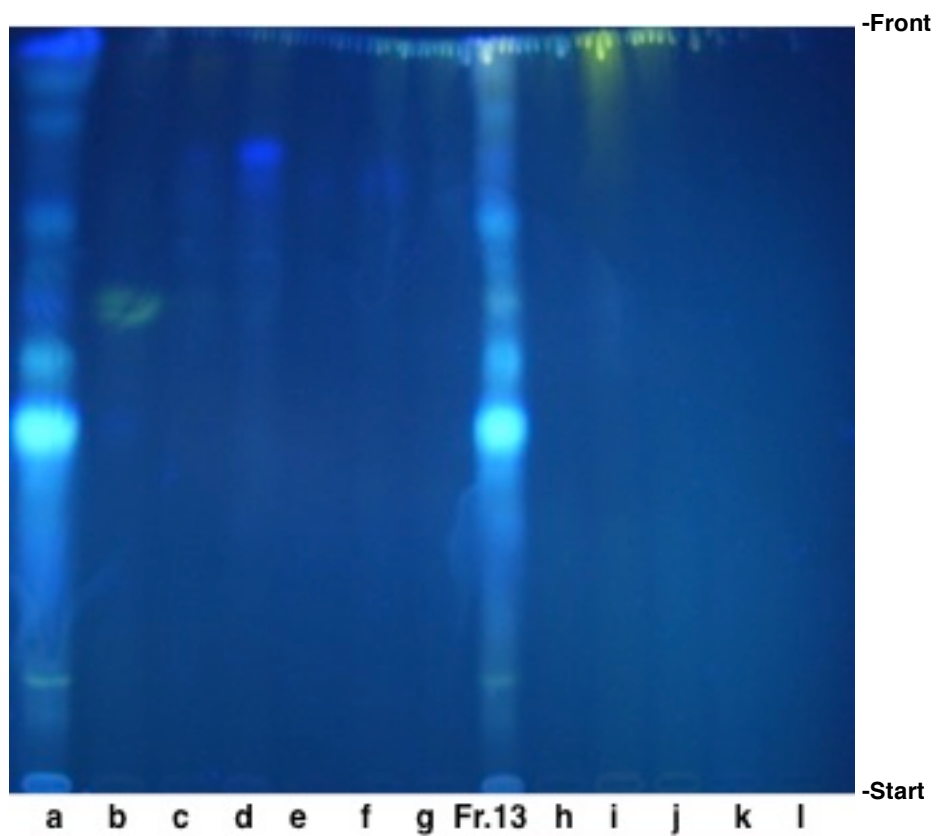


Abb. 28: DC der Sammelfractionen von SPE 4, Detektion mit NS/PEG (UV₃₆₀nm)

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gradient (Methanol: Wasser)	Menge
a	1	50:50	31,3 mg
b	2-3	50:50	1,8 mg
c	4	60:40	6,2 mg
d	5	60:40	2,1 mg
e	6	60:40	0,6 mg
f	7-9	60:40	0,8 mg
g	10-13	70:30	0,9 mg
h	14-16	80:20	0,9 mg
i	17-21	90:10	2,2 mg
j	22-24	95:5	2,3 mg
k	25-27	98:2	5,3 mg
l	28-30	100:0	0,9 mg

Tab. 10: Sammelfraktionen der SPE 4

Der quantitative Hauptanteil der Fraktion 13 wurde mit der Sammelfraktion a eluiert. In dieser wurden die mit AASS grün gefärbte Komponente mit R_f ca. 0,2, (siehe Abb. 27, S.26) sowie die blau fluoreszierende Substanz mit R_f 0,5 angereichert (siehe Abb. 28, S.26). Eine ebenfalls blau fluoreszierende Komponente von schwächerer Polarität bei R_f 0,55 konnte detektiert werden. Mehrere dunkelblau fluoreszierende, eher apolare Substanzen mit R_f 0,6-0,95 wurden sichtbar (siehe Abb. 28, S.26).

In der Sammelfraktion b konnte eine grün-gelb fluoreszierende Komponente mit R_f 0,6 isoliert werden (siehe Abb. 28, S.26).

In den Sammelfraktionen c und d wurden zwei zuvor nicht aufgetrennte dunkelblaue Substanzen mit R_f 0,85 und 0,8 angereichert (siehe Abb. 27, S.26).

An der Fließmittelfront in der Sammelfraktion i konnte man eine sehr apolare, intensiv gelb fluoreszierende Zone erkennen (siehe Abb.28, S.26).

Die quantitative Ausbeute der Sammelfraktionen erlaubte keine weitere Auftrennung einzelner Fraktionen, um Substanzen zu isolieren (siehe Tab.10, S.27).

Allerdings wurde versucht, Komponenten aus Sammelfraktion a, b, c und i durch dünnschichtchromatographische Vergleiche mit Vergleichssubstanzen zu identifizieren.

3.5.2 Dünnschichtchromatographische Vergleiche

3.5.2.1 Sammelfraktion a von SPE 4

In der Sammelfraktion a wurde mit AASS eine grüne Bande bei R_f ca. 0,2 detektiert (siehe Abb. 27, S.26). Das Laufverhalten und die Färbung ließen auf das Vorliegen von Zuckern schließen. Fraktion a wurde deshalb mit den Vergleichssubstanzen Glucose, Saccharose und Fructose auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte aufgetragen, mit der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11) entwickelt und mit AASS detektiert.

Die grüne Bande mit R_f 0,2 und Glucose stimmten in Farbe und R_f -Werten überein (siehe Abb. 29 (1), S.28).

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurden Fraktion a und Glucose als Vergleichssubstanz nochmals mit der mobilen Phase F (siehe Tab.4, S.11) chromatographiert.

Man konnte erneut gleiche Färbung und gleiche R_f -Werte (R_f ca, 0,9) feststellen (siehe Abb. 29 (2), S.28) und die Substanz somit als Glucose identifizieren.

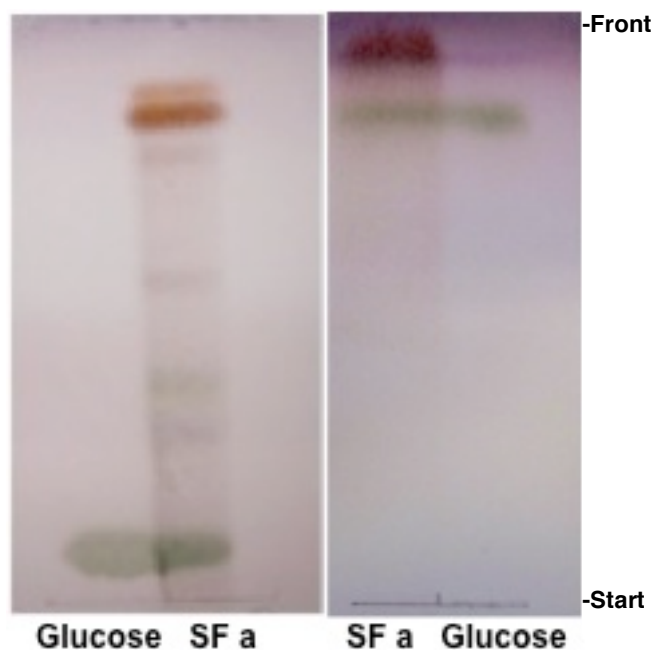


Abb. 29: DC-Vergleich der SF a von SPE 4 mit Glucose mit mobiler Phase A (1) und F (2)

Die Sammelfraktion a wies zudem nach Detektion mit NS/PEG unter UV_{360} nm eine intensiv blau fluoreszierende Bande mit R_f ca. 0,5 auf (siehe Abb. 28, S.26). Da Phenolcarbonsäuren unter diesen Bedingungen eine intensiv hellblaue Fluoreszenz aufweisen [6], wurde ein DC-Vergleich auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte mit der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11) durchgeführt. Als Vergleichssubstanzen fungierten Chlorogensäure und Kaffeesäure.



Abb. 30: DC-Vergleich 1 der SF a von SPE 4

V1	Chlorogensäure	V2	Kaffeesäure
-----------	----------------	-----------	-------------

Die Fluoreszenzfärbung und der R_f -Wert der Chlorogensäure (=5-Caffeoylchinasäure) schienen mit jenen der Zone bei R_f 0,5 der Sammelfraktion a zu korrelieren (Abb. 30, S.29).

Zur Abklärung wurde unter Verwendung einer anderen mobilen Phase, der Phase G (siehe Tab.4, S.11), chromatographiert (siehe Abb. 31, S.30).



Abb. 31: DC-Vergleich 2 der SF a von SPE 4, Detektion mit NS/PEG (UV_{360nm})

V1	Chlorogensäure
-----------	----------------

Die Substanzen erwiesen sich als ähnlich in ihrer Fluoreszenzfärbung, aber verschieden in ihren R_f-Werten (Abb. 31, S.30).

Somit konnte das Vorliegen von Chlorogensäure in der Fraktion a ausgeschlossen werden.

Aus der Literatur [6] ging hervor, dass Neochlorogensäure etwas apolarer als Chlorogensäure ist und einen geringfügig höheren R_f-Wert besitzt als die Chlorogensäure, wenn auf Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten mit der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11) chromatographiert wird.

Es wurde ein DC-Vergleich der Fraktion a mit Neochlorogensäure (=3-Caffeoylchinasäure) wieder auf Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten und der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11) vorgenommen.

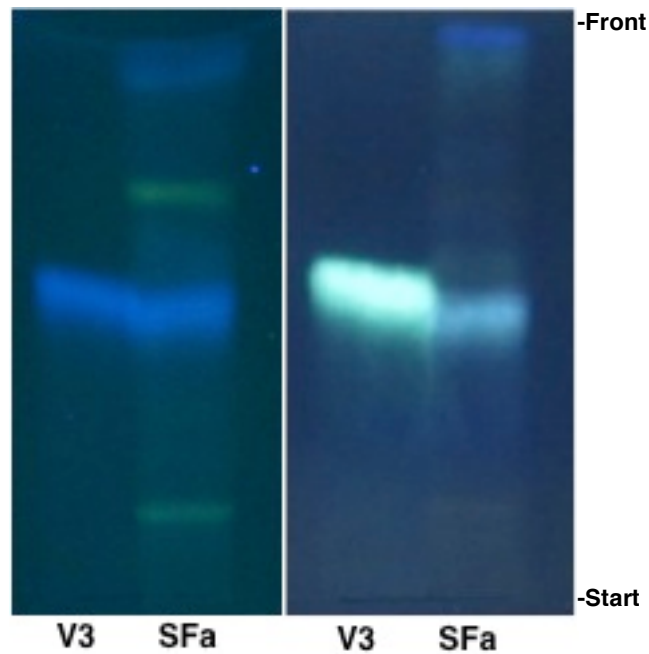


Abb. 32: DC-Vergleich 3 der SF a von SPE 4,
Detektion ohne (1) und mit NS/PEG (2) unter UV₃₆₀nm

V3	Neochlorogensäure
----	-------------------

Aus dem DC-Vergleich ging hervor, dass sich die R_f-Werte der Neochlorogensäure und der hellblau fluoreszierenden Substanz aus der Fraktion a geringfügig unterscheiden (Abb.32, S.31).

Es handelt sich bei der hellblau fluoreszierenden Substanz in Sammelfraktion a weder um Chlorogensäure, noch um Neochlorogensäure.

Auf Grund der sehr ähnlichen Fluoreszenz und der relativ ähnlichen R_f-Werte, kann man davon ausgehen, dass es sich bei der hellblau fluoreszierenden Substanz um eine Kaffeoylchinasäure handelt, bei der Kaffeesäure und Chinasäure über 1 oder 4 verestert sind. Da entsprechende Vergleichssubstanzen nicht verfügbar waren, konnte die Struktur dieser Substanz nicht geklärt werden.

3.5.2.2 Sammelfraktion b von SPE 4

In der Sammelfraktion b erschien nach Besprühen mit NS/PEG unter UV₃₆₀ nm eine grün fluoreszierende Bande mit R_f 0,6 (siehe Abb.28, S.26).

Laut der Literatur [6] weisen manche Flavonoidglykoside eine grün-gelbe Fluoreszenz mit NS/PEG unter UV₃₆₀ nm auf.

Es wurden daher dünnschichtchromatographische Vergleiche auf Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten und der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11) mit der Sammelfraktion b durchgeführt. Vergleichssubstanzen waren die Flavonoide Quercitrin, Astragalin und Neohesperidin. Es wurden auch DC-Vergleiche mit Rhamnetin und Isorhamnetin verwirklicht, welche aber nicht abgebildet sind.

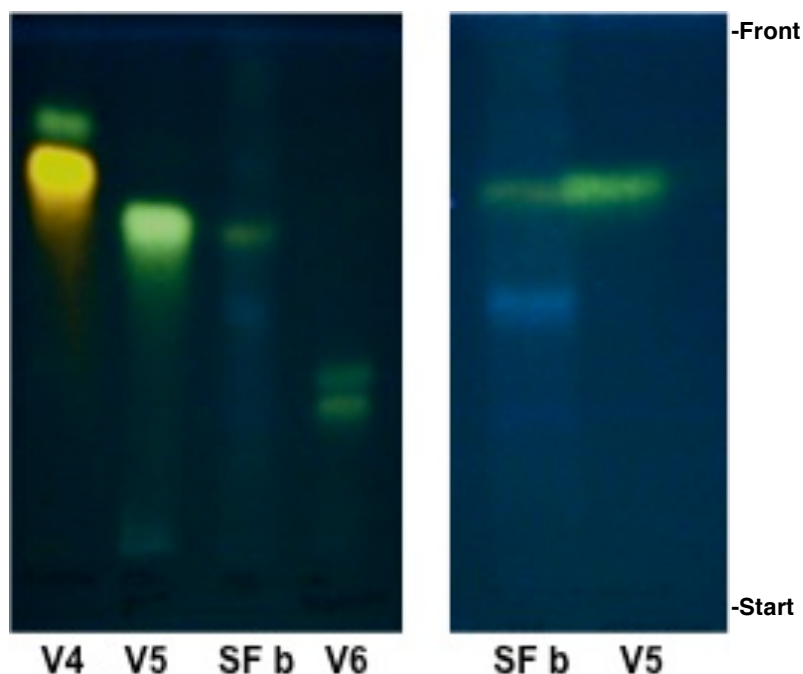


Abb. 33: DC-Vergleich 1 der SF b von SPE, Detektion mit NS/PEG (UV₃₆₀ nm)

V4	Quercitrin	V5	Astragalin	V6	Neohesperidin
-----------	------------	-----------	------------	-----------	---------------

Astragalin (=Kämpferol-3-O-glucosid) zeigte die gleiche grüne Fluoreszenz und den selben R_f von ca. 0,65 auf wie die Bande in Sammelfraktion b (siehe Abb.33, S.32). Um die Identität von Astragalin zu beweisen, wurde der Vergleich in einem anderen DC-System auf der stationären Phase Polyamid 11 F₂₅₄ und der mobilen Phase F (siehe Tab.4, S.11) wiederholt.



Abb. 34: DC-Vergleich 2 der SF b von SPE, Detektion mit NS/PEG (UV₃₆₀ nm)

Im zweiten DC-System wurde deutlich, dass es sich bei der Substanz nicht um Astragalin handelte, da die beiden Banden in ihrer Fluoreszenz zwar ähnlich waren, aber deutliche Unterschiede in ihren R_f-Werten zeigten (siehe Abb.34, S.33).

Die Identität dieses Flavonoidderivates konnte nicht festgestellt werden, da die quantitative Ausbeute (Tab.10, S.27) und die Reinheit der Fraktion (Abb.27 und 28, S.26) keine Strukturaufklärung zuließen.

3.5.2.3 Sammelfraktion c aus SPE 4

Sammelfraktion c enthielt eine breite dunkelblau gefärbte Bande bei R_f ca 0,8 nach Besprühen mit AASS (siehe Abb. 27, S.26).

Um fest zu stellen, ob es sich um mehrere ungetrennte Verbindungen handelt, wurde die Sammel fraktion b auf einer RP8 DC-Platte aufgetragen und mit der mobilen Phase D (siehe Tab.4, S.11) chromatographiert.

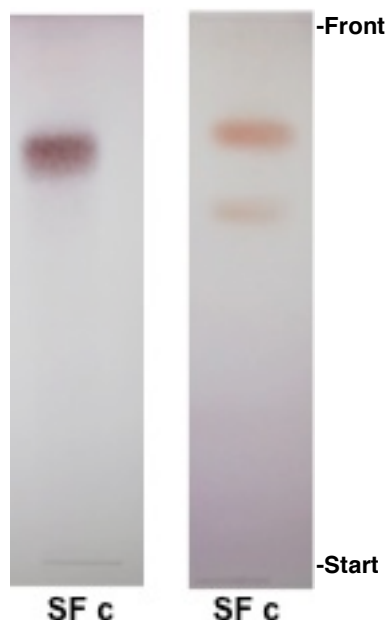


Abb. 35: DC der Sammelfraktion auf Kieselgelplatte mit mobiler Phase A (1) und auf RP8 DC-Platte mit mobiler Phase D (2), Detektion mit AASS

Im Vergleich der DC auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte und der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11) mit der DC auf einer RP8 DC-Platte und der mobilen Phase D (siehe Tab.4, S.11) wurde ersichtlich, dass Sammelfraktion c aus einer stärker polaren Hauptkomponente mit R_f 0,8 und einer Nebenkomponeute mit R_f 0,7 bestand (siehe Abb.35, S.34).

Die geringe quantitative Ausbeute der Sammelfraktion c (Tab.10, S.27) ermöglichte es aber nicht, die Substanzen durch weitere Trennverfahren zu isolieren.

3.5.2.4 Sammelfraktion i von SPE 4

In der Sammelfraktion i konnte man unter UV₃₆₀ nm an der Fließmittelfront eine gelb fluoreszierende Bande erkennen (siehe Abb.28, S.26).

Die Sammelfraktion i wurde in einem stärker apolaren DC-System, mit der mobilen Phase C (siehe Tab.4, S.11), nochmals entwickelt und mit Flavonoiden und Xanthonen verglichen.

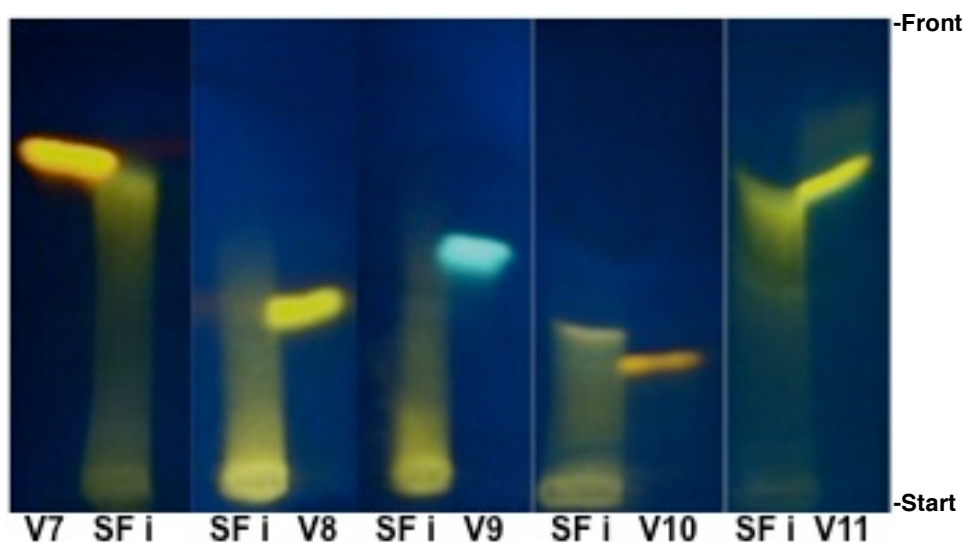


Abb. 36: DC-Vergleiche der SF i von SPE 4, Detektion mit NS/PEG (UV₃₆₀ nm)

V7	Quercitrin-3,7-dimethylether	V10	Quercetin
V8	Luteolin	V11	2-deprenyl-rheediaxanthon B
V9	Kämpferol		

Es konnte keine Übereinstimmung bezüglich Farbe und Rf-Wert zwischen der gelb fluoreszierenden Hauptkomponente in Sammelfraktion i und den Vergleichssubstanzen im DC-Vergleich fest gestellt werden (Abb. 36, S.35).

Auf Grund der stark gelben Fluoreszenz der Komponente könnte es sich um ein Flavonolglykosid vom Quercetin-Typ handeln. [6]

Diese Annahme konnte allerdings nicht überprüft werden, da von Sammelfraktion i zu wenig Ausbeute für weitere Untersuchungen vorhanden war (Tab.10, S.27).

3.6 SPE 5

Aus der Fraktion 7 wollte man eine intensiv hellblau fluoreszierende Komponente mit Rf 0,5 (siehe Abb.19 (1), S.14), sowie eine mit AASS gelb und eine blau gefärbte Substanz mit Rf 0,5 und 0,55 (siehe Abb.19 (2), S.14) isolieren.

Es standen 100 mg der Fraktion 7 zur Verfügung.

3.6.1 Durchführung der SPE 5

Bei der Solid Phase Extraktion von der Fraktion 7 ging man ähnlich wie bei den vorangegangenen SPEs vor (siehe 2.2.1 S.8).

Die 100 mg der Fraktion 7 wurden in Methanol-Wasser (50:50) gelöst, auf eine 6 ml Kartusche aufgetragen und anschließend eluiert.

Beim Einengen der Sammelfractionen von SPE 5 kam es zur Bildung eines gelb-orangen Niederschlages, der in Methanol löslich war. Es gelang, den Niederschlag aus den einzelnen Sammelfractionen abzuzentrifugieren. Aus den Überständen wurde das Methanol am Rotovapor und das Wasser mittels Lyophilisation entfernt.

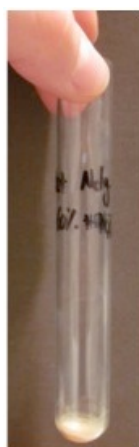


Abb. 37: Niederschlag aus SPE 5

Jede Sammelfraction von SPE 5 wurde somit in einen Niederschlag und den Eindampfrückstand des Überstandes getrennt.

Sowohl die Niederschläge, als auch die Überstände der Sammelfractionen wurden dünnschichtchromatographisch auf mit Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten und mit der mobilen Phase B (siehe Tab.4, S.11) untersucht (Abb. 38 und 39, S.37).

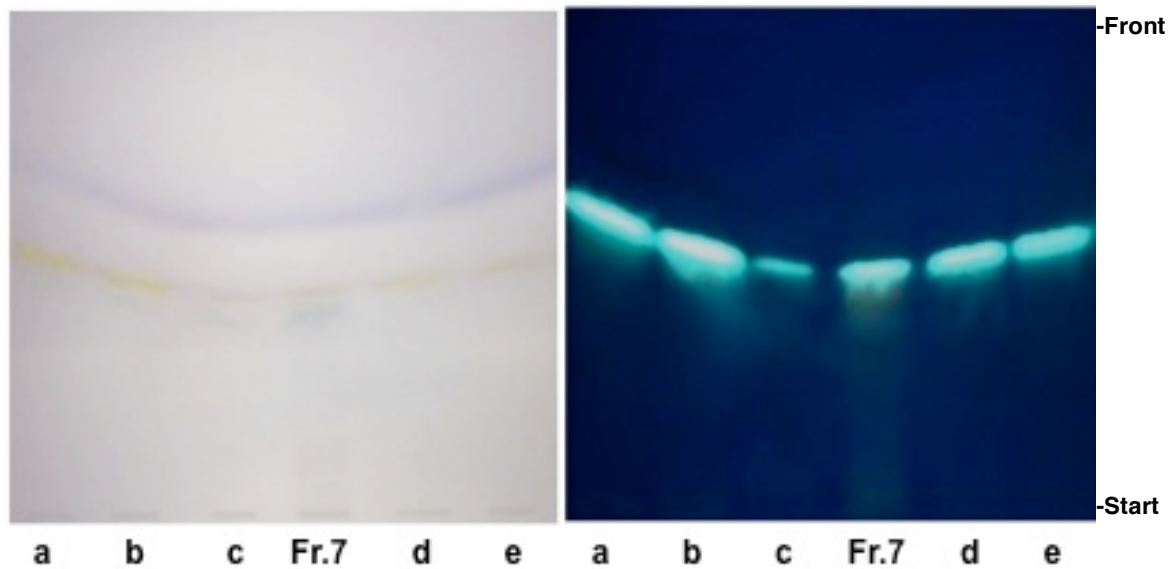


Abb. 38: DC der Niederschläge von SPE 5, Detektion mit AASS (1) und NS/PEG unter UV_{360nm} (2)

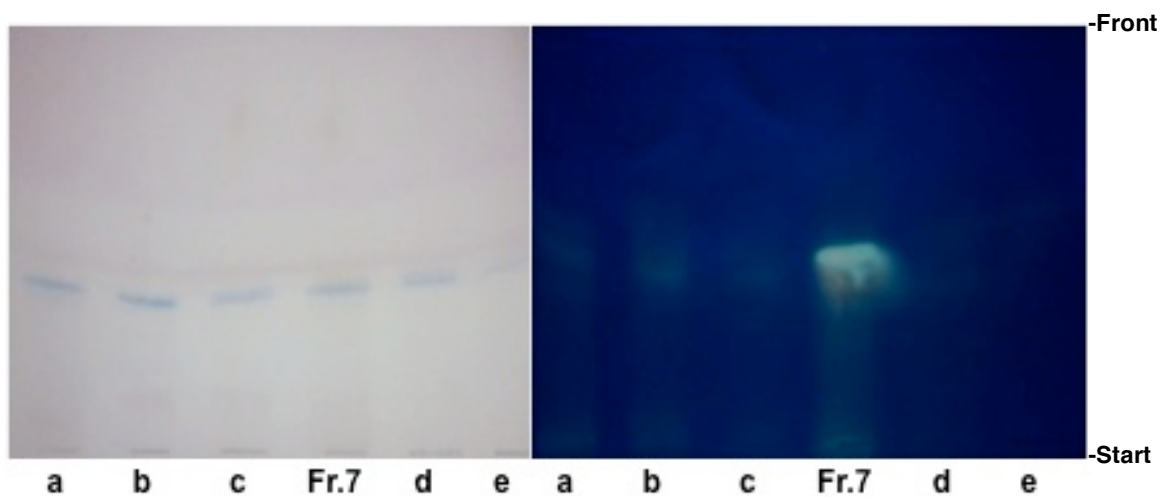


Abb. 39: DC der Überstände von SPE 5, Detektion mit AASS (1) und NS/PEG unter UV_{360nm} (2)

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Gradient (Methanol:Wasser)	Menge Niederschlag	Menge Überstand
a	4-13	60:40	3,2 mg	3,3 mg
b	14-17	70:30	4,3 mg	4,3 mg
c	18-20	80:20	1,1 mg	2,4 mg
d	21-23	90:10	0,4 mg	3,0 mg
e	24-30	100:0	3,2 mg	3,2 mg

Tab. 11: Sammelfractionen aus SPE 5

Es wurde ersichtlich, dass durch die Trennung von Niederschlag und Überstand zwei Komponenten von einander isoliert wurden.

Bei dem Niederschlag handelt es sich um eine, nach Detektion mit AASS intensiv gelb gefärbte (Abb.38 (1), S.37) und mit NS/PEG besprüht, unter UV₃₆₀ nm, stark hellblau fluoreszierende Substanz (Abb.38 (2), S.37). Diese wurde in weiterer Folge Substanz B genannt.

Der Überstand beinhaltete als Hauptkomponente eine mit AASS dunkelblau gefärbte Substanz (Abb.39 (1), S.37). Jene wurde Substanz A genannt, die aber nicht in chromatographisch reiner Form vorlag. Im Rahmen dieser Diplomarbeit war nicht genügend Zeit vorhanden, um eine vollständige Isolierung und Analyse von Substanz A durchzuführen.

Für eine Identifizierung der Substanz B wurden dünnschichtchromatographische Vergleiche durchgeführt.

3.6.2 Dünnschichtchromatographische Vergleiche von Substanz B

Die auffällige hellblaue Fluoreszenz des Niederschlages deutete auf das Vorliegen einer Phenolcarbonsäure oder eines Flavonoids hin [6], die mittels DC-Vergleichen identifiziert werden sollten.

Gemeinsam mit Substanz B wurden Kaffeesäure, Chlorogensäure, Rosmarinsäure, Isorhamnetin, Apigenin, Isovitexin, Kämpferol und Kämpferol-3-O-rutinosid auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte mit der mobilen Phase B (siehe Tab.4, S.11) entwickelt und mit NS/PEG besprüht.

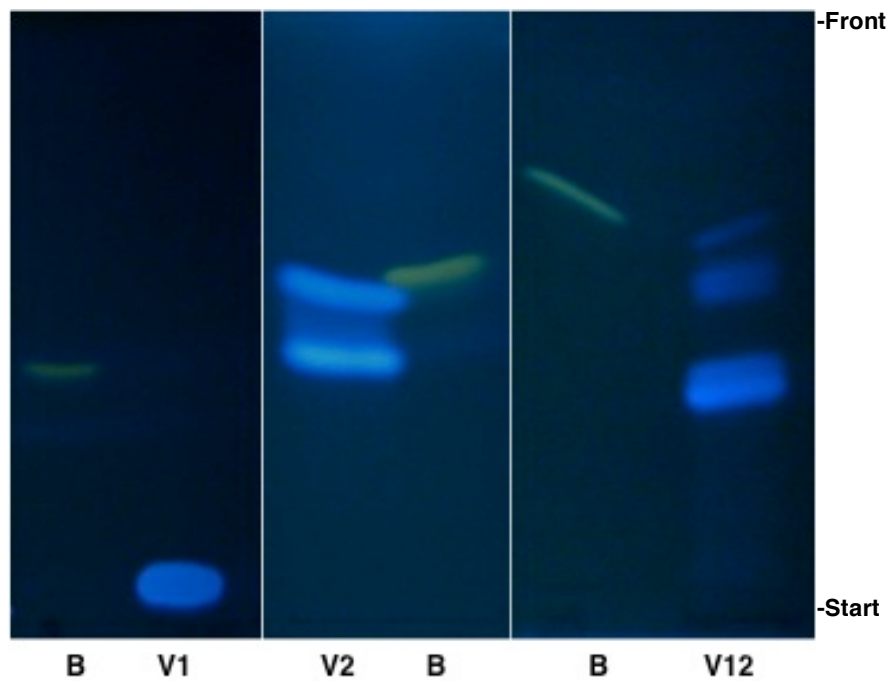


Abb. 40: DC-Vergleiche 1 von Substanz B, Detektion unter UV₃₆₀nm

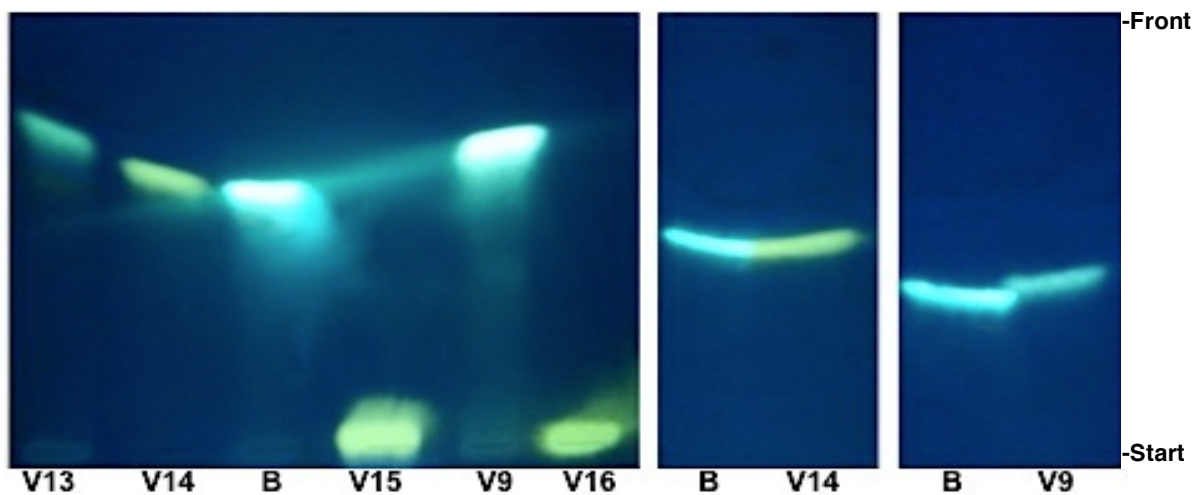


Abb. 41: DC-Vergleiche 2 von Substanz B, Detektion mit NS/PEG unter UV₃₆₀nm

V1	Chlorogensäure	V2	Kaffesäure	V9	Kämpferol
V12	Rosmarinsäure	V13	Isorhamnetin	V14	Apigenin
V15	Isovitexin	V16	Kämpferol-3-O-rutinosid		

Substanz B unterschied sich von allen Vergleichssubstanzen bezüglich der Fluoreszenzfärbung und der R_f-Werte (siehe Abb.40 und 41, S.39) und konnte mittels DC nicht identifiziert werden.

Es wurde aber ersichtlich, dass die Substanz in den Sammelfractionen a, b, d und e in sehr reiner Form vorlag, wobei besonders in Sammelfraction b die höchste Reinheit gegeben war (siehe Abb. 38, S.37). Die Sammelfraction b bot sich für weitere Strukturanalysen an.

3.6.3 HPLC-Analyse der Substanz B

Um die Struktur von Substanz B mittels HPLC-MS weiter zu untersuchen, wurde eine HPLC-Methode entwickelt, um die Reinheit zu überprüfen und HPLC-MS Analysen durchzuführen.

Die HPLC-Bedingungen waren wie folgt.

Probenkonzentration	1 mg/mL
Lösungsmittel	Methanol
Einspritzvolumen	5 µL
Detektion	Lichtstreuendetektor (ELSD)
	UV-Detektor (DAD) bei 360 nm
Gradient 1	0%B → 100%B in 40 min.
Gradient 2	10 min. 20% B → 100%B in 30 min.

Tab. 12: HPLC-Analysenbedingungen für Substanz B

Sowohl durch die Analyse mit HPLC-DAD, als auch mit HPLC-ELSD wurde ersichtlich, dass Substanz B in reiner Form vorlag (siehe Abb.42 und 43, S.41-42).

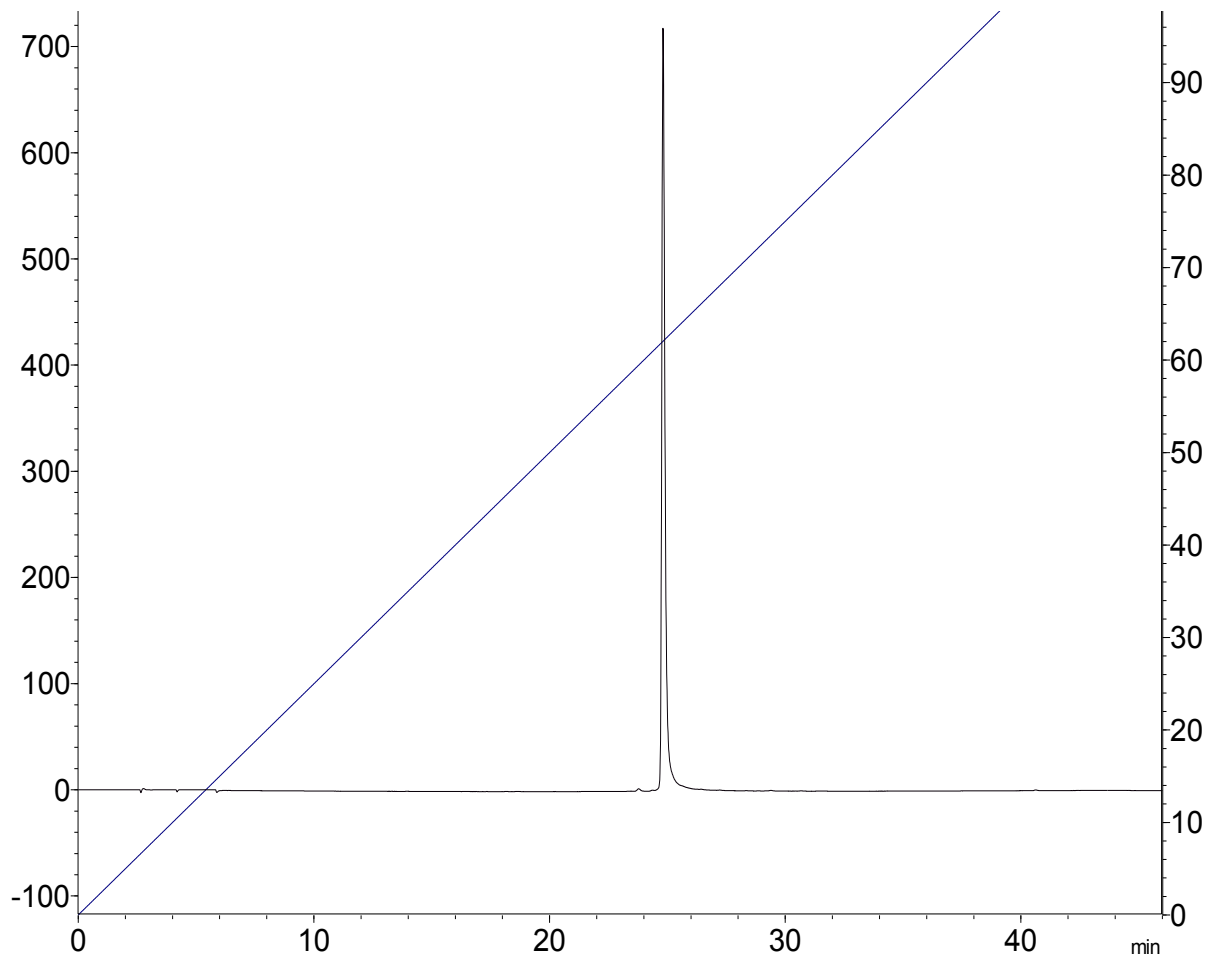


Abb. 42: HPLC-Chromatogramm von Substanz B, Gradient 1 und Detektion mit UV-Detektor bei 360 nm, Bedingungen siehe Tab.12, S.40

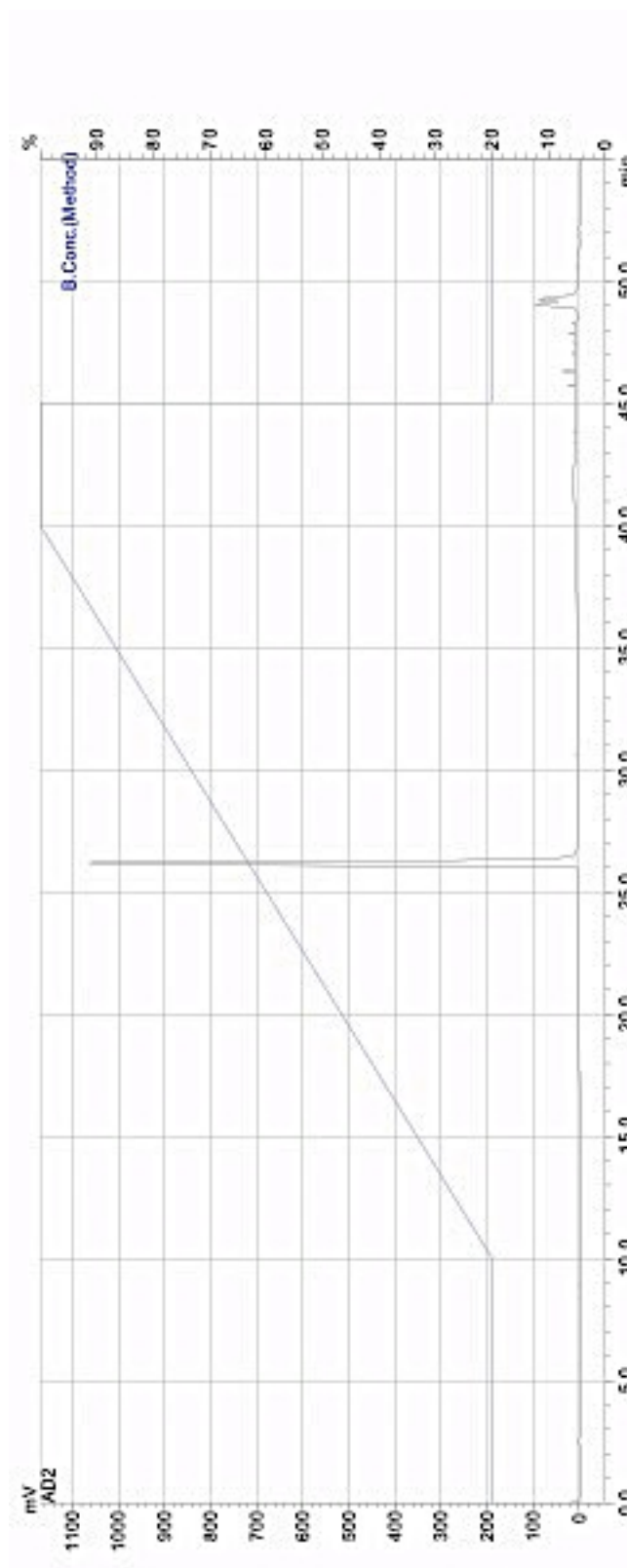


Abb. 43: HPLC-Chromatogramm von Substanz B, Gradient 1 und Detektion mit Lichtstreuendetektor, Bedingungen siehe Tab.12, S.40

3.6.4 Strukturaufklärung der Substanz B

Die HPLC-MS Untersuchung zeigte aufgrund des Fragmentierungsmusters, dass es sich bei der Substanz um ein Pentahydroxy-mono-C-prenyl-xanthon mit einem Massenpeak von 344,7 m/z handelt. Im MS² scan kam es zu den Neutralverlusten von C₃H₆ (-42 Da) und C₄H₆ (-56 Da), typisch für C-prenylierte Aromaten. Im MS³ wurde noch ein CO-Rest (-28 Da) abgespalten (siehe Anhang 13, S.73). Ähnliche Ergebnisse waren aus der Literatur bekannt [10,11].

Ein strukturell verwandtes vierfach hydroxyliertes Xanthon war bereits in einer vorangegangenen Dissertation aus *Metaxya rostrata* isoliert worden. [3]

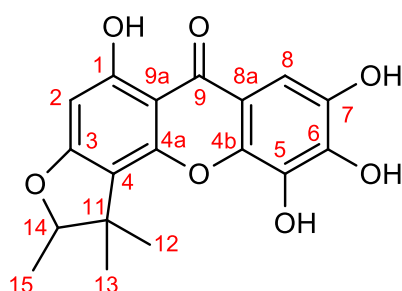
Zur weiteren Strukturklärung wurden ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, HMBC- sowie HSQC-Spektren aufgenommen (siehe Anhang 9-12, S. 70-72).

Im ¹H-NMR kamen zwei Singletts im aromatischen Bereich bei δ= 6,12 ppm und δ= 7,10 ppm zur Resonanz. Weitere zwei Singletts bei δ= 1,61 ppm und 1,32 ppm sowie ein Dublett bei δ= 1,40 ppm (J=6,6 Hz) waren Methylgruppen zuzuordnen. Das Proton einer CH-Gruppe trat bei 4,53 ppm als Quartett auf, wobei die Kopplungskonstante von 6,6 Hz die Substitution mit der Methylgruppe bewies.

Die ¹³C-NMR-Shifts der Trimethylfurano-Teilstruktur und des furano-anellierten hydroxylierten Benzols stimmten weitgehend mit jenen aus der Literatur [12] überein. Im pyrano-anellierten Benzol waren die Signale von C-6 und C-8 um 10 bzw. 17,4 ppm nach höherem Feld verschoben. In Übereinstimmung mit der Tieffeldverschiebung von C-7 um 29,5 ppm bewiesen diese Shifts im Vergleich zu 2-Deprenyl-rheediaxanthon B [12] die Verknüpfung einer weiteren Hydroxylgruppe am C-7 (siehe Tab.13, S.44).

Die Verbindung 2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B stellt einen neuen Naturstoff dar.

Die zwei kleinen Peaks mit einer Retentionszeit von 48 und 49 Minuten in der HPLC-Analyse (siehe Abb.43, S.42) wurden als Verunreinigungen identifiziert. Es handelt sich um Bis(2-ethylhexyl)phthalat und um Bis(2-ethylhexyl)adipat.



Chemical Formula: C₁₈H₁₆O₇
Molecular Weight: 344,32

		¹ H	J(H,H) (MeOH-d ₄)	¹³ C
1	C	---		165.02
2	CH	6.118	s	93.86
3	C	---		166.90
4	C	---		114.05
4a	C	---		154.39
4b	C	---		144.52 ^a
5	C	---		134.67
6	C	---		143.21 ^a
7	C	---		142.93 ^a
8	CH	7.101	s	100.18
8a	C	---		113.48
9	C	---		181.69
9a	C	---		104.10
11	C	---		44.99
12	CH ₃	1.613	s	25.97
13	CH ₃	1.325	s	21.40
14	CH	4.527	q 6.6	92.19
15	CH ₃	1.400	d 6.6	14.56

Tab. 13: NMR-Daten von Substanz B

3.7 SC 1

Man wollte aus der Fraktion 17 eine braun-rot fluoreszierende Substanz mit R_f 0,6 (siehe Abb. 18 (1), S.14), sowie drei mit AASS braun gefärbte Komponenten mit R_f 0,85, 0,89 und 0,9 (siehe Abb. 18 (2), S.14) isolieren.

3.7.1 Durchführung der SC 1

Von der Fraktion 17 standen 175 mg zur Verfügung, die es ermöglichten eine Auftrennung mittels Säulenchromatographie durchzuführen, um die Hauptkomponenten aus Fraktion 17 zu isolieren.

Hierzu wurden die beschriebenen SC-Parameter angewendet (siehe 2.2.2, S.9). Jede zehnte Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft und gleiche Fraktionen wurden zu Sammelfractionen vereinigt.

Die DC-Überprüfung der Sammelfractionen erfolgte auf Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatten mit der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11).

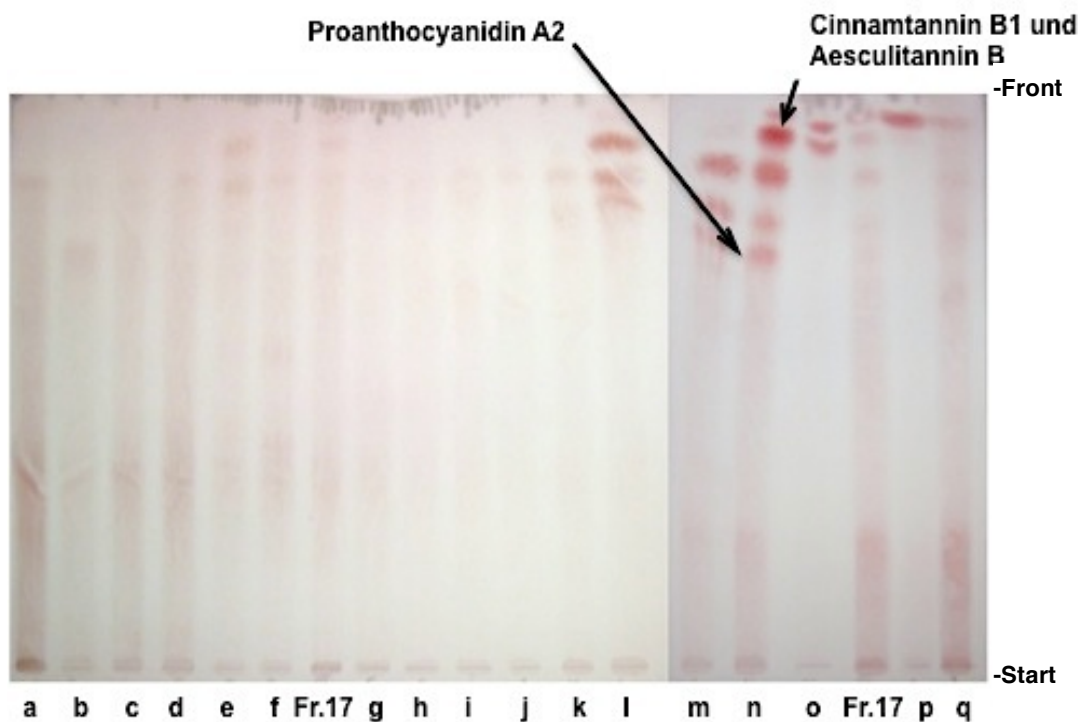


Abb. 44: DC der Sammelfractionen von SC1, Detektion mit AASS

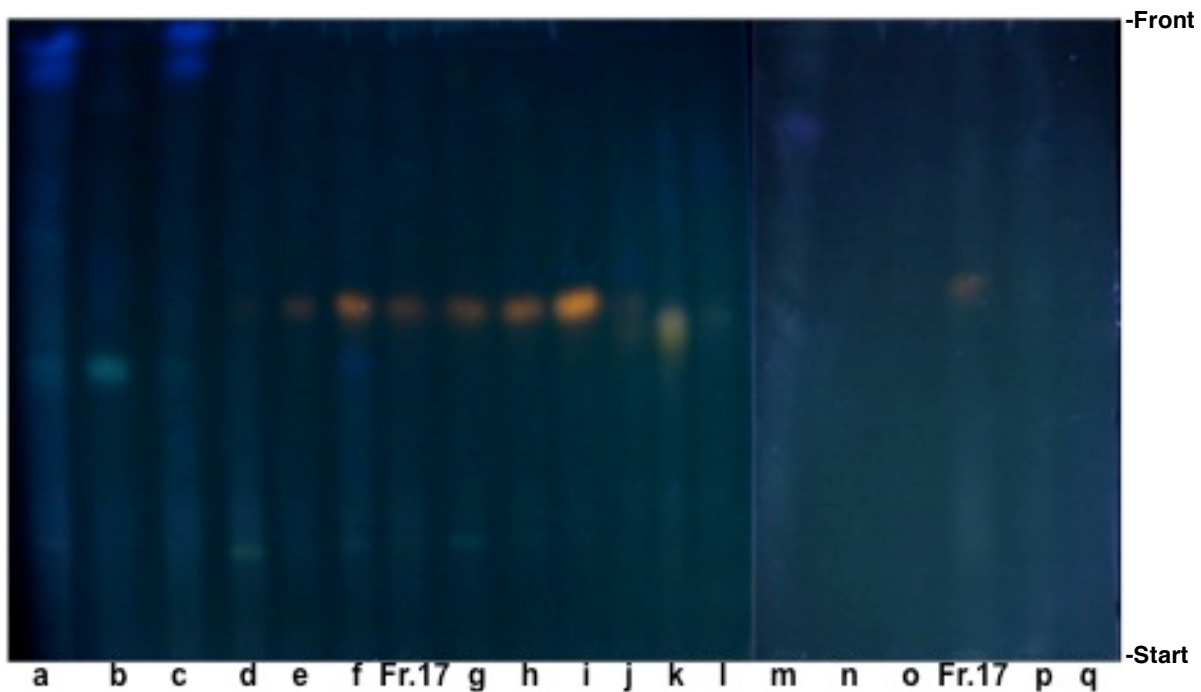


Abb. 45: DC der Sammelfractionen von SC1, Detektion mit NS/PEG (UV₃₆₀ nm)

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Elution mit Methanol: Wasser	Menge
a	1-45	50:50	16,8 mg
b	46-48	50:50	0,7 mg
c	49-58	50:50	2,6 mg
d	59-116	50:50	22,4 mg
e	117-141	50:50	8,1 mg
f	142-151	50:50	6,0 mg
g	152-169	50:50	8,6 mg
	170-184	60:40	
h	185-197	60:40	7,9 mg
i	198-216	60:40	9,1 mg
j	217-236	60:40	12,3 mg
k	237-242	60:40	2,4 mg
l	243-257	60:40	10,1 mg
m	258-266	60:40	5,5 mg
n	267-276	60:40	10,6 mg
o	277-283	60:40	5,0 mg
p	284-318	60:40	10,6 mg
q	319-345	60:40	19,4 mg

Tab. 14: Sammelfraktion von SC1

Die Sammelfraktion n und teilweise die Sammelfraktionen l, m und o enthielten mit AASS rotbraun gefärbte Substanzen mit Rf zwischen 0,7 und 0,95 (siehe Abb.44, S.45). Die Substanzen mit Rf 0,7 und 0,95 aus Sammelfraktion n waren aus *Metaxya rostrata* bereits bekannt [2], [5]. Es handelte sich um die Tannine Cinnamtannin B1, Aesculitannin B und Proanthocyanidin A2.

Die auffällig orange fluoreszierende Komponente mit Rf 0,5 konnte in den Sammelfraktionen e bis i detektiert werden (siehe Abb.45, S.46). Hierbei erschien die Sammelfraktion i am reinsten und bot sich für weitere Analysen an.

3.7.2 Dünnschichtchromatographische Vergleiche

3.7.2.1 Sammelfraktion I von SC 1

Die rot-braunen Banden in der Sammelfraktion I bei Rf. ca. 0,8- 0,9 (siehe Abb.44, S.45) zeigten ähnliches Laufverhalten wie die Komponenten in Sammelfraktion c und d aus SPE 4 (siehe Abb.27, S.26). Auch die Färbung der Banden war nach Entwicklung im gleichen DC-System (Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten mit der mobilen Phase A (siehe Tab.4, S.11)) und nach Detektion mit AASS sehr ähnlich.

Die Sammelfraktion c SPE 4 und die Sammelfraktion I aus SC 1 wurden cochromatographiert, um eine etwaige Übereinstimmung abzuklären (Abb.46, S.47).



Abb. 46: DC-Vergleich von SF c und SF I, Detektion mit AASS

Bei den Komponenten aus Sammelfraktion c aus SPE 4 und aus Sammelfraktion I von SC 1 handelte es sich nicht um die selbe Substanz. Die Banden wiesen unterschiedliche Rf-Werte auf (siehe Abb.46, S.47).

3.7.2.2 Sammelfraktion i aus SC 1

Auf Grund der orangen Fluoreszenz der Bande bei Rf. 0,5 in der Sammelfraktion i (siehe Abb.45, S.46) wurden verschiedene DC-Vergleiche mit Flavonoiden durchgeführt. Es wurden hierzu wieder Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten und die mobile Phase A (siehe Tab.4, S.11) eingesetzt. Als Vergleichssubstanzen dienten Apigenin, Quercetin, Hyperosid, Quercitrin, Isoquercitrin, Orientin und Fraktion 17 (siehe Tab.1, S.7).

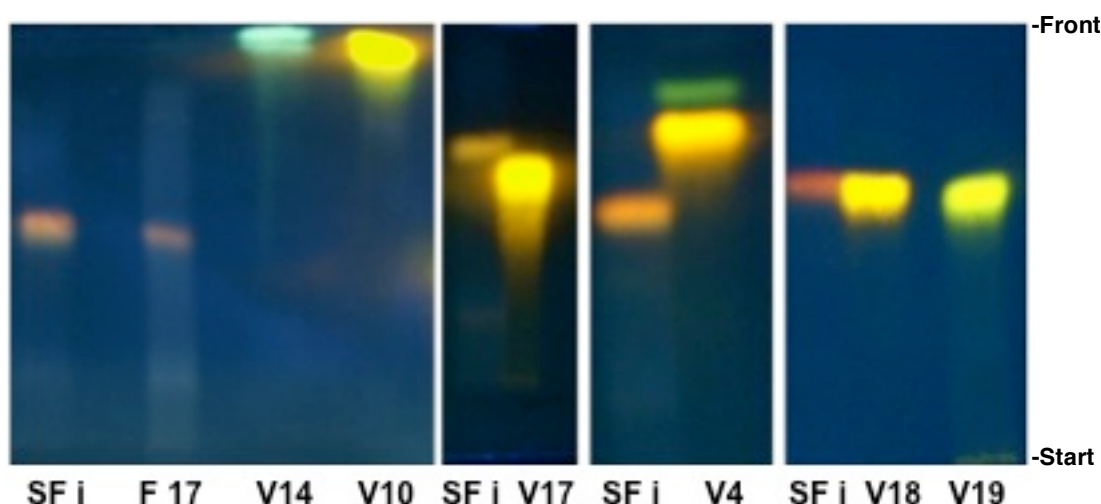


Abb. 47: DC-Vergleiche von Sammelfraktion i aus SC 1,
Detektion mit NS/PEG (UV_{360nm})

F17	Fraktion 17	V4	Quercitrin	V14	Apigenin
V17	Hyperosid	V18	Isoquercitrin	V19	Orientin

Die orange fluoreszierende Bande aus Sammelfraktion i wies entweder eine unterschiedliche Färbung oder einen unterschiedlichen Rf-Wert zu den Vergleichsflavonoiden auf (siehe Abb.47, S.48).

Bei der Komponente handelt es sich um keine der verwendeten Vergleichssubstanzen.

Man kann auf Grund der Fluoreszenz allerdings annehmen, dass es sich um ein Flavonolglykosid vom Quercetin-Typ handelt [6].

Mit Sammelfraktion i wurden weitere Analysen mittels HPLC durchgeführt. Ziel war die Reinheitsbestimmung und Methodenoptimierung für eine MS-Untersuchung.

3.7.3 HPLC-Analyse der Sammelfraktion i aus SC 1

Für die HPLC-Analyse wurden folgende Parameter verwendet:

Probenkonzentration	1mg/mL beim UV-Detektor
	3mg/mL beim ELSD
Lösungsmittel	Methanol
Einspritzvolumen	10µL
Detektion	Lichtstreuendetektor
	UV-Detektor bei 290 und 360nm
Gradient	10 min. 20% B→ 100%B in 30 min.

Tab. 15: HPLC-Analysenbedingungen für Sammelfraktion i aus SC 1

Die HPLC-Analyse zeigte, dass Sammelfraktion i mehrere Substanzen enthielt. Mittels ELSD und DAD wurden mindestens zwei unzureichend getrennte Peaks mit Retentionszeiten von 18 und 19 min detektiert. Außerdem waren mehrere polare Komponenten enthalten, die zwischen 2 und 5 Minuten eluierten (siehe Abb.48-50, S.50-51). Aus diesen Gründen wurden keine weiteren Versuche zur Strukturklärung unternommen.

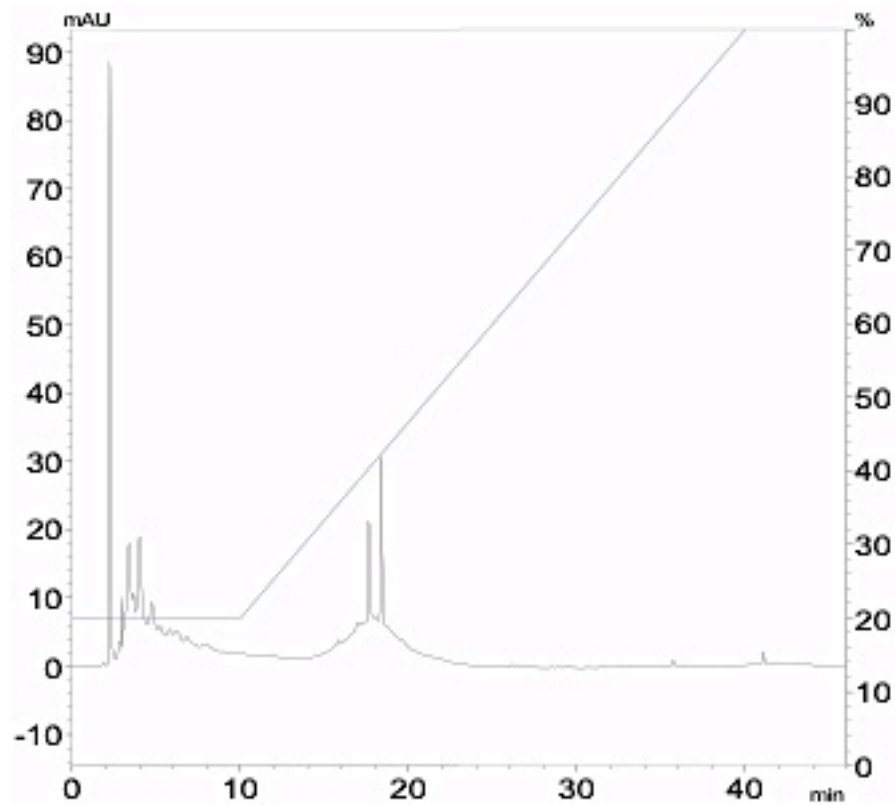


Abb. 48: HPLC-Chromatogramm von Sammelfraktion i,
Detektion mit UV-Detektor bei 290 nm

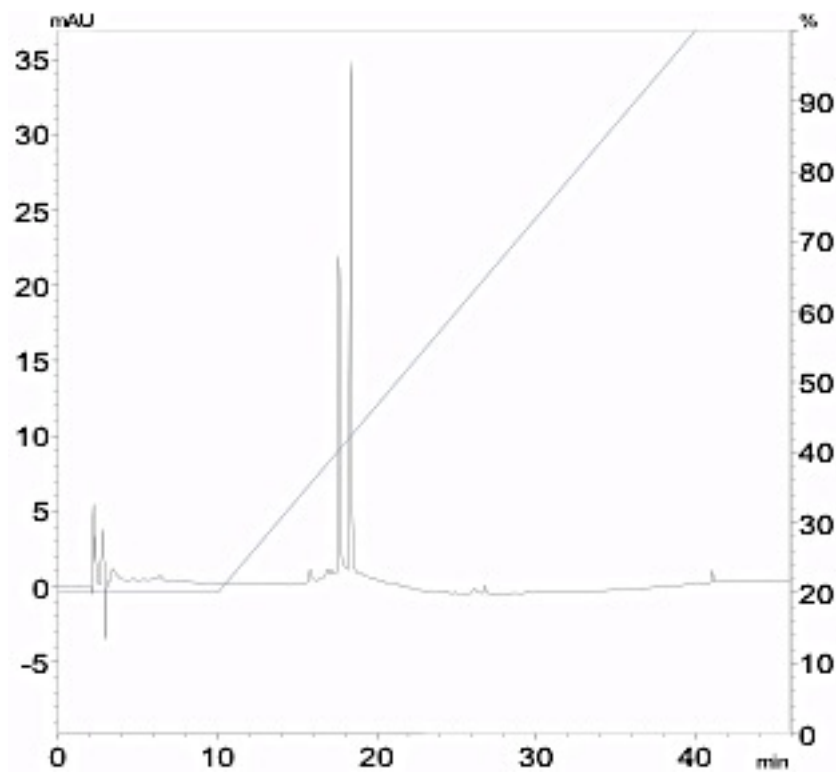


Abb. 49: HPLC-Chromatogramm von Sammelfraktion i,
Detektion mit UV-Detektor bei 360 nm

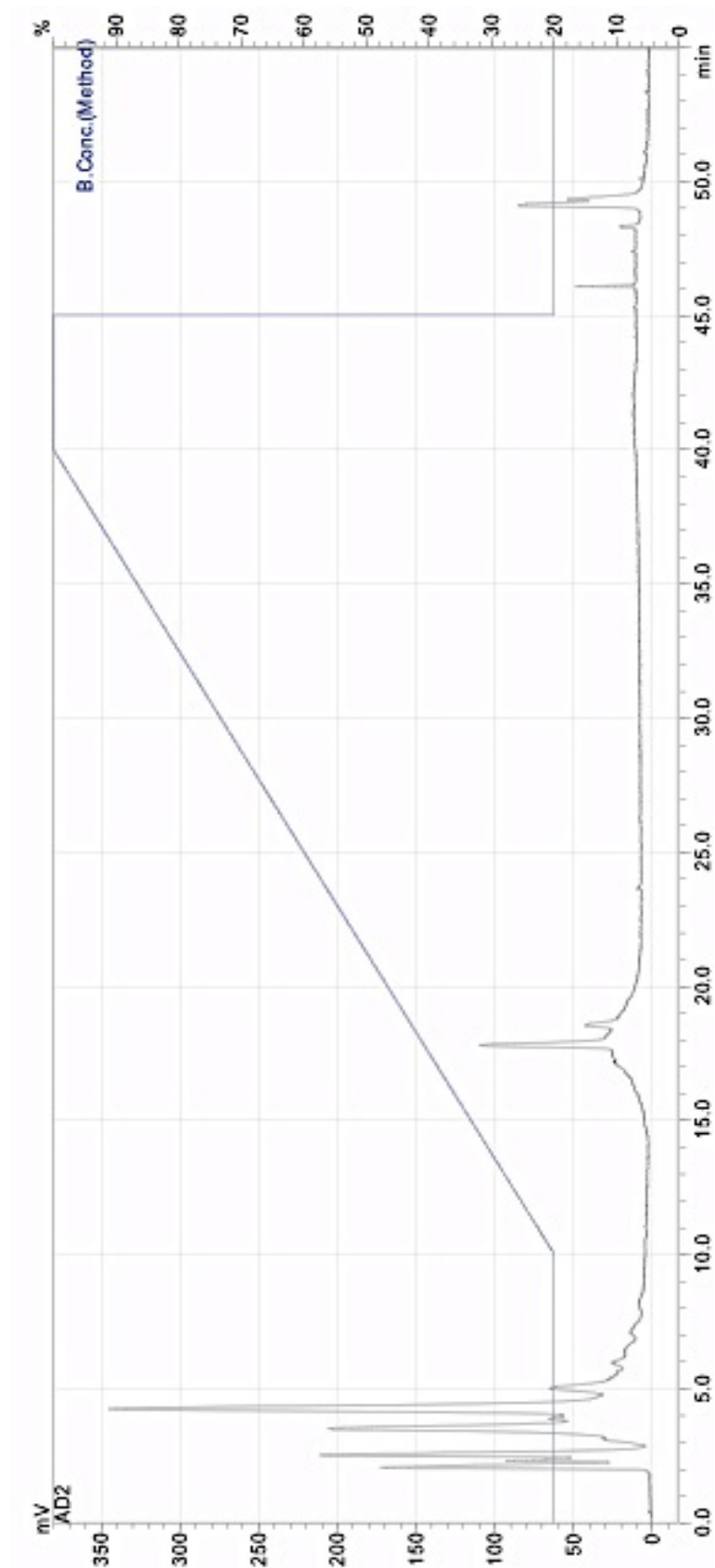


Abb. 50: HPLC-Chromatogramm von Sammelfraktion i, Detektion mit Lichtstreuendetektor

4 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Fraktionen eines Ethylacetat-Extraktes der Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata*, welche in einer vorangegangenen Diplomarbeit mittels Säulenchromatographie gewonnen worden waren [5], bezüglich ihrer Inhaltsstoffe analysiert. Ziel war es, Reinsubstanzen zu isolieren und zu identifizieren.

Von sechs Fraktionen (Fraktionen 2, 3, 4, 7, 13 und 17) wurden fünf mittels Solid Phase Extraktion und eine mittels Säulenchromatographie an Sephadex-LH 20 aufgetrennt. Die erhaltenen Sammelfraktionen wurden jeweils dünnschichtchromatographisch auf ihre Inhaltsstoffe überprüft.

Mehrere Sammelfraktionen wurden zur Identifizierung ihrer Hauptkomponenten dünnschichtchromatographisch mit Vergleichssubstanzen und mittels HPLC-DAD-MS und NMR-Spektroskopie untersucht.

Fraktion 2 enthielt ein Gemisch polarer Komponenten, die mit AASS blaue Färbungen zeigten. Mittels SPE wurden zwei Komponenten in Sammelfraktion j bis m bzw. in Sammelfraktion m bis p angereichert. Auf Grund der geringen Menge der Sammelfraktionen war eine Isolierung nicht möglich (Kap.3.2).

Mittels SPE von Fraktion 3 gelang es, in einer Sammelfraktion o eine polare, mit AASS blau gefärbte Substanz zu isolieren. Nachdem ausgeschlossen wurde, dass es sich bei der Komponente um einen Zucker handelt, wurde letztere mittels NMR und MS untersucht. Es konnte ein Glucocerebrosid mit einem gesättigten Fettsäurerest von 24 Kohlenstoffatomen und einem Sphingosinrest von 18 Kohlenstoffatomen und zwei Doppelbindungen nachgewiesen werden. Unseren Erkenntnissen zu Folge handelt es sich um das erste Cerebrosid, das aus einem Farn isoliert wurde (Kap.3.3).

Die Fraktion 4 erwies sich als ein sehr komplexes Vielkomponentengemisch. Es gelang nicht, einzelne Substanzen zu isolieren und die quantitative Ausbeute der einzelnen Fraktion war zu gering, um weitere Trennungsschritte vorzunehmen (Kap.3.4).

In Fraktion 13 waren als Hauptkomponenten eine mit AASS grün gefärbte, stark polare und eine stark blau fluoreszierende Substanz vorhanden. Die SPE 4 ermöglichte weitere Aussagen über die Inhaltsstoffe von Fraktion 13. In Sammelfraktion a konnte Glucose eindeutig mittels DC-Vergleich nachgewiesen

werden. Dünnschichtchromatische Vergleiche mit Phenolcarbonsäuren ließen auf die Anwesenheit eines Chlorogensäurederivates in Sammelfraktion a schließen. Man kann von einer Kaffeoylchinasäure ausgehen, bei der Kaffeesäure und Chinasäure über 1 oder 4 verestert sind (Kap.3.5.2.1).

Eine mit NS/PEG unter UV_{360} nm grün fluoreszierende Bande in Sammelfraktion b könnte auf Grund der Ähnlichkeit in der Fluoreszenz und dem R_f Wert ein Mono- oder relativ apolares Diglycosid des Kämpferols sein. Die Identität dieses Flavonoidderivates konnte nicht geklärt werden, da die quantitative Ausbeute und die Reinheit der Fraktion keine Strukturaufklärung zuließen (Kap.3.5.2.2).

Eine gelb fluoreszierende Komponente aus Sammelfraktion i wurde dünnschichtchromatographisch mit verschiedenen Quercetinglykosiden untersucht. Obwohl keine Übereinstimmung mit den Vergleichssubstanzen festzustellen war, dürfte es sich bei der Substanz um ein Flavonolglykosid vom Quercetin-Typ handeln (Kap.3.5.2.4).

Bei der SPE von Fraktion 7 fiel in mehreren Sammelfractionen ein Niederschlag aus, welcher abgetrennt wurde. Aufgrund der intensiven hellblauen Fluoreszenz mit NS/PEG unter UV_{360} nm in der DC-Überprüfung wurden Vergleiche mit Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden durchgeführt.

Da diese Untersuchungen auf keine der Vergleichssubstanzen hinwiesen, wurde der Niederschlag B mittels HPLC-MS untersucht. Es konnte 2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B als Hauptbestandteil mittels MS-und NMR-Experimenten identifiziert werden. Diese Verbindung stellt einen neuen Naturstoff dar (Kap.3.6).

Fraktion 17, die eine braun-rot fluoreszierende, sowie drei mit AASS braun gefärbte Komponenten beinhaltete, wurde mittels Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 aufgetrennt. Die Dünnschichtchromatogramme der gesammelten Fraktion zeigten die Anwesenheit der bereits aus vorangegangenen Untersuchungen bekannten Tannine Cinnamtannin B1, Aesculitannin B und Proanthocyanidin A2 (Kap.3.7.2).

In der Sammelfraktion i konnte man mittels DC-Vergleich für die orange fluoreszierende Hauptkomponente das Vorliegen einiger Flavonoide ausschließen. Die Menge der Sammelfraktion und das Vorliegen mehrerer Nebenkomponten erlaubten keine Isolierung der Substanz. Man kann davon ausgehen, dass es sich auch hier um ein Flavonolglykosid vom Quercetin-Typ handelt (Kap.3.7.3.2).

5 Zusammenfassung

Metaxya rostrata wurde auf Grund ihrer ethomedizinischen Verwendung bei Magen-Darm-Ulzera in Costa Rica, in vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeiten auf ihre Inhaltsstoffe und Wirkungsmechanismen untersucht.

Da *Metaxya rostrata* auch bezüglich ihrer chemischen Zusammensetzung wenig erforscht ist, widmeten sich dieser Thematik mehrere Diplomarbeiten. Die vorliegende Diplomarbeit stellt die Weiterverfolgung dieses Zieles dar.

Es wurden sechs Fraktionen eines Ethylacetat-Extraktes der Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata*, welche in einer vorangegangenen Diplomarbeit mittels Säulenchromatographie gewonnen worden waren, herangezogen. Die Fraktionen wurden mit Solid Phase Extraction bzw. Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 aufgetrennt und die erhaltenen Sammelfraktionen wurden dünnschichtchromatographisch sowie mittels HPLC-MS und NMR-Spektrometrie analysiert.

Ein Glucocerebrosid, welches bis dato noch nie aus einem Farn isoliert worden war, konnte in Sammelfraktion o (SPE 2) mittels MS und NMR identifiziert werden.

Die Anwesenheit eines Chlorogensäurederivates in der Sammelfraktion a und eines Mono- oder relativ apolaren Diglycosides des Kämpferols in der Sammelfraktion b aus Fraktion 13 (SPE 4) konnte mittels DC nachgewiesen werden. Das Vorliegen von Flavonolglykosiden der Quercetintyps in der Sammelfraktion i aus Fraktion 13 (SPE 4) und in der Sammelfraktion l aus Fraktion 17 (SC 1) konnten ebenfalls dünnschichtchromatographisch belegt werden.

Aus Fraktion 7 wurde mittels SPE 5 eine Reinsubstanz, ein Xanthonderivat, gewonnen. Die genaue Struktur, 2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B, konnte mittels MS und NMR-Spektroskopie identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um einen neuen Naturstoff.

6 Summary

Due to the fact that *Metaxya rostrata* is used in ethnic medicine of Costa Rica to cure gastrointestinal ulcers, previous scientific investigations focused on the exploration of its chemical composition and cytotoxic activities.

Until now very little has been published on the chemical composition of *Metaxya rostrata*. Respective chemical studies were performed in several diploma theses, which were continued in this study.

Six fractions from an ethylacetate extract of the rootlets from *Metaxya rostrata*, collected from column-chromatography in a previous diploma thesis, were further separated by solid phase extraction and column-chromatography on Sephadex LH-20. The collective fractions were analysed by thin layer chromatography, HPLC-MS and NMR spectroscopy.

A glucocerebroside, which so far has never been isolated from a fern, was identified in collective fraction o (SPE 2) by means of MS and NMR.

The presence of both a chlorogenic acid derivative in fraction a and a mono- or diglycoside of the kaempferol-type in the collective fraction b of fraction 13 (SPE 4) can be assumed. The occurrence of a flavonol glycoside of the quercetin-type in collective fraction i of fraction 13 (SPE 4) and in collective fraction l of fraction 17 (SC 1) can also be assumed after thinlayer-chromatography.

Using SPE, a pure compound, a xanthone-derivative, was isolated from fraction 7. The exact chemical structure, 2-deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B, was identified by MS-analysis und NMR-spectroscopy. This compound is a new natural substance.

7 Abkürzungsverzeichnis

AASS	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
Abb.	Abbildung
Conc.	konzentriert
COSY	Correlation Spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
DAD	Diode Array Detector
DDA	Data dependent acquisition
ELSD	Evaporative light scattering detector
ESI	Electrospray Ionisation
EtAc	Ethylacetat
Fr.	Fraktion
HCT	High Capacity Trap
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
Ndg.	Niederschlag
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
NS/PEG	Naturstoffreagens A-Polyethylenglycol 400
RP	Reversed Phase
SC	Säulenchromatographie
SF	Sammelfraktion
SPE	Solid Phase Extraction
Tab.	Tabelle
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
V	Vergleichssubstanz

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Metaxya rostrata</i> (Kunth C. Presl) [3]	1
Abb. 2: 2-deprenyl-rheediaxanthon B [3]	2
Abb. 3: Betulinsäure [3]	2
Abb. 4: Aesculitannin B [2].....	2
Abb. 5: Cinnamtannin B-1 [2].....	3
Abb. 6: (2E)-(6-hydroxyhexyliden)cyclopropyl- β -glucopyranosid [3]	3
Abb. 7: (6E)-6[2-(β -glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]hexansäure [3]	4
Abb. 8: Methyl- α -fructofuranosid [3]	4
Abb. 9: 4-O- β -D-glucopyranosyl-p-trans-coumarsäure.....	4
Abb. 10: 4-O- β -D-glucopyranosyl-kaffeesäure	4
Abb. 11: Fern-9(11)-en [4]	5
Abb. 12: Squalen [4]	5
Abb. 13: Proanthocyanidin A-2 [5]	5
Abb. 14: Nebenwurzeln der <i>Metaxya rostrata</i> [3]	6
Abb. 15: Trennschema des Ethylacetat-Extraktes der Nebenwurzeln.....	7
Abb. 16: SPE-Apparatur	9
Abb. 17: SC an Sephadex LH-20.....	10
Abb. 18: DC der Fraktionen mit mobiler Phase A, Detektion mit NS/PEG (1) und AASS (2).....	14
Abb. 19: DC der Fraktionen mit mobiler Phase B, Detektion mit NS/PEG (1) und AASS (2).....	14
Abb. 20: RP-DC von Fraktion 2, Detektion mit AASS.....	15
Abb. 21: DC der Sammelfraktionen von SPE 1, Detektion mit AASS.....	16

Abb. 22: DC der Sammelfractionen von SPE 2, Detektion mit AASS.....	18
Abb. 23: DC der Sammelfractionen von SPE 2, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm)	19
Abb. 24: DC von Sammelfraktion o, Detektion mit AASS	20
Abb. 25: DC der Sammelfractionen von SPE 3, Detektion mit AASS.....	23
Abb. 26: DC der Sammelfractionen von SPE 3, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm)	24
Abb. 27: DC der Sammelfractionen von SPE 4, Detektion mit AASS.....	26
Abb. 28: DC der Sammelfractionen von SPE 4, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm)	26
Abb. 29: DC-Vergleich der SF a von SPE 4 mit Glucose mit mobiler Phase A (1) und F (2)	28
Abb. 30: DC-Vergleich 1 der SF a von SPE 4	29
Abb. 31: DC-Vergleich 2 der SF a von SPE 4, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm)...	30
Abb. 32: DC-Vergleich 3 der SF a von SPE 4, Detektion ohne (1) und mit NS/PEG (2) unter UV ₃₆₀ nm	31
Abb. 33: DC-Vergleich 1 der SF b von SPE, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm)	32
Abb. 34: DC-Vergleich 2 der SF b von SPE, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm).....	33
Abb. 35: DC der Sammelfraktion auf Kieselgelplatte mit mobiler Phase A (1) und auf RP8 DC-Platte mit mobiler Phase D (2), Detektion mit AASS	34
Abb. 36: DC-Vergleiche der SF i von SPE 4, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm)....	35
Abb. 37: Niederschlag aus SPE 5.....	36
Abb. 38: DC der Niederschläge von SPE 5, Detektion mit AASS (1)	37
Abb. 39: DC der Überstände von SPE 5, Detektion mit AASS (1) und NS/PEG unter UV ₃₆₀ nm (2)	37
Abb. 40: DC-Vergleiche 1 von Substanz B, Detektion unter UV ₃₆₀ nm.....	39
Abb. 41: DC-Vergleiche 2 von Substanz B, Detektion mit NS/PEG unter UV ₃₆₀ nm	39
Abb. 42: HPLC-Chromatogramm von Substanz B, Gradient 1 und Detektion mit UV-Detektor bei 360 nm, Bedingungen siehe Tab.12, S.40	41

Abb. 43: HPLC-Chromatogramm von Substanz B, Gradient 1 und Detektion mit Lichtstreudetektor, Bedingungen siehe Tab.12, S.40.....	42
Abb. 44: DC der Sammelfractionen von SC1, Detektion mit AASS	45
Abb. 45: DC der Sammelfractionen von SC1, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm)...	46
Abb. 46: DC-Vergleich von SF c und SF I, Detektion mit AASS	47
Abb. 47: DC-Vergleiche von Sammelfraction i aus SC 1, Detektion mit NS/PEG (UV ₃₆₀ nm)	48
Abb. 48: HPLC-Chromatogramm von Sammelfraction i, Detektion mit UV-Detektor bei 290 nm	50
Abb. 49: HPLC-Chromatogramm von Sammelfraction i, Detektion mit UV-Detektor bei 360 nm	50
Abb. 50: HPLC-Chromatogramm von Sammelfraction i, Detektion mit Lichtstreudetektor	51

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Fraktionen aus dem Ethylacetat-Extrakt für weitergehende Untersuchungen	7
Tab. 2: Elutionsmittelzusammensetzung der SPE	8
Tab. 3: Bedingungen der SC.....	9
Tab. 4: Stationäre und mobile Phasen der DC.....	11
Tab. 5: HPLC-Parameter.....	12
Tab. 6: Sammelfraktionen der SPE 1	17
Tab. 7: Sammelfraktionen der SPE 2.....	19
Tab. 8: NMR-Daten von Substanz O.....	22
Tab. 9: Sammelfraktionen der SPE 3.....	24
Tab. 10: Sammelfraktionen der SPE 4.....	27
Tab. 11: Sammelfraktionen aus SPE 5	37
Tab. 12: HPLC-Analysenbedingungen für Substanz B	40
Tab. 13: NMR-Daten von Substanz B	44
Tab. 14: Sammelfraktion von SC1	46
Tab. 15: HPLC-Analysenbedingungen für Sammelfraktion i aus SC 1	49

10 Literaturverzeichnis

- [1] Virtbauer J, Krenn L, Kählig H, Hübner A, Donath O, Marian B. Chemical and pharmacological investigations of *Metaxya rostrata*. Zeitschrift für Naturforschung, 2008, 63c: 469-475.
- [2] Virtbauer J. Bioassay-guided chemische Untersuchungen von tropischen Arzneipflanzen. Dissertation, Universität Wien, 2007.
- [3] Kainz K. Phytochemical investigation and bioactivity-guided isolation of cytotoxic compounds from *Metaxya rostrata*, Dissertation, Universität Wien, 2011.
- [4] Merlinger B. Phytochemische Untersuchungen am Baumfarn *Metaxya rostrata*, Diplomarbeit, Universität Wien, 2010.
- [5] Pemmer T. Phytochemische Untersuchungen der Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata*, Diplomarbeit, Universität Wien, 2011.
- [6] Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Springer-Verlag Berlin, 1983.
- [7] Maruta T, Saito T, Inagaki M, Shibata O, Higuchi R. Biologically active glycosides from Asteroidea, 41. Isolation and Structure determination of glucocerebrosides from the Starfish *Linckia laevigata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 53, 1255-1258.
- [8] Inagaki M, Oyama A, Arao K, Higuchi R. Constituents of Crinoidea, 4. Isolation and structure of ceramides and glucocerebrosides from the Feather Star *Comanthus japonica*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2004, 52, 1307-1311.

- [9] Hsu F, Turk J. Structural determination of glycosphingolipids as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisional-activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *American Society for Mass Spectrometry*, 2001, 12, 61-79.
- [10] Zhou Y, Han Q, Song J, Qiao C, Xu H. Characterization of polyprenylated xanthenes in *Garcinia xipshuanbannaensis* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1206, 131–139.
- [11] T. da Costa C, Dalluge J, Welch M, Coxon B, Margolis S and Horton D. Characterization of prenylated xanthenes and flavanones by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 2000, 35, 540–549.
- [12] Rath G, Potterat O, Mavi S, Hostettmann K. Xanthenes from *Hypericum roeperanum*. *Phytochemistry*, 1996, 43, 513-520.

11 Curriculum vitae

Name: Natalie Schmidt

Geburtsdatum und –ort: 6. Februar 1988, Wien

Staatsangehörigkeit: Österreich

Eltern: Mag.Claudia Schmidt
Mag.Erhard Schmidt,MBA

Ausbildung

1994-1997 Volksschule Lycée Francais, Wien

1999-2006 Mittelschule Lycée Francais, Wien
Naturwissenschaftlicher Zweig

Juni 2006 Maturaabschluss mit gutem Erfolg

Oktober 2006 Beginn des Studium der Pharmazie an der
Universität Wien

Oktober 2010 bis Januar 2011 Praktische Arbeit der Diplomarbeit am Department
für Pharmakognosie der Universität Wien

Praktika und Ausbildungen

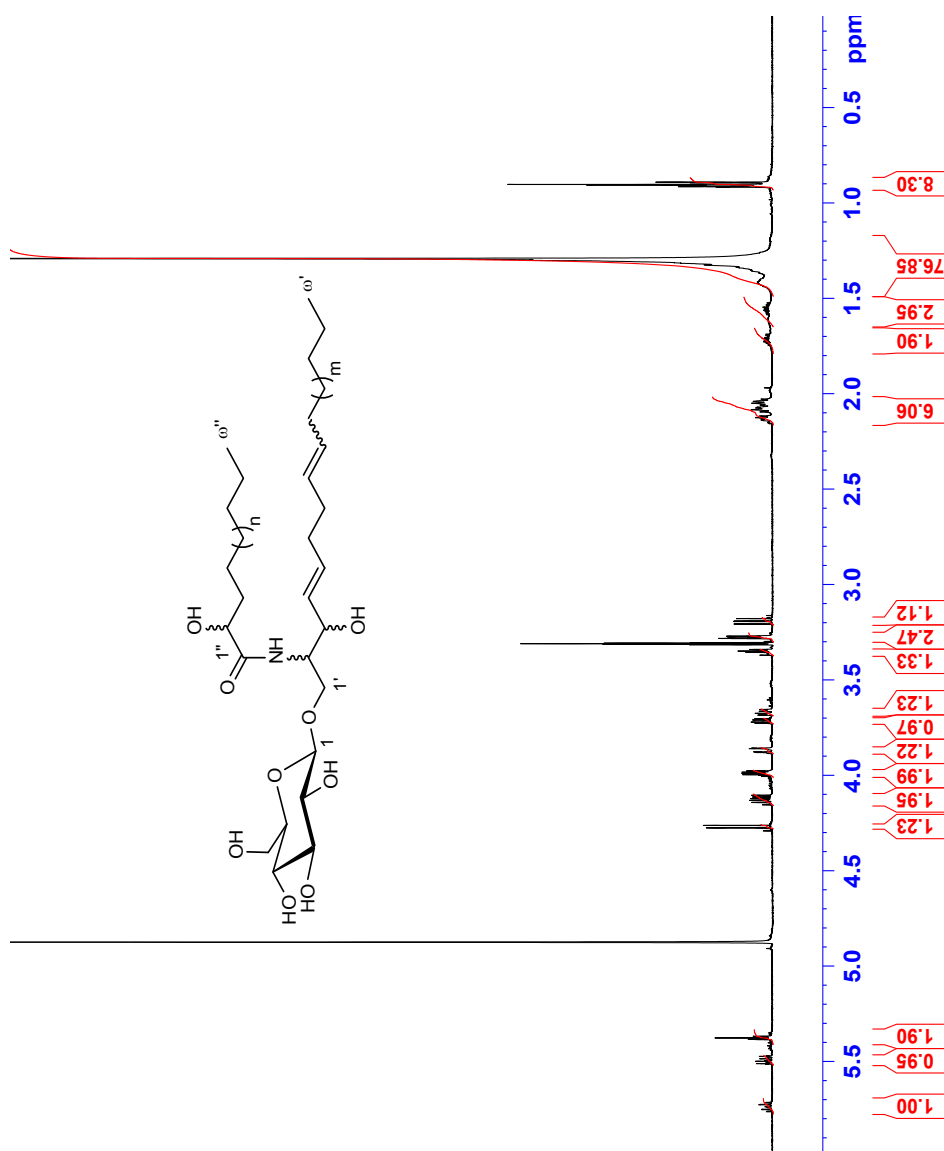
September und Oktober 2007 Apotheke “Zur Universität”, Wien

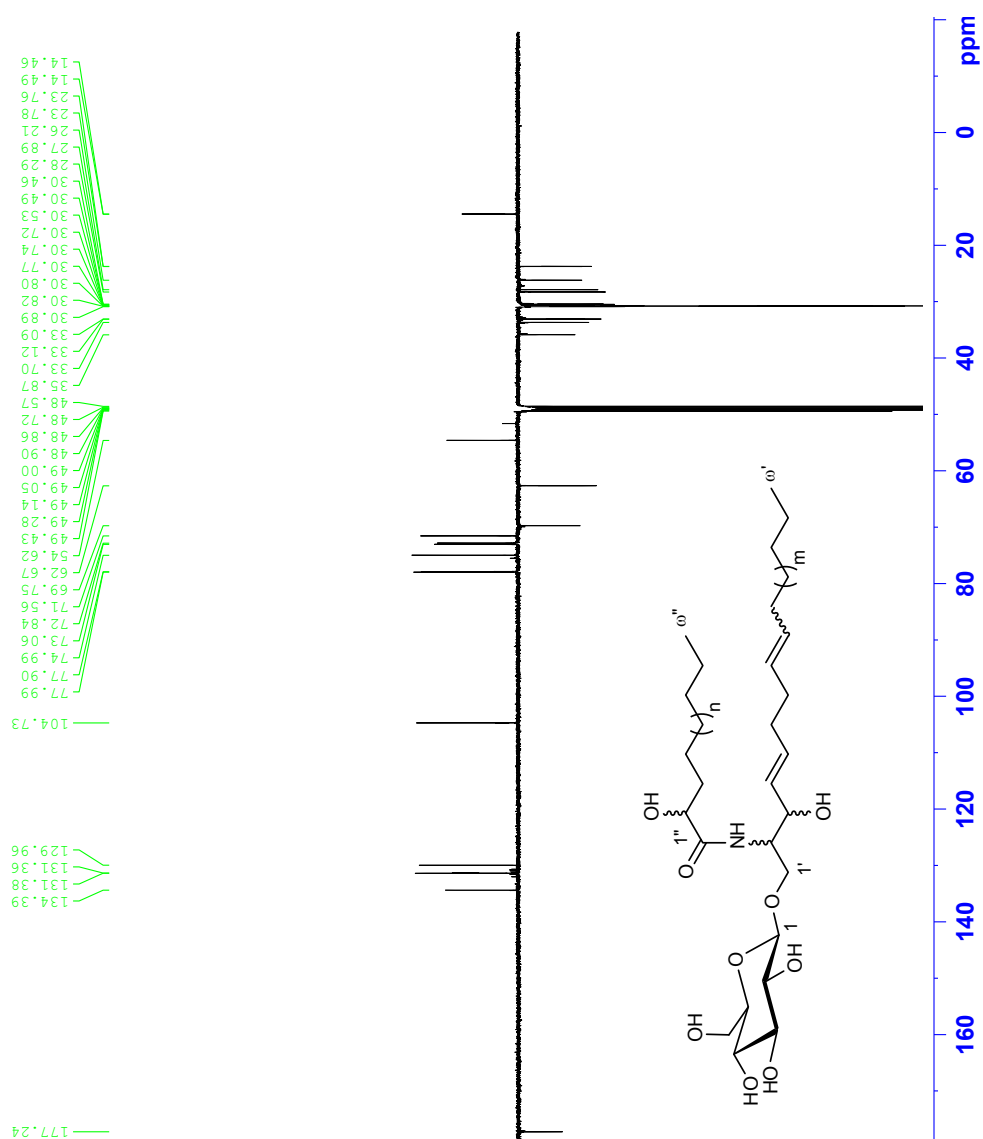
August 2008 “Diana Apotheke”, Berlin

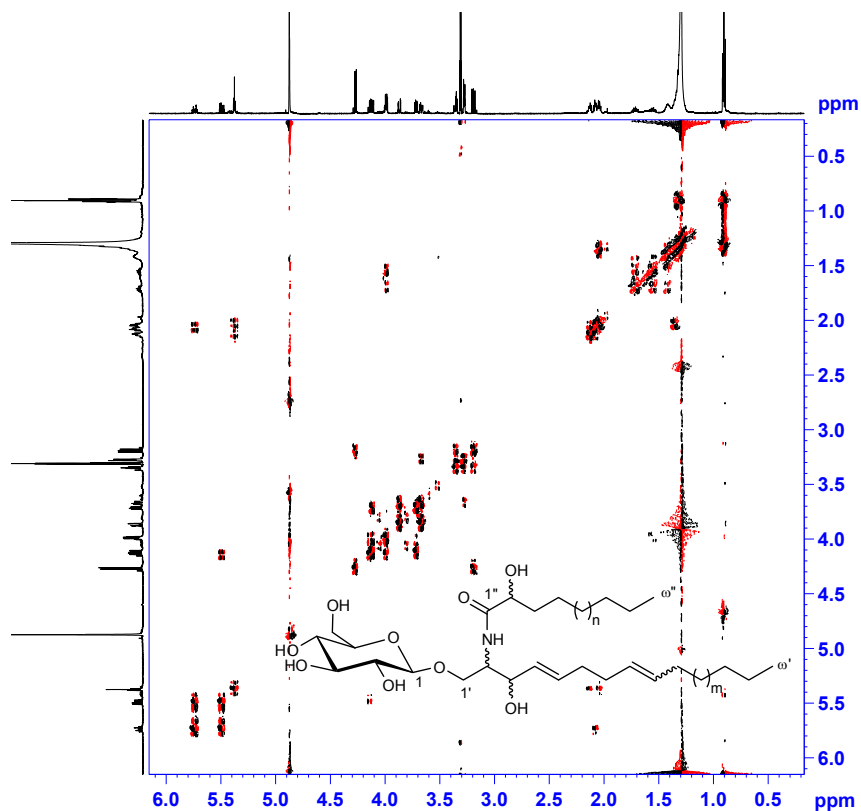
September 2009 TCM-Summer-school in Chengdu, China

Seit Sommersemester 2011 Tutorin im Praktikum “Pharmazeutische Qualität
biogener Arzneimittel” an der Universität Wien

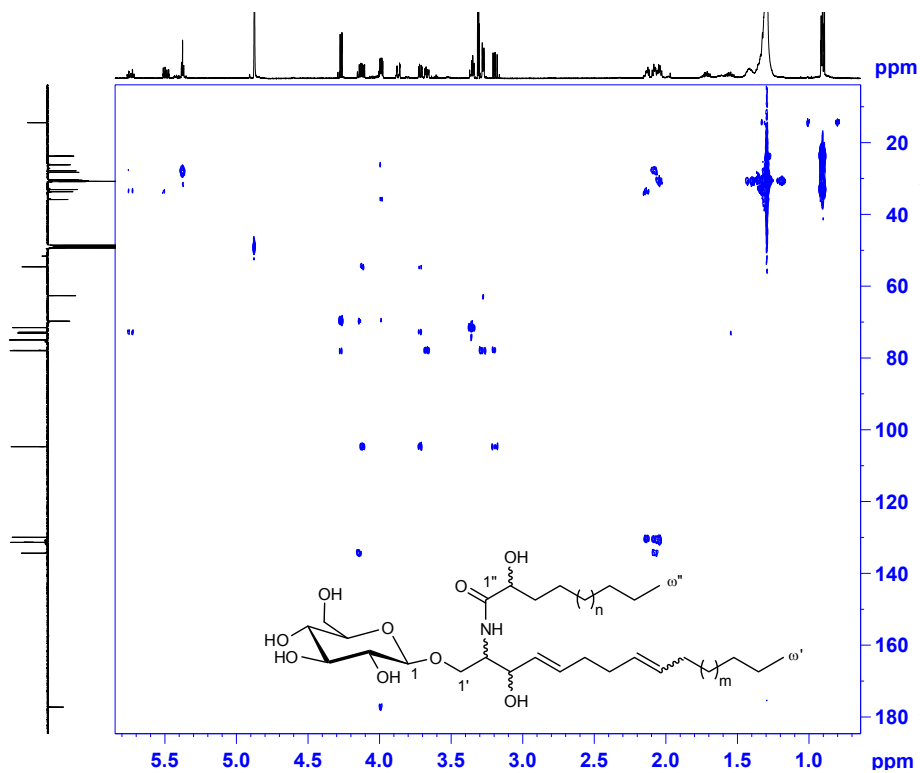
12 Anhang

Anhang 1: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz O

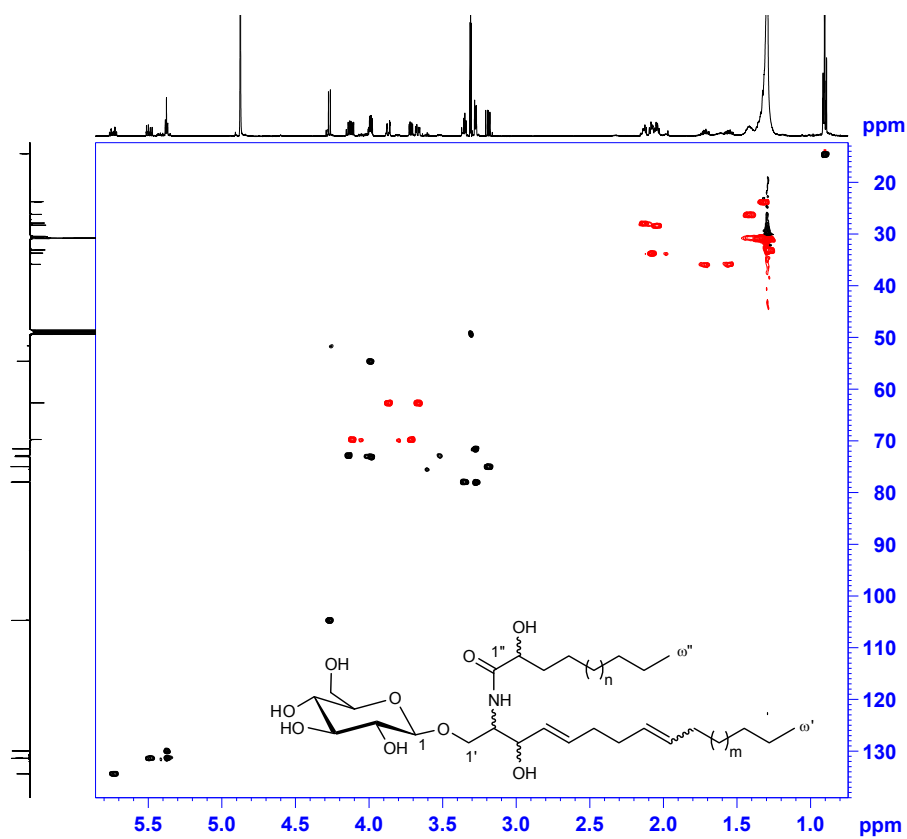
Anhang 2: ^{13}C -NMR-Spektrum von Substanz O



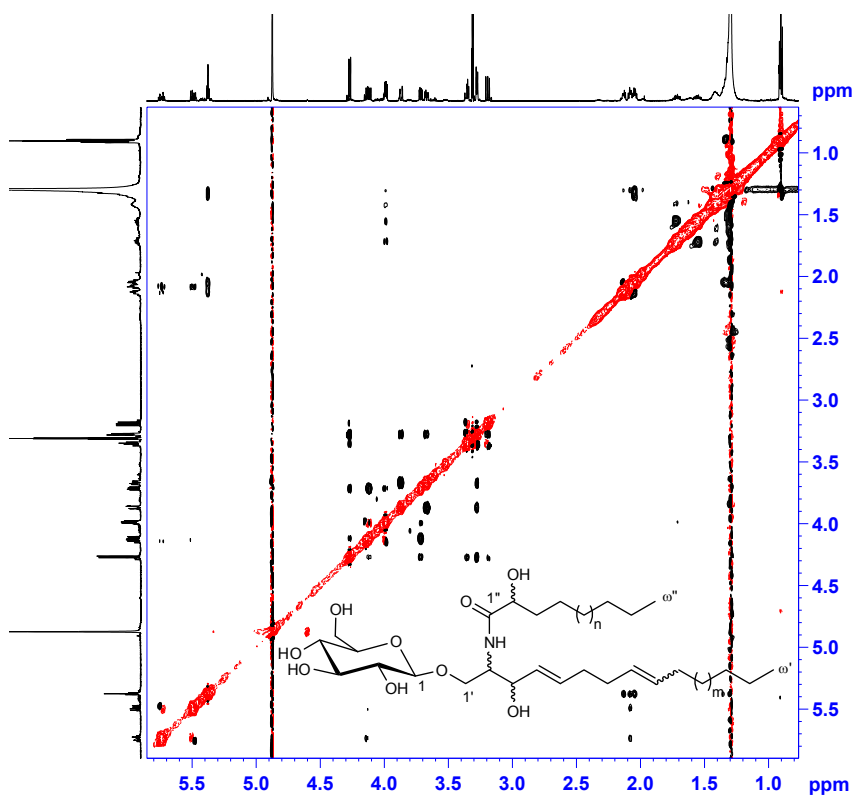
Anhang 3: COSY-Spektrum von Substanz O



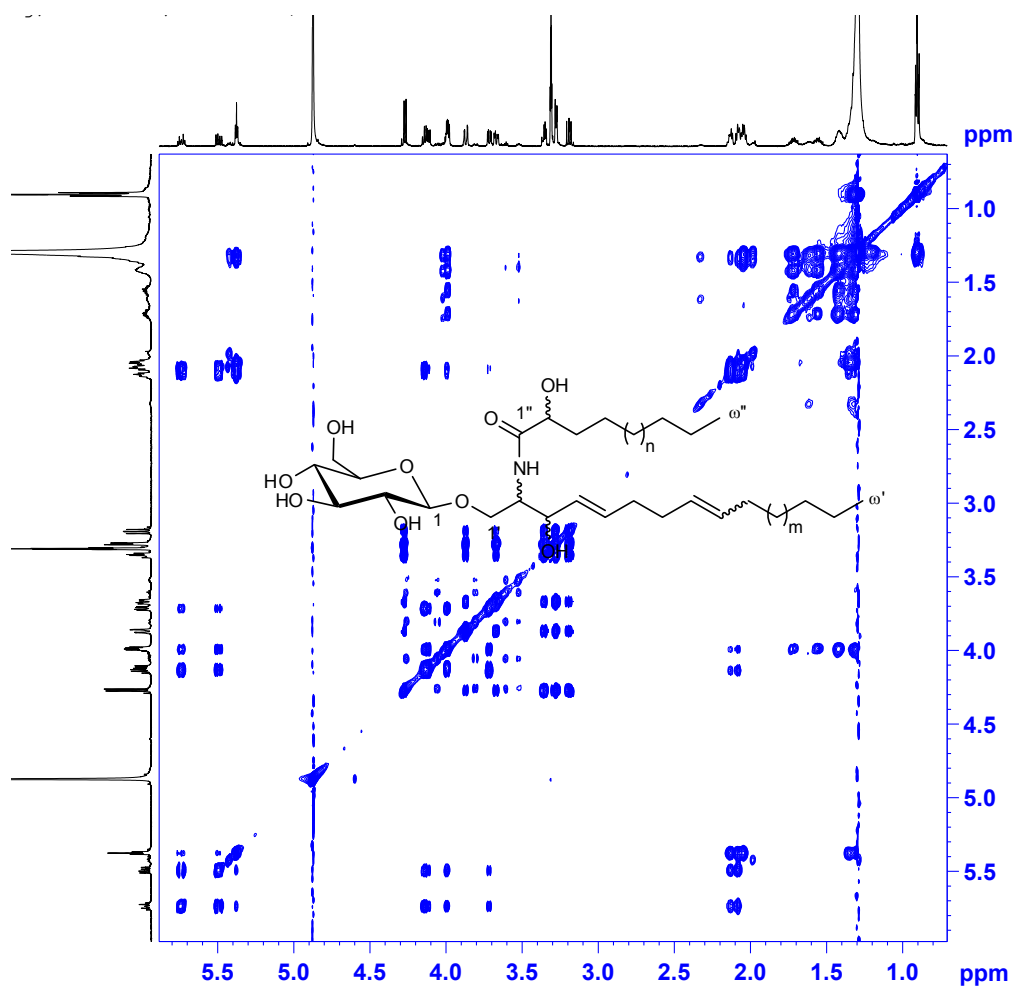
Anhang 4: HMBC-Spektrum von Substanz O



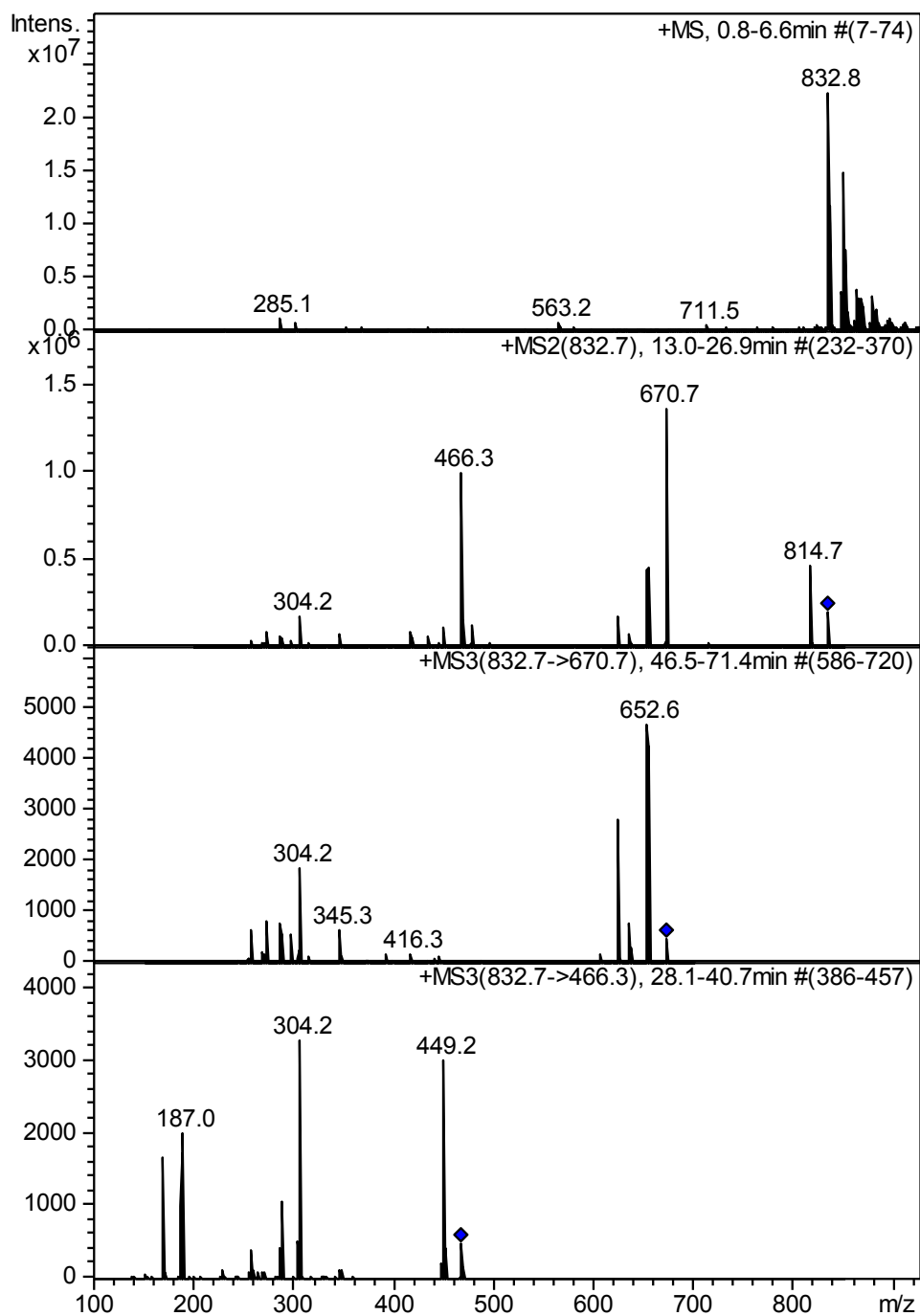
Anhang 5: HSQC-Spektrum von Substanz O



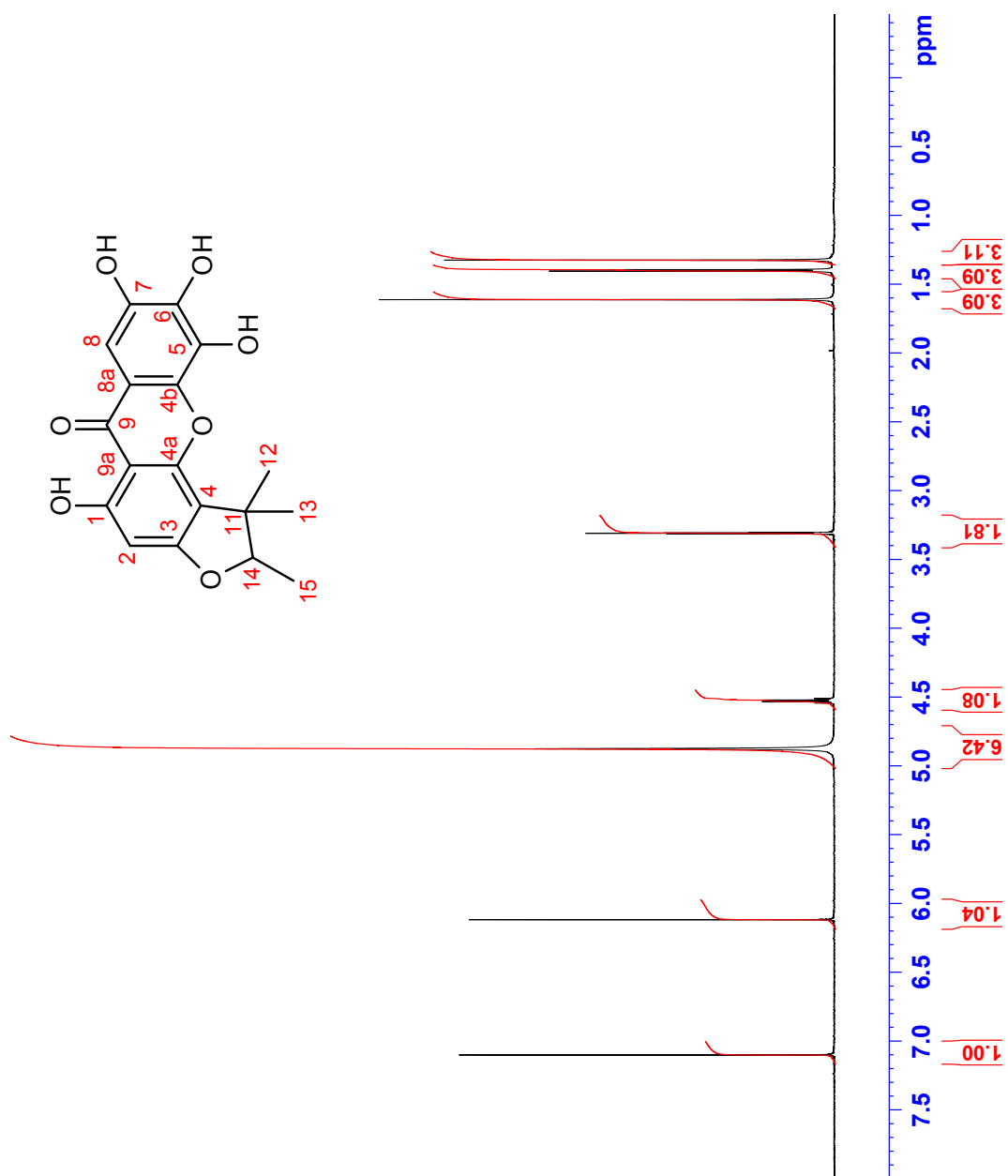
Anhang 6: NOESY-Spektrum von Substanz O

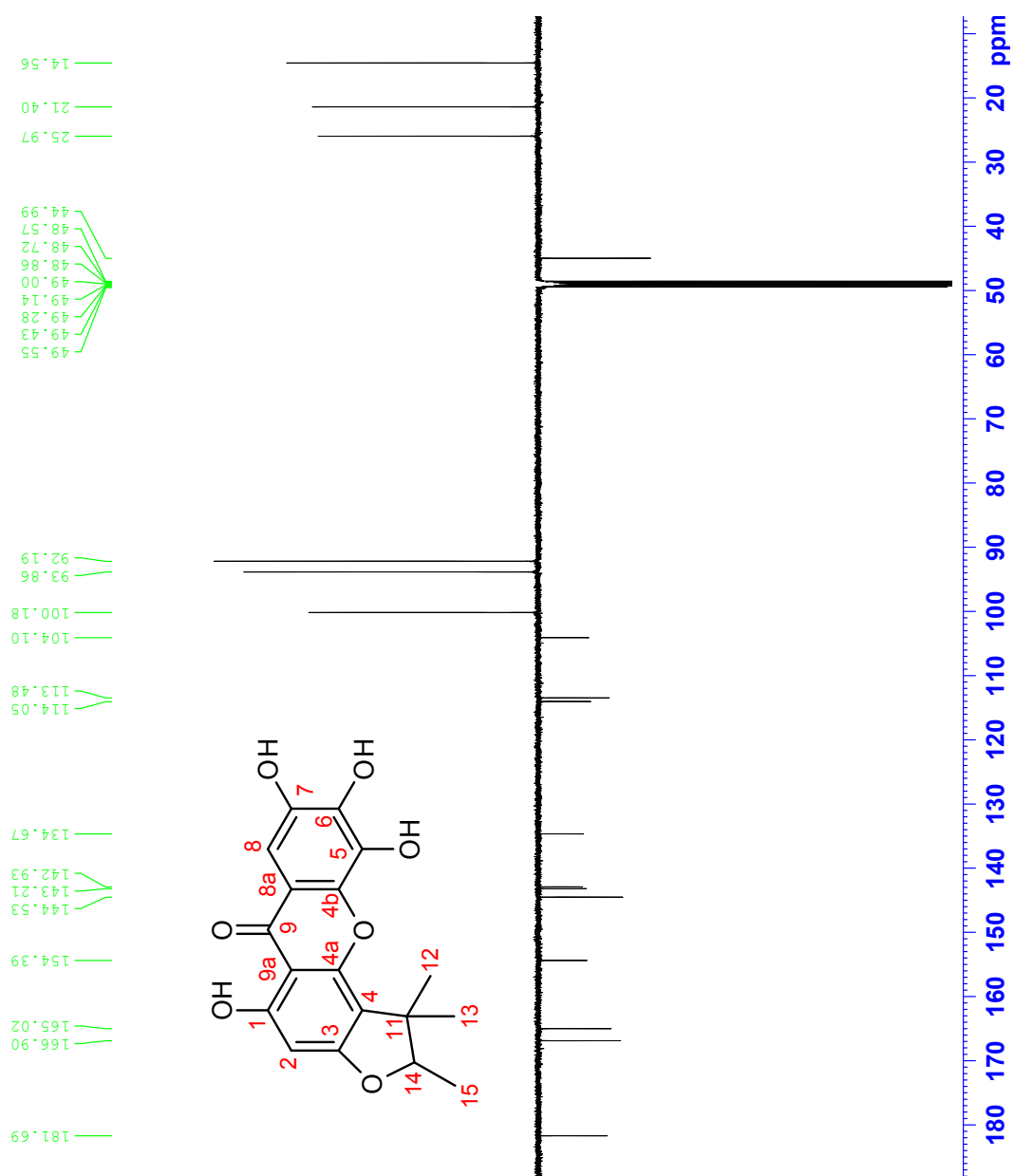


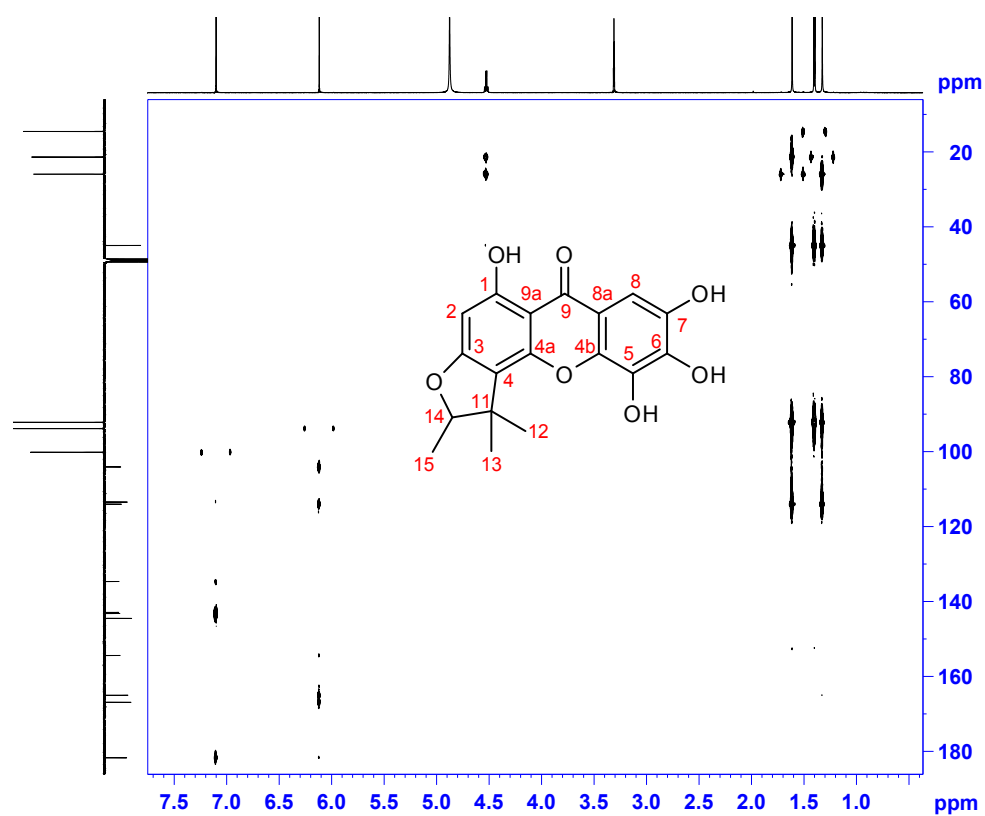
Anhang 7: TOCSY-Spektrum von Substanz O



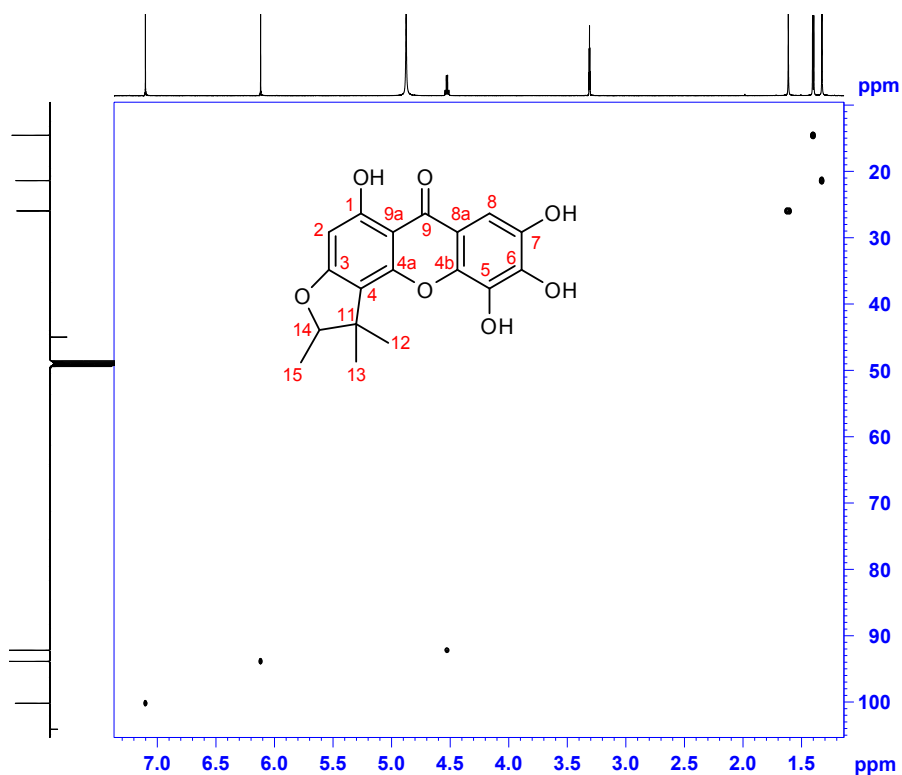
Anhang 8: MS-Spektren von Substanz O

Anhang 9: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz B

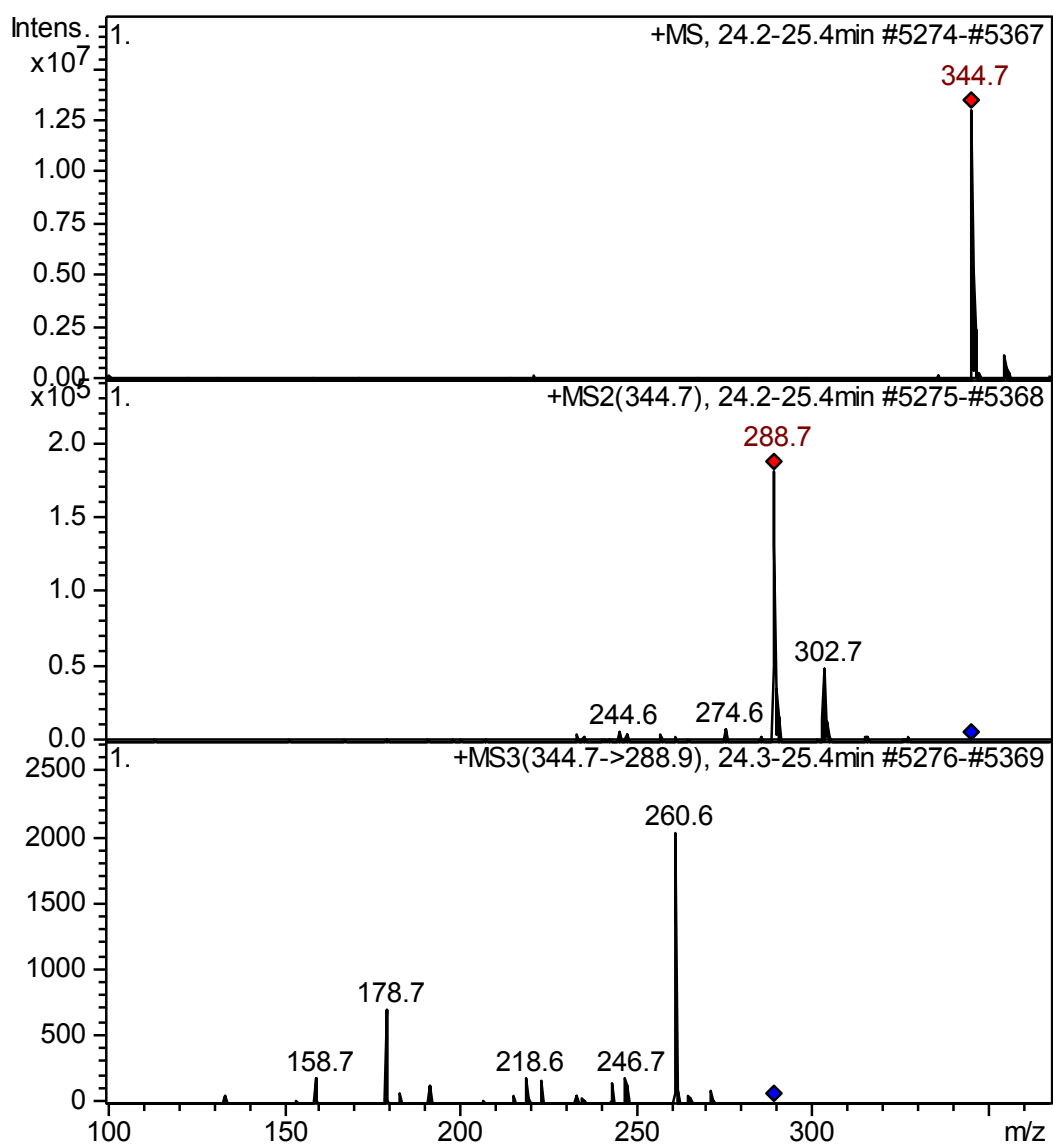
Anhang 10: ^{13}C -NMR-Spektrum von Substanz B



Anhang 11: HMBC-Spektrum von Substanz B



Anhang 12: HSQC-Spektrum von Substanz B

**Anhang 13: MS-Spektrum von Substanz B**