



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Isolierung von Inhaltsstoffen aus dem Harz von
Dorema ammoniacum D.Don“

verfasst von

Johannes Lutz

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Mein Danke 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 und unkomplizierte Betreuung während meiner gesamten Arbeitszeit.

Mein besonderer Dank gilt auch dem ganzen Department der Pharmakognosie insbesondere Dr. Hamid-Reza Adhami. Durch seinen fachlich-kompetenten Rat, seine tatkräftige Unterstützung bei meiner Arbeit und die ausführlichen Geräteunterweisungen konnte ich sehr viel lernen. Weiters möchte ich mich bei Michael Blaschke für ein stets offenes Ohr sowie bei Dr. Martin Zehl für die zahlreichen HPLC-MS Experimente bedanken.

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

MEINEN ELTERN

„SEI ES IMMER SEI ES GANZ“

Franz Grillparzer

1.EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
2.MATERIAL UND METHODEN.....	4
2.1 Material	4
2.2 Methoden.....	5
2.2.1 Solid Phase Extraction (SPE)	5
2.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC).....	6
2.2.3 Current Counter Chromatography (CCC)	7
2.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	7
2.2.5 Liquid Chromatography - Massenspektrometrie (LC-MS)	8
2.2.6 Kernspinresonanz Spektroskopie (NMR).....	9
3.ERGEBNISSE.....	10
3.1 DC-Kontrolle der Fraktionen aus Dorema ammoniacum	10
3.2 SPE 1	11
3.2.1 Überprüfung von Fraktion C8 mittels Reversed – Phase DC	11
3.2.2 Durchführung der SPE 1	12
3.2.3 Strukturaufklärung von JRL 1	13
3.3 SPE 2	16
3.3.1 Überprüfung von Fraktion M9 mittels Reversed – Phase DC.....	16
3.3.2 Durchführung der SPE 2	17
3.3.3 Strukturaufklärung von JRL 2	18
3.4 SPE 3	21
3.5 CCC 1.....	23
3.5.1 Vergleich der Fraktion Q5 mit Fraktion L7 mittels DC	23
3.5.2 Durchführung der CCC 1.....	23
3.6 SPE 4	25
3.6.1 Durchführung der SPE 4	25
3.7 Quantifizierung von JRL 1 und JRL 2 im Extrakt und in der Droge	26
3.7.1 HPLC - Methode.....	26
3.7.2 Quantifizierung von JRL 1 mittels externer Standardisierung.....	27
3.7.3 Vermessung des DCM – Extrakts.....	27
3.7.4 Berechnung der Konzentration von JRL 1 in der Droge und im Extrakt	28
3.7.5 Quantifizierung von JRL 2 mittels externer Standardisierung.....	29
3.8.2 Vermessung des DCM – Extrakts.....	29
3.8.3 Berechnung der Konzentration von JRL 2 in der Droge und im Extrakt	30

4.DISKUSSION DER ERGEBNISSE	31
5. ZUSAMMENFASSUNG	33
6. ABSTRACT	35
ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS	37
TABELLENVERZEICHNIS	38
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	39
LITERATURVERZEICHNIS	40
ANHANG	42
CURRICULUM VITAE.....	56

1. Einleitung und Problemstellung

Dorema ammoniacum (D. Don) ist ein Strauch aus der Familie der Apiaceae, dessen Verbreitungsgebiet sich in Westasien vom Iran über Afghanistan bis nach Pakistan erstreckt.



Abb. 1: *Dorema ammoniacum* (D. Don)
(<http://davesgarden.com>/Zugriff: 19.04.13)

In den erwähnten Regionen wird *Dorema ammoniacum* ethnomedizinisch, speziell in der iranischen traditionellen Medizin (ITM), zum einen als Expectorans und zur Behandlung von gastrointestinalen Störungen verwendet und zum anderen in Mischung mit anderen Harzen zur Behandlung von kognitiven Störungen.

Morbus Alzheimer umfasst ein komplexes Krankheitsbild und für die Pathophysiologie der Krankheit sind zahlreiche biochemische Signalkaskaden des menschlichen Körpers verantwortlich u.a. oxidative Prozesse, Störungen des β -amyloid-Metabolismus und Entzündungsprozesse (Welberg et al., 2011). Auch steht ein cholinerges Defizit im Gehirn in Korrelation mit dem Schweregrad von Morbus Alzheimer und dem damit verbundenen Verlust der Gedächtnisleistung (Garcia-Alloza et al., 2006).

Einleitung und Problemstellung

Ein Ansatz, dieses cholinerge Defizit zu beheben, ist der Einsatz von Acetylcholinesterasehemmern, die den Abbau von Acetylcholin blockieren und dadurch dessen Konzentration im Gehirn und die Verfügbarkeit dieses Botenstoffes an den cholinergen Synapsen erhöhen (Howes et al., 2003). Der Einsatz von Acetylcholinesterasehemmern ist dadurch eine Option zur Verlangsamung der Symptome von Alzheimer (Lane et al., 2004).

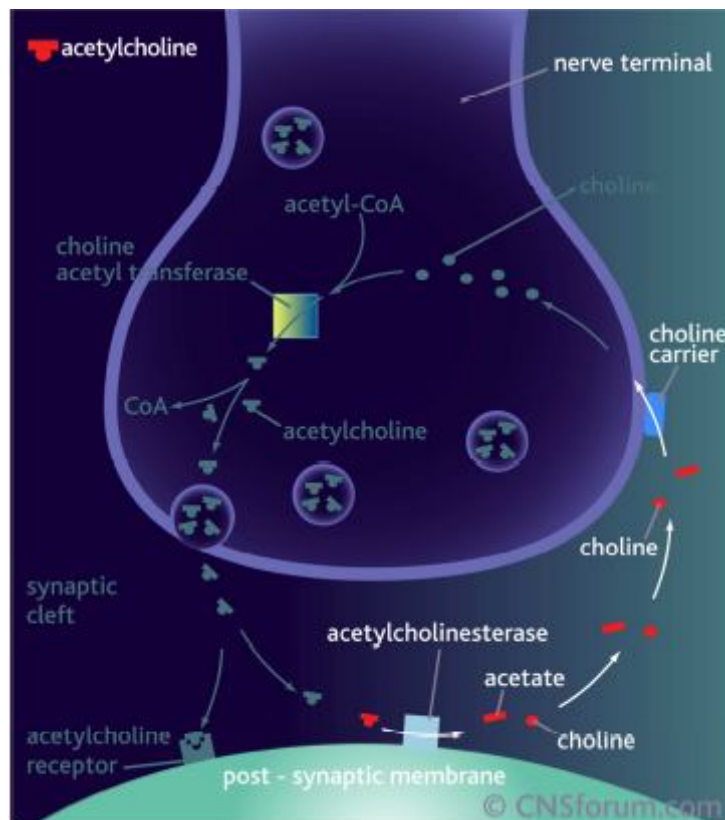


Abb. 2: Synaptische Übertragung von Acetylcholin
(www.cnsforum.com/Zugriff 19.04.13)

In einem Screening waren mittels Accelerated Solvent Extraction jeweils ein Methanol - und ein Dichlormethan - Extrakt aus 40 Pflanzen der traditionellen iranischen Medizin hergestellt und anschließend auf ihr Potential zur Acetylcholinesteraseinhibition geprüft worden (Adhami et al., 2011).

Einleitung und Problemstellung

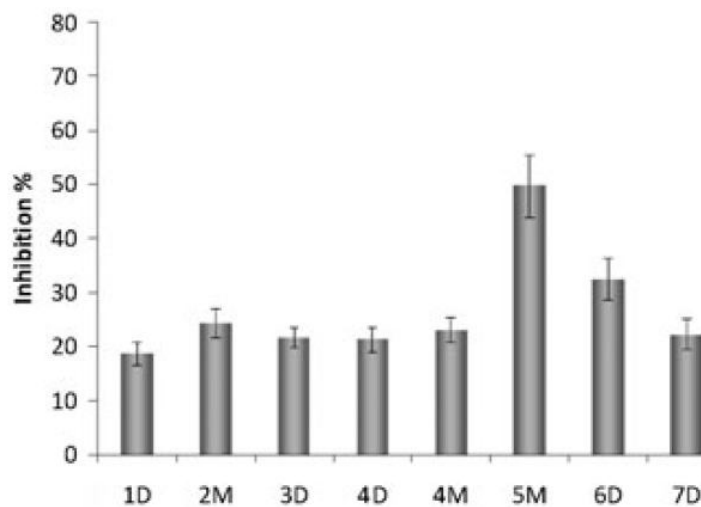


Abb. 3: Acetylcholinesteraseinhibition verschiedener DCM-Extrakte aus der ITM
6D entspricht dem DCM – Extrakt aus *Dorema ammoniacum* (Adhami et al., 2012)

In dieser vorausgegangenen Doktorarbeit (Adhami, 2012) waren die Extrakte mit der besten inhibierenden Aktivität bereits untersucht und die für die Wirkung mitverantwortlichen Komponenten charakterisiert worden.

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war die Isolierung von aktiven Reinsubstanzen aus dem DCM – Extrakt von *Dorema ammoniacum*, um sie auf ihre Acetylcholinesterase-inhibierende Aktivität zu testen und strukturell zu charakterisieren.

2.Material und Methoden

2.1 Material

Im Zuge der vorangegangenen Doktorarbeit waren zwei Dichlormethanextrakte des Harzes von *Dorema ammoniacum* hergestellt worden.



Abb. 4: Gummiharz von *Dorema ammoniacum*
(Adhami, 2012)

Diese Extrakte waren sowohl mittels Vakuumflüssigchromatographie als auch Säulenchromatographie fraktioniert und mehrere Inhaltsstoffe isoliert und charakterisiert worden.

Da es nicht möglich gewesen war, alle Fraktionen der beiden Extrakte zu untersuchen, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählte Fraktionen zur chemischen Charakterisierung bearbeitet werden.

Es standen folgende Fraktionen zur Verfügung:

Fraktion von Extrakt 1	Menge in mg
M 1	17
M 2	23
M 3	20
M 4	26
M 5	20
M 6	9
M 7	15
M 8	88
M 9	298

Tab. 1: Fraktionen aus DCM - Extrakt 1 für weitergehende Untersuchungen

Fraktionen von Extrakt 2	Menge in mg
C 1	170
C 2	278
C 3	255
C 4	263
C 5	478
C 6	188
C 7	274
C 8	94

Tab. 2: Fraktionen aus DCM - Extrakt 2 für weitergehende Untersuchungen

Material und Methoden

Alle Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie untersucht und man beschloss, mit der genaueren Charakterisierung der Fraktionen C8 und M9 fortzufahren.

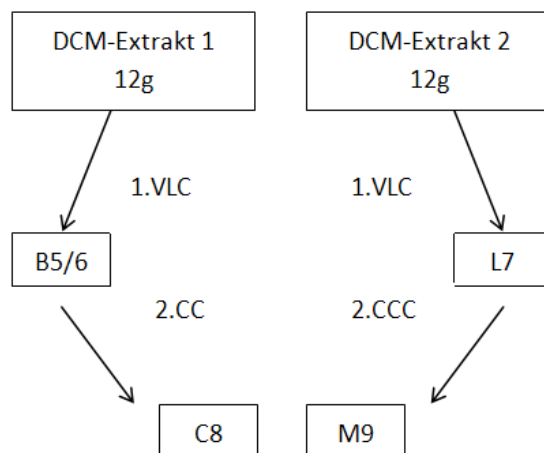


Abb. 5: Fraktionierung der Dichlormethanextrakte

2.2 Methoden

2.2.1 Solid Phase Extraction (SPE)

Die SPE wurde verwendet, um aus bereits stark angereicherten Fraktionen einzelne Inhaltsstoffe in größeren Mengen zu isolieren, um durch LC-MS und NMR deren Struktur aufzuklären.

Dafür wurden Megabond Elut C18 Kartuschen (Varian Inc, Deutschland) mit einem Fassungsvermögen von 12 ml verwendet. Als mobile Phase dienten Methanol-Wasser-Gemische unter Gradientenelution.

Vorgehensweise:

Jede Kartusche wurde dreimal mit 10 ml Wasser und anschließend dreimal mit 10 ml Methanol konditioniert. Nach anschließender Trocknung wurde die in Dichlormethan gelöste Probe auf die stationäre Phase aufgetragen. Nach ausreichender Trocknung der Festphase folgte Gradientenelution mit Methanol-Wasser-Gemischen in mehreren Schritten (siehe Tab. 3, S.6). Die Säule wurde mit jeweils 10 ml von jedem Gemisch sooft eluiert bis kein Analyt mehr im Eluat nachweisbar

Material und Methoden

war. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen eingedampft und dünn-schichtchromatographisch überprüft. Fraktionen mit übereinstimmender Zusammensetzung wurden zu Sammelfraktionen vereinigt.

MeOH [%]	Wasser [%]
40	60
50	50
60	40
70	30
75	25*
80	20
85	15*
90	10
95	5*
100	0

Tab. 3: Zusammensetzung der Elutionsmittel für die SPE

* diese Methanol-Wasser-Gemische wurden ausschließlich in SPE 3 und SPE 4 angewendet

2.2.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden verschiedene stationäre und mobile Phasen herangezogen.

Stationäre Phase	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)	
Mobile Phase	A	CH ₂ Cl ₂ /EtOAc/MeOH (100+7+3)
	B	CH ₂ Cl ₂ /EtOAc/MeOH (100+7+2)
	C	MeOH/H ₂ O (80+20)
	D	MeOH (100)
	E	CHCl ₃ /EtOAc (90+10)

Tab. 4: Mobile und stationäre Phasen der DC

Als ideale Detektionsmethode erwies sich Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens.

Anisaldehyd – Schwefelsäure – Reagens (AASS)

0,5 ml Anisaldehyd wurden mit 10 ml Eisessig vereinigt, dann 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure vorsichtig dazugegeben. Die DC-Platte wurde mit 10 ml dieses Gemisches besprüht und 5-10 min bei ca. 100 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht und UV-365 nm.

2.2.3 Current Counter Chromatography (CCC)

Gerät	DE Spectrum Centrifuge
Pumpe	ECOM Alpha 10+ isocratic pump
Kühlung	H50/H150 Smart Water Chiller
Umdrehungsgeschwindigkeit	1620 Umdrehungen/min
Modus	Normalphasenmodus
Säulenvolumen	170 ml
Fließmittelsystem (FMS)	Hexan-EtOAc-MeOH-H ₂ O (5+2+5+2)
Flussrate	1ml/min
Fraktionen	600 á 1 ml

Tab. 5: Bedingungen der CCC

2.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Mittels SPE konnten die Substanzen JRL1 und JRL 2 isoliert werden, welche mittels NMR - Spektroskopie eindeutig charakterisiert wurden und anschließend mittels HPLC im DCM-Extrakt quantifiziert wurden. Die HPLC wurde an einem LC-20AD Flüssigchromatographen mit DGU-20AS Degasser, SIL-20AC HAT Autosampler, CTO-20AC Säulenofen und CBM-20A Communication Bus Module (Shimadzu, Wien, Austria) durchgeführt. Detektiert wurden die Verbindungen mit Hilfe eines SPD-M20A Diode Array Detector (Shimadzu, Wien, Austria) bei der Wellenlänge 260 nm. Es wurden folgende HPLC-Parameter eingesetzt:

Säule	Agilent Hypersil BDS – C18 4 x 250mm,5 µm
Mobile Phase	A: 0,05% Ameisensäure B: Acetonitril
Durchflussrate	1ml/min
Temperatur	35°C
Injektionsvolumen	10µl

Tab. 6: Bedingungen der HPLC

2.2.5 Liquid Chromatography - Massenspektrometrie (LC-MS)

Die Strukturaufklärung mittels LC-MS wurde auf einem UltiMate 3000 RSLC-series system (Dionex, Germering, Germany), gekoppelt an ein HCT 3D Quadrupol Ion Trap Mass Spectrometer, kombiniert mit einer orthogonalen ESI Quelle (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland), durchgeführt. Folgende LC-Parameter wurden verwendet:

Säule	Acclaim 120 C18, 2.1 x 150mm, 3µm
Mobile Phase	A: 0,1 % Ameisensäure B: Acetonitril
Durchflussrate	0,5 ml/min
Temperatur	25°C

Tab. 7: Bedingung der LC

Das Elutionsgemisch wurde vor der ESI Ionenquelle im Verhältnis 1:8 gesplittet. Die ESI Ionenquelle war eingestellt wie folgt:

Kapillare Spannung	+/- 3,7kV
Nebulizer	26 psi (N ₂)
Gasflussrate	9 l/min (N ₂)
Temperatur	340°C

Tab. 8: Parameter der ESI

Zur automatischen Datenerfassung wurde der „data dependent acquisition modus“ (DDA) eingesetzt.

2.2.6 Kernspinresonanz Spektroskopie (NMR)

Die NMR-Messungen wurden auf einem Bruker Avance DRX 600 NMR-Spektrometer mit einem 5 mm QNP Probenkopf (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P) mit z-Gradientenspule und automatischer Tuning- und Matching-Einheit durchgeführt.

Messfrequenz:	600,13 MHz für ^1H -NMR bzw. 150,92 MHz für ^{13}C -NMR
Messtemperatur:	298 K
Lösungsmittel:	MeOH- d_4

Tab. 9: Parameter der NMR

Es wurden 1D- (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) und gradient enhanced 2D-Experimente (CO-SY, TOCSY, NOESY, HMBC, HSQC) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 DC-Kontrolle der Fraktionen aus *Dorema ammoniacum*

Die verfügbaren Fraktionen (siehe Material, S. 5) wurden mittels DC untersucht. Als stationäre Phase dienten Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten sowie die mobilen Phasen A (Abb. 6) und B (Abb. 7).

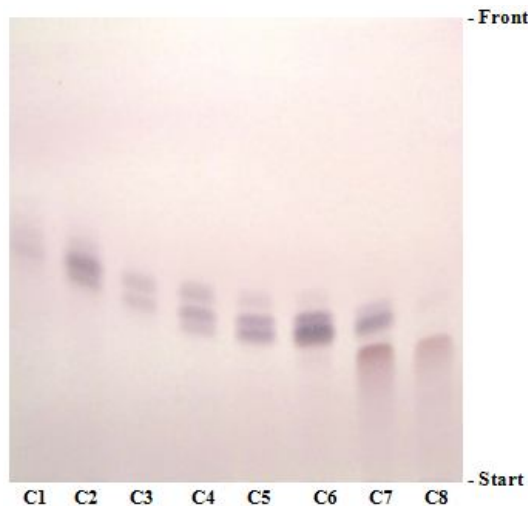


Abb. 6: DC der Fraktionen C1 - C8

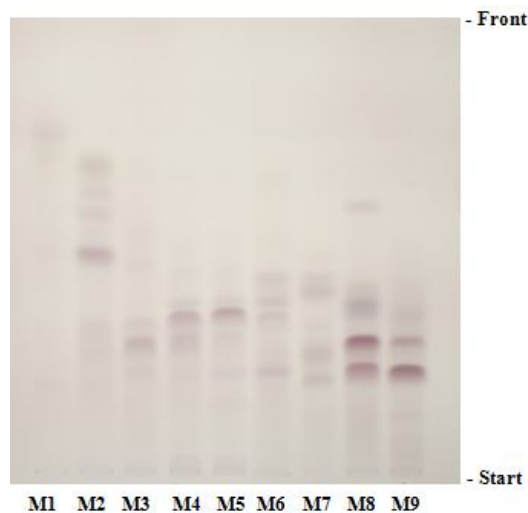


Abb. 7: DC der Fraktionen M1 - M9

Die zwei violetten Hauptkomponenten, die in den Fraktionen C4-C7 bei R_f ca. 0,29 und R_f ca. 0,33 zu sehen sind, wurden bereits in der vorangegangenen Doktorarbeit (Adhami, 2012) isoliert und chemisch charakterisiert. Neben den Fraktionen C4-C7 zeigten auch die Fraktion C8 sowie die Fraktion M9 signifikante Bioaktivität in der DC-Bioautographie auf Acetylcholinesteraseinhibition nach (Marston et al., 2002) (siehe Abb. 8). Zusätzlich enthielten die Fraktionen C8 und M9 auch wenige Nebenkomponenten und lagen in ausreichender Menge, (Fraktion C8, ca. 90 mg und Fraktion M9, ca. 300 mg), für weitere Reinigungsschritte vor.

Ergebnisse

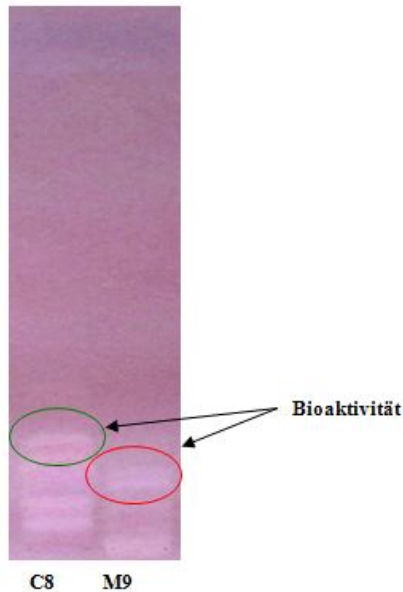


Abb. 8: DC - Bioautographie

3.2 SPE 1

3.2.1 Überprüfung von Fraktion C8 mittels Reversed – Phase DC

Aus Fraktion C 8 sollte eine mit AASS hellrosa gefärbte Hauptkomponente mit R_f ca. 0,27 (siehe Abb. 6, S.10) isoliert werden. Die Fraktion umfasste 94 mg, die mit Hilfe der SPE aufgetrennt werden sollten.

Zur besseren Charakterisierung von Fraktion C8 erfolgte eine weitere DC Kontrolle, um zu überprüfen, ob sich noch andere Substanzen in dieser Fraktion befanden. Dazu wurde die Fraktion C8 auf einer Kieselgel 60 RP-18 F₂₅₄ Fertigplatte aufgetragen und mit der mobilen Phase C entwickelt.



Abb. 9: RP - DC der Fraktion C8

Ergebnisse

Als Resultat der Trennung lag eine höher konzentrierte rotviolette Hauptkomponente mit R_f 0,51 neben mehreren unscharfen Banden ,beginnend bei R_f ca. 0,67, vor (siehe Abb. 9, S. 11).

3.2.2 Durchführung der SPE 1

Die SPE von Fraktion C8 wurde durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben. Zur Durchführung wurde eine 12 ml Kartusche benutzt, auf deren Festphase 94 mg der Fraktion C8, in ca. 300 μ l Dichlormethan gelöst, aufgetragen wurden.

Ähnliche Fraktionen wurden zu Sammelfraktionen vereinigt und anschließend wurden diese auf eine Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatte aufgetragen und in der mobilen Phase E chromatographiert.

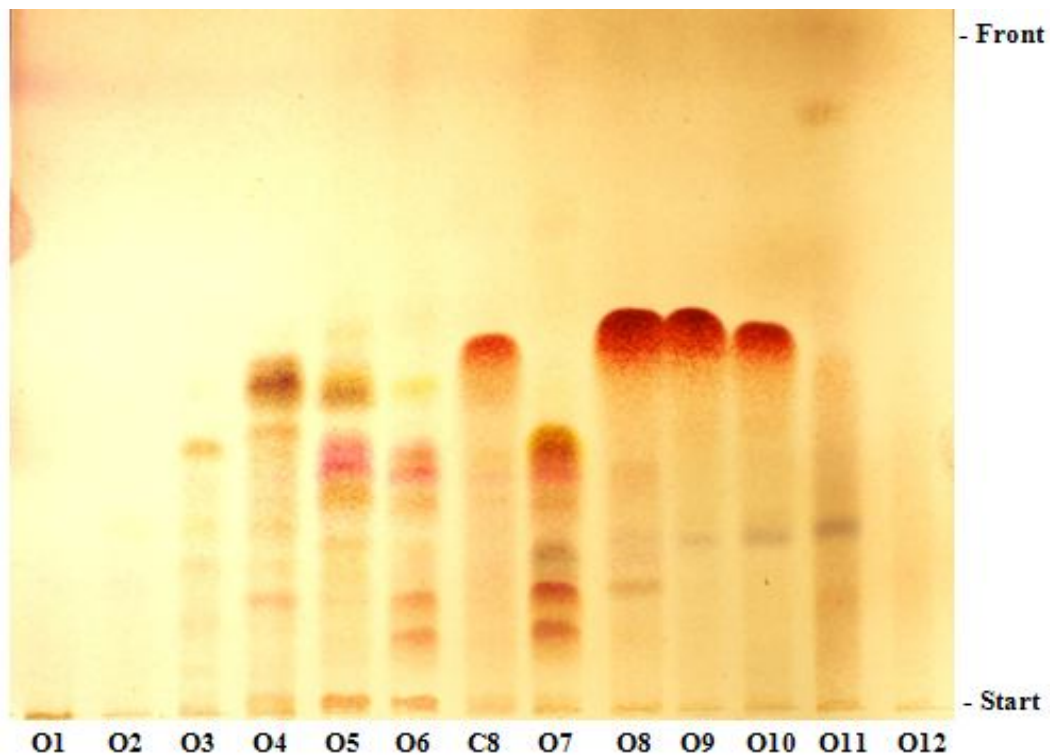


Abb. 10: DC der Sammelfraktionen von SPE 1

Ergebnisse

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Elution mit	Menge in mg
O1	1-5	40% MeOH	0,1
O2	6-10	50% MeOH	0,4
O3	11	60% MeOH	1,9
O4	12-15	60% MeOH	5,2
O5	16	70% MeOH	5,5
O6	17	70% MeOH	3,3
O7	18-20	70% MeOH	3,8
O8	21-22	80% MeOH	13,5
O9	23	80% MeOH	9,6
O10	24	80% MeOH	4,1
O11	25-32	90% MeOH	3,6
O12	33-35	100% MeOH	1,2

Tab. 10: Sammelfraktionen von SPE 1

Wie der DC-Analyse der Sammelfraktionen von SPE 1 deutlich zu entnehmen ist, enthielten die Sammelfraktionen O1 – O7 im unteren R_f-Bereich zahlreiche unterschiedlich gefärbte Substanzen, deren weitere Fraktionierung auf Grund der geringen Menge und hohen Komplexität jedoch nicht weiterverfolgt wurde. Mengenmäßig befand sich der Großteil der Fraktion C8 in den Sammelfraktionen O8 – O10. In diesen Sammelfraktionen war bei R_f 0,56 die mit AASS dunkelrote Komponente angereichert (siehe Abb. 10, S.12), die die höchste Aktivität gezeigt hatte (siehe Abb. 8, S.11). In Fraktion O8 standen 13,75 mg JRL 1 zur Strukturaufklärung zur Verfügung.

3.2.3 Strukturaufklärung von JRL 1

JRL 1 wurde mittels MS fragmentiert. Das Fragmentierungsmuster (siehe Abb.11, S.14) und das Molekulargewicht (356) der Substanz JRL 1 korrelierten mit den Daten von (4E, 8E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,9,13-trimethyltetradeca-4,8,12-trien-1-one (Kojima et al., 1998). Durch die Aufnahme von ¹H und ¹³C-NMR-, sowie HSQC-, TOCSY-, NOESY- und HMBC – Spektren konnte für JRL 1 diese Struktur bestätigt werden.

Ergebnisse

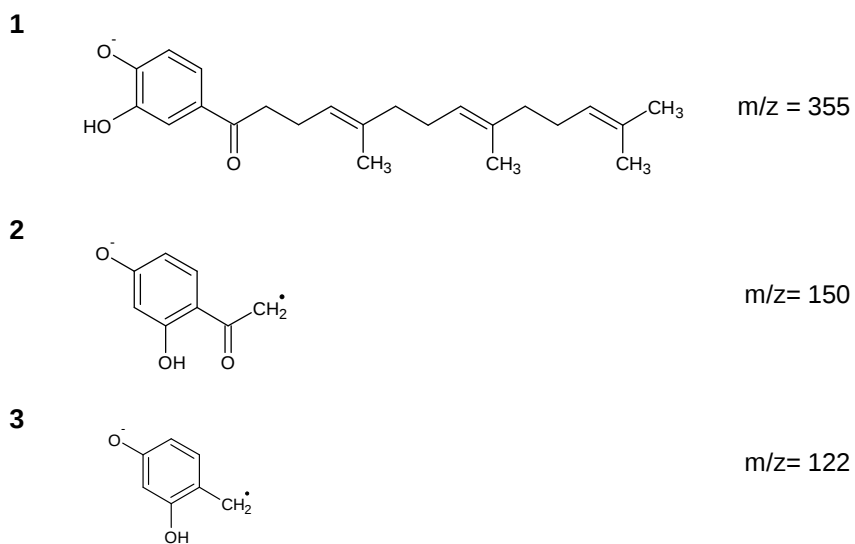
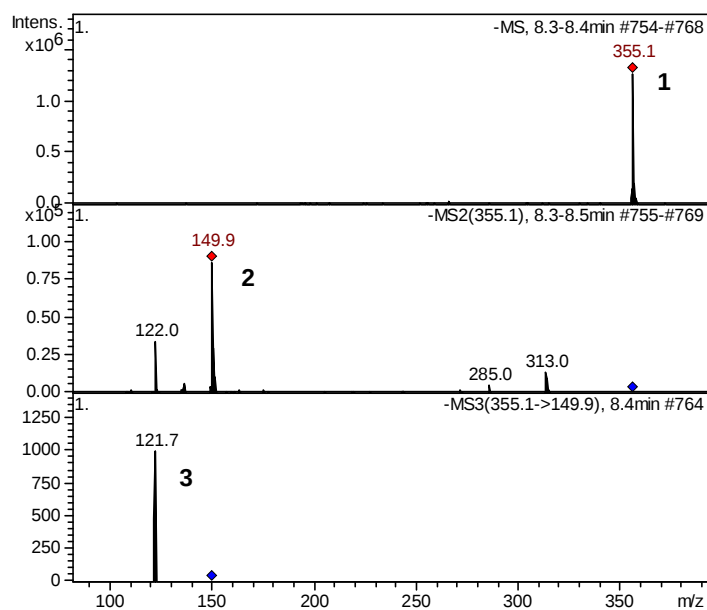
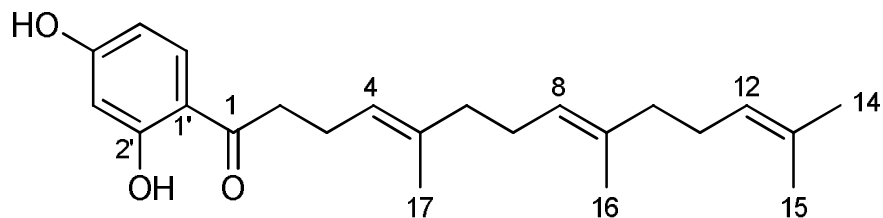


Abb. 11: ESI-MSⁿ Spektren von JRL1 und daraus resultierende Strukturen, negative ion mode, Bedingungen siehe Methodenteil

Ergebnisse

JRL 1

(9 mg, CDCl₃, 298.1 K)



Chemical Formula: C₂₃H₃₂O₃

Molecular Weight: 356,50

		¹ H (ppm)	J _{H,H} (Hz)	¹³ C (ppm)
1	C	---	---	204.67
2	CH ₂	2.924	m	38.07
3	CH	2.417	m	23.24
4	CH	5.166	t 7.2 / q 1.4 / t 1..2	122.30
5	C	---	---	136.83
6	CH ₂	1.988	m	39.63
7	CH ₂	2.058	m	26.50
8	CH	5.091	m	124.01
9	C	---	---	135.10
10	CH ₂	1.969	m	39.68
11	CH ₂	2.058	m	26.74
12	CH	5.091	m	124.35
13	C	---	---	131.30
14	CH ₃	1.677	m	25.69
15	CH ₃	1.595	m	17.68
16	CH ₃	1.589	m	16.00
17	CH ₃	1.656	m	16.04
1'	C	---	---	113.86
2'	C	---	---	165.17
	OH	12.829	breit	
3'	CH	6.375	m	103.53
4'	C	---	---	162.50
5'	CH	6.373	m	107.64
6'	CH	7.654	d 9.3	132.36

Tab. 11: ¹H und ¹³C – NMR Daten von JRL 1

Ergebnisse

3.3 SPE 2

3.3.1 Überprüfung von Fraktion M9 mittels Reversed – Phase DC

Aus Fraktion M9 (siehe Abb 7, S. 10) sollte eine mit AASS violettrot gefärbte Hauptkomponente mit R_f 0,2 isoliert werden. Die Fraktion umfasste 298 mg, die in Portionen zu jeweils 100 mg mit Hilfe von SPE 2 und SPE 3 aufgetrennt wurde.

Zur genaueren Charakterisierung wurde die Fraktion M9 auf einer Kieselgel 60 RP-18 F₂₅₄ Fertigplatte aufgetragen und in der mobilen Phase C entwickelt.



Abb. 12: RP - 18 DC von M9

Als Resultat der Trennung konnte die violettblaue Hauptkomponente mit R_f 0,25 neben zwei weiteren violetten Banden mit R_f ca. 0,1 und 0,34 sowie einer grünlichen Bande bei R_f ca. 0,52 detektiert werden.

Ergebnisse

3.3.2 Durchführung der SPE 2

Die SPE von Fraktion M9 wurde durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben. Es wurde eine 12 ml Kartusche benutzt, auf die ca. 100 mg der Fraktion M9, gelöst in ca. 300 µl Dichlormethan, aufgetragen wurden. Ähnliche Fraktionen wurden zu Sammelfraktionen vereinigt und anschließend auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte aufgetragen und in der mobilen Phase A chromatographiert.

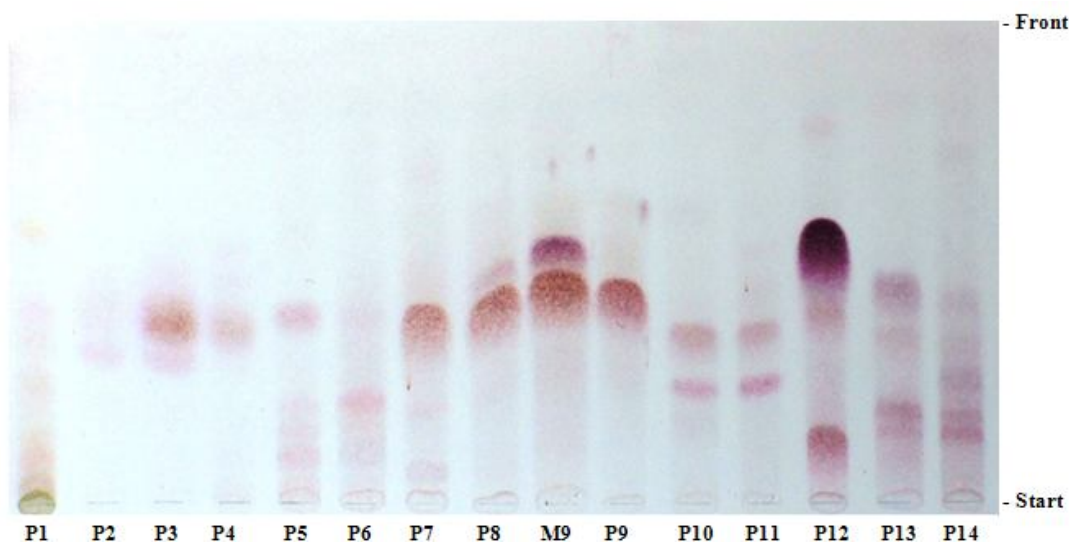


Abb. 13: DC der Sammelfraktionen von SPE 2

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Elution mit	Menge in mg
P1	1-6	40 - 50% MeOH	1,4
P2	7	50% MeOH	0,2
P3	8-9	50 - 60% MeOH	0,7
P4	10-11	50 - 60% MeOH	0,4
P5	12-15	60% MeOH	1,3
P6	16-18	70% MeOH	0,9
P7	19-20	70% MeOH	3,2
P8	21	80% MeOH	16,2
P9	22	80% MeOH	4,1
P10	23	80% MeOH	0,9
P11	24-25	80% MeOH	0,3
P12	26	90% MeOH	9,0
P13	27	90% MeOH	1,7
P14	28-35	90-100% MeOH	2,5

Tab. 12: Sammelfraktionen von SPE 2

Ergebnisse

Wie der DC-Analyse zu entnehmen ist, handelte es sich bei M9 um ein Gemisch mit 2 Hauptkomponenten. Die Sammelfraktionen P1 – P7, P10,11,13 und 14 wurden auf Grund ihrer niedrigen Mengen nicht weiter bearbeitet. Mengenmäßig wurde der Großteil der Fraktion M9 in den Sammelfraktionen P8 und P9 eluiert, wobei in Sammelfraktionen P9 die aufzuklärende Verbindung am stärksten angereichert war. Beim Vergleich von Fraktion M9 mit den Sammelfraktionen der SPE 2 war festzustellen, dass der mit AASS braunrötliche Substanzfleck bei R_f 0,45 in den Sammelfraktionen P8 und P9 aufkonzentriert werden konnte (siehe Abb. 13, S. 17). In Fraktion P12 war die zweite Hauptkomponente mit R_f ca. 0,53 angereichert, die weiter aufgereinigt werden sollte. Mittels HPLC wurde die Reinheit der angereicherten Substanz JRL 2 in Fraktion P8 überprüft. Insgesamt standen 20,3 mg Substanz JRL 2 in den Fraktionen P8 und P9 zur Strukturaufklärung zur Verfügung.

3.3.3 Strukturaufklärung von JRL 2

JRL 2 wurde mittels MS untersucht. Das Fragmentierungsmuster (siehe Abb. 14, S. 19) und das Molekulargewicht (382) der Substanz JRL 2 korrelierten mit den MS-Daten von 4',7'-dihydroxy-3-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl]-2H-chromen-2-one (Amminoresinol) (Spath et al.,1936). Nach der Aufnahme von ^1H und ^{13}C -NMR-, sowie HSQC-, TOCSY-, NOESY- und HMBC – Spektren konnte diese Struktur bestätigt werden.

Ergebnisse

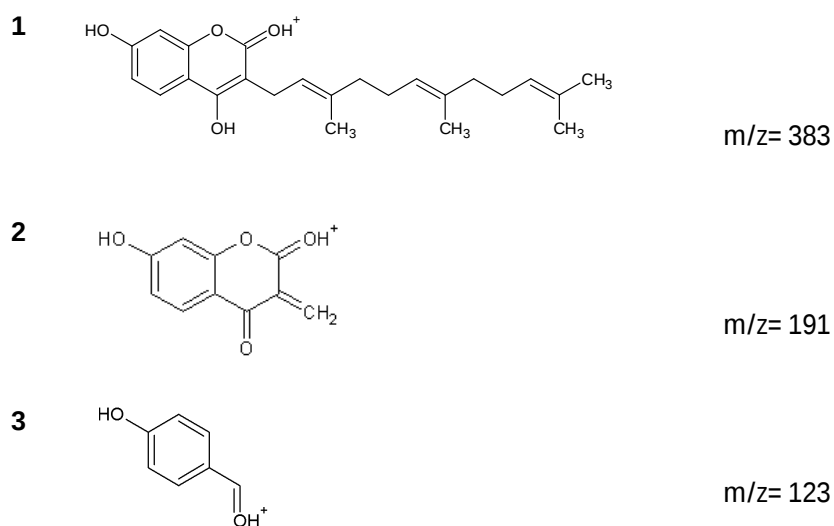
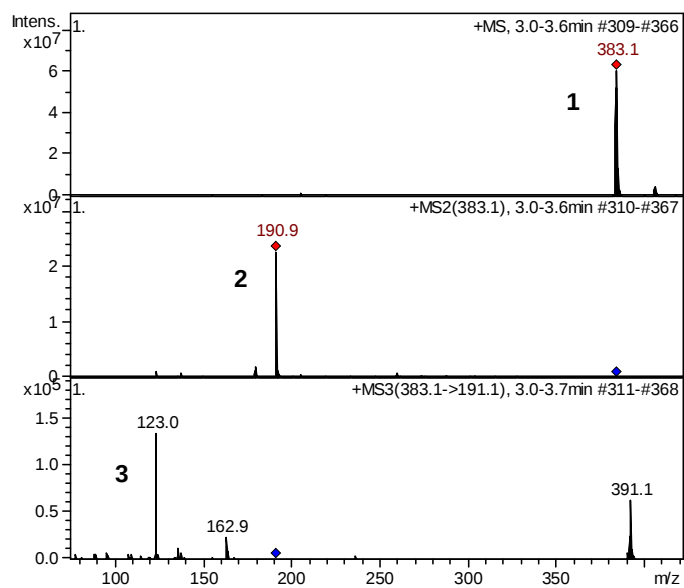
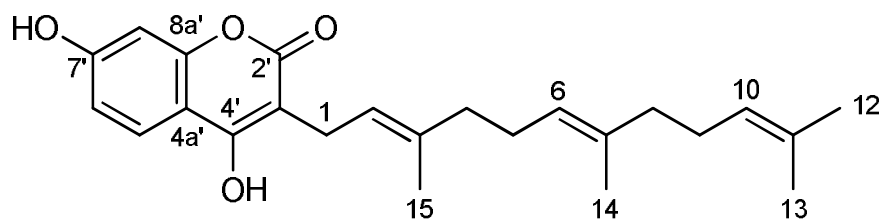


Abb. 14: ESI-MSⁿ Spektren von JRL2 und daraus resultierende Strukturen, positive ion mode, Bedingungen siehe Methodenteil

Ergebnisse

JRL 2

(4 mg, CDCl₃, 298.1 K)



Chemical Formula: C₂₄H₃₀O₄

Molecular Weight: 382,49

		¹ H (ppm)	J _{H,H} (Hz)	¹³ C (ppm)
1	CH ₂	3.406	d 7.6 / q 0.6	23.73
2	CH	5.453	t 7.6 / q 1.4	120.24
3	C	---	---	142.78
4	CH ₂	2.170	m	39.65
5	C	2.173	m	25.94
6	CH	5.078	m	122.97
7	C	---	---	136.41
8	CH ₂	2.005	m	39.65
9	CH ₂	2.065	m	26.59
10	CH	5.078	m	124.23
11	C	---	---	131.42
12	CH ₃	1.669	m	25.69
13	CH ₃	1.579	m	17.73
14	CH ₃	1.616	m	16.41
15	CH ₃	1.844	m	16.41
2'	C	---	---	164.87
3'	C	---	---	99.65
4'	C	---	---	162.42
4a'	C	---	---	108.88
5'	CH	7.633	d 8.7	124.19
6'	CH	6.822	d 8.7 / d 2.4	113.17
7'	c	---	---	160.04
8'	CH	6.969	d 2.4	102.62
8a'	C	---	---	153.94

Tab. 13: ¹H und ¹³C – NMR Daten von JRL 2

Ergebnisse

3.4 SPE 3

Ziel dieser Festphasenextraktion war es, die Ausbeute der in Fraktion P12 von SPE 2 (siehe Abb. 13, S. 17) isolierten Komponente zu erhöhen.

SPE 3 wurde durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben. Allerdings wurde der Gradient des Methanol-Wasser-Gemisches in 5 % - Schritten anstatt in 10 % - Schritten gesteigert. Zur Durchführung wurden auf eine 12 ml Kartusche weitere 100 mg der Fraktion in ca. 300 µl Dichlormethan gelöst aufgetragen.

Ähnliche Fraktionen wurden zu Sammelfraktionen vereinigt und auf eine Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte aufgetragen und in der mobilen Phase A chromatographiert.

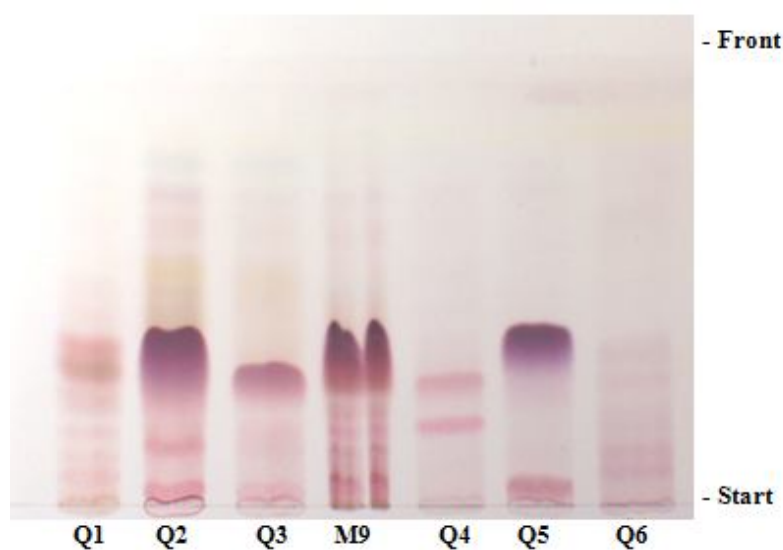


Abb. 15: DC der Sammelfraktionen von SPE 3

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Elution mit	Menge in mg
Q1	1-4	70% MeOH	11,5
Q2	5-7	70 - 75% MeOH	41,2
Q3	8	75% MeOH	3,1
Q4	9-12	75 - 80% MeOH	6,0
Q5	13-17	80 - 85% MeOH	15,2
Q6	18-30	85 - 95% MeOH	7,7

Tab. 14: Sammelfraktionen von SPE 3

Ergebnisse

Wie aus der DC-Analyse zu entnehmen ist (siehe Abb. 15, S. 21), enthielten die Sammelfractionen Q2 – Q5 den Großteil der aufgetragenen Fraktion M9. In Fraktion Q5 Substanz konnte Substanz JRL 3 angereichert werden.

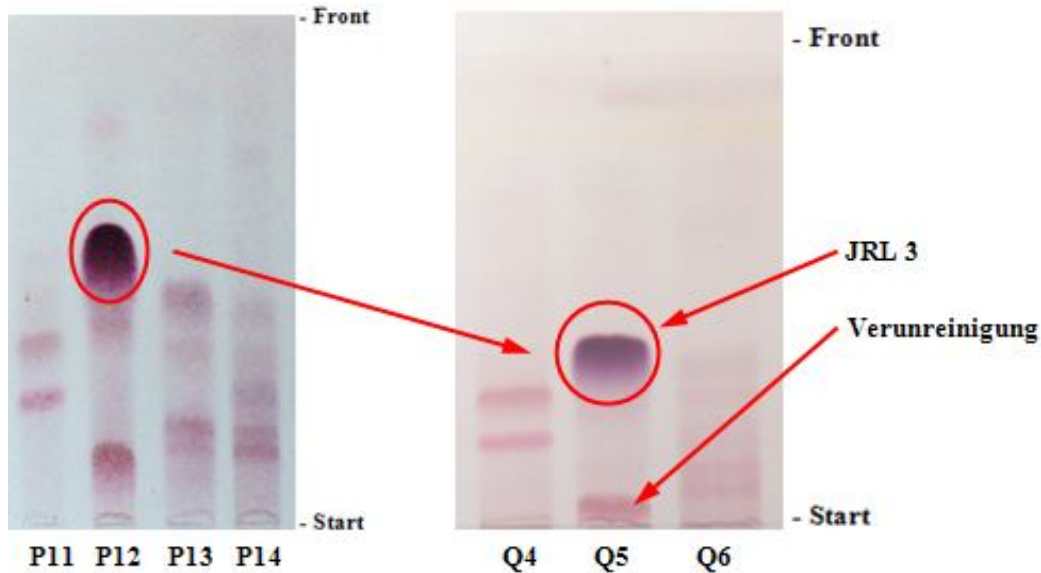


Abb. 16: DC - Vergleich von SPE 2 und SPE3

SPE 3 wurde durchgeführt, um die Ausbeute der Substanz JRL 3 aus Fraktion P12 (siehe Abb.13, S.17) zu erhöhen. Mittels HPLC wurde die Reinheit von Substanz JRL 3 festgestellt. Es standen 15,2 mg zur Strukturaufklärung zur Verfügung. Jedoch gelang es nicht, mittels SPE 3 Nebenprodukte von JRL 3 abzutrennen. Auch mit einer säulenchromatographischen Aufreinigung an einer Sephadexsäule konnte JRL 3 nicht rein dargestellt werden. Bedingt durch die geringe Ausbeute dieser Säulenchromatographie war eine weitere Fraktionierung nicht möglich. Daher sollte die Substanz aus einer Fraktion (L7), die mittels VLC aus dem DCM-Extrakt gewonnen worden war (Adhami, 2012) durch CCC rein dargestellt werden.

3.5 CCC 1

3.5.1 Vergleich der Fraktion Q5 mit Fraktion L7 mittels DC

Um JRL 3 für die Strukturaufklärung in ausreichender Menge zu isolieren, wurde die Fraktion L7 (siehe Abb. 18, unten) mit der Fraktion Q5 verglichen.

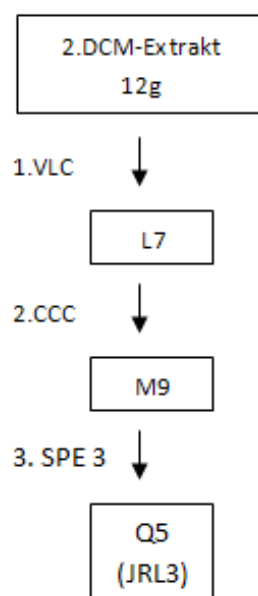


Abb. 17: Fraktionierung von DCM - Extrakt 2

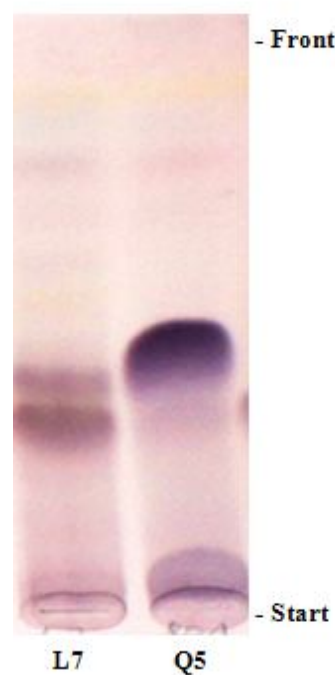


Abb. 18: DC von Fraktion L7 und Q5

In Fraktion L7 lag die violette Hauptkomponente ebenfalls vor. Die Fraktion L7 umfasste 750 mg und wurde durch CCC aufgetrennt, mit dem Ziel, zusätzlich Substanz JRL 3 zu isolieren und in weiterer Folge die Struktur aufzuklären.

3.5.2 Durchführung der CCC 1

Die CCC 1 von Fraktion L7 wurde durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben. 750 mg der Fraktion wurden im Fließmittelsystem (siehe Methodenteil, S. 5), gelöst und im Normalphasenmodus aufgetrennt.

Ergebnisse

Nach der Trennung wurden Fraktionen mit übereinstimmender Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt und mittels DC auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte in der mobilen Phase A untersucht.

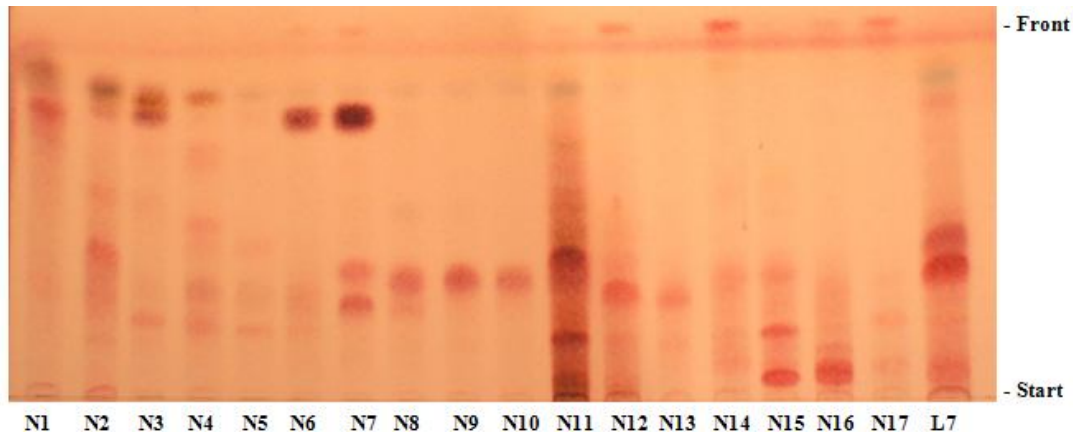


Abb. 19: DC der Sammelfraktionen von CCC 1

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Phasensystem	Menge in mg
N1	1-11	Hexan/Ethylacetat/ Wasser/Methanol (5+2+5+2)	28,1
N2	12-23		60,2
N3	24-28		37,4
N4	29-34		20,9
N5	35-37		7,4
N6	38-42		19,8
N7	43-51		44,2
N8	52-56		9,8
N9	57-59		8,9
N10	60-61		7,9
N11	62-74		183,3
N12	75-82		30,5
N13	83-100		9,5
N14	101-130		15,1
N15	140-210		33,6
N16	210-320		31,9
N17	330-390		11,4

Tab. 15: Sammelfraktionen von CCC1

Nach der CCC von L7 enthielten die Sammelfraktionen N1-N8 zahlreiche unterschiedlich gefärbte Substanzen, deren Isolierung nicht weiterverfolgt wurde. Mengemäßig befand sich der Großteil der Fraktion L7 in der Fraktion N11. In den Fraktionen N6 und N7 wurde bei R_f 0,73 ein dunkelroter Substanzfleck detektiert der mit Hilfe von SPE 4 weiter aufgereinigt wurde.

Ergebnisse

3.6 SPE 4

Aus Fraktion N6 und N7 der CCC 1 (siehe Abb.19, S. 24), sollte eine mit AASS dunkelrot gefärbte Hauptkomponente mit R_f ca. 0,73 isoliert werden. Die Fraktionen wurden zur Sammelfraktion N vereinigt, welche 64 mg umfasste und mit Hilfe von SPE 4 aufgetrennt wurde. Ziel dieser Festphasenextraktion war es, die Komponente bei ca. R_f 0,73 zu isolieren und ihre Struktur aufzuklären.

3.6.1 Durchführung der SPE 4

Die SPE der Fraktion N wurde durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben, wobei der Gradient des Methanol-Wasser-Gemisches in 5 % Schritten beginnend bei 70% MeOH, gesteigert wurde. Fraktion N (64 mg in 300 μ l Dichlormethan gelöst) wurde auf eine 12 ml Kartusche aufgetragen.

Ähnliche Fraktionen wurden zu Sammelfraktionen vereinigt und auf einer Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte aufgetragen und in der mobilen Phase A chromatographiert.

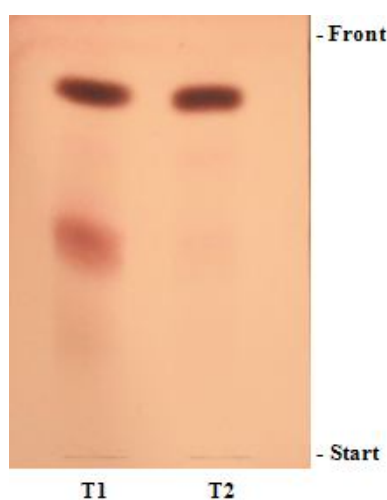


Abb. 20: DC der Sammelfraktionen von SPE 4

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Elution mit	Menge in mg
T 1	1	70% MeOH	31,5
T 2	2	70% MeOH	4,6

Tab. 16: Sammelfraktionen von SPE 4

Ergebnisse

Die Sammelfraktion T1 zeigte in der DC unterschiedlich gefärbte Substanzen mit Rf-Werten von 0,56 bzw. 0,83. In Sammelfraktion T2 war die Verbindung JRL 4 in chromatographisch einheitlicher Form angereichert worden.

Mittels LC - MS wurde die Reinheit der isolierten Substanz JRL 4 überprüft. Die Daten der Massenspektrometrie korrelierten sehr gut mit den MS-Daten der Substanz (2'S,5'R)-2'-ethenyl-5'-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-methyl-3-oxohept-5-en-2-yl]-7-methoxy-2'-methyl-4H-spiro[chromene-3,1'-cyclopentane]-2,4-dione (Doremon A) (Adhami, 2012) und JRL 4 wurde damit zweifelsfrei identifiziert.

3.7 Quantifizierung von JRL 1 und JRL 2 im Extrakt und in der Droge

3.7.1 HPLC - Methode

Für die Quantifizierung von JRL 1 und JRL 2 wurde eine HPLC - Methode entwickelt, mit deren Hilfe die Eichkurven erstellt und das DCM – Extrakt vermessen werden konnten. Bei der HPLC Trennung an einer RP-18 Phase erfolgte Gradientenelution bei 35 °C und einer Flussrate von 1ml/min. Als mobile Phase dienten Acetonitril (A) und 0,05 % wässrige Ameisensäure (B).

Minute	Acetonitril (A) %
0 - 34	0 - 50
35 - 54	51 - 75
55 - 59	76 - 90
60 - 61	90 - 50

Tab. 17: Elutionsgradient

Ergebnisse

3.7.2 Quantifizierung von JRL 1 mittels externer Standardisierung

Die Quantifizierung von JRL 1 erfolgte mittels einer erstellten Eichgerade, für die Substanz JRL 1 in 5 verschiedenen Konzentrationen (0,8; 1,7; 2,5; 3,4; 4,2 µg/ml MeOH) analysiert wurde. Es wurden jeweils 10 µl eingespritzt und 2 Parallelanalysen durchgeführt.

Die Erstellung erfolgte auf Basis der resultierenden AUC-Werte (y-Achse) und den 5 ansteigenden Konzentrationen von JRL 1 (x-Achse).

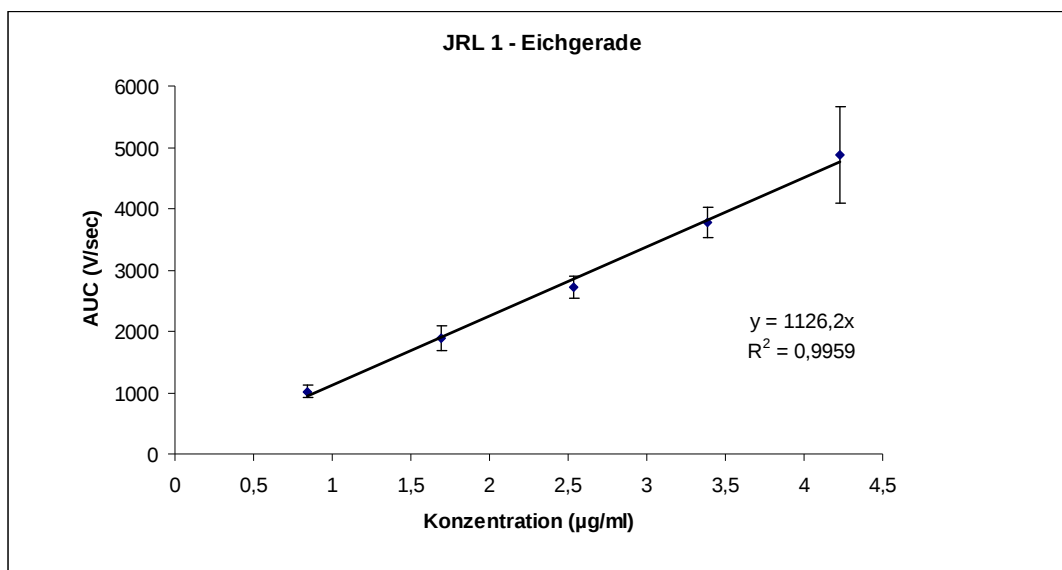


Abb. 21: Eichgerade von JRL 1

3.7.3 Vermessung des DCM – Extrakts

Die Methode wurde zur Vermessung des DCM – Extraktes verwendet. Dazu wurde eine Lösung von 4mg/ml DCM - Extrakt in MeOH hergestellt und 10 µl in die HPLC eingespritzt. Der AUC – Wert des Peaks von JRL 1 im Chromatogramm des DCM Extraktes wurde bestimmt und in die Gleichung der Eichgerade eingesetzt.

Ergebnisse

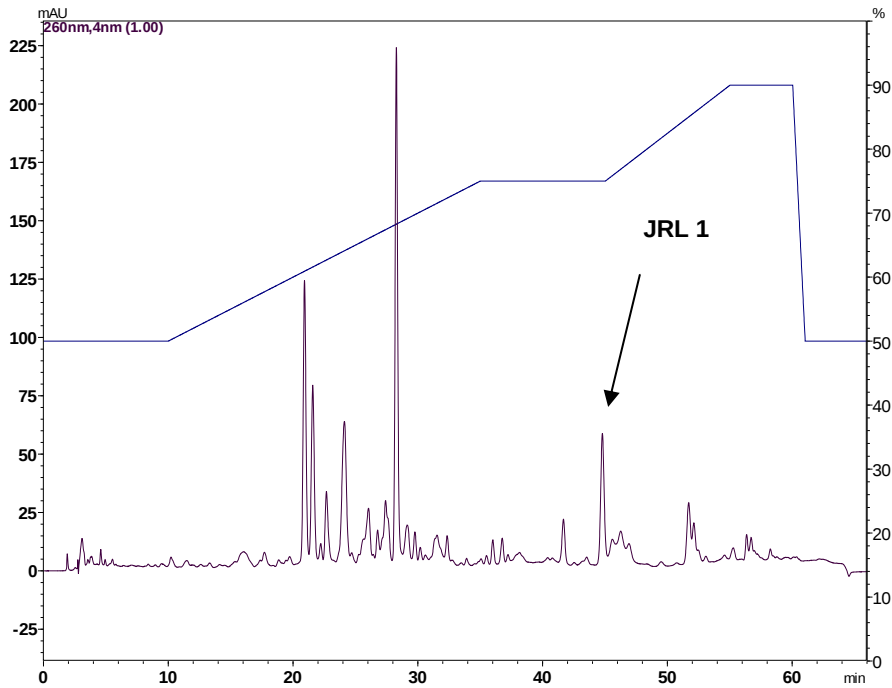


Abb. 22: Chromatogramm des DCM-Extrakts

3.7.4 Berechnung der Konzentration von JRL 1 in der Droge und im Extrakt

Aus der Konzentration der Einspritzlösung ergab sich die Menge an Extrakt im Einspritzvolumen.

Berechnung:

1) $1407,680 \text{ (AUC)} = 1126,2 \cdot x$

$x = 1,2502 \text{ } \mu\text{g JRL 1 in } 40 \text{ } \mu\text{g Extrakt}$

2) $1,2502/40 \cdot 100 = 3,1255$

Aus der Fläche des Peaks von JRL 1 ergab sich eine Konzentration von 3,13 % im DCM Extrakt.

Zur Herstellung des DCM-Extrakts waren 21g Droge eingesetzt worden. Das Gewicht des Extraktes betrug 13g. Das ergab einen Massenanteil des Extraktes an der Droge von 62 %. Somit konnte für das Harz ein Gehalt von 1,93 % JRL 1 ermittelt werden.

Ergebnisse

3.7.5 Quantifizierung von JRL 2 mittels externer Standardisierung

Die Quantifizierung von JRL 2 erfolgte mittels einer erstellten Eichgeraden und derselben HPLC-Methode wie bei JRL1 analog zur Eichgerade von JRL 1.

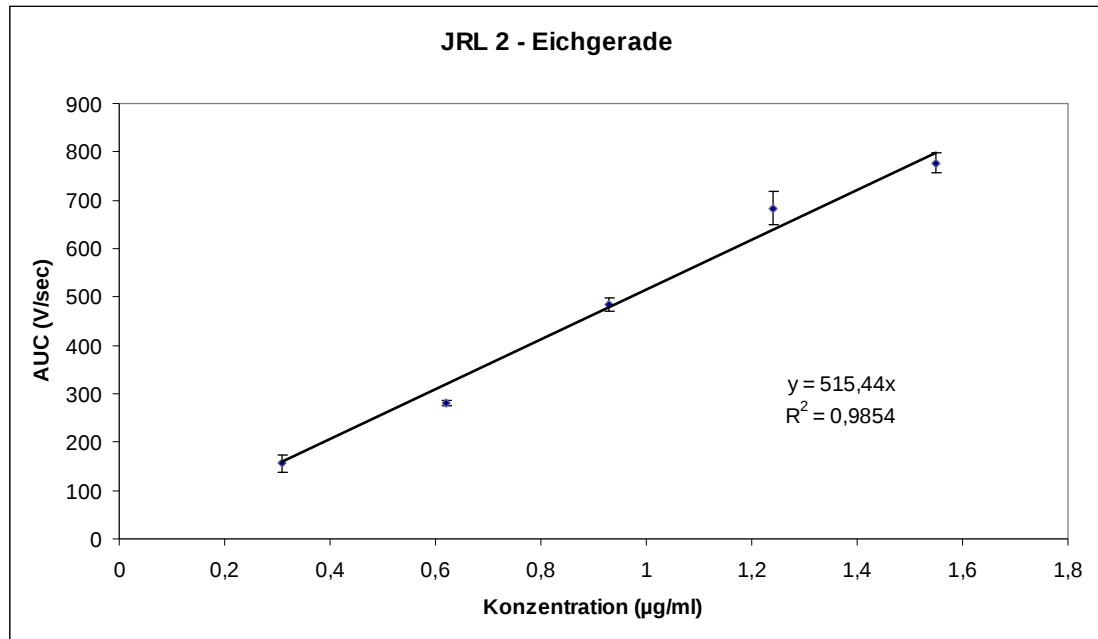


Abb. 23: Eichgerade von JRL 2

3.8.2 Vermessung des DCM – Extrakts

Die entwickelte HPLC - Methode wurde auch zur Vermessung von JRL 2 im Extrakt verwendet. Zur Quantifizierung von JRL 2 wurde der DCM Extrakt in der Konzentration 1mg/ml in einer Menge von 10 µl in die HPLC eingespritzt. Als Lösungsmittel diente ebenfalls MeOH.

Ergebnisse

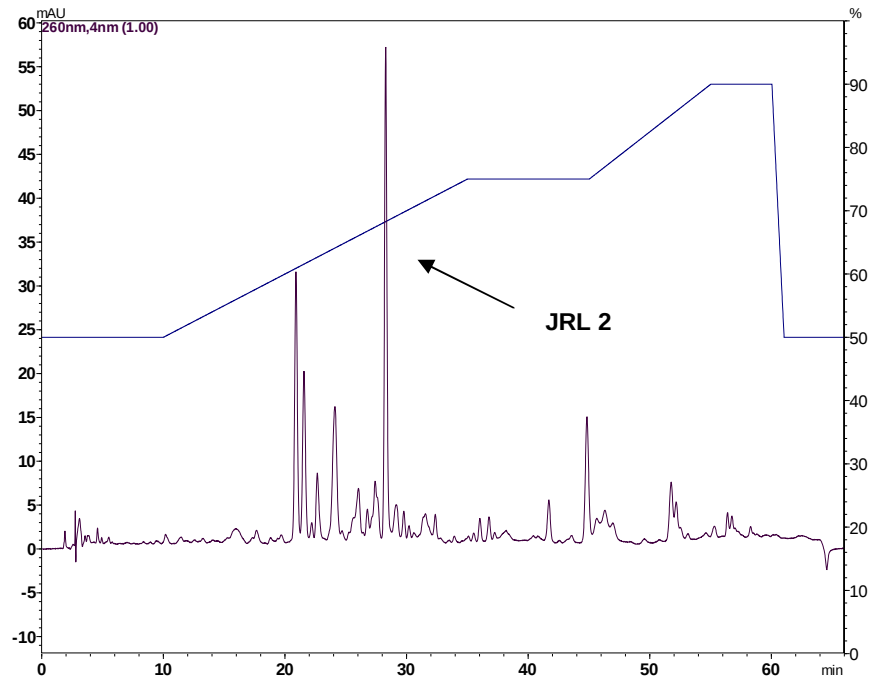


Abb. 24: Chromatogramm des DCM-Extrakts

3.8.3 Berechnung der Konzentration von JRL 2 in der Droge und im Extrakt

Aus der Konzentration der Einspritzlösung ergab sich die Menge an Extrakt im Einspritzvolumen.

Berechnung:

$$1) 821,548 \text{ (AUC)} = 515,44 \cdot x$$

$$x = 1,5939 \text{ } \mu\text{g JRL 2 in } 10 \text{ } \mu\text{g Extrakt}$$

$$2) 1,5939 / 10 \cdot 100 = 15,939$$

Aus der Fläche des Peaks von JRL 2 ergab sich eine Konzentration von 15,939 % im DCM-Extrakt. Zur Herstellung des DCM-Extrakts waren 21g Droge eingesetzt worden. Das Gewicht des Extraktes betrug 13g. Das ergab einen Massenanteil des Extraktes an der Droge von 62 %. Somit konnte für das Harz ein Gehalt von 9,85 % JRL 2 ermittelt werden.

4.Diskussion der Ergebnisse

Gegenstand dieser Diplomarbeit war die Reindarstellung von Komponenten aus Fraktionen eines Dichlormethanextraktes des Harzes von *Dorema ammoniacum*, welche in einer vorangegangenen Dissertation mittels Säulenchromatographie und Current Counter Chromatography gewonnen worden waren. Ziel war die Isolierung und Identifizierung dieser Reinsubstanzen.

Von drei Ausgangsfraktionen (C8, M9, L7) wurden zwei mittels Solid Phase Extraktion und eine mittels Current Counter Chromatography aufgetrennt. Die daraus resultierenden Sammelfractionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Die Sammelfractionen, die eine überwiegende Hauptkomponente enthielten, wurden mittels HPLC-MS untersucht und in weiterer Folge durch NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Die Fraktion C8 enthielt eine Hauptkomponente, JRL 1, die nach Detektion mit AASS eine rotviolette Färbung ergab. Nach Durchführung einer Solid Phase Extraktion konnte im anschließendem DC-Vergleich gezeigt werden, dass die Substanz chromatographisch einheitlich isoliert worden war. Durch MS und NMR konnte ein zweifach - hydroxylierter Aromat mit einem 14 C-Atome langen, mehrfach ungesättigten Alkylrest mit einer Ketofunktion in Position 1 nachgewiesen werden und JRL 1 wurde eindeutig als (4E, 8E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,9,13-trimethyltetradeca-4,8,12-trien-1-one identifiziert. Die Substanz war bereits aus *Ferula feruloides* (Kojima et al., 1998) und aus *Dorema ammoniacum* (Cardillo et al., 1968) isoliert worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es erstmalig, detaillierte ¹³C-NMR-, sowie HSQC-, TOCSY-, NOESY- und HMBC – Daten der Verbindung aus *Dorema ammoniacum* (D. Don), zusammenzustellen.

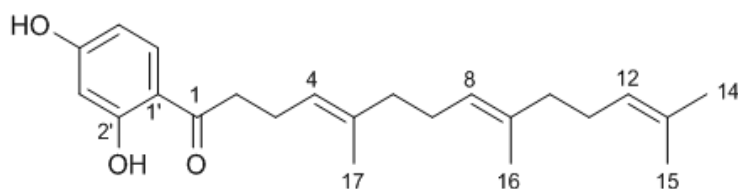


Abb. 25: Strukturformel von JRL 1

Die Fraktion M9 wurde in zwei Portionen zu je 100 mg mittels SPE aufgetrennt. Nach erstmaliger Durchführung der Solid Phase Extraktion konnte eine mit AASS

Diskussion der Ergebnisse

gelbrötlich gefärbte Hauptkomponente, JRL 2, isoliert werden und durch MS und NMR als eine cumarinähnliche Grundstruktur mit einem 12 C – Atome langen, mehrfach ungesättigten Alkylrest nachgewiesen werden. Für JRL 2 konnte die Struktur 4',7'-dihydroxy-3-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl]-2H-chromen-2'-one (Amminoresinol) ermittelt werden. Die Verbindung war bereits 1936 von Spath beschrieben worden, jedoch konnten erstmalig NMR – Daten der isolierten Verbindung generiert werden.

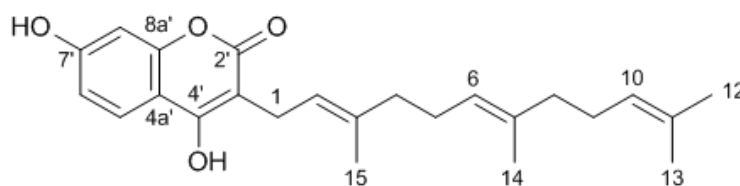


Abb. 26: Strukturformel von JRL 2

In SPE 3 von M9 konnte neben JRL 2 eine weitere Komponente in chromatographisch einheitlicher Form angereichert werden. Dies erwies sich nur als teilweise erfolgreich und nach Aufreinigung der vereinigten Sammelfractionen aus den zwei Festphasenextraktionen von M9 stellte sich JRL 3 immer noch als komplexes Vielkomponentengemisch dar. Es war nicht möglich, einzelne Substanzen zu isolieren und die Menge der Fraktion war zu gering, um durch weitere Aufreinigungsschritte die Reindarstellung zu erreichen.

Die Fraktion L7 war ein komplexes Substanzgemisch, das durch CCC aufgetrennt wurde. Ziel war es, JRL 3, in größerer Menge zu isolieren. Wie aus dem DC-Chromatogramm der Sammelfractionen der CCC hervorgeht (Abb. 19, S. 24), konnte JRL 3 mittels CCC1 nicht in chromatographisch einheitlicher Form gewonnen werden. Dennoch gelang es, mit der Sammelfraktion N eine fast reine Verbindung zu isolieren. Durch SPE 4 wurde Substanz JRL4 weiter aufgereinigt und mittels HPLC-MS charakterisiert. Nach Abgleich mit den MS-Daten der vorangegangenen Doktorarbeit (Adhami, 2012) handelt es sich bei JRL 4 um (2'S,5'R)-2'-ethenyl-5'-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-methyl-3-oxohept-5-en-2-yl]-7-methoxy-2'-methyl-4H-spiro[chromene-3,1'-cyclopentane]-2,4-dione (Doremon A).

5. Zusammenfassung

Dorema ammoniacum, eine Pflanze aus der iranischen traditionellen Medizin, weist ein breites Anwendungsspektrum auf und wird ethnomedizinisch auch zur Behandlung von kognitiven Störungen eingesetzt.

Kognitive Störungen stehen meistens in Zusammenhang mit einem cholinergen Defizit im Gehirn. Eine Therapiemöglichkeit stellt die Behebung dieses Defizits mit Acetylcholinesterasehemmern dar, die den Abbau des Botenstoffes verhindern und dessen Bereitstellung an den Synapsen verbessern.

Im Rahmen eines Screenings (Adhami, 2012) zeigte das DCM-Extrakt von *Dorema ammoniacum* Komponenten mit Acetylcholinesterase - hemmender Aktivität. Ziel dieser Diplomarbeit war die Isolierung und chemische Charakterisierung von aktiven Reinsubstanzen und die anschließende Quantifizierung dieser im DCM-Extrakt und der Droge.

Zur Verfügung standen 2 Dichlormethanextrakte, die mittels Säulenchromatographie und Current Counter Chromatography gewonnen worden waren. Aufgrund des Vorliegens einer überwiegenden Hauptkomponente und erhöhter Aktivität im Bioautographieexperiment wurden 3 Fraktionen (C8, M9, L7) ausgewählt, die weiter aufgetrennt wurden.

Fraktion C8 enthielt eine Hauptkomponente, die durch SPE 1 fast rein isoliert werden konnte. Durch eine anschließende MS und NMR konnte JRL 1 eindeutig strukturell als (4E, 8E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,9,13-trimethyltetradeca-4,8,12-trien-1-one charakterisiert werden. Es gelang erstmalig, detaillierte NMR-Daten der Verbindung JRL 1 zu erheben.

Die Fraktion M9 wurde in SPE 2 und SPE 3 aufgetrennt. Mittels SPE 2 konnte die Hauptkomponente JRL 2 in chromatographisch einheitlicher Form angereichert werden. Durch NMR und MS konnte für JRL 2 eine cumarinähnliche Grundstruktur mit mehrfach ungesättigtem Alkylrest nachgewiesen und die Substanz als Aminoresinol identifiziert werden. SPE 3 vermochte nicht, eine zweite Hauptkomponente aus M9, JRL 3, rein darzustellen. Auch eine anschließende Aufreinigung an einer Sephadexsäule führte nicht zu chromatographisch einheitlicher Form.

Zusammenfassung

Fraktion L7 war ein komplexes Substanzgemisch, das durch CCC1 aufgetrennt wurde. Wie aus der DC der Sammelfractionen hervorging, wurde eine Hauptkomponente in Sammelfraction N angereichert. Diese wurde SPE 4 unterworfen und die isolierte Hauptkomponente JRL 4 mittels MS als Doremon A, identifiziert.

Abschließend wurde, die Konzentration der Reinsubstanzen JRL 1 und JRL 2 im Extrakt mittels HPLC quantifiziert und in der Droge bestimmt.

6. Abstract

Dorema ammoniacum, a plant from Iranian traditional medicine, has a wide range of applications and is also used ethno medically to treat cognitive disorders.

Cognitive disorders are usually associated with a cholinergic deficit in the brain. One treatment option is the reduction of this deficit by acetylcholinesterase inhibitors, which prevent the degradation of the neurotransmitter and improve its provision at the synapses

During a screening of natural compounds (Adhami, 2012) the DCM extract of *Dorema ammoniacum* showed acetylcholinesterase inhibiting activity. The intention of this thesis was the isolation and chemical characterization of pure active substances and the subsequent quantification of these in the DCM extract and the drug.

Two dichloromethane extracts had been obtained by column chromatography and counter current chromatography. Due to the occurrence of one predominant compound and an increased activity in the bioautographic experiment, three fractions were selected for further investigation (C8, M9, and L7).

Fraction C8 contained a major component, which was isolated in almost pure form by SPE 1. MS- and NMR-experiments clearly characterized JRL 1 as (4E, 8E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,9,13-trimethyltetradeca-4,8,12-trien-1-one. For the first time detailed NMR data of this compound have been collected.

Fraction M9 was separated by SPE 2 and SPE 3. By SPE 2 the major component JRL 2 was enriched. By NMR and MS studies JRL 2 was a coumarin with a polyunsaturated alkyl rest and identified as Amminoresinol. SPE 3 did not result in the isolation of the second major component of M9, JRL 3, in a chromatographically uniform state. Subsequent purification on a Sephadex column chromatography did not result in a pure compound either.

L7 fraction was a complex mixture of substances and was submitted to separation by CCC1. In fraction N a main component was enriched. By SPE 4 it was isolated and by MS characterized and identified as Doremon A.

Abstract

Finally, the substances JRL 1 and JRL 2 were quantified by HPLC and their concentrations in the DCM extract and the drug determined.

Abbkürzungsverzeichnis

AASS	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
Abb.	Abbildung
CC	Column Chromatography
CCC	Current Counter Chromatography
COSY	Correlation Spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DAD	Diode Array Detector
DDA	Data dependent acquisition
ELSD	Evaporative light scattering detector
ESI	Electrospray Ionisation
EtAc	Ethylacetat
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
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
RP	Reversed Phase
SC	Säulenchromatographie
SF	Sammelfraktion
SPE	Solid Phase Extraction
Tab.	Tabelle
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
VLC	Vacuum Liquid Chromatography

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Fraktionen aus DCM–Extrakt 1 für weitergehende Untersuchungen.....	4
Tab. 2: Fraktionen aus DCM - Extrakt 2 für weitergehende Untersuchungen.....	4
Tab. 3: Zusammensetzung der Elutionsmittel.....	6
Tab. 4: Mobile und stationäre Phasen der DC	6
Tab. 5: Bedingungen der CCC	7
Tab. 6: Bedingungen der HPLC.....	7
Tab. 7: Bedingungen der LC.....	8
Tab. 8: Parameter der ESI.....	8
Tab. 9: Parameter der NMR	9
Tab. 10: Sammelfraktionen von SPE 1.....	13
Tab. 11: ^1H und ^{13}C – NMR Daten von JRL 1	15
Tab. 12: Sammelfraktionen von SPE 2.....	17
Tab. 13: ^1H und ^{13}C – NMR Daten von JRL 2	20
Tab. 14: Sammelfraktionen von SPE 3.....	21
Tab. 15: Sammelfraktionen von CCC1	24
Tab. 16: Sammelfraktionen von SPE 4.....	25
Tab. 17: Elutionsgradient.....	26

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Dorema ammoniacum</i> (D. Don)	1
Abb. 2: Synaptische Übertragung von Acetylcholin.....	2
Abb. 3: Acetylcholinesteraseinhibition verschiedener DCM - Extrakte aus der ITM. .	3
Abb. 4: Gummiharz von <i>Dorema ammoniacum</i>	4
Abb. 5: Fraktionierung der Dichlormethanextrakte	5
Abb. 6: DC der Fraktionen C1 - C8	10
Abb. 7: DC der Fraktionen M1 - M9	10
Abb. 8: DC - Bioautographie	11
Abb. 9: RP - DC der Fraktion C8.....	11
Abb. 10: DC der Sammelfractionen von SPE 1	12
Abb. 11: ESI-MS ⁿ Spektren von JRL 1 und daraus resultierende Strukturen.....	14
Abb. 12 RP - 18 DC von M9.....	16
Abb. 13: DC der Sammelfractionen von SPE 2	17
Abb. 14: ESI - MS ⁿ Spektren von JRL 2 und daraus resultierende Strukturen.....	19
Abb. 15: DC der Sammelfractionen von SPE 3.....	21
Abb. 16: DC - Vergleich von SPE 2 und SPE 3.....	22
Abb. 17: Fraktionierung von DCM-Extrakt 2.....	23
Abb. 18: DC von Fraktion L7 und Q5	23
Abb. 19: DC der Sammelfractionen von CCC 1	24
Abb. 20: DC der Sammelfractionen von SPE 4.....	25
Abb. 21: Eichgerade von JRL 1	27
Abb. 22: Chromatogramm des DCM-Extrakts	28
Abb. 23: Eichgerade von JRL 2	29
Abb. 24: Chromatogramm des DCM-Extrakts	30
Abb. 25: Strukturformel von JRL 1	31
Abb. 26: Strukturformel von JRL 2	32

Literaturverzeichnis

- [1] Howes MJ, Houghton PJ. 2003. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 75: 513 - 527

- [2] Garcia-Alloza M, Zaldúa N, Díez Ariza M. 2006. Effect of selective cholinergic denervation on the serotonergic system: Implications for learning and memory. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 65: 1074 - 1081

- [3] Marston A, Kissling J, Hostettman K. 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*. 13: 51 - 54.

- [4] Wellberg L. 2011. Neurodegenerative disease: meet the mediator, but not as you know. *Nature Reviews Neuroscience*. 12: 66 - 67

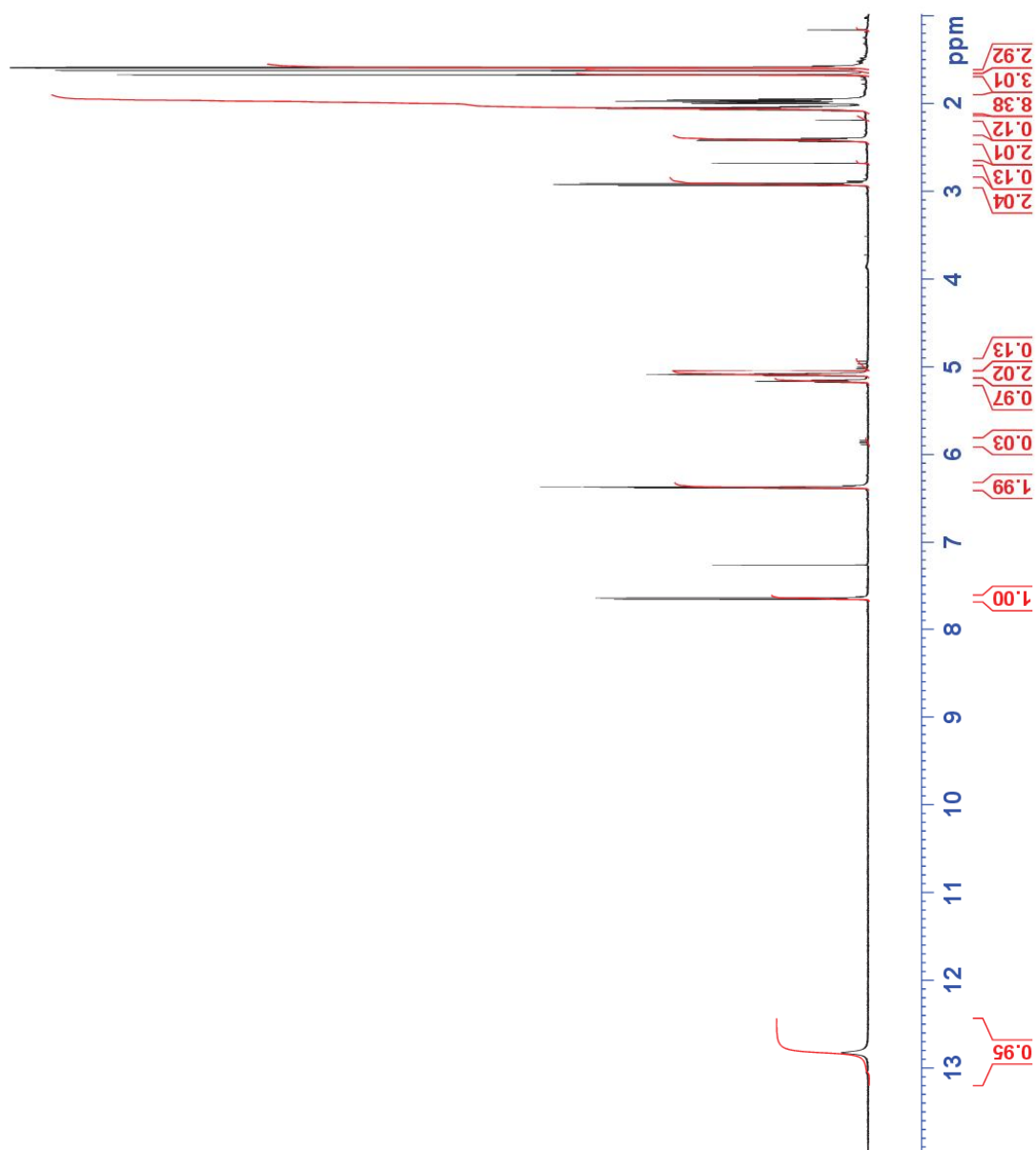
- [5] Lane RM, Kivipelto M, Greig N. 2004. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer's disease. *Clinical Neuropharmacology*. 27: 141 - 149

- [6] Cardillo G, Cricchio R, Merlini L. 1968. Un nuovo costituente fenolico della gomma ammoniaco. *Ricerca Scientifica*. 38: 804 - 805

- [7] Adhami H, Farsan H, Krenn L. 2011. Screening of Medicinal Plants from Iranian Traditional Medicine for Acetylcholinesterase Inhibition. *Phytotherapy Research*. 25: 1148 - 1152

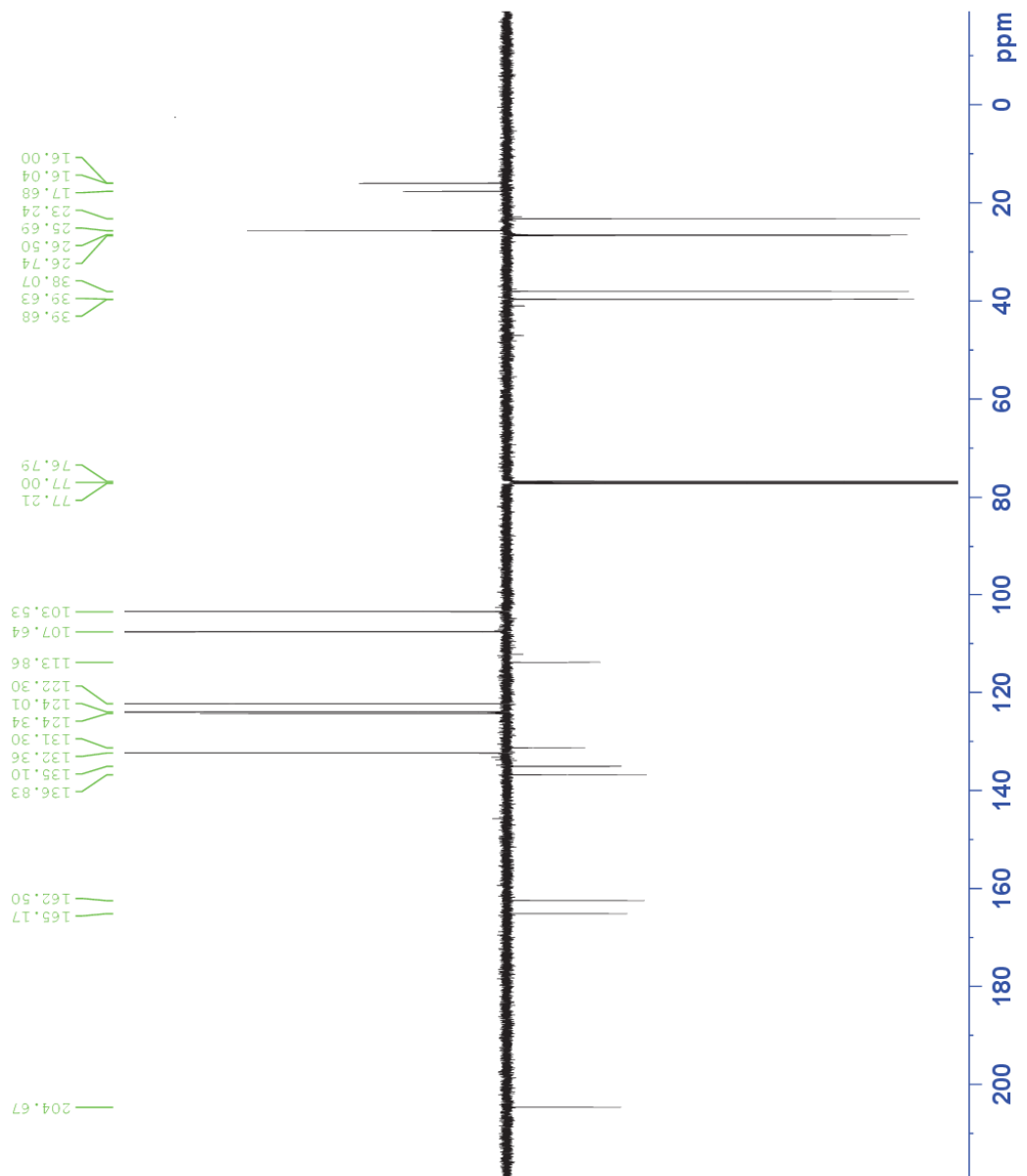
- [8] Adhami H. 2012. Bioassay guided isolation of compounds with acetylcholinesterase inhibitory activity from selected medicinal plants used in Iranian Medicine. PhD Thesis, Universität Wien
- [9] Spath E. 1936. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft [Abteilung] B; Abhandlungen, V69B, P1656 - 64 CAPLUS
- [10] Kojima K, Isaka K, Purev O, Jargalsaikhan G, Suran D, Mizukami H, Ogihara Y. 1998. Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 46: 1781 - 1784

Anhang

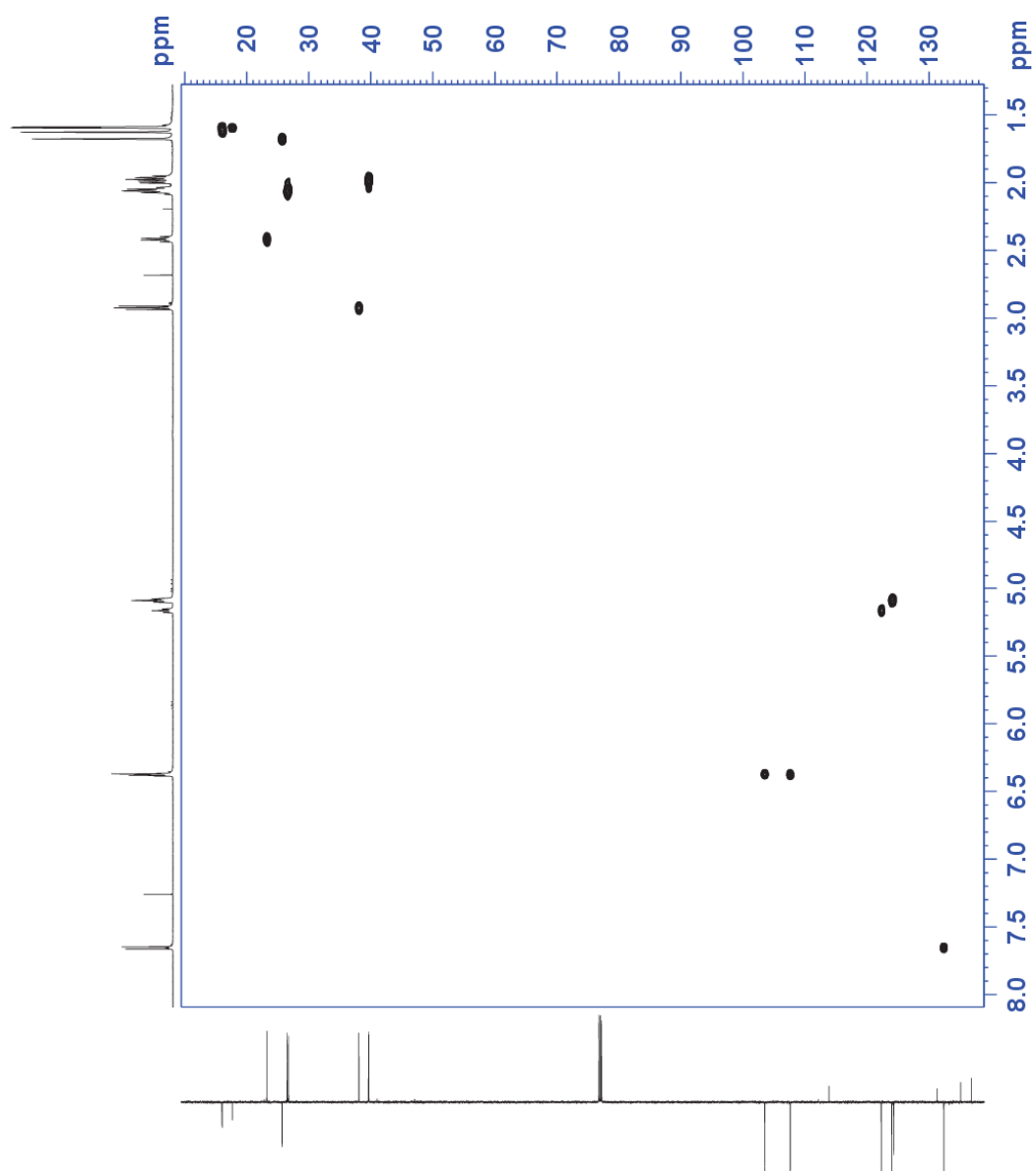


Anhang 1: ^1H -NMR-Spektrum von JRL 1

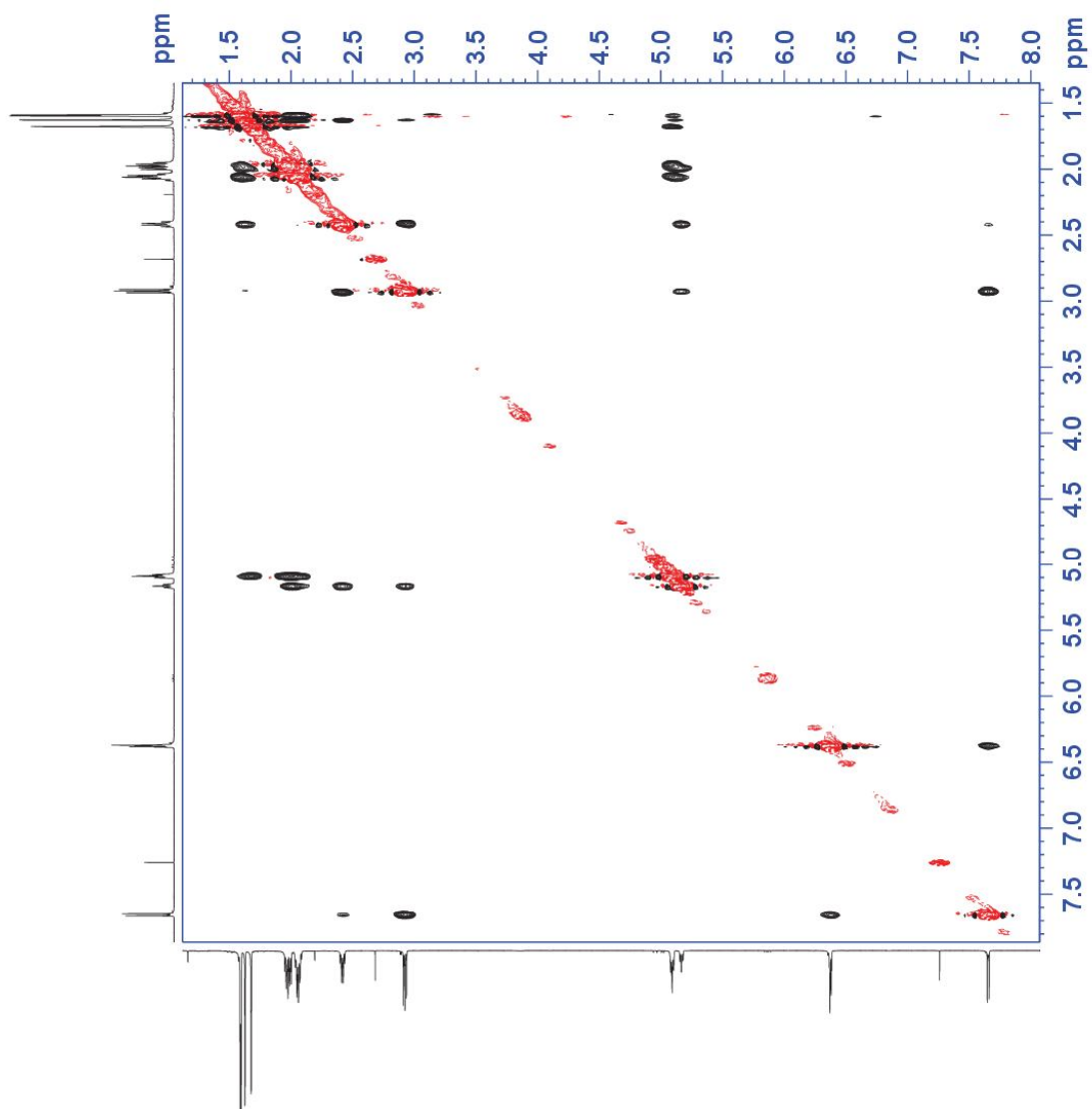
Anhang



Anhang 2: ^{13}C -NMR-Spektrum von JRL 1

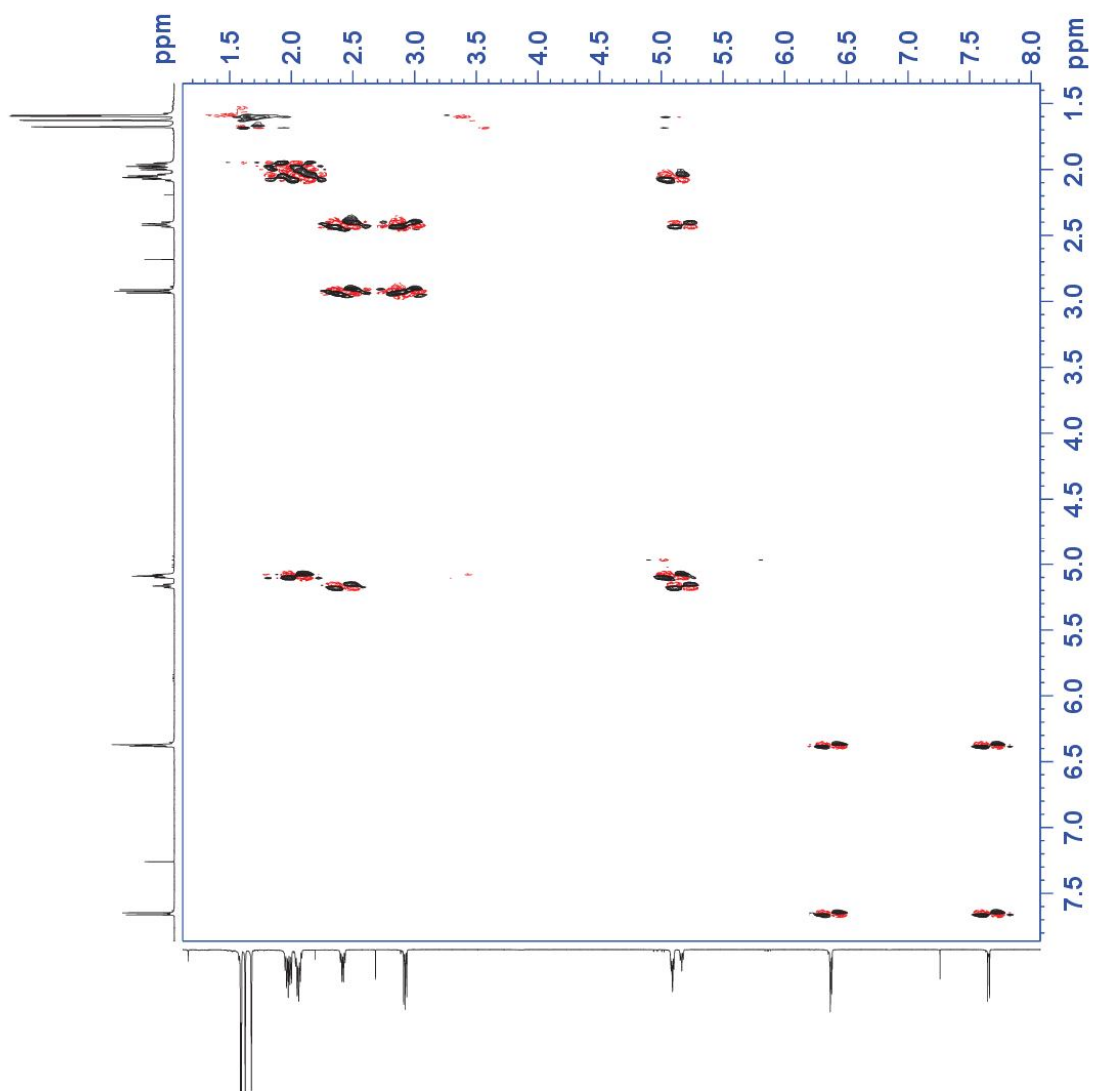


Anhang 3: HSQC-NMR-Spektrum von JRL 1

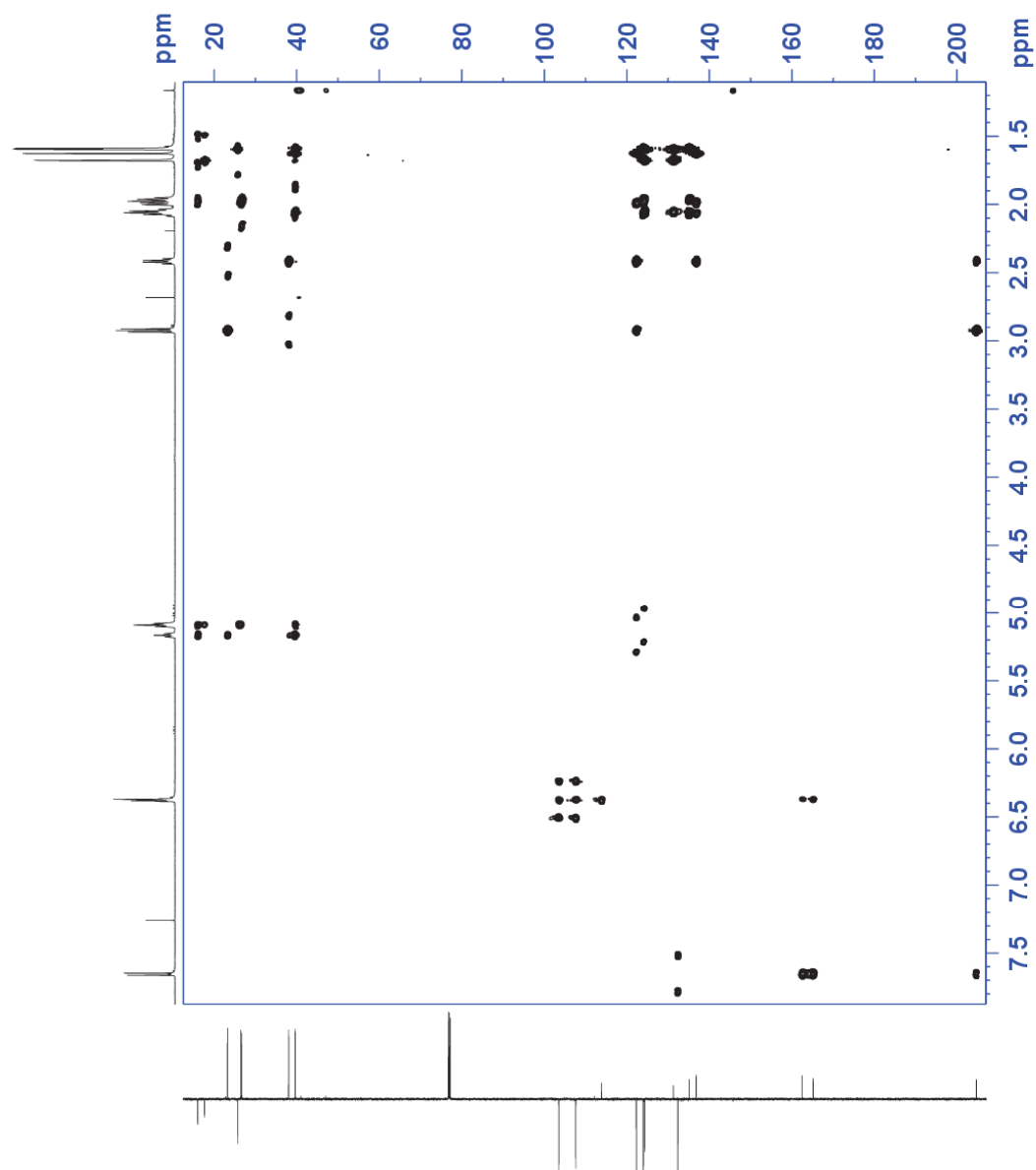


Anhang 4: NOESY-NMR-Spektrum von JRL 1

Anhang

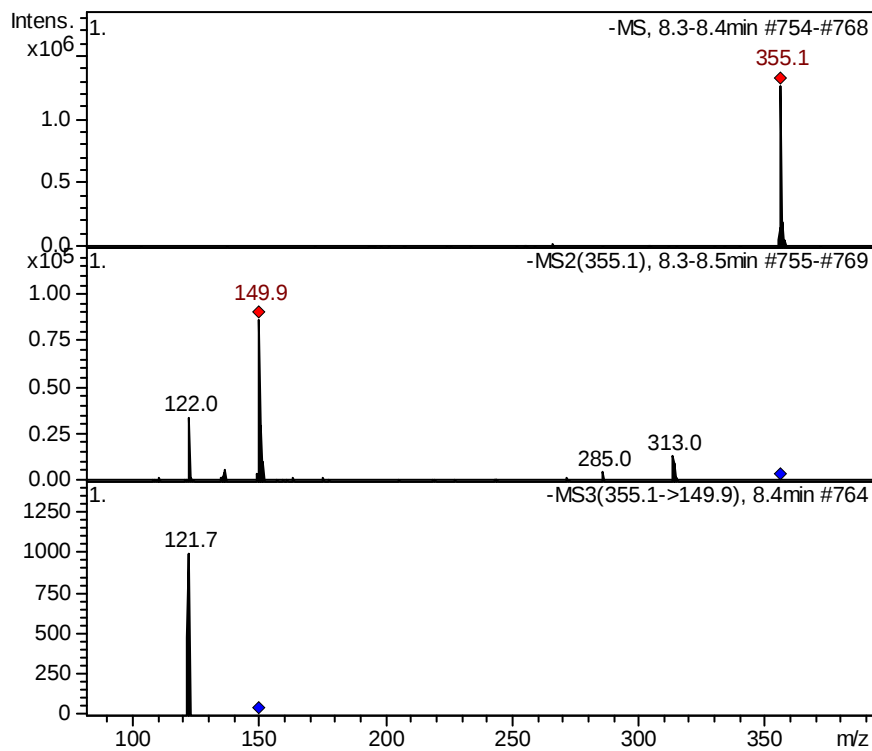


Anhang 5: COSY-NMR-Spektrum von JRL 1

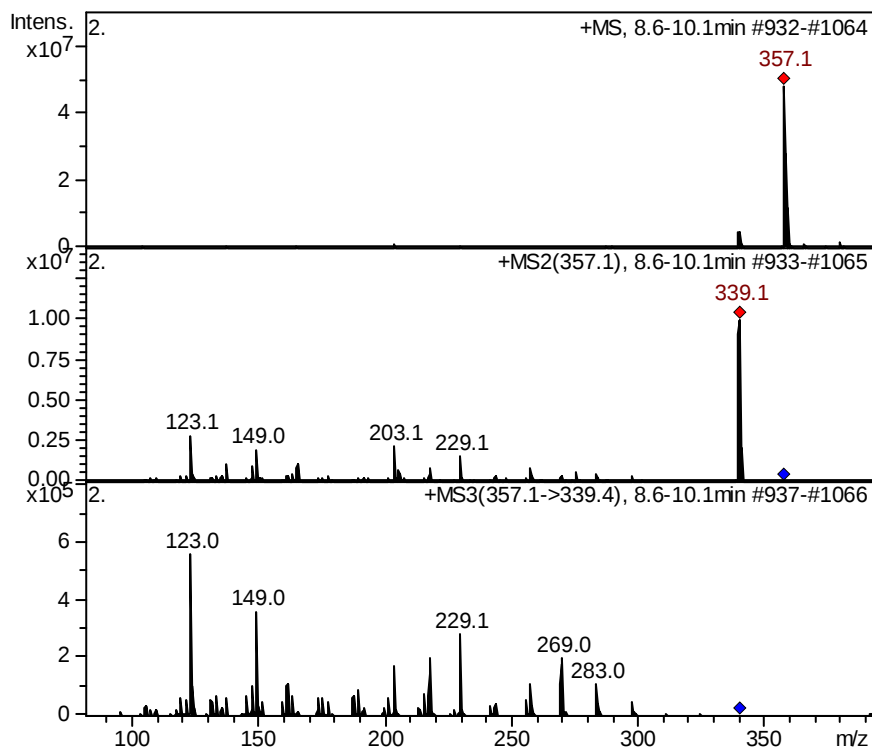


Anhang 6: HMBC-NMR-Spektrum von JRL 1

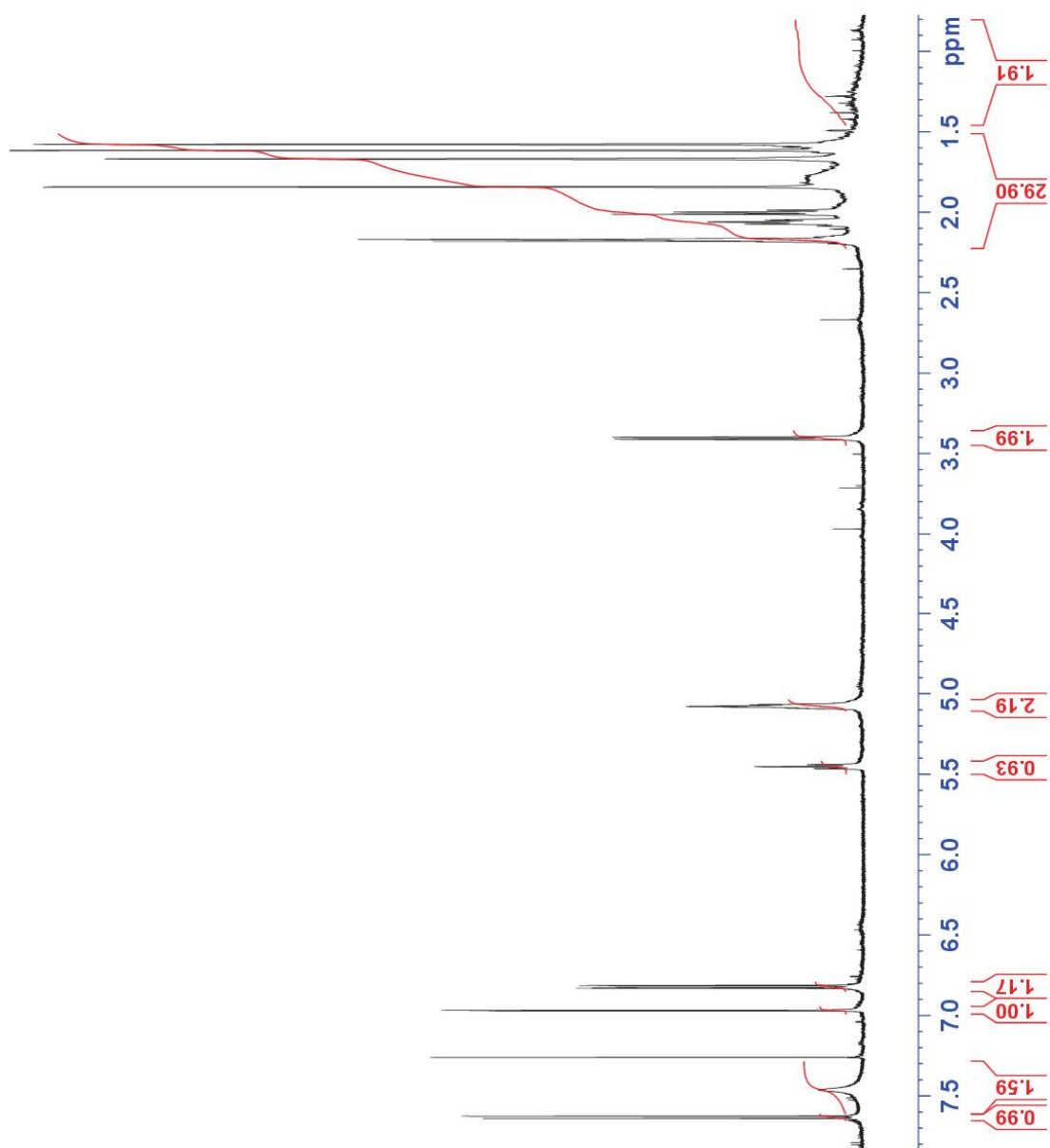
Anhang



Anhang 7: ESI-MSⁿ Spektren des $[M-H]^-$ Ions von "JRL1".

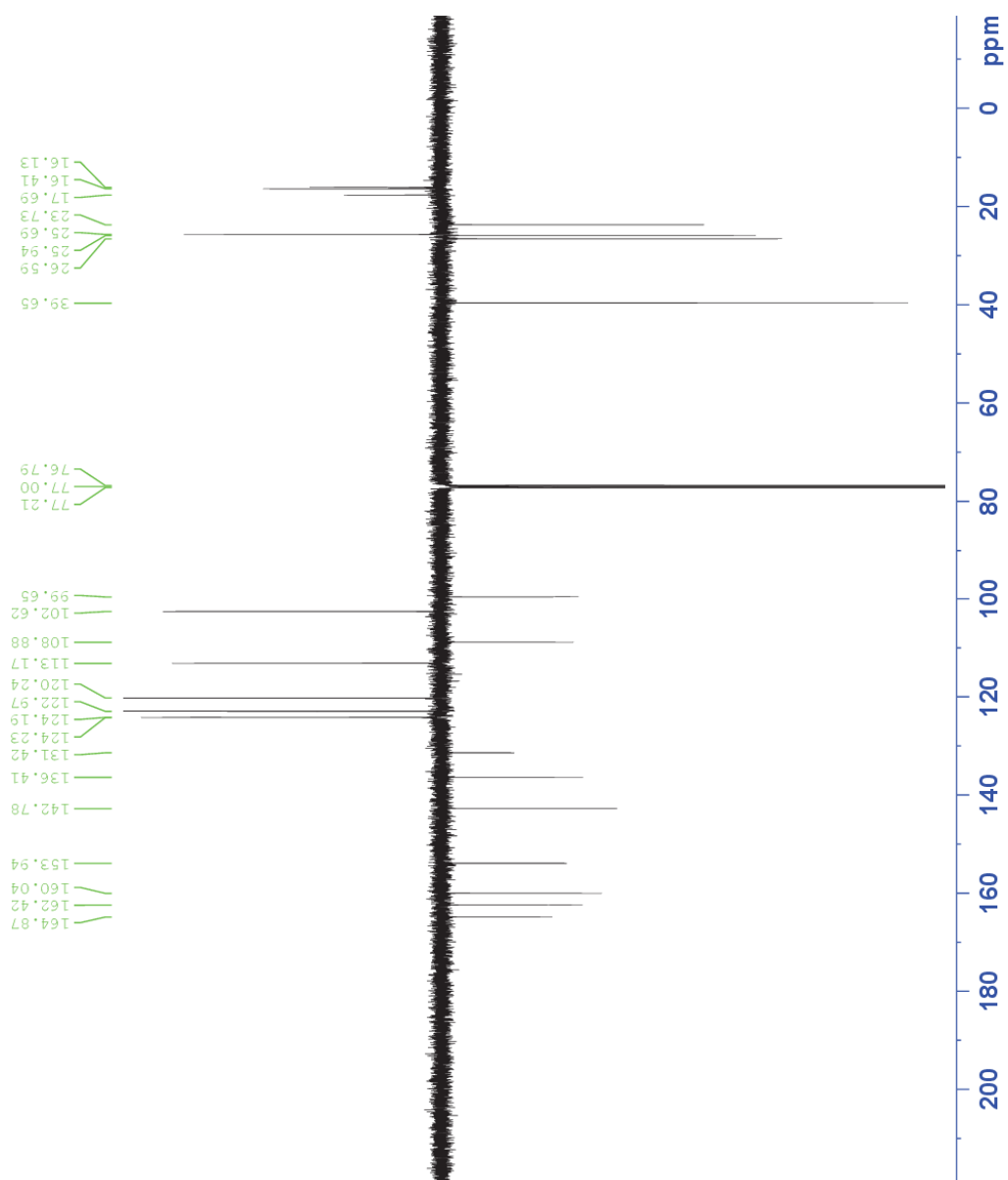


Anhang 8: ESI-MSⁿ Spektren des $[M+H]^+$ Ions von "JRL1".

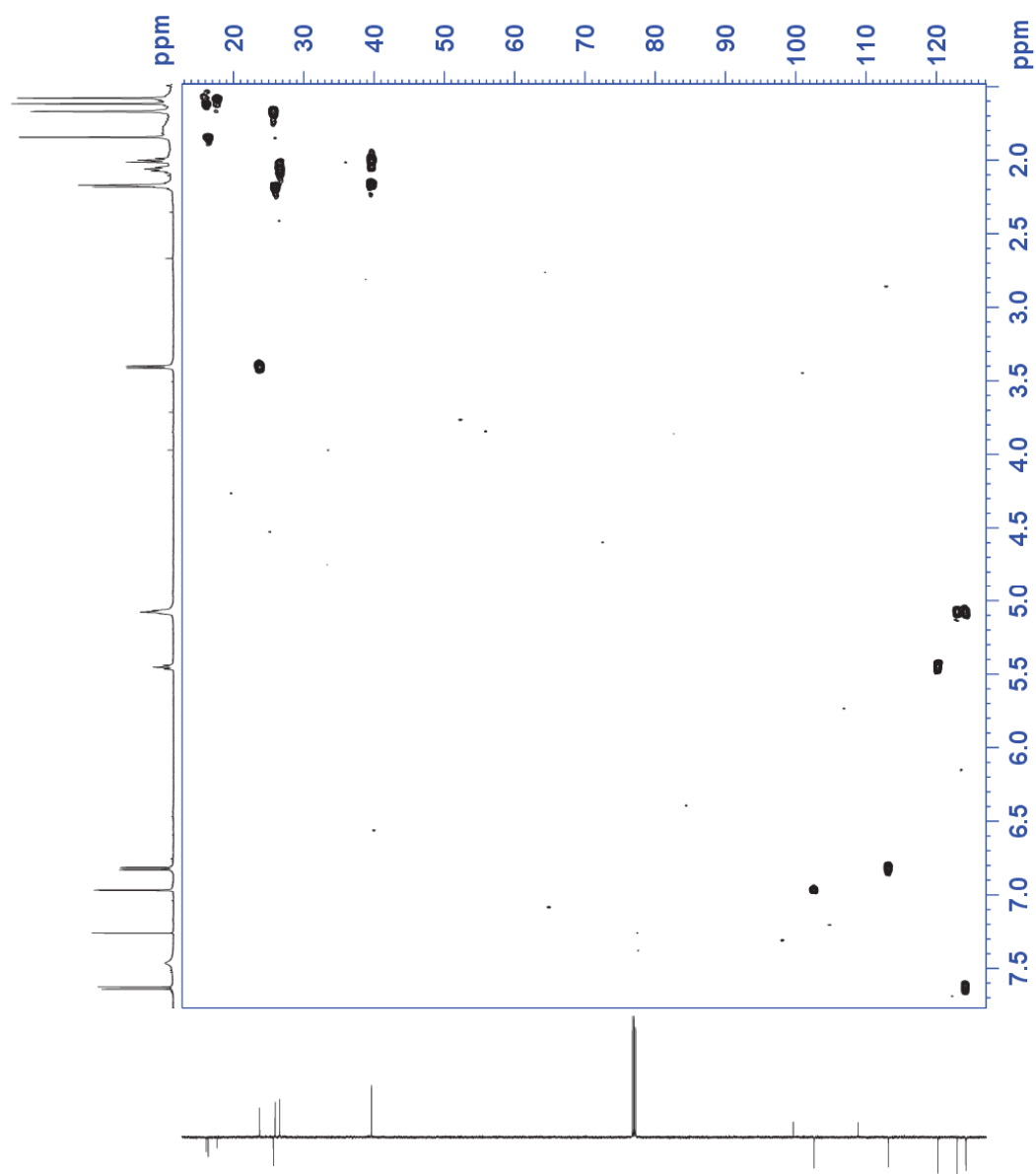


Anhang 9: ^1H -NMR-Spektrum von JRL 2

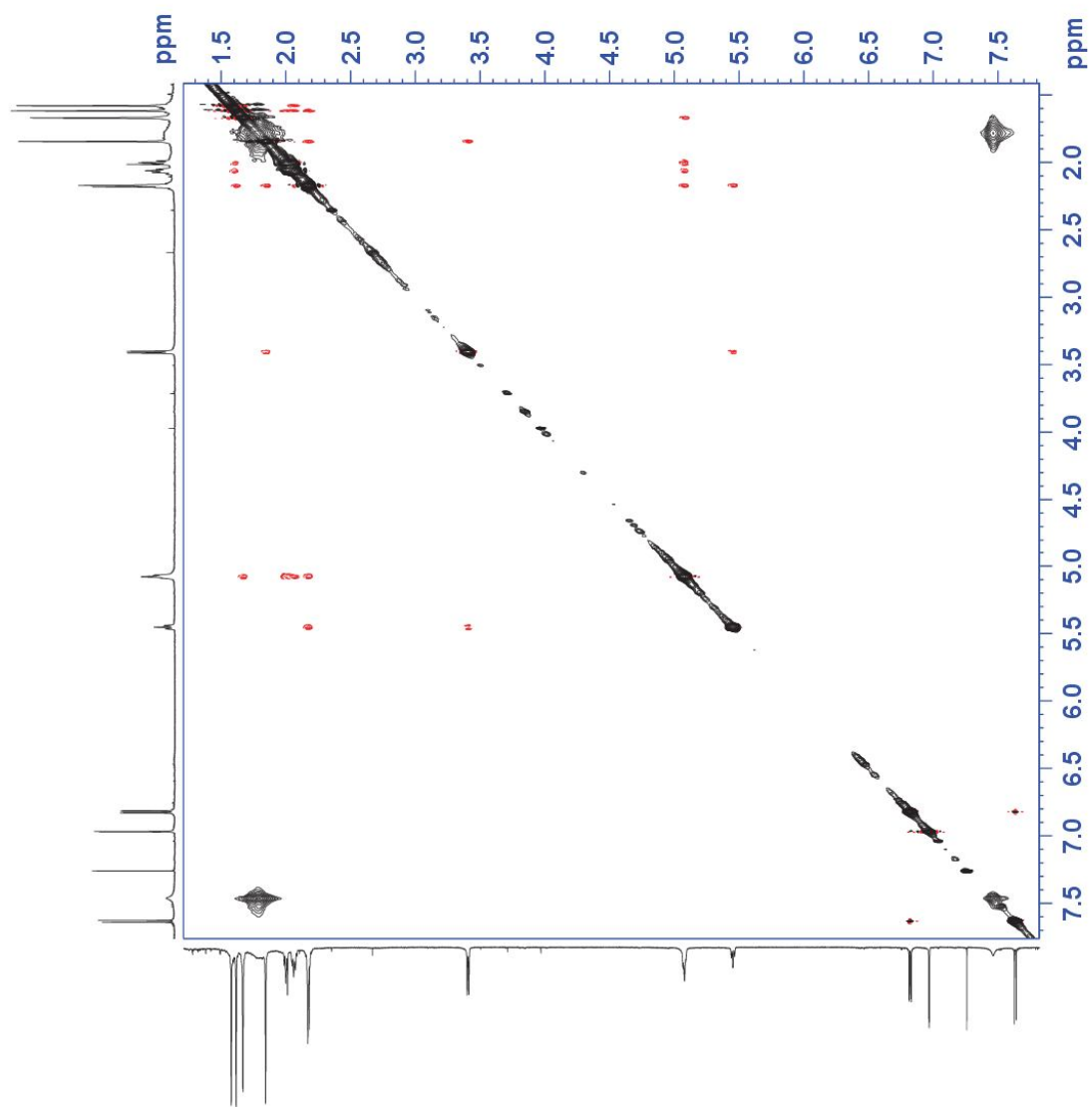
Anhang



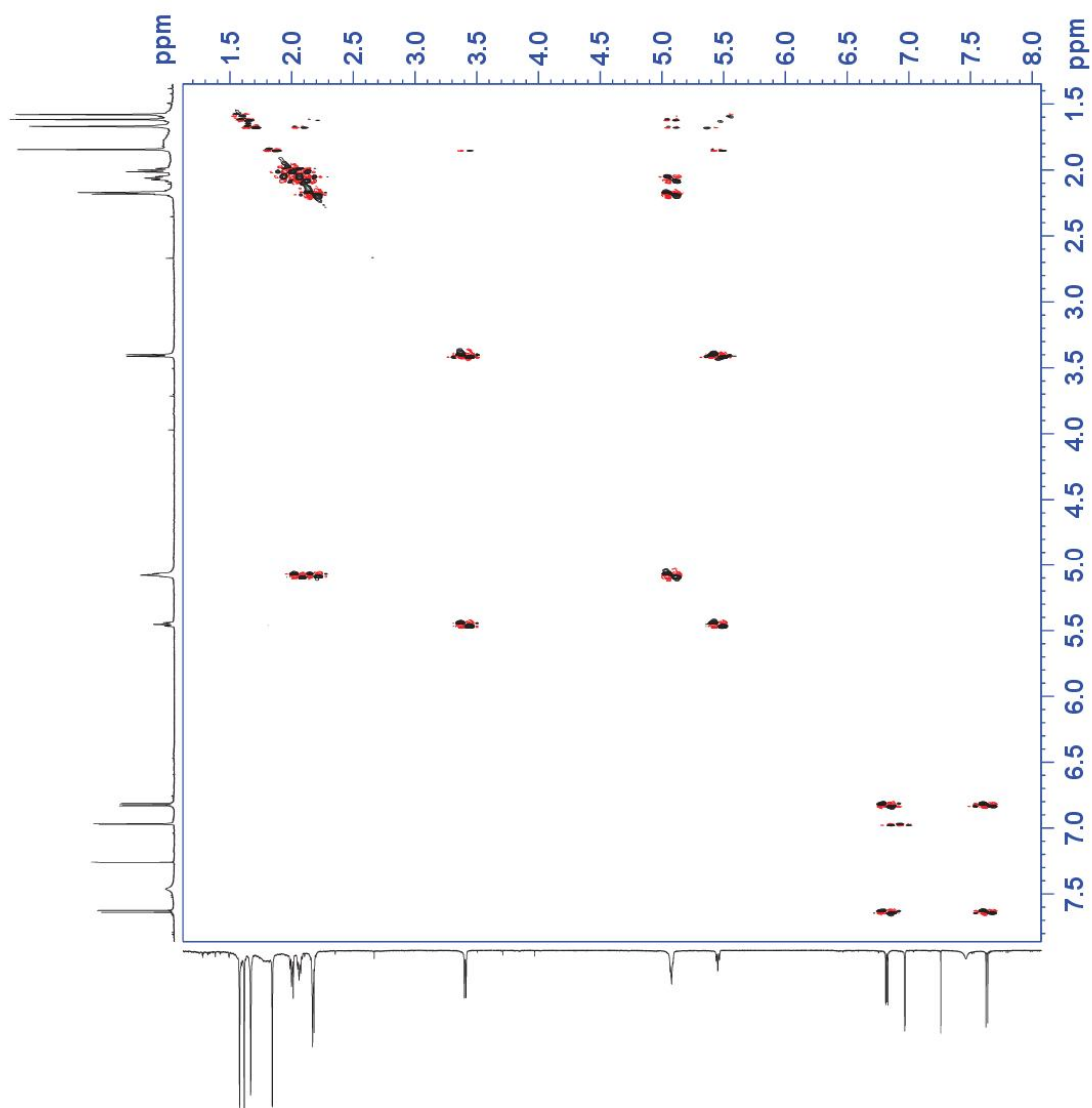
Anhang 10: ¹³C-NMR-Spektrum von JRL 2



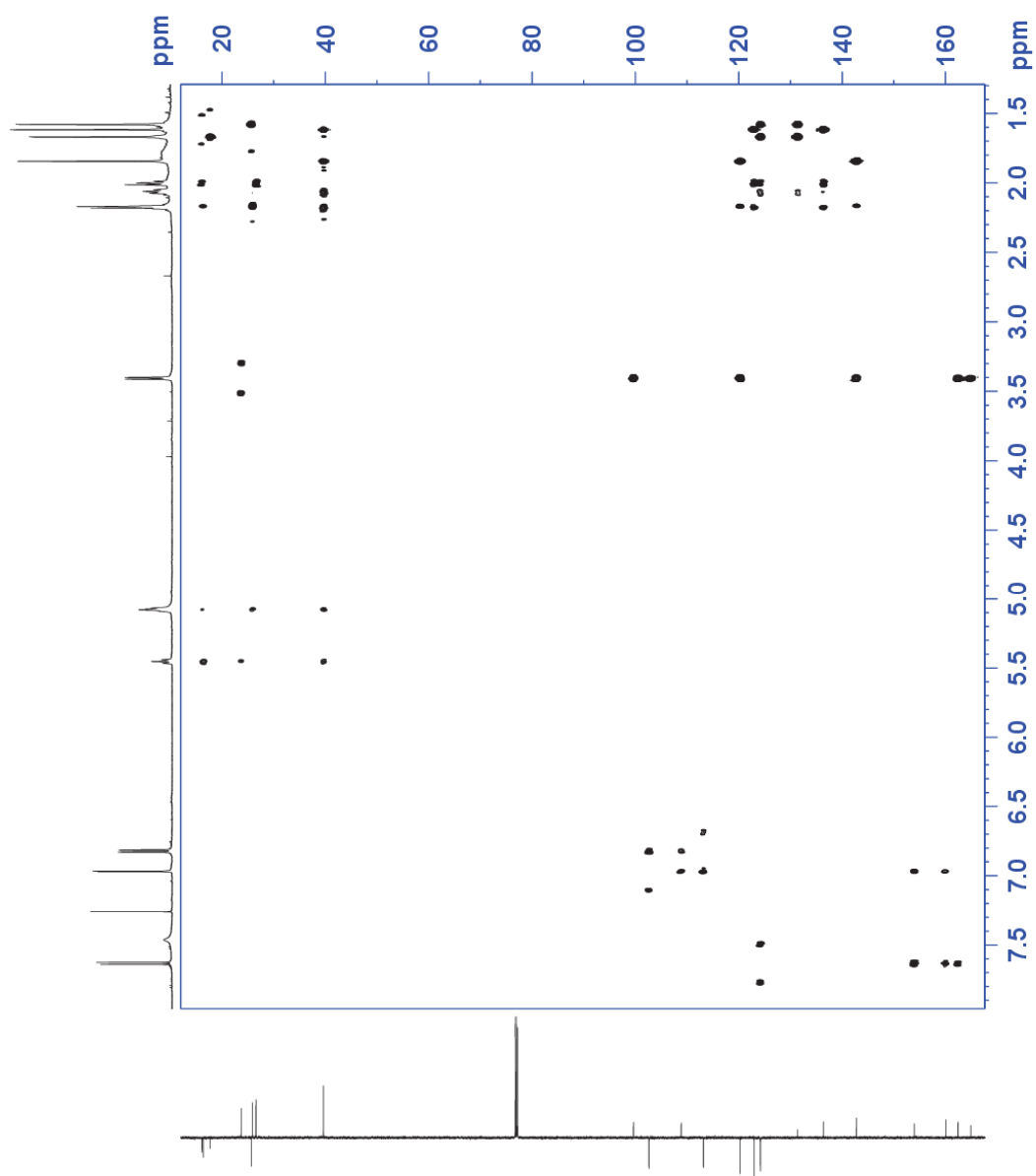
Anhang 11: HSQC-NMR-Spektrum von JRL 2



Anhang 12: NOESY-NMR-Spektrum von JRL 2

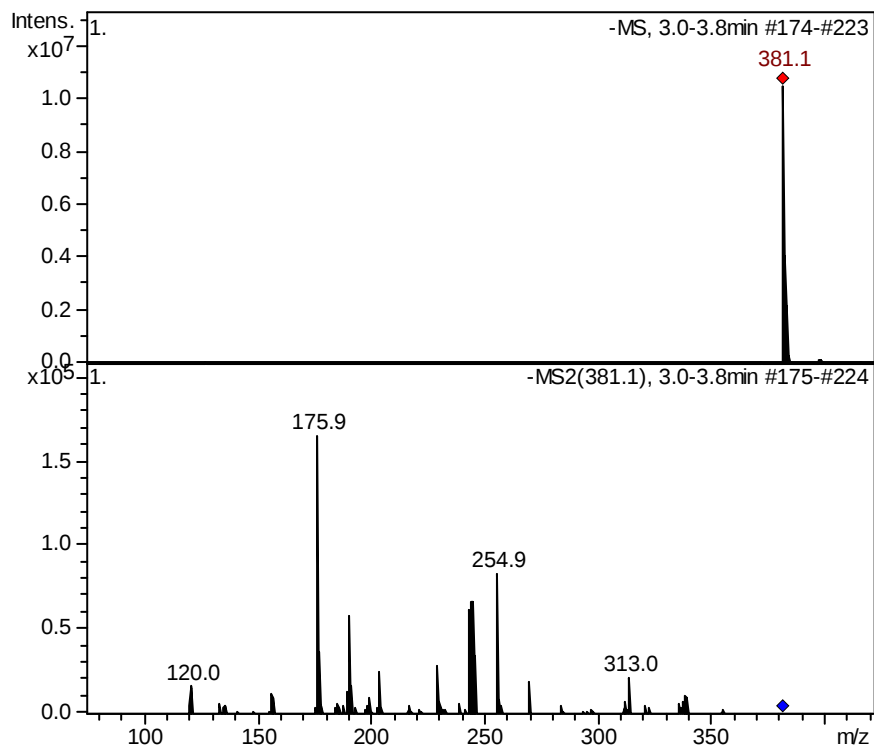


Anhang 13: COSY-NMR-Spektrum von JRL 2

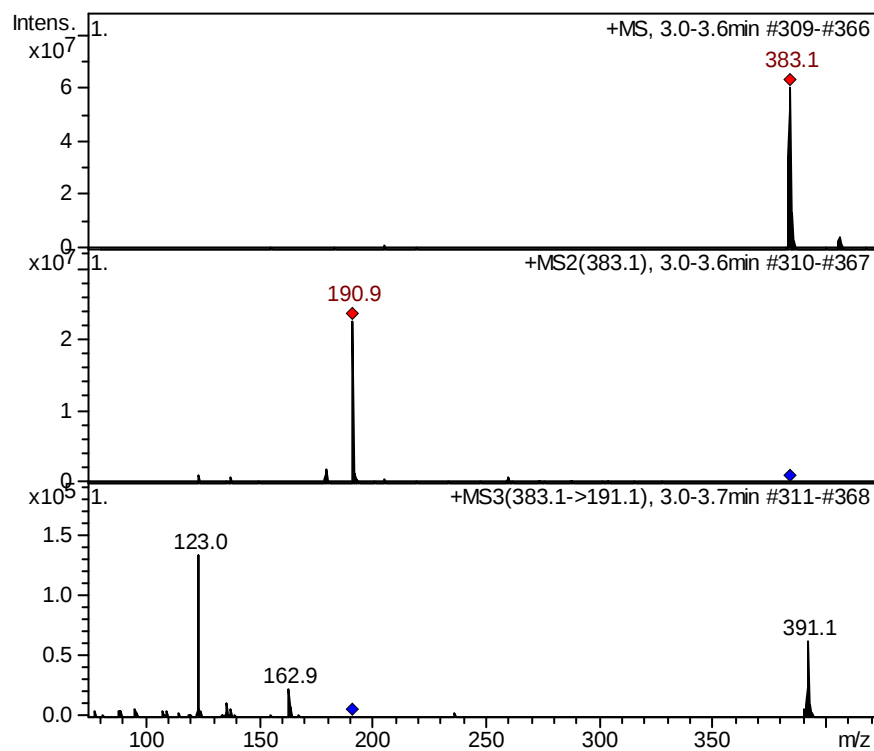


Anhang 14: HMBC-NMR-Spektrum von JRL 2

Anhang



Anhang 15: ESI-MSⁿ Spektren des [M-H]⁻ Ions von "JRL2".



Anhang 16: ESI-MSⁿ Spektren des [M+H]⁺ Ions von "JRL2".

CURRICULUM VITAE

Name	Johannes Lutz
Geburtsdatum	15. März 1988
Geburtsort	Bregenz
Eltern	Ingrid Lutz Dr. Reinhard Lutz

Ausbildung

1994 – 1998	VS Bütze, Wolfurt
1998 – 2006	PG Mehrerau, Bregenz
Jun. 2006	Matura mit gutem Erfolg
Aug. 2006	Grundwehrdienst, Militärspital 2 Innsbruck
Okt. 2007	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien
WS 2011	Auslandssemester an der Universidad de Granada, Spanien
SoSe 2012	Praktische Arbeit am Department für Pharmakognosie

Praktika

Juli 2009	Hofsteigapotheke Wolfurt
Juli 2010	Intercell AG
Seit WS 2012	Tutor im Praktikum „Pharmazeutische Qualität biogener Arzneimittel“ an der Universität Wien