



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Anwendung von unterschiedlichen Präparationstechniken
zur Herstellung von wasserlöslichen neutralen und sauren
Polysacchariden aus Mucilagen von *Ocimum basilicum*
und *Hyptis suaveolens*“

verfasst von

Daniela Brandstätter

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Danksagung

Mit dieser Diplomarbeit danke ich meinen Eltern für ihre großzügige Unterstützung während meines Studiums und auch dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben und mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet haben.

Ich bedanke ich mich bei Herrn o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein für die Vergabe des Diplomarbeitsthemas und die Möglichkeit, in der Arbeitsgruppe des Departments mitarbeiten zu können.

Weiters danke ich Herrn Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Werner Praznik für die Unterstützung und Ratschläge bei allen Problemen, die während der praktischen Arbeit auftraten, vor allem für die Hilfestellungen zur Verfassung und Formatierung dieser Arbeit, sowie für die Hilfe zur Interpretation der SE-Chromatogramme.

Für die abschließende Korrektur bedanke ich mich bei Herrn Hon. Prof. Univ. Doz. Frank Michael Unger, Ph.D.

Bedanken möchte ich mich auch bei Mag. Andrea Cavarkapa, welche mich genauer an das Thema heranführte und mir in allen Fragen hilfreich zur Seite stand, besonders für Ihre Hilfe zur richtigen Interpretation der Dünnschicht- und SE-Chromatogramme.

Ich danke auch allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Viernstein für die angenehme Atmosphäre, Kollegialität und Hilfsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Zielsetzung	5
1.2 <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) und <i>Ocimum basilicum</i> (L.), eine kurze Einführung	5
1.2.1 <i>Hyptis suaveolens</i> (L.)	6
1.2.2. <i>Ocimum basilicum</i> (L.)	7
1.3 Gewinnung des Ausgangsmaterials, der Mucilage	8
 2. Material und Methoden	 10
2.1 Freisetzung der Polysaccharide aus der Mucilage	10
2.1.1 Freisetzung der alkalilöslichen Heteropolysaccharide mit 4M NaOH bzw. 4M KOH	10
2.1.2 Zentrifugation	10
2.1.3 Neutralisation	11
2.1.4 Abtrennung der störenden Begleitstoffe	11
2.1.4.1 Dialyse	12
2.1.4.2. Ausfällung	13
2.1.5 Lyophilisation	14
2.2 Freisetzung der wasserlöslichen Heteropolysaccharide mit Pectinase	14
2.2.1 Pectinase	14
2.2.2 Zentrifugation	15
2.2.3 Abtrennung der störenden Begleitstoffe, Zentrifugation und Ausfällung	15
2.2.4 Lyophilisation	16
2.3 Fraktionierung der Heteropolysaccharide mittels Ionenaustauscher	17
2.3.1 Batchverfahren	17

2.3.2 Präparative Säulenchromatographie (SC).....	18
2.3.3 Probenvorbereitung für die präparative SC	20
2.3.4 Elution von neutralem und saurem Polysaccharid.....	20
2.3.5 Regeneration der Säulenmaterialien	21
2.4 Charakterisierung der Polysaccharide	22
2.4.1 Saure Hydrolyse der Polysaccharide	22
2.4.2 Dünnschichtchromatographie (DC)	22
2.4.2.1 DC der „Oligosaccharid“-Fraktionen	23
2.4.2.2 DC nach saurer Hydrolyse	24
2.4.3 Größenausschluss-Chromatographie (SE-Chromatographie).....	25
3. Ergebnisse und Diskussion.....	27
3.1 Ausbeuten an Heteropolysaccharid nach Dialyse bzw Ausfällung	27
3.2 Freisetzung der Heteropolysaccharide mit Pectinase.....	28
3.3 Untersuchung der „Oligosaccharid“-Fraktionen mittels SE-C und DC	29
3.3.1 SE-C der „Oligosaccharid“ – Fraktion.....	29
3.3.2 DC der „Oligosaccharid“-Fraktionen.....	31
3.4 Fraktionierung der Heteropolysaccharide	33
3.4.1 Batchverfahren	33
3.4.2 Präparative Säulenchromatographie	33
3.4.3 Vergleich der beiden Säulenmaterialien	34
3.5 DC nach saurer Hydrolyse.....	36
3.5.1 Monosaccharid-Zusammensetzung der Mucilage von <i>Ocimum</i> <i>basilicum</i>	37
3.5.2 Monosaccharid-Zusammensetzung der Mucilage von <i>Hyptis</i> <i>suaveolens</i>	39
3.6 SE-Chromatogramme und Größendimensionen	42

3.6.1 SE-Chromatogramme von <i>Ocimum basilicum</i>	43
3.6.2 SE-Chromatogramme der Mucilage von <i>Hyptis suaveolens</i>	49
3.6.3 SE-Chromatogramme der mit Pectinase freigesetzten Heteropolysaccharide	52
 4. Ausblick	57
5. Summary	58
6. Zusammenfassung	58
7. Abbildungsverzeichnis	60
8. Tabellenverzeichnis	61
9. Literaturverzeichnis	62

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung

Das Ziel meiner Diplomarbeit war es, unterschiedliche Präparationstechniken auszutesten, um für weitere Untersuchungen möglichst rasch eine hohe Ausbeute an wasserlöslichen Heteropolysacchariden sowie nach Trennung mit möglichst geringem Zeit- und Materialenaufwand, viel neutrales und saures Polysaccharid zu erhalten.

Es wurde daher sowohl die bereits aus mehreren Diplomarbeiten bekannte Freisetzung der Heteropolysaccharide mit Alkalien, sowie eine enzymatische Spaltung mit Pectinasen durchgeführt.

Parallel zu der bereits bekannten Extraktionsmethode mit 4M Natronlauge (NaOH) wurde auch mit 4M Kalilauge (KOH) gearbeitet.

Zur Trennung der neutralen und sauren Heteropolysaccharide wurde neben der präparativen Säulenchromatographie auch das Batchverfahren als Vergleich herangezogen.

1.2 *Hyptis suaveolens* (L.) und *Ocimum basilicum* (L.), eine kurze Einführung

Da sich Mitarbeiter des Departments für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie sowie der Universität für Bodenkultur bereits seit Jahren mit der Isolierung und Charakterisierung von Polysacchariden aus *Hyptis suaveolens* (L.) und *Ocimum basilicum* (L.) beschäftigen und schon mehrere Diplomarbeiten zum Thema verfasst wurden, wird hier nur kurz auf die allgemeinen Charakteristika des Ausgangsmaterials eingegangen.

Die Mucilage, welche als Ausgangsmaterial verwendet wurde, stammt aus den Samenschalen von *Hyptis suaveolens* (*Hyptis*) sowie *Ocimum basilicum* (*Ocimum*).

Beide Pflanzen sind Vertreter der Familie der Lamiaceen (Lippenblütler). Demnach zeigen sie sämtliche morphologische Charakteristika dieser Familie, wie einen vierkantigen Stängel, kreuzgegenständige Blätter und zygomorphe Blüten mit je 5 Blütenblättern, welche eine Unter- und Oberlippe bilden.¹

1.2.1 *Hyptis suaveolens* (L.)



Abbildung 1 *Hyptis suaveolens*

Hyptis suaveolens wird seit langem in der Volksmedizin für unterschiedliche Leiden, zum Beispiel bei Erkältungskrankheiten oder bei gastrointestinalen Beschwerden eingesetzt.

Aus den Blättern kann mittels Wasserdampfdestillation ätherisches Öl gewonnen werden, welches als Hauptkomponenten 1,8-Cineol und β -Caryophyllen enthält.³

Neuere Studien belegen, dass dieses ätherische Öl von *Hyptis* insektizid wirksam ist und somit eine umweltfreundliche Alternative zu herkömmlichen Insektiziden auch in der Prophylaxe gegen Anopheles-Mücken darstellt.⁴

1.2.2. *Ocimum basilicum* (L.)

Ocimum ist eine 20-50cm hohe Pflanze mit eiförmig gegenständigen, zugespitzten Blättern, welche bis zu 4cm lang und rund 2cm breit sind. Die Blüten sind zygomorph, gelblichweiß bis rötlich und meist in 6-zähligen Wirteln angeordnet.⁵

Das in der Volksmedizin verwendete Basilikumkraut „Herba Basilici“ besteht aus den zur Blütezeit gesammelten oberirdischen Teilen von *Ocimum basilicum*.



Abbildung 2 *Ocimum basilicum*

Die Inhaltsstoffe von *Ocimum* variieren je nach Chemotyp, Herkunft und Erntezeitpunkt, sodass die Teedroge Herba Basilici zwischen 0,04 und 0,70% ätherisches Öl enthält.

Die Hauptkomponenten des ätherischen Öls sind Linalool, Methylchavicol und Eugenol. Weitere Bestandteile sind Mono- und Sesquiterpene, sowie Phenylpropane, Gerbstoffe und Flavonoide. Verwendet wird Herba Basilici sowohl frisch als auch getrocknet als Gewürz. In der Volksmedizin wird Basilikumkraut als Stomachicum bei Appetitlosigkeit, als Carminativum und bei Völlegefühl angewandt.⁷

Basilikumkraut wird auch bei Entzündungen im Rachenraum als Adstringens eingesetzt.

Dem ätherischen Öl von *Ocimum basilicum* wird außerdem eine anthelmintische und antiphlogistische, sowie protektive Wirkung bezüglich Magengeschwüren nachgesagt.⁸

Da das ätherische Öl aber estragolhältig ist und Estragol als potentiell Cancerogen gilt, wurde von der Kommission E eine therapeutische Anwendung untersagt, obwohl bei gebräuchlichen Dosierungen keine Nebenwirkungen bekannt sind. [Auszug aus Monographie der Kommission E, BAnz Nr. 54 vom 18.03.1992]⁹

1.3 Gewinnung des Ausgangsmaterials, der Mucilage

Generell bilden *Hyptis* und *Ocimum* zum Schutz ihrer Samen vor Austrocknung Exopolysaccharide, die Wasser in großen Mengen aufnehmen.

In diesem Fall wurden die Mucilagen (Schleime) aus den Samen von *Hyptis* von Frau Prof. Siriporn Okonogi, Ph.D und die geriebenen Samenschalen von *Ocimum* von Frau Prof. Pimporn Leelapornpisid, M.Sc, Universität Chiang Mai, Thailand, zur Verfügung gestellt.

In Thailand werden zur Gewinnung der Mucilage die winzigen Samen von *Hyptis* und *Ocimum* in heißem Wasser quellen gelassen und die gebildeten Exopolysaccharid-Schleime, also die Mucilage, in der Sonne getrocknet. In den gewonnenen Mucilagen sind noch Reste der Samenschalen sichtbar.

Da diese Heteropolysaccharide (Mucilagen) nicht wasserlöslich sind, wird ein „Verseifungsschritt“ mit Natronlauge (NaOH) bzw. mit Kalilauge (KOH) durchgeführt, wobei Estergruppen gespalten und die Heteropolysaccharide so wasserlöslich gemacht werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Enzymen, die die Heteropolysaccharide eventuell soweit freisetzen, dass man sich die aufwändige Extraktion mit Alkalien erspart.¹⁰

Pharmazeutisch technologisch interessant sind die Mucilagen wegen ihrer hohen Wasserbindefähigkeit. Sie werden als potentielle Laxantien, aber auch als Prebiotica eingesetzt.¹¹

2. Material und Methoden

2.1 Freisetzung der Polysaccharide aus der Mucilage

2.1.1 Freisetzung der alkalilöslichen Heteropolysaccharide mit 4M NaOH bzw. 4M KOH

Je 5g Mucilage von *Hyptis suaveolens* bzw. *Ocimum basilicum* wurden mit Alkali extrahiert um daraus die alkalilöslichen Heteropolysaccharide zu gewinnen.

Es wurden je 2 Chargen à 5g hergestellt, wobei unterschiedliche Temperaturen und Extraktionszeiten gewählt wurden.

Für die 1.Charge von *Hyptis*/*Ocimum* wurden jeweils 5g Mucilage fein zerrieben in einen Erlenmeyer Kolben übertragen, mit 150ml 4M Natronlauge bzw. 4M Kalilauge versetzt und über Nacht bei 80°C (NaOH-Fraktion) bzw. 70°C (KOH-Fraktion) rühren gelassen.

Die 2.Chargen wurden analog zur 1.Charge extrahiert, allerdings über 4 Tage, die NaOH Fraktion bei 80°C und die KOH-Fraktion bei 70°C.

Um das Volumen zu erhöhen, wurden die Proben nach der Extraktion mit 100ml Aqua dest. verdünnt.

2.1.2 Zentrifugation

Die Proben wurden mit der Zentrifuge RC5C (Thermo scientific) bei ca 19°C für 15min bei 12000rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abpipettiert und in einem 1000ml Erlenmeyerkolben gesammelt.

Die Rückstände in den Zentrifugenröhrchen wurden 2x mit insgesamt 150ml 2M NaOH bzw. 2M KOH gewaschen und nach Homogenisation mit dem Vortex (Heidolph Reax top) erneut bei 12000rpm zentrifugiert.

2.1.3 Neutralisation

Die so gewonnenen Überstände wurden chargenmäßig vereint und anschließend mit 25%iger Salzsäure neutralisiert.

Die Erlenmeyerkolben wurden dabei in eine Mischung aus zerstoßenem Eis und kaltem Wasser getaucht und unter Rühren auf einen pH Wert von 6,5-7 eingestellt. Die Kühlung ist unbedingt notwendig, da die bei der Neutralisation der Probenlösungen mit 25%iger Salzsäure entstehende Reaktionswärme abgeführt werden muss.

Das Volumen betrug nach der Neutralisation jeweils rund 500ml.

Die neutralisierten Proben wurden nach Zugabe von Natriumazid als Konservierungsmittel bei 4°C gelagert.

2.1.4 Abtrennung der störenden Begleitstoffe

Die Dialyse bzw. Ausfällung der Probenlösungen diente der Abtrennung der noch vorhandenen Salze in der Lösung, welche bei der weiteren Bearbeitung stören würden.

Die neutralisierte 1.Charge von *Hyptis* und *Ocimum* wurde dialysiert, die 2.Charge von *Hyptis/Ocimum* wurde hingegen sofort lyophilisiert, wieder in Aqua dest. gelöst und ausgefällt. (siehe 2.1.4.2)

Anmerkung: Von den KOH-Fractionen der 1.Charge *Hyptis* und *Ocimum* wurden nur rund 2/3 des Probenvolumens dialysiert, der verbleibende Rest wurde wie unter 2.1.4.2 beschrieben ausgefällt.

2.1.4.1 Dialyse

Die Dialyse ist eine physikalische Methode zur Abtrennung von gelösten niedermolekularen von makromolekularen/kolloidal gelösten Stoffen. Sie beruht auf der Tatsache, dass makromolekulare oder kolloiddisperse Stoffe nicht oder nur sehr schwer durch semipermeable Membranen diffundieren können. Die molekulardispersen Moleküle können durch die Membran dem Konzentrationsgefälle folgend hindurch diffundieren und so abgetrennt werden.¹²

Die 1.Charge von *Hyptis/Ocimum* wurde dialysiert.

Die Dialysenschläuche (Sigma Aldrich 76mm(3.0.in)) wurden vor dem Befüllen mit den Probelösungen in destilliertem Wasser für 40min ausgekocht, damit sich die Poren im Schlauch öffnen konnten.

Anschließend wurden die Schläuche mit kaltem Wasser versetzt.

Die Schläuche wurden zu ca. 2/3 mit der neutralisierten Probe befüllt, in 5L Plastikbechergläsern mit Leitungswasser übertragen und mit einer Glasplatte fixiert.

Zur Förderung des Konzentrationsaustausches wurden die Lösungen in den Plastikbechergläsern gerührt, das Wasser wurde anfangs stündlich, später 2x pro Tag gewechselt, über 4 Tage hinweg.

Für die Prüfung auf Salzfreiheit (Chloridionen) wurde aus jedem Becherglas und aus jedem Dialyseschlauch eine Probe gezogen und mit Silbernitratlösung versetzt. Leitungswasser wurde als Blindprobe zum Vergleich herangezogen.

Bei Anwesenheit von Chloridionen waren die Proben weiß getrübt und mussten bis zur Salzfreiheit weiter dialysiert werden.

2.1.4.2. Ausfällung

Da die Möglichkeit besteht, dass in der Mucilage potentiell vorhandene höhere Oligosaccharide durch Dialyse verloren gehen, wurden die 2.Chargen von *Hyptis* und *Ocimum* nicht dialysiert, sondern durch Ausfällen weiterverarbeitet.

Hierfür wurden die Proben nach der Neutralisation sofort lyophilisiert (siehe Punkt 2.1.5), danach in einer geringen Menge Aqua dest. unter Erwärmen gelöst und anschließend mit Methanol und Aceton ausgefällt.

Die in Aqua dest. gelösten Proben wurden mit der 4-fachen Menge Methanol versetzt, worauf das Heteropolysaccharid ausfiel. Der Überstand wurde abgetrennt und mit Aceton 1:1 versetzt, worauf ebenfalls sehr viel Niederschlag gebildet wurde.

Dieser „Niederschlag“ (wird in weiterer Folge als „Oligosaccharid“-Fraktion bezeichnet) wurde anschließend weiter untersucht. Es wurden sowohl Größenausschluss-Chromatogramme (Size Exclusion-chromatography, SE-C) als auch ein Dünnschichtchromatogramm (DC) angefertigt. (siehe Punkt 3.3)

Die mit Methanol ausgefällten Heteropolysaccharide wurden anschließend in Aqua dest. gelöst und dialysiert, da sich die verbleibenden Methanolreste nur sehr schwer abtrennen ließen und die Dialyse als „materialschonender“ empfunden wurde.

2.1.5 Lyophilisation

Die Proben wurden in Birnen- oder Rundkolben am Rotavapor (Heidolph WB2001) unter raschem Drehen in einem mit Trockeneis gesättigten Acetonbad eingefroren. Anschließend wurden die Kolben an den Lyophilisator (Heto Power Dry LL3000) gehängt, welcher nach Anlegen von Vakuum das Wasser aus den Proben entfernt, sodass diese über Nacht vollständig getrocknet werden.

Der Lyophilisator musste vor jeder Verwendung stets 30min bei geschlossenen Ventilen betrieben werden, damit eine Innentemperatur von -56°C erreicht werden konnte, erst dann wurde die Pumpe dazu eingeschaltet und das Verbindungsventil zum Vakuum geöffnet.

Je nach Leistungsfähigkeit der Pumpe konnten 3-4 500ml Kolben mit einem Flüssigkeitsvolumen von ca.150ml gleichzeitig getrocknet werden.

2.2 Freisetzung der wasserlöslichen Heteropolysaccharide mit Pectinase

2.2.1 Pectinase

Die verwendete „Pectinase“ der Firma Sigma Aldrich ist *„ein durch Aspergillus niger Kulturen gewonnenes Enzym, welches vor allem Pectintranseliminase, Polygalacturonase und Pectinesterase sowie kleine Mengen Hemicellulasen und Cellulasen beinhaltet.“*¹³

Die verwendete Pectinase weist laut der Fa. Sigma Life Science eine *„Aktivität von mehr als 1Unit/mg auf, wobei 1Unit der Enzymmenge entspricht, welche 1µmol Galacturonsäure von Polygalacturonsäure pro Minute bei einem pH Wert von 4,0 und 50°C freisetzt.“*¹⁴

Je 4,0g der Mucilage von *Hyptis* bzw. *Ocimum* wurden fein zerrieben in 2 500ml Schraubglasflaschen übergeführt und mit je 200ml Aqua dest. versetzt.

Die Proben wurden rühren gelassen, die Mucilagen begannen bereits nach wenigen Minuten stark zu quellen, es entstand ein sehr dickflüssiger „Schleim“.

Zu dieser viskosen Lösung wurden jeweils 2ml Pectinase (Fa. Sigma Aldrich) zugegeben.

Da die Proben nach 2 Tagen noch immer sehr viskös waren, wurden erneut 2ml Pectinase zugegeben, nach 3 weiteren Tagen waren die Proben ausreichend dünnflüssig.

2.2.2 Zentrifugation

Die Proben wurden mit der Zentrifuge RC5C Thermo Scientific bei 12000rpm bei 10°C für 10min zentrifugiert.

Anschließend wurden die Überstände, welche durch die Pectinase gelb gefärbt waren, abdekantiert und in Schlifferlenmeyerkolben gesammelt.

Der Rückstand wurde erneut mit ca. 100ml Aqua dest. 24 Stunden lange am Magnetrührer rühren gelassen, dann erneut zentrifugiert und abdekantiert.

Die Überstände wurden vereint und bei 4°C gelagert.

2.2.3 Abtrennung der störenden Begleitstoffe, Zentrifugation und Ausfällung

Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurden die Proben auf einer Heizplatte für 3min aufgeköcht, damit das bei späteren Analysen störende Protein, sowie andere störende Begleitstoffe (Pectinase) ausfallen konnten.

Die Proben wurden erneut zentrifugiert, die Überstände waren nun klar und wurden in Erlenmeyerkolben gesammelt.

Um das Polysaccharid auszufällen, wurden die Proben zuerst lyophilisiert um Methanol zu sparen, anschließend wieder in Aqua dest. gelöst und im Verhältnis 1:4 mit Methanol ausgefällt.

Die Überstände wurden abgetrennt und das ausgefallene Polysaccharid wurde wieder unter Erwärmen in Aqua dest. gelöst und in Kolben übergeführt.

2.2.4 Lyophilisation

Die Proben wurden analog zu Punkt 2.1.5 lyophilisiert.

2.3 Fraktionierung der Heteropolysaccharide mittels Ionenaustauscher

Das durch Extraktion mit Alkalien bzw. durch enzymatische Spaltungsreaktionen aus der Mucilage gewonnene Heteropolysaccharid wurde in neutrales und saures Polysaccharid (PS) getrennt.

Hierfür wurden 2 unterschiedliche Methoden gewählt, mit dem Ziel, eine optimale Trennmethode zu finden, mit welcher eine größere Menge an Heteropolysacchariden zu gewinnen sind.

2.3.1 Batchverfahren

Ziel des Batchverfahrens war es herauszufinden, ob eine Trennung des Heteropolysaccharids in neutrales und saures Polysaccharid auch ohne Säule möglich ist.

Als Ionenaustauscher wurde DEAE-Cellulose (Diethylaminoethyl-Cellulose, Pre-swollen Microgranular Anion Exchanger DE52, Whatman), ein schwacher Anionenaustauscher, gewählt und in Aqua dest. quellen gelassen. Das Volumen betrug nach Überführen in eine Mensur und nach beendeter Sedimentation 76ml.

Die DEAE-Cellulose wurde auf einer Porzellannutsche unter Anlegen von Vakuum zuerst 2x mit je 500ml Aqua dest. gewaschen und anschließend trockengesaugt.

Diese DEAE-Cellulose wurde in einem Becherglas in Aqua dest. suspendiert, mit rund 190ml 0,05M Ammoniaklösung alkalisiert (pH12), mit 120ml 0,2M Ameisensäure auf pH3 und mit rund 490ml 0,005M Formiatpuffer auf einen pH-Wert von 5 eingestellt.

Nach der pH-Wert Einstellung wurde die in 0,005M Formiatpuffer gelöste Probe (200mg *Hyptis* der NaOH Fraktion) der DEAE-Cellulose zugegeben und über Nacht in einem Becherglas am Magnetrührer rühren gelassen.

Die DEAE-Cellulose wurde wieder auf die Nutsche aufgebracht und versucht, unter Vakuum das neutrale, in Lösung vorliegende Polysaccharid abzusaugen.

Der Versuch, die DEAE-Cellulose an der Nutsche zu waschen, gestaltete sich als ebenso problematisch wie die pH-Wert Einstellung, da die DEAE-Cellulose die Poren des Filterpapiers so verklebt hatte, dass der Überstand mit dem neutralen Polysaccharid nicht wie gewünscht, durch Anlegen von Vakuum, abgetrennt werden konnte.

2.3.2 Präparative Säulenchromatographie (SC)

Es wurde eine Säule mit 90g vorgequollener DEAE-Cellulose, welche über Nacht in Aqua dest. quellen gelassen wurde, entsprechend dem berechneten Volumen der Säule gepackt und diese zu 2/3 befüllt. Die Länge der Säule betrug 50cm, der Durchmesser 2,8cm.

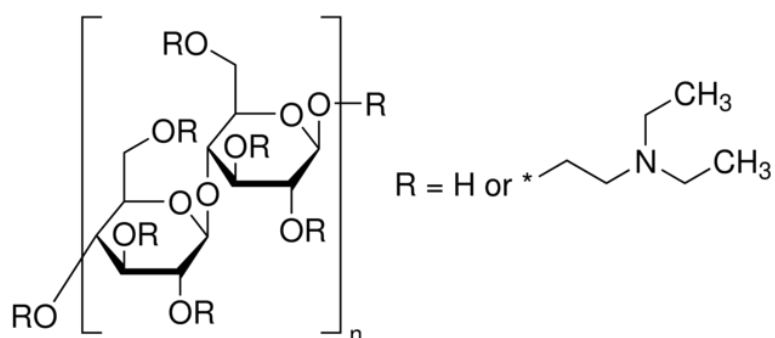


Abbildung 3 Struktur von DEAE-Cellulose¹⁵

Da bereits bekannt war, dass DEAE-Cellulose nicht zu den stabilsten Materialien zählt und es häufig zum Zusammensinken oder Einbrechen der stationären Phase kommt, wurde als „Unterlage“, bevor die DEAE-Cellulose in die Säule gefüllt wurde, ca. 8cm hoch Sephacrylgel eingefüllt.¹⁶

Nachdem die Säule luftblasenfrei gefüllt war, wurde die DEAE-Cellulose mit 3 verschiedenen Puffersystemen mithilfe einer Pumpe [Microperpex Peristaltic pump (LKB Bromma)] „aufgeladen“, damit eine Trennung des Heteropolysaccharids in neutrales und saures Polysaccharid überhaupt möglich ist.

Die DEAE-Cellulose Säule wurde zuerst mit 0,05M Ammoniaklösung auf einen pH-Wert von 13 eingestellt, anschließend mit 0,2M Ameisensäure auf pH-Wert von 3 angesäuert und mit 0,005M Formiatpuffer (pH5) auf den Ziel-pH-Wert von 5 eingestellt.

Parallel zu der DEAE-Cellulose Säule wurde eine kürzere, bereits vorhandene Säule (Länge: 30cm, Durchmesser 1,5cm), welche mit DEAE-Fractogel® (in weiterer Folge als Fractogel®-Säule bezeichnet) befüllt war, verwendet.

Die Fractogel®-Säule wurde analog zur DEAE-Cellulose Säule mit den 3 Puffersystemen aufgeladen.

Fractogel® der Fa. Merck ist ein synthetisches Polymer, welches dank der „Tentakeltechnologie“ vorteilhaft gegenüber herkömmlichen Trägermaterialien ist. Durch die „Tentakel“, also langen Linearpolymerketten, welche die Zielsubstanzen besser binden, kann eine verbesserte Trennleistung erzielt werden. Fractogel® weist außerdem eine hohe Druckstabilität auf und ermöglicht demnach sehr hohe Durchsatzraten mit hohen Ausbeuten.¹⁷

2.3.3 Probenvorbereitung für die präparative SC

Um das Heteropolysaccharid mittels präparativer SC auftrennen zu können, wurde das Probenmaterial in Schraubeprouvetten eingewogen und in 0,005M Formiat-Puffer über Nacht unter Rühren auf einer Heizplatte (RCT basic IKA Labortechnik) mit Alublock bei 60°C gelöst.

Hyptis erwies sich als extrem dickflüssig, was das Auftragen auf die Säulen selbst nach nachträglichem Verdünnen schwierig gestaltete.

Ocimum hingegen war viel dünnflüssiger, und schlechter in Formiat löslich.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese zentrifugiert (Zentrifuge Heraeus Sepatech), damit keine festen Bestandteile auf die Säule aufgetragen werden, sondern nur die gelösten Proben.

Bei *Ocimum* verblieb nach der Zentrifugation wesentlich mehr Rückstand als bei *Hyptis*.

Für die DEAE-Cellulose Säule wurde eine maximale Auftragemenge von 750mg ermittelt, für die Fractogel®- Säule wurde eine Auftragemenge von 250mg als angemessen betrachtet.

Unter Punkt 3.4.3 und in Tabelle 3 sind zwei genau dokumentierte Trennungen auf der DEAE-Cellulose Säule bzw. auf der Fractogel®-Säule zum Vergleich des nötigen präparativen Aufwandes dargestellt.

2.3.4 Elution von neutralem und saurem Polysaccharid

Das neutrale Polysaccharid wurde mit 0,005M Formiatpuffer eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mithilfe eines Fraktionenkollektors (Fraction collector Frac-100) gesammelt.

Für die DEAE-Cellulose Säule wurde, ausgehend von Voruntersuchungen, eine Vorlaufzeit von rund 40min ermittelt. Die einzelnen Fraktionen betrugen ca. 12-13ml, als Fließgeschwindigkeit wurde 1ml/min gewählt.

Aus jeder Fraktion wurde mit Micropipetten ein Tropfen auf eine DC-Platte aufgetragen, um nachweisen zu können, wann kein neutrales Polysaccharid mehr vorhanden ist (das ist dann der Fall, wenn an den Auftragestellen nach Besprühen mit Thymol keine violette Verfärbung mehr sichtbar ist).

Die DC-Platte wurde dafür trockengeföhnt, mit Thymol besprüht und für 4min bei 150°C in den Trockenschrank gelegt.

Sobald kein neutrales Polysaccharid mehr nachweisbar war, wurde auf den höher konzentrierten 0,35M Formiat-Puffer umgestellt, um das saure Polysaccharid zu eluieren.

Der Fraktionskollektor für die Fractogel®-Säule wurde analog programmiert, allerdings ohne Vorlaufzeit, da das neutrale Polysaccharid hier schon ab der zweiten Fraktion nachweisbar war.

2.3.5 Regeneration der Säulenmaterialien

Nach jeder Trennung mussten die Säulen vollständig regeneriert werden, also mit den 3 Puffersystemen (0,05M Ammoniak-Lösung, 0,02M Ameisensäure, 0,005M Formiatpuffer, pH6) wieder neu aufgeladen werden. Die dafür benötigten Volumina sind unter Punkt 3.4.3 in Tabelle 4 dargestellt.

2.4 Charakterisierung der Polysaccharide

2.4.1 Saure Hydrolyse der Polysaccharide

Um die Monosaccharid-Zusammensetzung der Proben untersuchen zu können, wurde eine saure Hydrolyse mit 2M Trifluoressigsäure durchgeführt.

Hierfür wurden 2mg der dialysierten Proben, also gesamtes Heteropolysaccharid (GPS), sowie 2mg neutrales und 2mg saures Polysaccharid in Schraubeprouvetten eingewogen.

In jede Epruvette wurde 1ml 2M Trifluoressigsäure zugegeben, die Schraubeprouvetten wurden gut verschlossen und in einem Alublock auf der Heizplatte für 2 Stunden bei 100°C unter Rühren reagieren gelassen. Nach 2 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 1ml Methanol gestoppt.

Um die Trifluoressigsäure aus der Probe zu entfernen, wurde mit einer Spezialapparatur (EPIERCE Model 18780 Reacti Vap™ Evaporating Unit) Stickstoff (Druckventil (DIN 477, Nr.10) in die Epruvetten eingeleitet und die Proben „sanft“ gespült.

Die Epruvetten wurden hierfür geöffnet im Epruvettenständer am Wasserbad angebracht und auf zirka 60°C erwärmt.

Die Proben wurden 6-7 mal mit jeweils 1ml Methanol gewaschen und anschließend zur Trockene eingedampft.

2.4.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden 2 Fließmittel hergestellt:

Für die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung (nach saurer Hydrolyse) wurde ein Acetonitril/Aqua dest. Gemisch im Verhältnis 17:3 bereitet, für die Oligosaccharide ein Fließmittel aus n-Butanol/Propanol/Ethanol/Wasser im Verhältnis 80:120:120:80.¹⁸

Als Sprühreagens wurde Thymol verwendet (0,5g Thymol, 5ml Schwefelsäure, 95ml Ethanol).

2.4.2.1 DC der „Oligosaccharid“-Fraktionen

Die „Oligosaccharid“ Fraktionen wurden zu je 1mg in kleine 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße eingewogen und in 1ml Aqua dest. gelöst.

Um einen Vergleich zu den dialysierten Heteropolysacchariden zu erhalten, wurden 4 Vergleichsproben (GPS) verwendet.

Es wurden außerdem 2 Standards für Monosaccharide bereitet und mitlaufen gelassen.

Standard 1: Mannose, Galactose und Maltose in Methanol (je 1mg/ml Methanol)

Standard 2: Glucose, Lactose in Methanol (je 1mg/ml Methanol)

Je 5µl Probenlösung wurde auf die vorbereitete DC-Platte punktförmig aufgetragen.

Als Fließmittel wurde das Oligosaccharid-Fließmittel gewählt, also n-Butanol/ Propanol/Ethanol/Wasser im Verhältnis 80:120:120:80, da ja auf potentiell enthaltene höhere Oligosaccharide getestet wurde.

Die DC-Platte wurde gut trockengeföhnt und dann in den DC-Trog gestellt. Zur besseren Entwicklung wurde die Platte insgesamt 3-fach entwickelt. Nach jeder Entwicklung wurde die Platte gut trockengeföhnt und abkühlen gelassen. Jede Entwicklung dauerte rund 70-80min.

Nach der dritten Entwicklung wurde die DC-Platte nach erneutem Föhnen 2x mit Thymol Sprühreagens besprüht und für einige Minuten im Trockenschrank bei 150°C getrocknet. Das DC wurde dann gescannt. (siehe Abbildung 6)

2.4.2.2 DC nach saurer Hydrolyse

Nach dem Eindampfen zur Trockene und der Wiederaufnahme in 1ml Methanol wurden die Proben abwechselnd mit Monosaccharid-Standards punktförmig (händisch) oder mithilfe des Linomats CAMAG auf die DC Platten (TLC Silica gel 60 F254, Merck) aufgetragen.

Für den Linomat ist die Software „wincats“ sowie eine Stickstoffflaschenverbindung nötig. Die Software erlaubt eine genaue Festlegung der Bandenbreite und der Anzahl der Banden pro DC-Platte, sowie die genaue Einstellung des Auftrage Volumens.

Die einzelnen Proben wurden mit einer speziellen Spritze (Camag Linomat Syringe 695.9914) aufgezogen, die Spritze automatisch in einen Sprühaufsatz entleert und die Lösung ohne direkten Kontakt mit der DC-Platte auf die gewünschte Position gesprüht.

Die getrockneten DC-Platten wurden in den mit Monosaccharid-Lösungsmittel gesättigten DC-Trog gestellt. Um eine bessere Trennung der einzelnen Banden zu erreichen, wurden die DC-Platten 4-fach entwickelt. Da das Laufmittel (mobile Phase) sehr rasch „wandert“, dauert jede Entwicklung rund 15min. Zwischen den einzelnen Entwicklungen wurden die DC-Platten trockengeföhnt und abkühlen gelassen. Nach der letzten Entwicklung wurde die trockene Platte mit Thymol als Sprühreagens besprüht und im Trockenschrank bei 120°C entwickelt.

Die Banden wurden nach 3-5min sichtbar, es wurde ein zweites Mal mit Thymol besprüht und die weitere Farbentwicklung bei offener Trockenschranktür beobachtet.

Die Platten wurden zur Dokumentation gescannt. (siehe Abbildungen 7 und 8)

2.4.3 Größenausschluss-Chromatographie (SE-Chromatographie)

Die Größenausschluss-Chromatographie (SE-C, size exclusion-chromatography) ermöglicht die Berechnung des Molekulargewichts; diese Methode wird zur Analyse im Oligomer- und Polymerbereich verwendet.

Polysaccharide können entsprechend ihrem hydrodynamischen Volumen, welches mit der molaren Masse korreliert, aufgetrennt werden. Je höher das Molekulargewicht ist, desto früher erfolgt demnach auch die Elution des Polysaccharids.¹⁹

Das verwendete SE-C Säulensystem (Pharmacia System) ist ein 4-Säulensystem aus Toyopearl 40S, Superose 6, Superdex 200 und Toyopearl HW 40S.

Es wurden SE-Chromatogramme vom gesamten Heteropolysaccharid vor, sowie nach der Trennung in neutrales und saures Polysaccharid erstellt.

Hierfür wurden je 500µg der jeweiligen Probe (Heteropolysaccharid, neutrales und saures Polysaccharid) in einem 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß (PP (Art.Nr.9409310)) eingewogen und in 500µl des Eluenten, 0,05M NaCl-Lösung, gelöst.

Die Proben wurden am Vortex homogenisiert und zentrifugiert, um eventuelle feste Bestandteile nicht in die SE-C-Anlage zu injizieren.

Mithilfe einer Glasspritze (Hamilton) wurden rund 350µl der zu injizierenden Probe aufgezogen, 300µl wurden luftblasenfrei in das System injiziert.

Um zu verhindern, dass sich Salz in der Säule ablagert, musste stets mit Aqua bidestillata nachgespült werden.

Ebenso wurden von den unter Punkt 2.1.4.2 beschriebenen „Oligosaccharid“-Fraktionen SE-Chromatogramme erstellt.

Die „Oligosaccharid“-Fraktionen wurden zu je 10mg in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen, in 1ml 0,05M NaCl-Lösung gelöst, am Vortex homogenisiert und injiziert. (siehe Punkt 3.3.1, Abbildungen 4 und 5)

Die Elutionsrate der Polysaccharide betrug bei einem Druck von 2,0bar rund 0,6ml/min.

Mit der CODAWIN Software (CODAWIN, a.h.group, Graz) wurden die einzelnen Peaks in den SE-Chromatogrammen genauer analysiert und hinsichtlich des Molekulargewichts und der Polydispersität untersucht.

Als Standard wurde ein SE-Chromatogramm einer Mischung von Dextranen und Glucose aufgenommen. (siehe Punkt 3.6, Abbildung 9).

Zur Interpretation der einzelnen Peaks durch Integration mittels der CODAWIN Software wurden folgende Parameter herangezogen:

- M_wGewichtsmittel des Molekulargewichtes
- M_nZahlenmittel des Molekulargewichtes
- dp (degree of polymerisation)...Polymerisationsgrad
Berechnung: $M_w/162$ (162 ist das Molekulargewicht der Anhydroeinheit von Hexosen)
- dpw ...Gewichtsmittel
- dnp ...Zahlenmittel
- M_w/M_n ...Polydispersitätsgrad(-index)

Bei $M_w/M_n=1$ ist das Molekül monodispers z.B. Glukose hat ein $M_w=180$ und $M_n=180$).

Je größer der Polydispersitätsgrad ist, umso breiter ist die Verteilung des Molekulargewichts.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ausbeuten an Heteropolysaccharid nach Dialyse bzw Ausfällung

Wie unter Punkt 2.1.4 beschrieben, wurde die 1.Charge von *Hyptis* und *Ocimum* nach der Neutralisation dialysiert, die 2.Charge aber ausgefällt.

In Tabelle 1 sind die Ausbeuten der beiden Chargen gegenübergestellt.

Tabelle 1 Gegenüberstellung Dialyse - Ausfällung

	Ausgangsmenge (g)	Ausbeute in g (%) Charge1 (dialysiert)	Ausbeute (%) Charge2 (ausgefällt)
<i>Hyptis</i> NaOH	5	2,15 (43%)	
	5		1,51 (30,2%)
<i>Hyptis</i> KOH	5	1,14(22,8%)	
	5		1,79 (35,8%)
<i>Ocimum</i> NaOH	5	1,59 (31,8%)	
	5		1,86 (37,2%)
<i>Ocimum</i> KOH	5	1,23 (24,6%)	
	5		1,73 (34,6%)

Wie unter Punkt 2.1.4 beschrieben, wurde von den 1.Chargen *Hyptis/Ocimum* KOH je etwa 1/3 des Probenvolumens analog der 2.Charge ausgefällt.

Demnach können die in Tabelle 1 dargestellten Werte der NaOH, nicht aber der KOH–Fraktionen für einen 1:1 Vergleich herangezogen werden.

Wie in Tabelle 1 ersichtlich, ist die Dialyse zwar nur bedingt effizienter als die Ausfällungen, wenn man aber bedenkt, dass nach den Ausfällungen der Methanolrest nur sehr mühsam entfernt werden kann und in diesem Fall die

ausgefällten Proben nachträglich ebenso dialysiert wurden, ist die Dialyse den Ausfällungen doch vorzuziehen.

3.2 Freisetzung der Heteropolysaccharide mit Pectinase

Verglichen mit der Freisetzung des wasserlöslichen Heteropolysaccharids mit Alkalien ist die Freisetzung mit Pectinase, wie unter Punkt 2.2 beschrieben, wesentlich unkomplizierter, schneller und auch in der Ausbeute vorteilhaft.

Die Freisetzung mit Pectinase dauerte insgesamt nur 6 Tage, verglichen dazu beträgt die Freisetzungsdauer mit Alkalien allein 4 Tage, die nachfolgenden Schritte wie Neutralisation und Dialyse nehmen ebenso einige Tage in Anspruch.

In Tabelle 2 werden die Ausgangsmengen und Ausbeuten der Extraktion mit Alkalien mit den Ausbeuten der Freisetzung mit Pectinase gegenübergestellt:

Tabelle 2 Gegenüberstellung Ausbeuten Extraktion mit Alkalien / mit Pectinase

	Ausgangsmenge (g)	Ausbeute in g (%)
Extraktion mit Alkalien		
<i>Hyptis</i> (beide Fraktionen)	20	6,31 (31,55%)
<i>Ocimum</i> (beide Fraktionen)	20	6,41 (32,05%)
Freisetzung mit Pectinase		
<i>Hyptis</i>	4	1,69 (42,25%)
<i>Ocimum</i>	4	1,68 (42,0%)

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, kann durch Freisetzung mit Pectinase deutlich mehr Polysaccharid gewonnen werden, als bei der Extraktion mit Alkalien.

Da die Aufarbeitung der Mucilagen mit Pectinase einfacher handhabbar ist als die vielstufige und zeitintensive Extraktion mit Alkalien, kann die enzymatische Behandlung der Mucilagen für weitere Arbeiten empfohlen werden.

3.3 Untersuchung der „Oligosaccharid“-Fraktionen mittels SE-C und DC

Von den durch Aceton-Ausfällungen (siehe Punkt 2.1.4.2) gewonnenen „Oligosaccharid“-Fraktionen wurden SE-Chromatogramme und ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt.

3.3.1 SE-C der „Oligosaccharid“ – Fraktion

In Abbildung 4 ist das SE-Chromatogramm der potentiellen „Oligosaccharidfraktion“ von *Ocimum basilicum* zu sehen.

Zwischen 60 und 70ml ist deutlich ein sehr großer Peak sichtbar (siehe Pfeil).

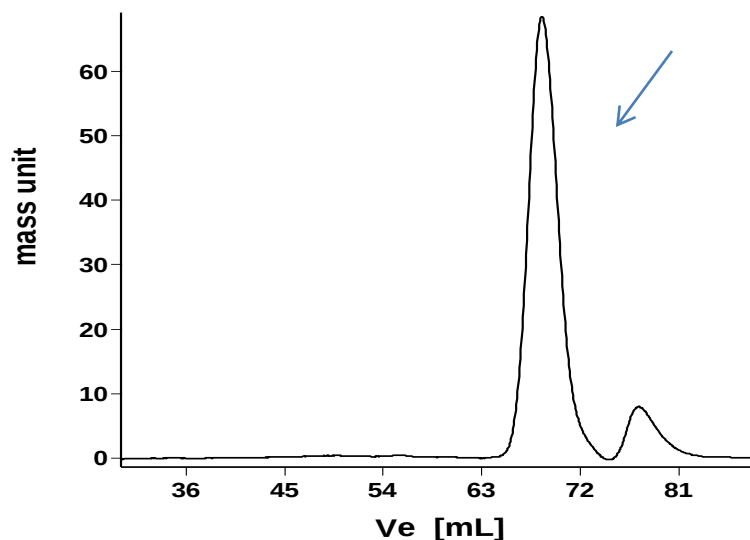


Abbildung 4 SE-C „Oligosaccharidfraktion“ von *Ocimum* (Mucilage)

In Abbildung 5 ist das SE-Chromatogramm der „Oligosaccharidfraktion“ von *Hyptis suaveolens* zu sehen, auch in diesem Chromatogramm ist ein Peak zwischen 60 und 70ml zu erkennen.

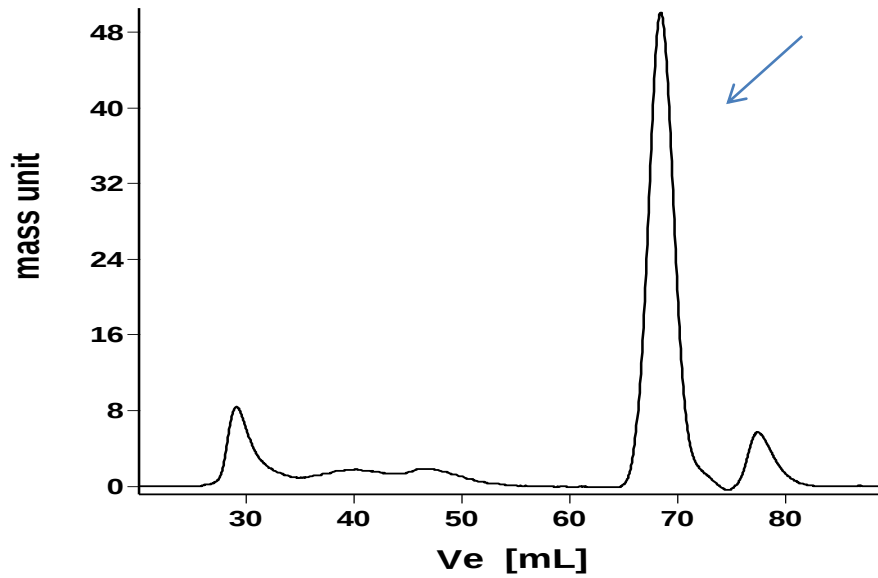


Abbildung 5 SE-C „Oligosaccharidfraktion“ von *Hyptis* (Mucilage)

3.3.2 DC der „Oligosaccharid“-Fraktionen

Um die Ergebnisse dieser SE-Chromatogramme besser interpretieren zu können, wurde parallel zu den Aufnahmen ein DC angefertigt. (siehe Abbildung 6)

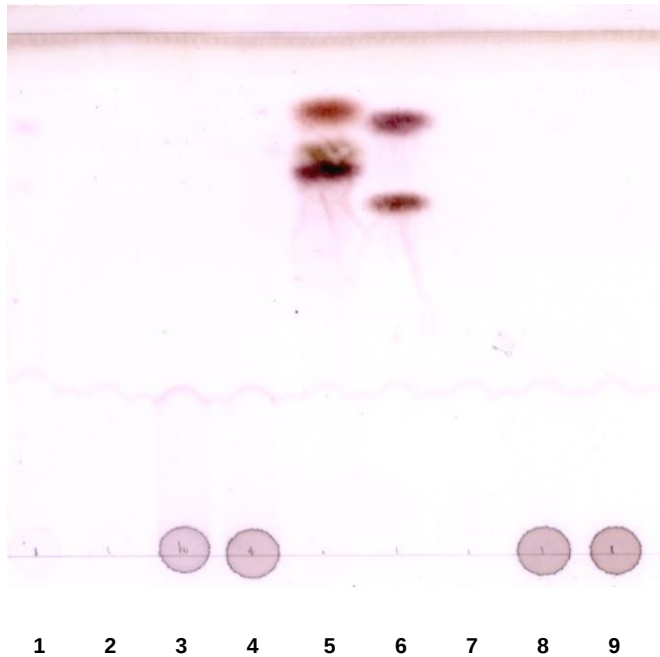


Abbildung 6 DC "Oligosaccharid“-Fraktionen

- Bande 1 *Ocimum* KOH „Oligosaccharidfraktion“
- Bande 2 *Ocimum* NaOH „Oligosaccharidfraktion“
- Bande 3 *Ocimum* NaOH GPS (dialys.)
- Bande 4 *Ocimum* KOH GPS(dialys.)
- Bande 5 Standard 1: Mannose, Galactose u. Maltose in Methanol
- Bande 6 Standard 2: Glucose, Lactose in Methanol
- Bande 7 *Hyptis* KOH „Oligosaccharidfraktion“
- Bande 8 *Hyptis* KOH GPS(dialys.)
- Bande 9 *Hyptis* NaOH GPS(dialys.)

Auf der DC Platte sind außer den Standards und den im Oligosaccharid-Fließmittel nicht gewanderten dialysierten Heteropolysacchariden (GPS) keine Banden zu finden, die auf das Vorhandensein von Oligosacchariden hindeuten würden.

Demnach konnte der in den SE-Chromatogrammen aufgetretene Peak als „Salzpeak“ zugeordnet werden, die „Oligosaccharid“-Fraktionen enthalten also nur Salze, welche bei der Ausfällung ausgefallen waren, aber keine Oligosaccharide.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Mucilagen entweder gar keine höheren Oligosaccharide enthalten, oder dass die Mucilagen bei der Herstellung in Thailand so gereinigt wurden, dass dabei die Oligosaccharide verloren gingen.

3.4 Fraktionierung der Heteropolysaccharide

3.4.1 Batchverfahren

Wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben gestaltete sich das waschen der DEAE-Cellulose auf der Nutsche als schwierig, weil die DEAE-Cellulose die Poren des Filterpapiers verklebte und somit ein Absaugen des in Lösung vorliegenden neutralen Polysaccharids unmöglich machte.

Auch das händische Abpipettieren des Überstands und Zentrifugieren war nicht geeignet, da Reste der DEAE-Cellulose, an welcher das saure Polysaccharid gebunden war, in den Zentrifugenröhrchen zurückblieben und die Verluste des Materials zu groß waren.

Die durch das händische Auswaschen des neutralen Polysaccharids entstandenen Volumina von mehr als 400ml Formiatpuffer waren sehr unhandlich für eine Ausgangsmenge von 200mg GPS, die vollständige Abtrennung des neutralen Polysaccharids war nicht möglich.

Die Versuche mit dem Batchverfahren wurden abgebrochen, da es mit DEAE-Cellulose als Ionenaustauscher bzw. mit den verwendeten Puffersystemen nicht funktionierte, und der Verlust an Probenmaterial viel zu groß war.

3.4.2 Präparative Säulenchromatographie

Wie bereits unter Punkt 2.3.2 beschrieben, wurde das Heteropolysaccharid in neutrales und saures Polysaccharid mittels präparativer Säulenchromatographie aufgetrennt.

3.4.3 Vergleich der beiden Säulenmaterialien

Um den für die präparative Trennung notwendigen Aufwand vergleichen zu können, wurden 2 Trennungen genau dokumentiert.

Auf der DEAE-Cellulose Säule wurde *Hyptis* KOH mit einer Einwaage von 757,85mg aufgetragen.

Nach einer Vorlaufzeit von 30min wurde in den Fraktionen 4-11 (jeweils ca. 12ml) neutrales Polysaccharid nachgewiesen.

Nach Umstellen auf den höher konzentrierten 0,35M Formiatpuffer wurde in den Fraktionen 28-116 saures Polysaccharid nachgewiesen.

Im Vergleich dazu wurden auf der Fractogel®-Säule 269,81mg *Ocimum* KOH aufgetragen.

In den Fraktionen 2-10 war neutrales Polysaccharid nachweisbar, das saure Polysaccharid war in den Fraktionen 13-17 enthalten.

**Tabelle 3 Vergleich DEAE-Cellulose/Fractogel® Auftrennungsleistung/
Zeitaufwand**

	Einwaage (mg)	Neutrales PS (mg)	Saures PS (mg)	Zeitaufwand (inkl. Regeneration)
DEAE- Cellulose	757,85	210,77 (27,81%)	302,03 (39,85%)	Rund 4 Arbeitstage
Fractogel®	269,81	80,90 (29,98%)	101,24 (37,52%)	7h

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, ist Fractogel® wesentlich effizienter in Trennleistung und Zeitaufwand als die DEAE-Cellulose.

Auch im Hinblick auf die Regeneration des Säulenmaterials erweist sich Fractogel® als wesentlich „sparsamer“, verglichen mit der DEAE-Cellulose Säule (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 Regeneration der Säulenmaterialien im Vergleich

	DEAE–Cellulose	Fractogel®
0,05M Ammoniak-Lösung	500ml	50ml
0,02M Ameisensäure	290ml	50ml
0,005M Formiatpuffer (pH6)	500ml	100ml

Durch Gegenüberstellung der Volumina, welche für die Regeneration jeweils benötigt werden, sowie des Zeitaufwandes, der aus Tabelle 3 ersichtlich ist, kann gezeigt werden, dass Fractogel® als Anionenaustauscher doch um einiges besser für mehrfache Auftrennungen geeignet ist als DEAE-Cellulose.

DEAE-Cellulose selbst ist ein eher instabiles Material, welches sich für häufige Trennungen als ungeeignet erwiesen hat. Die Trennleistung wurde bei jedem Trenngang schlechter und auch die Dauer der Trennung stieg stetig an.

Mit DEAE-Cellulose wurde fast ausschließlich die Mucilage von *Hyptis* aufgetrennt, nur eine Trennung der Mucilage von *Ocimum* NaOH erfolgte auf der DEAE-Cellulose-Säule. Mit der Fractogel®-Säule wurde ausschließlich die Mucilage von *Ocimum* aufgetrennt.

Leider zeigte sich im DC nach der sauren Hydrolyse, dass die Trennung mit der DEAE–Cellulose Säule nicht wie erwartet verlaufen ist und deshalb Reste des neutralen im sauren Polysaccharid von *Hyptis* nachweisbar waren und umgekehrt. (siehe Punkt 3.5.2)

3.5 DC nach saurer Hydrolyse

Um die Monosaccharid-Zusammensetzung der Polysaccharide untersuchen zu können, wurde wie unter Punkt 2.4.1 beschrieben, eine saure Hydrolyse des GPS mit 2M Trifluoressigsäure durchgeführt.

Wie unter Punkt 2.4.2.2 wurde nach der sauren Hydrolyse ein DC zur Analyse der Monosaccharid-Zusammensetzung angefertigt.

Die jeweiligen Standards wurden gewählt, da diese bereits in einer früheren Diplomarbeit an der Universität Wien²⁰ genauer charakterisiert wurden und für die Identifizierung der Monosaccharide als besonders geeignet empfunden wurden.

3.5.1 Monosaccharid-Zusammensetzung der Mucilage von *Ocimum basilicum*

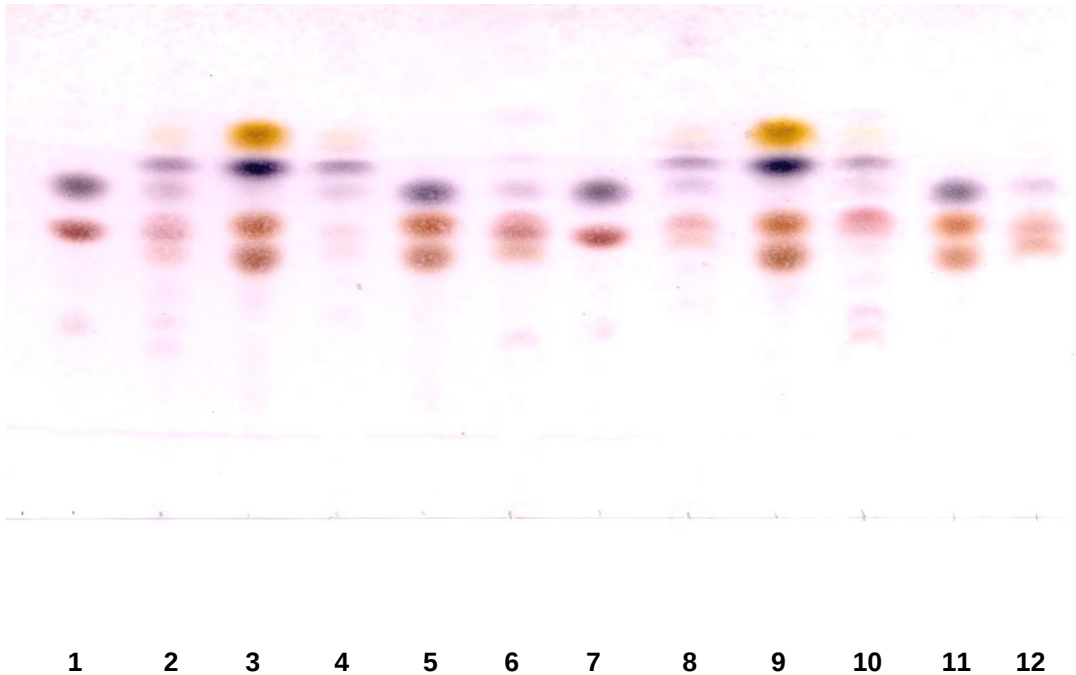


Abbildung 7 Monosaccharidzusammensetzung der Mucilage von *Ocimum*

- Bande 1: Standard 2 (Arabinose, Glukose, Glucuronsäure, 1mg/ml Methanol) (von oben nach unten)
- Bande 2: *Ocimum* gesamtes Heteropolysaccharid NaOH
- Bande 3: Standard 1 (Rhamnose, Xylose, Mannose, Galactose, 1mg/ml Methanol)
- Bande 4: *Ocimum* sauer NaOH
- Bande 5: Standard 3 (Arabinose, Mannose, Galactose, 1mg/ml Methanol)
- Bande 6: *Ocimum* neutral NaOH
- Bande 7: Standard 2
- Bande 8: *Ocimum* gesamtes Heteropolysaccharid KOH
- Bande 9: Standard 1
- Bande 10: *Ocimum* sauer KOH
- Bande 11: Standard 3
- Bande 12: *Ocimum* neutral KOH

Anhand der 3 verwendeten Standards ist eine Zuordnung der einzelnen Banden und somit eine Identifikation der Monosaccharide möglich.

Im sauren Polysaccharid der Mucilage von *Ocimum basilicum* (Banden 4 und 10) wurden Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose und Glucuronsäure nachgewiesen.

Im neutralen Polysaccharid der Mucilage von *Ocimum* (Banden 6 und 12) wurden Arabinose, Mannose, Glucose und Galactose nachgewiesen.

Die Monosaccharid-Zusammensetzung von *Ocimum* wurde bereits in früheren Diplomarbeiten untersucht und konnte auch dieses Mal bestätigt werden.²¹

Genaue Details bezüglich der Verknüpfungen der Monosaccharide sind weiterhin unbekannt.

Da die *Ocimum* Fraktionen ausschließlich auf der Fractogel®-Säule aufgetrennt wurden, konnte mit diesem DC nachgewiesen werden, dass die Trennung des Heteropolysaccharids in neutrales und saures Polysaccharid vollständig war.

Anmerkung: Die in Standard 2 verwendete Glucuronsäure ist nur sehr schwach sichtbar.

3.5.2 Monosaccharid-Zusammensetzung der Mucilage von *Hyptis suaveolens*

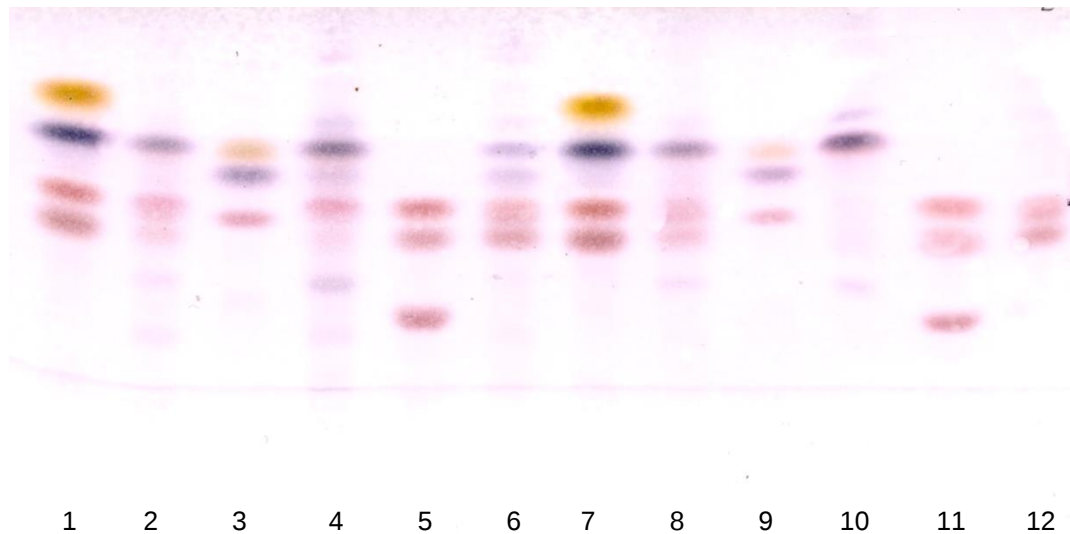


Abbildung 8 Monosaccharidzusammensetzung der Mucilage von *Hyptis*

- Bande 1: Standard 1 (Rhamnose, Xylose, Mannose, Galactose, 1mg/ml Methanol)
- Bande 2: *Hyptis* Gesamtes Heteropolysaccharid NaOH
- Bande 3: Standard 4 (Fucose, Arabinose, Glukose, Galakturonsäure, 1mg/ml Methanol)
- Bande 4: *Hyptis* sauer NaOH
- Bande 5: Standard 5 (Galactose, Mannose, Maltose, 1mg/ml Methanol)
- Bande 6: *Hyptis* neutral NaOH
- Bande 7: Standard 1
- Bande 8: *Hyptis* Gesamtes Heteropolysaccharid KOH
- Bande 9: Standard 4
- Bande 10: *Hyptis* sauer KOH
- Bande 11: Standard 5
- Bande 12: *Hyptis* neutral KOH

In Abbildung 8 ist die Monosaccharid-Zusammensetzung von *Hyptis suaveolens* nach erfolgter saurer Hydrolyse zu sehen.

Auf den Banden 4 und 10 ist das saure Polysaccharid von *Hyptis* zu sehen. Die genaue Monosaccharid-Zusammensetzung vom neutralen und sauren Polysaccharid von *Hyptis* wurde im Rahmen einer Dissertation an der Universität Wien bereits genau untersucht.

Demnach enthält das saure *Hyptis*-Polysaccharid Fucose, Xylose und 4-O-Methylglucuronsäure, und das neutrale Polysaccharid Mannose, Galactose und Glucose.²²

Im sauren Polysaccharid von *Hyptis*-NaOH wurden Xylose und 4-O- Methylglucuronsäure (nur sehr schwach sichtbar) gefunden.

Bande 6 zeigt die neutrale Fraktion von *Hyptis*-NaOH nach saurer Hydrolyse. Es wird hier deutlich, dass die Trennung mit der DEAE-Cellulose Säule nicht optimal verlaufen ist, denn es sind Banden von Xylose und Fucose sichtbar, die eigentlich nur im sauren Polysaccharid von *Hyptis* auftreten.

Das saure Polysaccharid der KOH-Fraktion von *Hyptis* wurde auf Bande 10 aufgetragen. Hier war die Trennung besser als bei der NaOH Fraktion, im sauren Polysaccharid wurden Xylose und ganz schwach sichtbar auch 4-O-Methylglucuronsäure nachgewiesen.

Im neutralen Polysaccharid von *Hyptis* wurden Galactose, Glucose und Mannose gefunden; Mannose in etwas geringerer Konzentration im Vergleich mit den anderen zwei Monosacchariden.

Auch das neutrale Polysaccharid von *Hyptis* KOH wurde, wie auf Bande 12 ersichtlich, vollständig getrennt. Hier sind, verglichen mit Bande 6, keine „Reste“ des sauren Polysaccharides erkennbar.

Wie in Abbildung 8 deutlich ersichtlich ist, war die Trennung in neutrales und saures Polysaccharid bei den Natrium-Fractionen der Mucilage von *Hyptis* nicht erfolgreich.

Da diese Fraktionen auf der DEAE Cellulose Säule gewonnen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Länge dieser Säule zu lang gewählt war und die Trennleistung daher auch durch das häufige Brechen des Säulenmaterials stetig abnahm.

Wäre die DEAE-Cellulose Säule nur 10-15cm lang gewesen und hätte sie dafür einen größeren Durchmesser gehabt, wäre sicherlich eine bessere Trennleistung und somit eine höhere Ausbeute erzielt worden.

Generell besitzt Fractogel® eine höhere mechanische Stabilität und ermöglicht eine optimale Trennung der Polysaccharide über einen längeren Zeitraum hinweg.

3.6 SE-Chromatogramme und Größendimensionen

Wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben, wurden von GPS, neutralem und saurem Polysaccharid SE-Chromatogramme aufgenommen.

Um das Molekulargewicht der Polysaccharide abschätzen zu können, wurde eine Mischung verschiedener Dextrane mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Glucose in einer Konzentration von jeweils 3mg/ml als Standardmischung²³ verwendet:

Dextran 670	(MG: 40 1300g/mol)
Dextran 150	(MG: 21400g/mol)
Dextran 12	(MG 9890g/mol)
Dextran 1	(MG 1080g/mol)
Glucose als Monosaccharid	(MG: 180g/mol)

Abbildung 9 zeigt ein SE-Chromatogramm (Elutionsprofil) dieser Standardmischung bei einer Elutionsrate von 0,6ml/min und einem Druck von 2,0bar.

Glucose hat ein so geringes Molekulargewicht, dass es im SE-Chromatogramm nicht sichtbar ist.

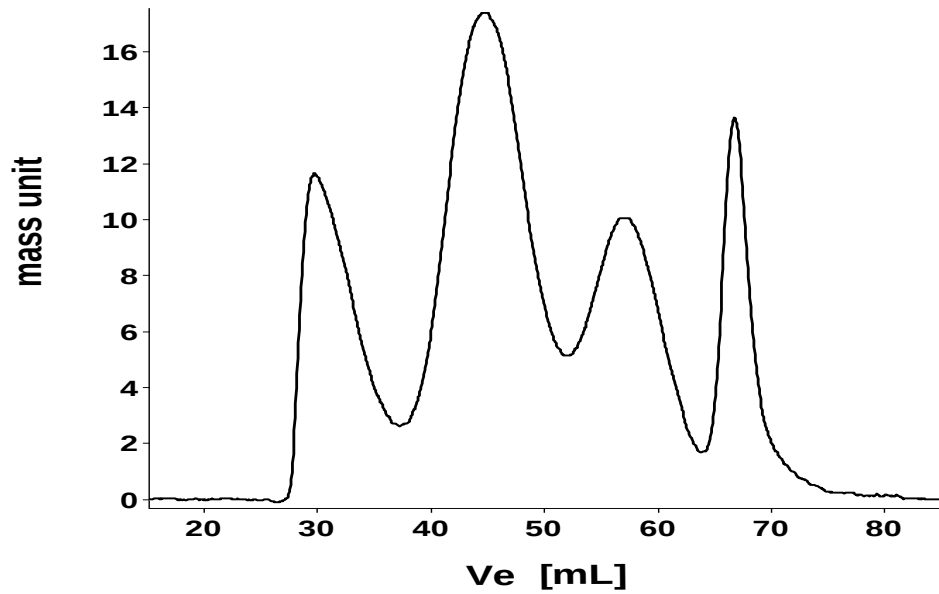


Abbildung 9 SE-Chromatogramm der Standardmischung

Aus dem Maximum der Elutionsprofile wurde unter Verwendung der CODAWIN Software die Kalibrierung des Säulensystems durchgeführt und zur Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung der Heteropolysaccharide herangezogen.

In den folgenden Abbildungen sind die SE-Chromatogramme der Mucilagen von *Ocimum* KOH, *Hyptis* KOH und den Polysacchariden, welche mit Pectinase freigesetzt wurden, dargestellt.

3.6.1 SE-Chromatogramme von *Ocimum basilicum*

In Abbildung 10 ist das SE-Chromatogramm des dialysierten Heteropolysaccharids der Mucilage von *Ocimum basilicum* der KOH Fraktion zu sehen.

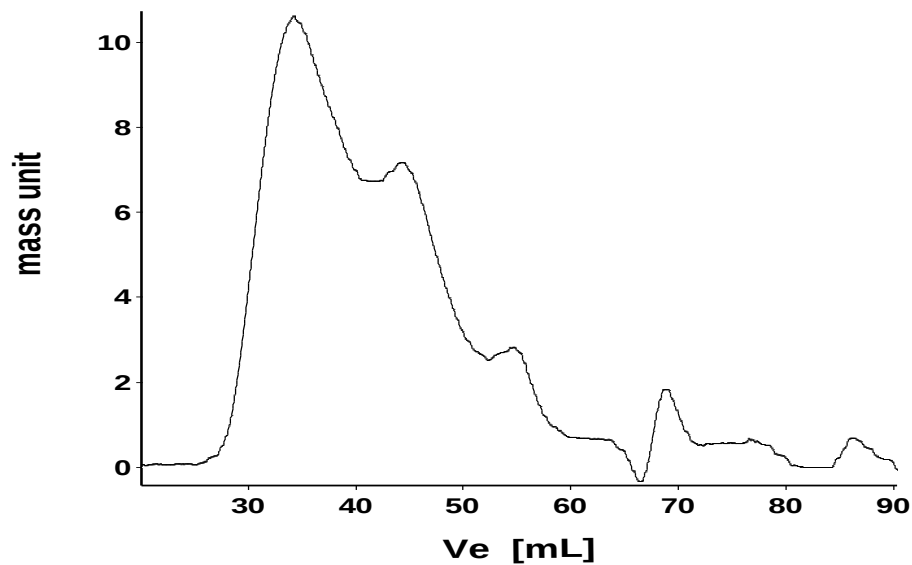


Abbildung 10 SE-C von *Ocimum* (Mucilage), KOH Fraktion, GPS

Die SE-Chromatogramme wurden zur Charakterisierung und Bestimmung des Molekulargewichts mit den Kalibrierungsstandards verglichen.

In Abbildung 11 ist das gesamte Heteropolysaccharid der Mucilage von *Ocimum* zu sehen, die Skala zeigt hier den Logarithmus des Molekulargewichts. Außerdem ist hier zu beachten, dass die Kurve als Spiegelbild zur eigentlichen Aufnahme des Heteropolysaccharids (siehe Abbildung 10) vorliegt.

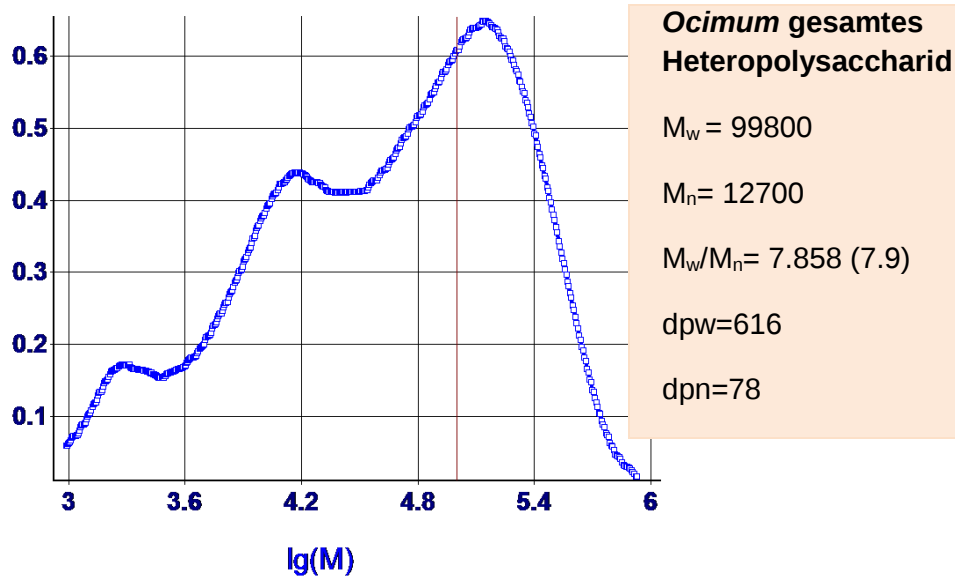


Abbildung 11 SE-C von *Ocimum* (Mucilage), KOH, GPS (log)

Das berechnete Molekulargewicht beträgt demnach für das Heteropolysaccharid von *Ocimum* 99800g/mol, der Polydispersitätsgrad (M_w/M_n) beträgt rund 7,9.

In der Abbildung 12 wurden die SE-Chromatogramme von saurem und neutralem Polysaccharid der Mucilage von *Ocimum* KOH übereinander gelegt, um die Verteilung besser darstellen zu können.

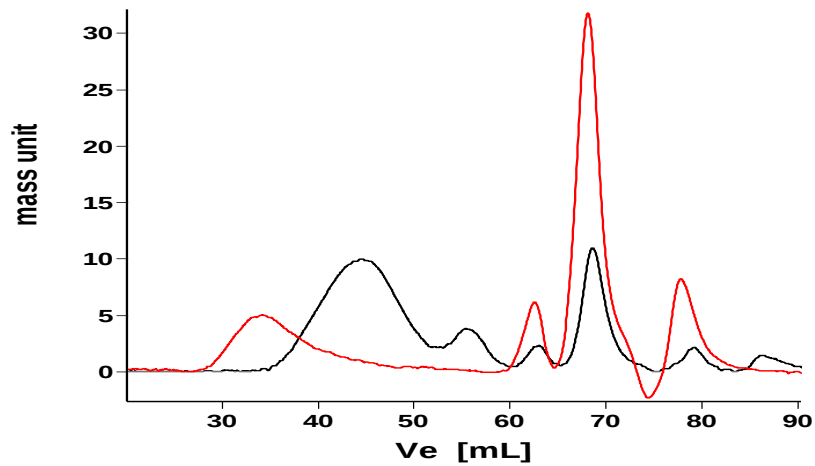


Abbildung 12 SE-C von *Ocimum* (Mucilage) KOH neutral/sauer

Die rote Kurve zeigt hier das saure Polysaccharid, die schwarze Kurve zeigt das neutrale Polysaccharid von *Ocimum*.

In Abbildung 13 ist die Molekulargewichtsverteilung des neutralen Polysaccharids der Mucilage von *Ocimum* zu sehen, auch hier ist die Kurve spiegelverkehrt zum eigentlichen SE-Chromatogramm (Abbildung 12, Trennung erfolgt von hochmolekularen zu niedermolekularen Anteilen).

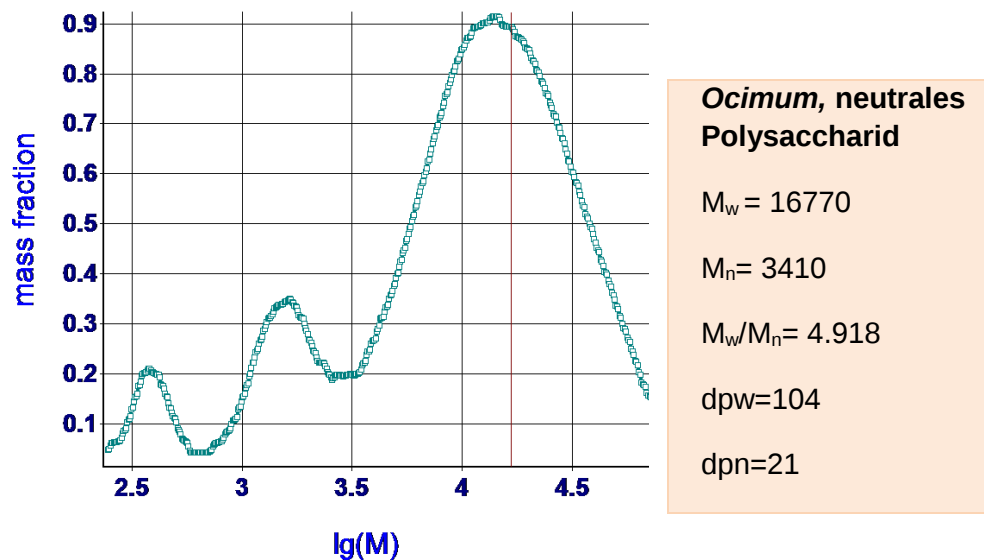
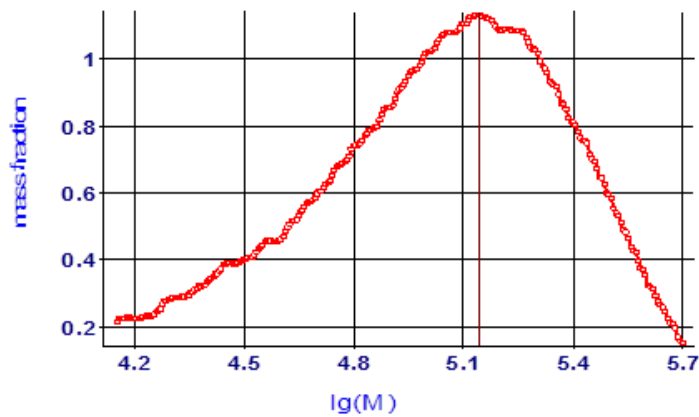


Abbildung 13 SE-C von *Ocimum* (Mucilage) KOH neutral (log)

Das errechnete mittlere Molekulargewicht beträgt für das neutrale Polysaccharid 16770g/mol, der Polydispersitätsgrad beträgt rund 4,9.

Abbildung 14 zeigt das SE-C des sauren Polysaccharids der Mucilage von *Ocimum*, wieder in der log-Skala, das errechnete Molekulargewicht beträgt hier 138510g/mol und der Polydispersitätsgrad nur noch 1,9.



***Ocimum*, saures
Polysaccharid**

$M_w = 138510$

$M_n = 72550$

$M_w/M_n = 1.909$ (1.9)

$dpw = 855$

$d_{pn} = 448$

Abbildung 14 SE-C *Ocimum* (Mucilage) KOH sauer (log)

Vergleicht man die Molekulargewichte von neutralem und saurem Polysaccharid, wird auch klar, warum das saure Polysaccharid früher eluiert wird, als das neutrale.

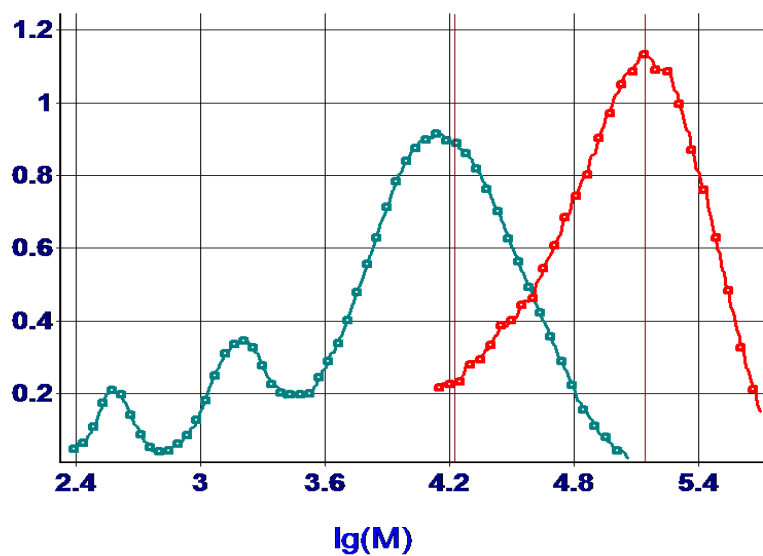


Abbildung 15 SE-C *Ocimum* (Mucilage) neutral/sauer (log)

In Abbildung 15 ist die Verteilung zwischen neutralem und saurem Polysaccharid in der log-Skala übereinandergelegt. Die grüne Kurve stellt das neutrale, die rote Kurve das saure Polysaccharid der Mucilage von *Ocimum* dar.

3.6.2 SE-Chromatogramme der Mucilage von *Hyptis suaveolens*

Abbildung 16 zeigt das SE-Chromatogramm des dialysierten Heteropolysaccharids der Mucilage von *Hyptis* (KOH-Fraktion).

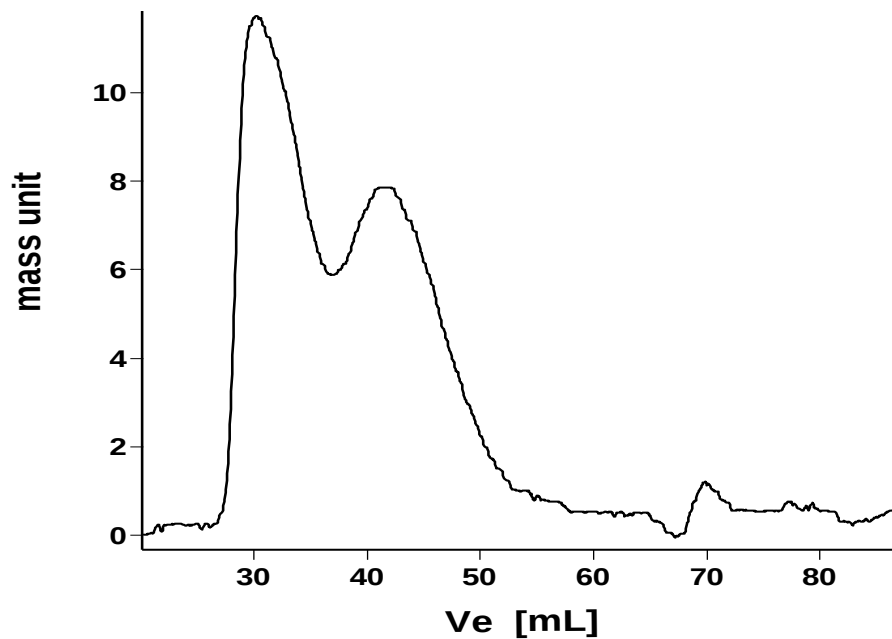
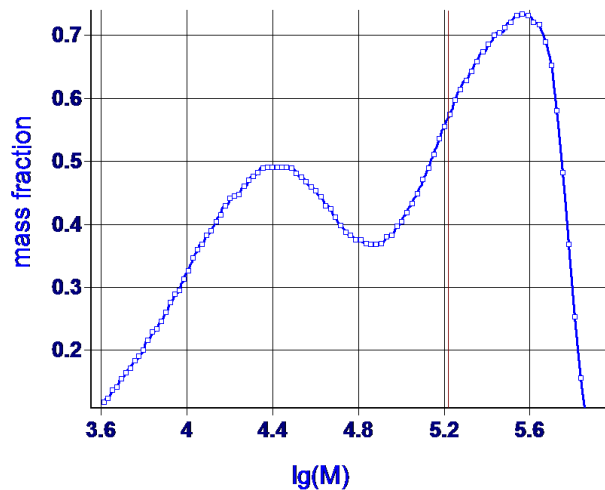


Abbildung 16 SE-C von *Hyptis* (Mucilage), KOH, GPS

Auch hier wurde zur Berechnung des Molekulargewichts ein Vergleich mit den Standards durchgeführt.



**Heteropolysaccharid
Hyptis gesamt**

$M_w = 167320$

$M_n = 31010$

$M_w/M_n = 5.396$ (5.4)

$dpw = 1033$

$dnp = 191$

Abbildung 17 SE-C von *Hyptis* (Mucilage), GPS, KOH (log)

Durch Darstellung des Chromatogrammes in der log-Skala (Abbildung 17) konnte ein Molekulargewicht von 167320g/mol errechnet werden. Bei *Hyptis* beträgt der Polydispersitätsgrad des Heteropolysaccharids außerdem rund 5,4.

Abbildung 18 zeigt die SE-Chromatogramme von neutralem und saurem Polysaccharid der Mucilage von *Hyptis* übereinander gelegt. Die rote Kurve zeigt auch hier das saure Polysaccharid von *Hyptis*, die schwarze Kurve stellt das neutrale Polysaccharid von *Hyptis* dar.

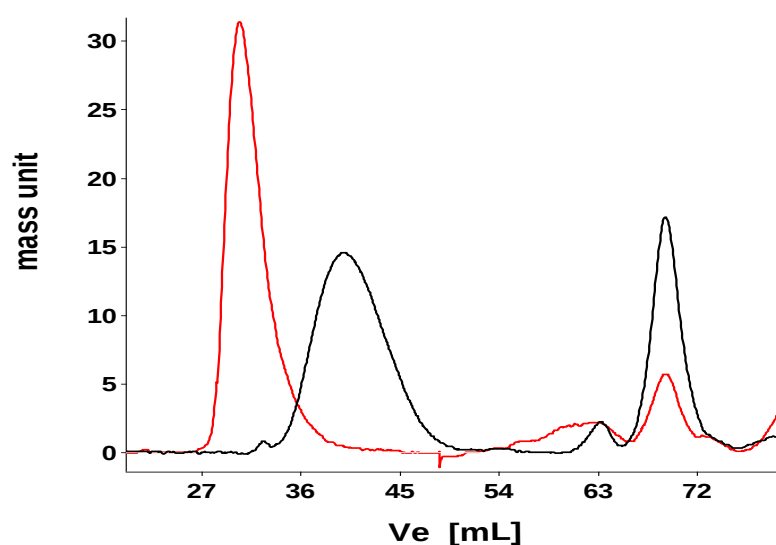


Abbildung 18 SE-C von *Hyptis* (Mucilage), KOH neutral/sauer

Abbildung 19 zeigt die Molekulargewichtsverteilung des neutralen Polysaccharids der Mucilage von *Hyptis* KOH in der log-Skala, das mittlere Molekulargewicht beträgt hier 33290g/mol, der Polydispersitätsgrad 1,4.

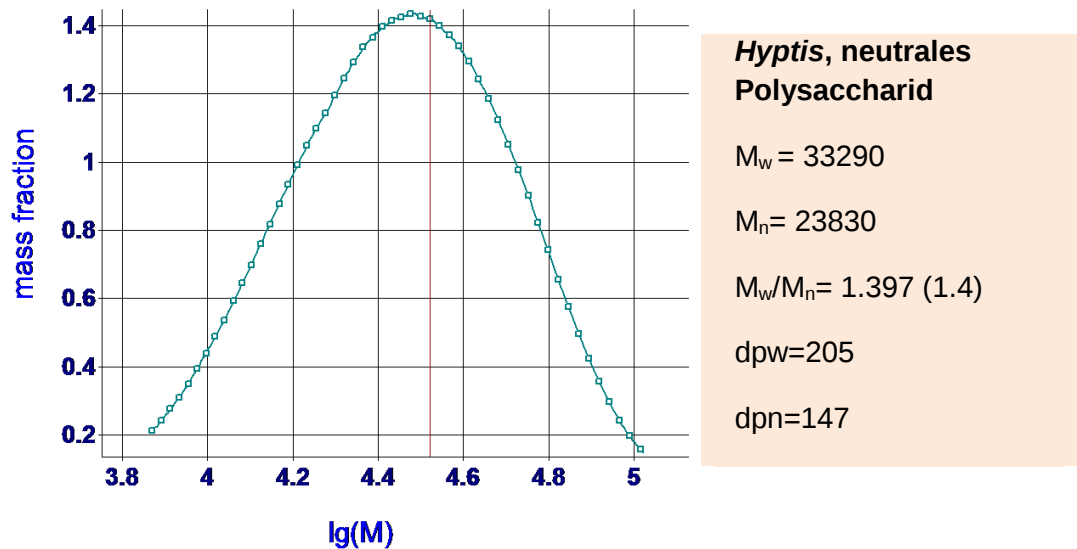


Abbildung 19 SE-C von *Hyptis* (Mucilage), KOH, neutrales PS (log)

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 20 die Molekulargewichtsverteilung des sauren Polysaccharids der Mucilage von *Hyptis* KOH dargestellt, das mittlere Molekulargewicht wurde mit 315500g/mol und der Polydispersitätsgrad mit 1,2 ermittelt.

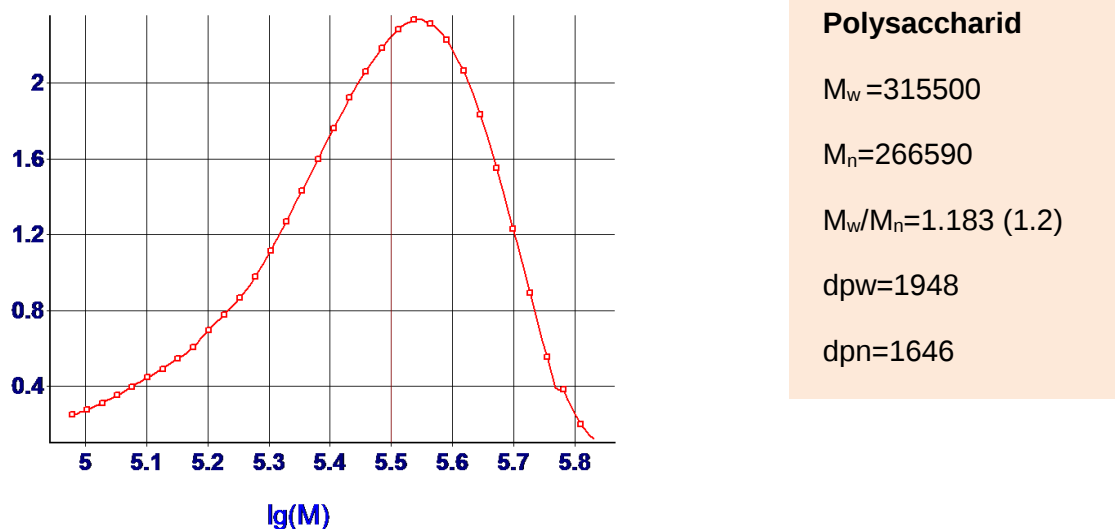


Abbildung 20 SE-C von *Hyptis* (Mucilage), KOH saures PS (log)

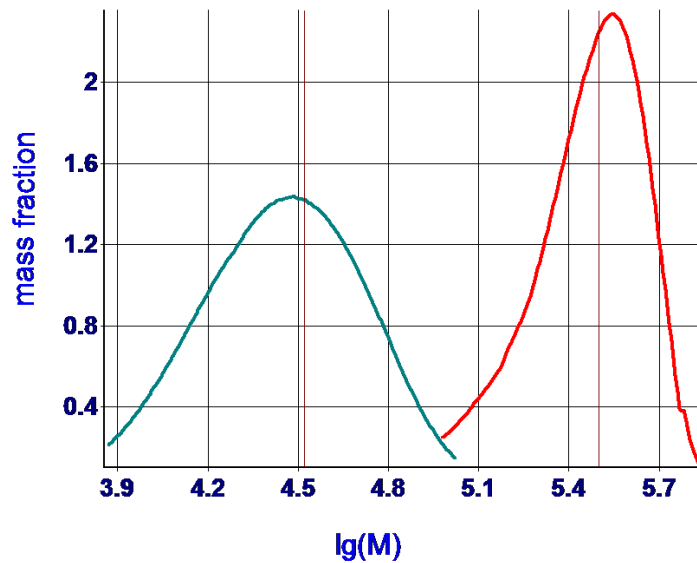


Abbildung 21 SE-C von *Hyptis* (Mucilage), KOH neutral/sauer, (log)

Bei der Freisetzung mit Alkalien beträgt das Verhältnis zwischen neutralem und saurem Polysaccharid rund 1:1.

3.6.3 SE-Chromatogramme der mit Pectinase freigesetzten Heteropolysaccharide

Neben den SE-Chromatogrammen der Alkaliextraktionen von *Ocimum* und *Hyptis* wurden auch die mittels Pectinase freigesetzten Heteropolysaccharide der Mucilage von *Hyptis* und *Ocimum* mittels SE-Chromatographie untersucht.

Abbildung 22 zeigt das SE-Chromatogramm der mittels Pectinase aus der Mucilage von *Hyptis* freigesetzten Heteropolysaccharide.

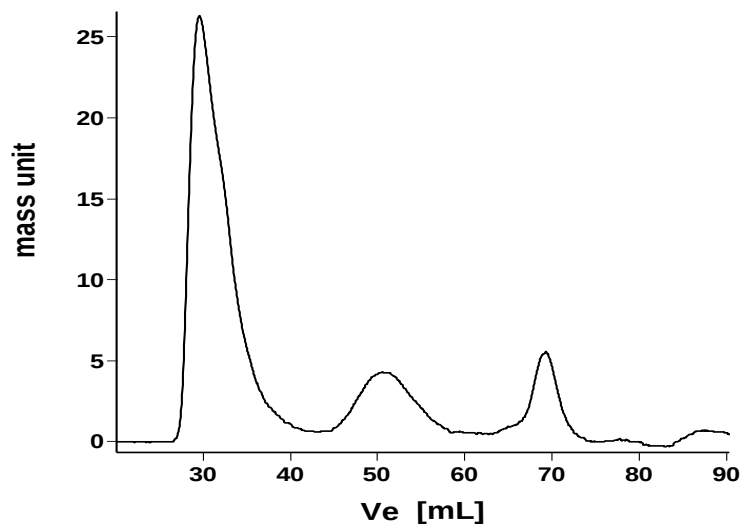


Abbildung 22 SE-C *Hyptis* (Mucilage) gesamt, mit Pectinase freigesetzt

Das Verteilungsmuster ist hier im Vergleich zu den Heteropolysaccharid-Aufnahmen der KOH-Fractionen von *Hyptis* und *Ocimum* doch sehr unterschiedlich. Das Verhältnis zwischen saurem und neutralem Polysaccharid beträgt bis zu 5:1.

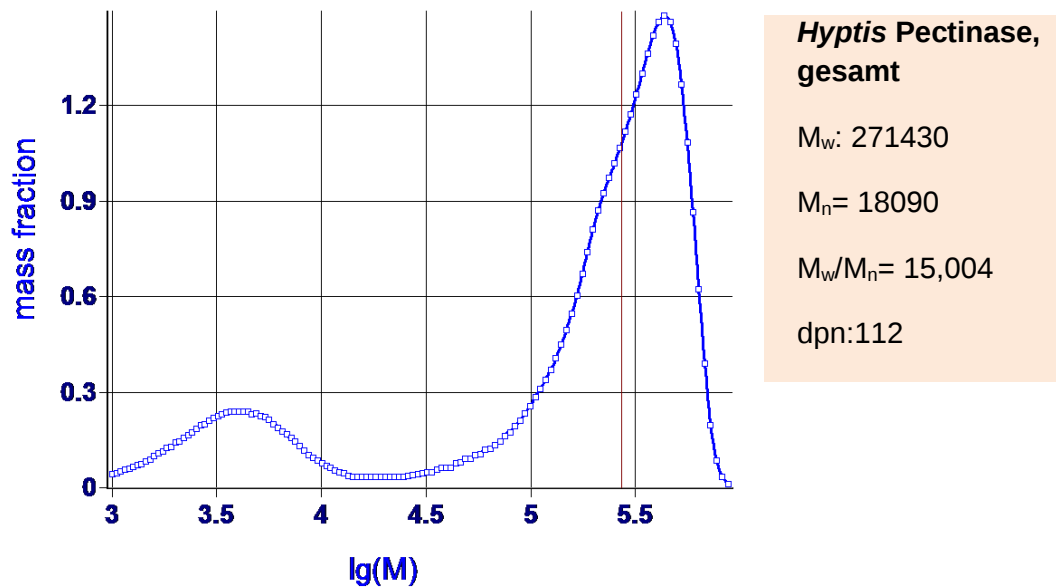


Abbildung 23 SE-C gesamtes Polysaccharid von *Hyptis*, Pectinase (log)

Das mittlere Molekulargewicht des Heteropolysaccharids nach Freisetzung mit Pectinasen liegt bei 271440g/mol. Verglichen mit dem Molekulargewicht von *Hyptis* KOH, welches bei 167320g/mol liegt, ist doch ein Unterschied erkennbar.

Es wurde, ausgehend von Abbildung 22, mithilfe der CODAWIN Software auch der Anteil vom neutralen und sauren Polysaccharid nach Freisetzung mit Pectinase integriert. (siehe Tabelle 5)

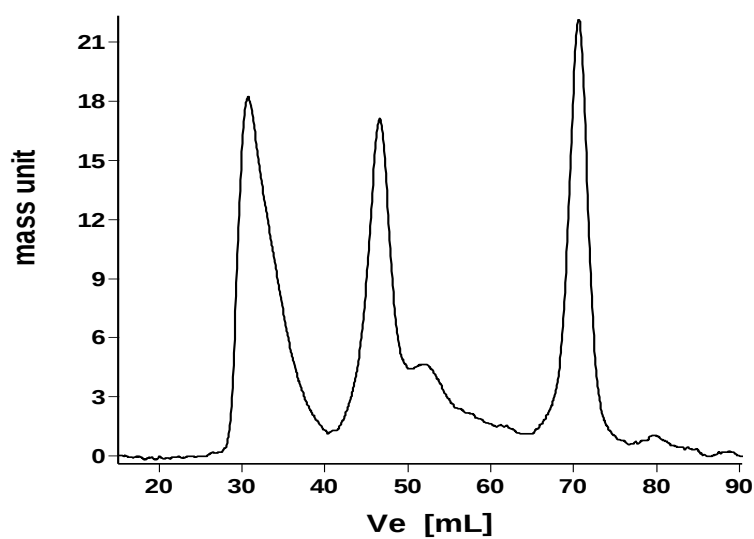
Tabelle 5 Molekulargewicht/Polydispersitätsgrad von neutralem und saurem PS von *Hyptis* (mit Pectinase freigesetzt)

Saures PS von <i>Hyptis</i> , Pectinase	Neutrales PS von <i>Hyptis</i> , Pectinase
M_w :331010	M_w :4470
M_n :234650	M_n :3260
M_w/M_n :1,41	M_w/M_n :1,37 (1,4)
dpw:2043	dpw:28

Das saure Polysaccharid von *Hyptis* weist demnach ein mittleres Molekulargewicht von 331010g/mol und einen Polydispersitätsindex von 1,35 auf.

Das neutrale Polysaccharid hat ein Molekulargewicht von 4470g/mol, der Polydispersitätsgrad beträgt hier 1,4.

Auch das in Abbildung 24 sichtbare SE-Chromatogramm der mittels Pectinase aus der Mucilage von *Ocimum* freigesetzten Polysaccharide weist ein anderes Verteilungsmuster auf.



***Ocimum* Pectinase,
gesamt**

M_w : 141210

M_n : 12680

(M_w/M_n) : 11,136

dpw: 872

dpn: 78

Abbildung 24 SE-C von *Ocimum* (Mucilage), gesamtes PS, Pectinase

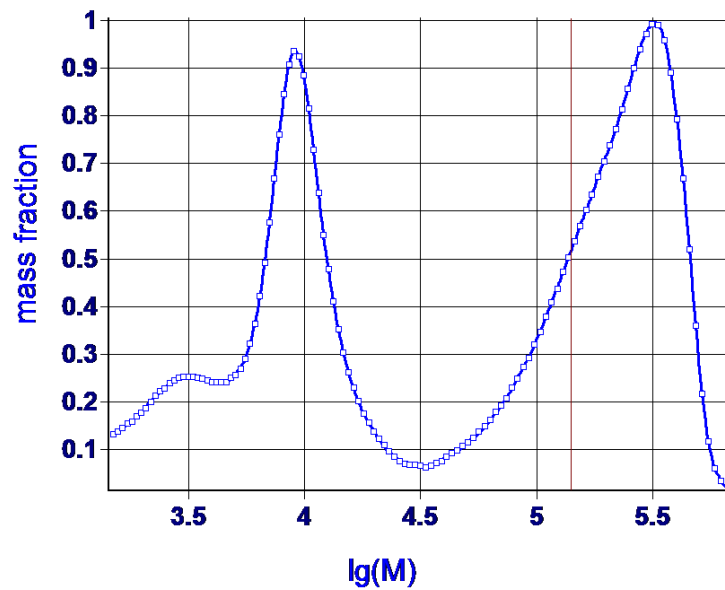


Abbildung 25 SE-C von *Ocimum* (Mucilage), GPS, Pectinase, (log)

Da noch nicht bekannt ist, was die Pectinase hier spaltet und ob diese Spaltungsreaktionen des Heteropolysaccharids auf Haupt-, oder Nebenaktivitäten der Pectinase zurückzuführen sind, muss dies in weiteren Arbeiten genauer untersucht werden.

In den Abbildungen 23 und 25 sieht man allerdings jetzt schon, dass der Polydispersitätsgrad bei den Freisetzungen mit Pectinasen doch viel niedriger ist, als bei der Freisetzung mit Alkalien. Die Polysaccharide sind demnach weniger polydispers.

4. Ausblick

Die in dieser Diplomarbeit durchgeführte Gewinnung von Heteropolysacchariden mit Pectinase zeigte wesentlich mehr Effizienz in der Ausbeute an Heteropolysacchariden, verglichen mit der bereits bekannten Freisetzung mit Alkalien.

Auch in den SE-Chromatogrammen der mit Pectinase freigesetzten Heteropolysaccharide zeigte sich ein sehr interessantes Verteilungsprofil zwischen saurem und neutralem Polysaccharid, welches auf jeden Fall weiter untersucht werden muss.

In weiteren Versuchen sollte daher mit Pectinase gearbeitet werden, um mehr Klarheit zu schaffen, was die Pectinase während der Freisetzung genau bewirkt.

Auch die genauen Verknüpfungen der Monosaccharide müssen mit geeigneten Analysemethoden weiter untersucht werden, um ein genaues Strukturmodell der Polysaccharide entwerfen zu können.

5. Summary

The mucilages from *Hyptis suaveolens* and *Ocimum basilicum* were treated with sodium and potassium hydroxides or with pectinase to extract the acidic and neutral heteropolysaccharides. Extraction with pectinase was more effective and faster than with alkali.

Furthermore, it could be shown, that column chromatography is necessary to separate the heteropolysaccharides. DEAE-cellulose and Fractogel® were tried to prepare the neutral and acidic polysaccharides.

Precipitation experiments were performed to examine the mucilages for content of oligosaccharides, but thin layer chromatography and size exclusion chromatography did not show the presence of oligosaccharides.

In the pectinase-treated fractions, size exclusion chromatography showed ratios of ca. 1:5 between the neutral and acid polysaccharides, different from the alkali-treated preparations, where the distribution is ca. 1:1. The effect of pectinase action on the mucilages requires further investigation.

6. Zusammenfassung

Die Mucilagen von *Hyptis suaveolens* und *Ocimum basilicum* wurden sowohl mit Alkalien als auch mit Pectinase extrahiert, wobei gezeigt werden konnte, dass die Extraktion mit Pectinase wesentlich effizienter und schneller ist, als die Freisetzung mit Alkalien.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Methode der Säulenchromatographie unverzichtbar für die Trennung der Heteropolysaccharidfraktionen in neutrales und saures Polysaccharid ist.

Es wurden Ausfällungsversuche durchgeführt, um feststellen zu können, ob die Mucilagen auch Oligosaccharide enthalten. Mittels DC und SE-C konnte dies allerdings nicht verifiziert werden.

Die mittels Pectinase freigesetzten Heteropolysaccharide zeigten allerdings bei den SE-Chromatogrammen ein sehr interessantes Verteilungsmuster von neutralem und saurem Polysaccharid, welche hier in etwa im Verhältnis 1:5 vorliegen.

Für nachfolgende Arbeiten und Experimente sollte daher unbedingt weiter mit Pectinase gearbeitet werden, um mehr Details über die genauen Effekte der Pectinase auf die Mucilagen zu gewinnen.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	<i>Hyptis suaveolens</i>	6
Abbildung 2	<i>Ocimum basilicum</i>	7
Abbildung 3	Struktur von DEAE-Cellulose	18
Abbildung 4	SE-C „Oligosaccharidfraktion“ von <i>Ocimum</i> (Mucilage)	29
Abbildung 5	SE-C „Oligosaccharidfraktion“ von <i>Hyptis</i> (Mucilage).....	30
Abbildung 6	DC "Oligosaccharid"-Fraktionen.....	31
Abbildung 7	Monosaccharidzusammensetzung der Mucilage von <i>Ocimum</i>	37
Abbildung 8	Monosaccharidzusammensetzung der Mucilage von <i>Hyptis</i>	39
Abbildung 9	SE-Chromatogramm der Standardmischung	43
Abbildung 10	SE-C von <i>Ocimum</i> (Mucilage), KOH Fraktion, GPS	44
Abbildung 11	SE-C von <i>Ocimum</i> (Mucilage), KOH, GPS (log).....	45
Abbildung 12	SE-C von <i>Ocimum</i> (Mucilage) KOH neutral/sauer	46
Abbildung 13	SE-C von <i>Ocimum</i> (Mucilage) KOH neutral (log)	47
Abbildung 14	SE-C <i>Ocimum</i> (Mucilage) KOH sauer (log).....	48
Abbildung 15	SE-C <i>Ocimum</i> (Mucilage) neutral/sauer (log).....	48
Abbildung 16	SE-C von <i>Hyptis</i> (Mucilage), KOH, GPS	49
Abbildung 17	SE-C von <i>Hyptis</i> (Mucilage), GPS, KOH (log)	50
Abbildung 18	SE-C von <i>Hyptis</i> (Mucilage), KOH neutral/sauer	50
Abbildung 19	SE-C von <i>Hyptis</i> (Mucilage), KOH, neutrales PS (log)	51
Abbildung 20	SE-C von <i>Hyptis</i> (Mucilage), KOH saures PS (log)	51
Abbildung 21	SE-C von <i>Hyptis</i> (Mucilage), KOH neutral/sauer, (log).....	52

Abbildung 22	SE-C <i>Hyptis</i> (Mucilage) gesamt, mit Pectinase freigesetzt.....	53
Abbildung 23	SE-C gesamtes Polysaccharid von <i>Hyptis</i> , Pectinase (log).....	54
Abbildung 24	SE-C von <i>Ocimum</i> (Mucilage), gesamtes PS, Pectinase	55
Abbildung 25	SE-C von <i>Ocimum</i> (Mucilage), GPS, Pectinase, (log).....	56

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Gegenüberstellung Dialyse - Ausfällung	27
Tabelle 2	Gegenüberstellung Ausbeuten Extraktion mit Alkalien / mit Pectinase	28
Tabelle 3	Vergleich DEAE-Cellulose/Fractogel® Auftrennungsleistung/Zeitaufwand...	34
Tabelle 4	Regeneration der Säulenmaterialien im Vergleich	35
Tabelle 5	Molekulargewicht/Polydispersitätsgrad von neutralem und saurem PS von <i>Hyptis</i> (mit Pectinase freigesetzt)	54

9. Literaturverzeichnis

- 1 Hunnius, Pharmazeutisches Wörterbuch, 9. Auflage, de Gruyter, Berlin, 2004, S.882
- 2 HYPERLINK "<http://www.stuartxchange.org/SuobKabayoPDInsert.jpg>" (11.11.2012)
- 3 Peerzada, N. (1997) "Chemical Composition of the Essential Oil of Hyptis Suaveolens", Faculty of Science, Northern Territory University, Casuarina, Darwin, Northern Territory, Australia; Molecules, 1997, 2, p165-168
- 4 Singh, V., Shrivastava G., Shukla, S., Shukla, A., Pandey, V. : "Mosquito repellent activity of essential oils of Hyptis suaveolens" Journal of Pharmacy Research, 2011, Vol.4(8), 2778-2779
- 5 Wichtl, M., "Teedrogen und Phytopharmaka", 5. Auflage, wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009, S. 124-126
- 6 HYPERLINK "http://www.missouriplants.com/Whiteopp/Ocimum_basilicum_page.html" (11.11.2012) page by Dan Tenaglia, Auburn, AL.
- 7 Wichtl, M., "Teedrogen und Phytopharmaka", 5. Auflage, wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009, S. 124-126
- 8 Wichtl, M., „Teedrogen und Phytopharmaka“, 5. Auflage, wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009, S.124-.126
- 9 Wichtl, M., „Teedrogen und Phytopharmaka“, 5. Auflage, wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009, S.125: Auszug aus Monographie der Kommission E, BAnz Nr. 54 vom 18.03.1992
- 10 Persönliche Mitteilung von Prof. Praznik

-
- 11 Schorn, S.: „Enzymkatalysierte Spaltung der Polysaccharide aus den Samen von *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.“, 2009, Diplomarbeit an der Universität Wien, S.17
 - 12 Ehlers, E. Chemie 1 „Kurzlehrbuch Allgemeine und anorganische Chemie“, 8. Auflage, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2003, S.210
 - 13 “Where Bio Begins” Fa Sigma Life science, Prod. Of Novozyme Corp., S.1386-1387 [Zitat]
 - 14 “Where Bio Begins” Fa Sigma Life science, Prod. Of Novozyme Corp., S.1386-1387 [Zitat]
 - 15 HYPERLINK
”<http://www.sigmaaldrich.com/large/structureimages/22/mfcd00146622.png>” (20.9.2013)
 - 16 Persönliche Mitteilung von Prof. Praznik
 - 17 {HYPERLINK “http://www.merckmillipore.de/pharmaceutical-ingredients/fractogel/-c_XRmb.s1OY_sAAAEoDPY71veP”}20.09.2013
 - 18 Ondrovics, A.: „Enzymkatalysierte Spaltung des Polysaccharides aus *Ocimum basilicum* Linn var. citratum“, 2008, Diplomarbeit an der Universität Wien, S.9
 - 19 Trathnigg, B.: “Size-exclusion Chromatography of Polymers”, *Karl-Franzens-University, Graz, Austria, p1-2*, in Meyers, R., “Encyclopedia of Analytical chemistry”, 2000, Wiley&Sons, Chichester, p 8008-8034
 - 20 Wenig, L.: „Präbiotische Polysaccharide aus *Ocimum basilicum*: Trennung und Charakterisierung der alkalilöslichen Fraktion unter Einsatz von Anionen-Austausch-Chromatographie“, 2008, Diplomarbeit an der Universität Wien, S.25
 - 21 Ondrovics, A.: „Enzymkatalysierte Spaltung des Polysaccharides aus *Ocimum basilicum* Linn var. citratum“, 2008, Diplomarbeit an der Universität Wien, S.21

-
- 22 Torabi, M.: „Polysaccharide aus KARAYA-GUMMI, *Sterculia lychnophora* und *Hyptis suaveolens*. Strukturen, enzymkatalysierte Spaltung und präbiotische Aktivität“, 2011, Dissertation an der Universität Wien, S. 56
- 23 Torabi, M.: „Polysaccharide aus KARAYA-GUMMI, *Sterculia lychnophora* und *Hyptis suaveolens*. Strukturen, enzymkatalysierte Spaltung und präbiotische Aktivität“, 2001, Dissertation an der Universität Wien, S.39

Lebenslauf



Daniela Brandstätter

Persönliche Angaben	Staatsangehörigkeit: Österreich Familienstand: ledig
Ausbildung	1995-1999 Volksschule St. Pölten-Wagram 1999-2007 BORG St. Pölten WS 2007: Beginn des Pharmaziestudiums an der Uni Wien
Sprachkenntnisse	Deutsch, Englisch, Französisch
Bisherige Berufserfahrungen	
August 2007:	Ferialjob im Landeskrankenhaus St. Pölten
Juli 2008:	Anstaltsapotheken Landeskrankenhaus St. Pölten
August 2008:	Fa. Herba Chemosan, Wien
Juli 2009:	Apotheken Böheimkirchen
August 2009:	Nibelungenapotheken, Herzogenburg
ab Dez. 2009:	Anstellung in der Christophorus Apotheken, St. Pölten-Wagram
Juli 2010:	Praktikum in der Christophorus Apotheken, St. Pölten-Wagram
September 2010:	Praktikum in der NÖ Landesregierung (Archiv)
1.4.2011-31.5.2013:	Anstellung in der Apotheken „Alte Remise“ in 1160 Wien
Februar 2013:	Öffentlichkeitsarbeit „Bleib Aktiv“ Messe
seit Juni 2013:	Anstellung in der Apotheken Süd, St. Pölten

St. Pölten, im Dezember 2013

Daniela Brandstätter