



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Phytochemische Untersuchungen der
wasserlöslichen Anteile eines Methanolextraktes
aus *Justicia secunda* VAHL (Acanthaceae)“

verfasst von

Stefanie Istvanits

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Danksagung

Ich danke Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

Ein großes Dankeschön geht an meine Betreuerinnen Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter und DI Barbara Theiler: danke für die nette, kompetente Betreuung, eure Geduld und für das interessante Diplomarbeitssthema!

Herrn Dr. Martin Zehl möchte ich für die Vermessungen auf der LC-MS und Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban für die Durchführung der NMR-Analysen danken.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Glasl-Tazreiter/Reznicek/Krenn für die familiäre Atmosphäre und die wertvollen Tipps im Rahmen der Methodenkonzeption.

Der wohl größte Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben, mich stets in jeder Situation meines Lebens unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht auch an Jakob, der seit Beginn meines Studiums immer hinter mir steht: danke für dein Verständnis, deine Geduld und vor allem für deine motivierenden und aufmunternden Worte, ohne die ich wohl nie so weit gekommen wäre!

Außerdem bedanke ich mich bei allen Verwandten, Freunden und vor allem bei Evi, einer ganz besonderen Studienkollegin.

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeiner Teil.....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Problemstellung und Zielsetzungen.....	3
2. Material und Methoden	4
2.1 Pflanzenmaterial.....	4
2.2 Extrakterstellung.....	6
2.3 Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)	8
2.3.1 Präparative HPTLC	13
2.3.2 Nachweis auf Zucker und Tannine.....	14
2.3.3 Phytochemischer Fingerprintvergleich von JS EC und JS FG	16
2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	18
2.5 Säulenchromatographie (SC)	21
2.6 α -Glucosidase-Inhibitions-Assay	26
2.6.1 Aktivitätsvergleich der Materialien JS EC und JS FG	31
2.6.2 Testung der Mutterfraktionen aus JS EC	32
2.6.3 Testung der aus der SC an Polystyrol gewonnenen-Fractionen .	33
2.7 Strukturaufklärung	35
2.7.1 Massenspektrometrie (MS).....	35
2.7.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Vergleich der Pflanzenmaterialien JS EC und JS FG	37
3.1.1 Fingerprintvergleich von JS EC und JS FG	37
3.1.2 Aktivitätsvergleich von JS EC und JS FG im α -Glucosidase- Inhibitions-Assay.....	42

3.2	Untersuchungen der Mutterfraktionen aus JS EC.....	45
3.2.1	Testung auf Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay	45
3.2.2	Resultate der HPTLC-Analyse	47
3.2.3	Resultate der HPLC-Analyse.....	50
3.3	Nachweis auf Zucker und Tannine.....	51
3.4	Zuckerabtrennung – Untersuchungen der Fraktionen V1-V7.....	54
3.4.1	Resultate der DC-Analyse	54
3.4.2	Resultate der HPLC-Analyse.....	56
3.4.3	Testung auf Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay	57
3.5	Untersuchungen der aktiven Fraktionen V4 und V6.....	60
3.5.1	Resultate der HPLC-Analyse.....	61
3.5.2	Verifizierung der Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay	66
3.5.3	Isolierung der aktiven Verbindung SI1 aus Fraktion V4.....	70
3.6	Strukturaufklärung der aktiven Verbindungen aus den Fraktionen V4 und V6	71
3.6.1	Resultate der Massenspektrometrie.....	71
3.6.2	Resultate der NMR	76
4.	Diskussion	77
5.	Zusammenfassung	80
6.	Abstract.....	81
7.	Literaturverzeichnis	82
8.	Anhang	84
9.	Curriculum vitae	111

1. Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Justicia secunda VAHL gehört zur Familie der Acanthaceae, welche ca. 250 verschiedene Gattungen und 2500 Arten umfasst. *Justicia* stellt dabei mit etwa 600 Arten, welche vor allem in tropischen und subtropischen Gebieten zu finden sind, die größte Gattung der Familie dar. Bei *Justicia secunda* VAHL handelt es sich um eine krautige Pflanze, die bis zu zwei Meter hoch werden kann und vor allem in Wäldern und entlang von Bächen in Westindien, Panama und Kolumbien wächst. Die ovalen bis lanzettlichen Blätter sind gegenständig angeordnet und können bis zu 16,5 cm lang und bis zu 6,5 cm breit sein. Die thyrsoiden bis rispigen Blütenstände weisen eine Länge von 5-15 cm und eine Breite von bis zu 7 cm auf und setzen sich aus roten bis violetten Röhrenblüten zusammen. Die Blüten selbst gliedern sich in eine Ober- und eine etwas längere Unterlippe [1].



Abbildung 1: *Justicia secunda* VAHL

Quelle: Lugardo O. Espinoza Caisa,
Corporación Verde Azul, Ecuador



Abbildung 2: *Justicia secunda*

Habitus [1]

In der traditionellen Medizin einiger tropischer und subtropischer Länder werden vor allem wässrige Extrakte meist aus den Blättern aber auch aus allen Anteilen von *Justicia secunda* zur Behandlung unterschiedlichster Krankheiten und Beschwerden verwendet. In der Republik Côte d'Ivoire wird z.B. ein Wasser-Extrakt, hergestellt aus den Blättern dieser Pflanze volksmedizinisch zur Behandlung von Hypertonie eingesetzt [2]. Des Weiteren wird *Justicia secunda* im Kongo von Zeugen Jehovas, welche Bluttransfusionen streng ablehnen, zur Therapie von Anämie verwendet [3]. Von größtem Interesse für diese Arbeit ist jedoch die traditionelle Anwendung von *Justicia secunda* bei Diabetes. In Ecuador wird die Pflanze von den Einheimischen in Form eines Tees oder seltener auch in Form eines Schnapses zur Behandlung von Diabetes eingesetzt.

Diabetes mellitus stellt ein globales Gesundheitsproblem dar. Schätzungen zufolge leiden 180 Millionen Menschen weltweit an Diabetes mellitus Typ II, welcher früher auch als Adult-Onset-Diabetes bzw. Altersdiabetes bezeichnet wurde [4]. Während die Insulinersatztherapie die Hauptbehandlungsmethode bei Typ I darstellt, sind es vor allem Diät und Lebensstiländerung, welche bei Typ II einen essentiellen Teil der Behandlung ausmachen. Orale Antidiabetika, wie z.B. α -Glucosidase-Hemmer, spielen ebenfalls eine große Rolle in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II [5]. Diese Therapeutika hemmen die α -Glucosidase im Bürstensaum des Dünndarms und damit die Spaltung von Di- und Oligosacchariden. Daraus resultiert eine verzögerte Resorption von Kohlenhydraten, was wiederum zur Folge hat, dass vor allem postprandiale Hyperglykämien vermieden werden können [6]. Acarbose ist neben Miglitol der am weitesten verbreitete α -Glucosidase-Inhibitor, jedoch stellen die schweren gastrointestinalen Nebenwirkungen ein großes Problem in der Praxis dar. Dies ist auch der Grund für das steigende Interesse an spezifischen α -Glucosidase-Hemmern natürlichen Ursprungs in den letzten Jahren [7].

Justicia secunda VAHL könnte eine Quelle potentiell blutzuckersenkender Verbindungen darstellen, weshalb der Testung dieser Pflanze auf Aktivität im sogenannten α -Glucosidase-Inhibitions-Assay in dieser Arbeit eine zentrale Bedeutung zukommt.

1.2 Problemstellung und Zielsetzungen

Wie bereits erwähnt, geht es in der vorliegenden Diplomarbeit in erster Linie um die Testung verschiedener Extrakte und Fraktionen von *Justicia secunda* VAHL im sogenannten α -Glucosidase-Inhibitions-Assay. Dieser Assay dient zum Nachweis α -glucosidasehemmender und somit auch möglicher blutzuckersenkender Komponenten, welche als Ausgangsverbindungen für die Herstellung neuer α -Glucosidase-Inhibitoren zur Therapie von Diabetes mellitus Typ II dienen könnten.

Die primären Ziele für diese Arbeit waren also der Nachweis des α -glucosidasehemmenden Potentials, die Isolierung der aktiven Verbindungen und eine anschließende Strukturaufklärung jener Komponenten. Da das Material für diese Arbeit sowohl aus Ecuador als auch aus Französisch-Guyana stammte, war es außerdem wünschenswert, die beiden Materialien hinsichtlich ihres phytochemischen Fingerprints sowie ihres α -glucosidasehemmenden Potentials miteinander zu vergleichen.

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel wird erläutert, welches Pflanzenmaterial für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, woher es stammte und wie die Herstellung der verschiedenen Extrakte durchgeführt wurde. Weiters werden alle chromatographischen und spektroskopischen Methoden, die im Rahmen des analytischen und semi-präparativen Arbeitens zum Einsatz kamen, genauer beschrieben.

2.1 Pflanzenmaterial

Das in dieser Diplomarbeit verwendete Pflanzenmaterial stammte zum Großteil aus Ecuador. Die Koordinaten des Sammelortes für die im Jahr 2011 gesammelten Blätter von *Justicia secunda* lauten 0°56'30"S, 79°00'28"W (siehe Abbildung 3). Die Blätter wurden direkt vor Ort geschnitten und getrocknet.



Abbildung 3: Sammelort des Pflanzenmaterials aus Ecuador

Quelle: <http://gps0.de/maps>

Ein kleiner Teil getrockneter Blattdroge stammte auch aus Französisch-Guyana. Die Koordinaten des Sammelortes für die im Jahr 2012 gesammelten Blätter aus Französisch-Guyana lauten 04°56'57"N, 52°18'29"W (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Sammelort des Pflanzenmaterials aus Französisch-Guyana

Quelle: <http://gpsso.de/maps>

Beide Materialien werden in der Folge mit JS EC (*Justicia secunda* Ecuador) und JS FG (*Justicia secunda* Französisch-Guyana) abgekürzt.

2.2 Extraktherstellung

Da generell mehr Pflanzenmaterial aus Ecuador zur Verfügung stand als aus Französisch-Guyana, wurde bereits im Vorfeld, innerhalb der parallel zu dieser Diplomarbeit durchgeführten Dissertation von DI Barbara Theiler, ein spezielles Extraktionsschema (siehe Abbildung 5, Seite 7) mit *Justicia secunda* aus Ecuador erarbeitet [8].

Mutterfraktionen (JS M EC, JS P EC, JS C EC, JS B EC, JS H EC und JS OWE EC) aus JS EC

Im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler war ausgehend vom Material aus Ecuador ein Methanol-Extrakt hergestellt worden, welcher aufeinanderfolgend mit Petrolether, Dichlormethan, Butanol und Wasser ausgeschüttelt worden war (siehe Abbildung 5, Seite 7). Die dabei erhaltenen Mutterfraktionen werden in der vorliegenden Diplomarbeit mit JS M EC (Methanol-Extrakt), JS P EC (Petrolether-Fraktion), JS C EC (Dichlormethan-Fraktion), JS B EC (Butanol-Fraktion) und JS H EC (Wasser-Fraktion) abgekürzt. Parallel dazu war ausgehend vom Drogenmaterial aus Ecuador auch ein sogenannter Original-Wasser-Extrakt (abgekürzt als JS OWE EC), welcher die Darreichungsform eines Teegetränks und dessen anschließende Passage durch den Gastrointestinaltrakt simulieren sollte, hergestellt worden. Die bisher beschriebenen Extrakte und Fraktionen existierten im Vorfeld nur für das Material aus Ecuador, mit Ausnahme des methanolischen Extraktes, welcher ebenso mit der Blattdroge aus Französisch-Guyana im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler hergestellt und als JS M FG bezeichnet worden war [8].

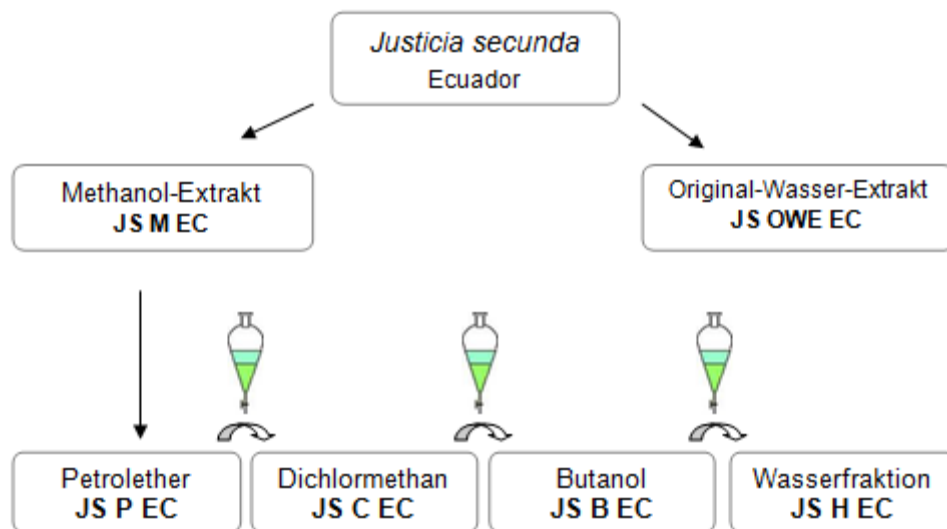


Abbildung 5: Extraktionsschema für *Justicia secunda* aus Ecuador [8]

Herstellung eines Original-Wasser-Extraktes (JS OWE FG) aus JS FG

Da ausgehend vom Material aus Französisch-Guyana bis dahin nur ein Methanol-Extrakt vorhanden war, wurde im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit zusätzlich ein OWE aus JS FG hergestellt, um den gewünschten Materialvergleich hinsichtlich der α -glucosidasehemmenden Aktivität durchführen zu können (siehe Kapitel 2.6.1., Seite 31). Dazu wurden 10 g pulverisierte Blattdroge von JS FG in einem Rundkolben mit 100 mL Wasser versetzt und zum Erreichen eines magenähnlichen sauren Milieus mit Trifluoressigsäure unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes auf pH 2 eingestellt. Um die Peristaltik nachzuahmen, wurde die eben bereitete Suspension für zwei Stunden bei 40°C im Rotationsverdampfer ohne Anlegen eines Vakuums bewegt. Anschließend wurde der Drogenrückstand durch Filtrieren abgetrennt, und das Filtrat mittels Lyophilisation zur Trockene gebracht. Die Ausbeute des OWEs betrug 3,27 g, was einem Droge-Extrakt-Verhältnis von 3:1 entspricht.

Für das praktische Arbeiten im Rahmen dieser Diplomarbeit kamen unterschiedlichste chromatographische und spektroskopische Methoden, welche auf den folgenden Seiten genauer erläutert werden, zum Einsatz.

2.3 Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochleistungs dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Dünnschichtchromatographie (DC)

Bei der DC handelt es sich, wie bei allen chromatographischen Methoden, um ein chemisch-physikalisches Verfahren, das zur Auftrennung komplexer Stoffgemische eingesetzt werden kann [9]. Das Prinzip der DC beruht auf der Verteilung der Komponenten eines Stoffgemischs zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Im Falle der DC stellt, wie der Name bereits vermuten lässt, die stationäre Phase eine dünne Schicht dar, die auf einem geeigneten Trägermaterial aus z.B. Glas oder Aluminium aufgetragen ist. Als stationäre Phase kommen in der Praxis vor allem Kieselgel, Aluminiumoxid, aber auch Cellulose zum Einsatz. Die mobile Phase setzt sich, angepasst an die Polarität der zu trennenden Komponenten, meist aus einem Gemisch verschiedenster Lösungsmittel zusammen. Die zu untersuchende Probelösung wird mithilfe einer Kapillare am unteren Teil der Platte aufgetragen und nach Verdampfen des Lösungsmittels in eine mit mobiler Phase gefüllte Entwicklungskammer gestellt. Durch die Kapillarkräfte wandert die mobile Phase langsam zum oberen Ende der Platte und nimmt dabei, je nach Wechselwirkung mit der stationären Phase und dem Lösungsmittel, die einzelnen Komponenten unterschiedlich weit mit [10].

Die klassische DC wurde in dieser Diplomarbeit für die Qualitätsüberprüfung von Extrakten und Fraktionen eingesetzt.

Bei den verwendeten Platten handelte es sich generell um DC-Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ aus Glas der Firma MERCK. Für den phytochemischen Fingerprintvergleich der beiden Materialien JS EC und JS FG (siehe Kapitel 2.1, Seite 4) kamen jedoch ausschließlich qualitativ hochwertige HPTLC-Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ aus Glas der Firma MERCK zum Einsatz (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 16).

Zur Auswertung wurde jede fertig entwickelte DC-Platte sowohl unter Tageslicht als auch unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 366 nm betrachtet. So konnten Verbindungen, die UV-Strahlung bei 254 nm absorbieren oder unter UV-Strahlung bei 366 nm zur Eigenfluoreszenz angeregt werden, detektiert werden. Um bestimmte Substanzklassen zu detektieren, wurden die Platten nach der Entwicklung in der jeweiligen mobilen Phase (siehe Tabelle 1, Seite 9) häufig mit geeigneten Sprüh- bzw. Tauchreagenzien behandelt (siehe Tabelle 2, Seite 10).

Tabelle 1: Für die DC verwendete stationäre und mobile Phasen

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F ₂₅₄ MERCK	
Mobile Phasen:	
System 1	Chloroform-Methanol-Wasser (60-40-10)
System 2	Chloroform-Methanol-Wasser (70-30-4)
System 3	Ethylacetat-konz. Ameisensäure-konz. Essigsäure-Wasser (100-11-11-26)
System 4	Dichlormethan-Methanol-konz. Essigsäure-Wasser (20-6-10-4)
System 5	Toluol-Ethylacetat (95-5)
System 6	n-Butanol-konz. Essigsäure-Wasser (66-17-17)
System 7	Acetonitril-Wasser-konz. Ameisensäure (30-8-2)

Es kamen unterschiedlichste Reagenzien zum Einsatz, um Verbindungen, welche weder bei Tages-, noch bei UV-Licht detektiert werden konnten, sichtbar zu machen (siehe Tabelle 2, Seite 10). Diese wurden entweder direkt auf die fertig entwickelte DC-Platte gesprüht oder mithilfe einer Tauchvorrichtung der Firma CAMAG auf die Platte aufgebracht.

Tabelle 2: Reagenzien zur Detektion im Rahmen der DC

Reagenz 1: Naturstoffreagenz A		
Zusammensetzung / Herstellung	Detektierbare Stoffklasse	Auswertung
Diphenylborsäure- β -aminoethylesterlösung (1% in Methanol)	Flavonoide	UV 366 nm
Reagenz 2: Eisen(III)-Chlorid-Reagenz		
Zusammensetzung / Herstellung	Detektierbare Stoffklasse	Auswertung
Eisen(III)-Chloridlösung (1-5% in 0,5 N Salzsäure)	Phenole	100°C Tageslicht
Reagenz 3: Zucker-Reagenz		
Zusammensetzung / Herstellung	Detektierbare Stoffklasse	Auswertung
0,5 g Diphenylamin in 0,5 mL Anilin lösen, 20 mL Aceton und 4 mL 85%ige Phosphorsäure zusetzen	Zucker	100°C Tageslicht
Reagenz 4: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz		
Zusammensetzung / Herstellung	Detektierbare Stoffklasse	Auswertung
425 mL Methanol mit 50 mL konz. Essigsäure und 25 mL konz. Schwefelsäure versetzen und zuletzt 2,5 mL Anisaldehyd zugeben	Zucker, Steroide, Terpene	100°C Tageslicht
Reagenz 5: Ninhydrin-Reagenz		
Zusammensetzung / Herstellung	Detektierbare Stoffklasse	Auswertung
0,4 g Ninhydrin in 200 mL Ethanol lösen	Amine und Aminosäuren	110°C Tageslicht

Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)

Bei der HPTLC handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen DC, die automatisiert und unter optimierten Bedingungen abläuft, wodurch eine höhere Trennleistung und Reproduzierbarkeit der chromatographischen Auftrennung erzielt werden kann. Die Unterschiede zur herkömmlichen DC liegen nicht nur in der Automatisierung und Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte, sondern auch in der Beschaffenheit der HPTLC-Platten [11]. Die HPTLC-Platten zeichnen sich typischerweise durch eine kleinere Korngröße und eine dichtere Packung der stationären Phase aus, wodurch die Trennleistung im Vergleich zur klassischen DC deutlich erhöht wird [10]. In dieser Arbeit kamen jene qualitativ hochwertigen und dementsprechend teureren Platten (HPTLC-Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ der Firma MERCK) jedoch ausschließlich zur vergleichenden Fingerprint-Analyse der beiden Materialien JS EC und JS FG (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 16) zum Einsatz. Für alle anderen Analysen wurden herkömmliche DC-Platten (DC-Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ der Firma MERCK) verwendet.

Die HPTLC-Anlage, mit der die Analysen der vorliegenden Diplomarbeit durchgeführt wurden, stammte von der Firma CAMAG (siehe Tabelle 3, Seite 12). Zum einheitlichen, automatisierten Aufbringen der entsprechenden Probelösungen auf die Platte wurde der CAMAG Automatic TLC Sampler 4 verwendet. In der CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2) erfolgte die bezüglich Kammersättigung, Luftfeuchtigkeit und Temperatur optimierte Entwicklung der Platten in der jeweiligen mobilen Phase. Mithilfe des CAMAG TLC Visualizers wurden nach jedem Schritt Fotos der Platte aufgenommen, um am Ende der Analyse eine genaue Auswertung durchführen zu können. Häufig eingesetzt wurde auch die Tauchvorrichtung CAMAG Chromatogram Immersion Device (III), um eine einheitliche Benetzung der Platte mit entsprechenden Detektionsreagenzien zu gewährleisten.

Tabelle 3: HPTLC-Anlage der Firma CAMAG

C A M A G G e r ä t s c h a f t e n	
Autosampler (Aufbringen der Probelösungen)	CAMAG Automatic TLC Sampler 4
Entwicklungskammer	CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2)
Aufnahme der Bilder	CAMAG TLC Visualizer
Tauchvorrichtung	CAMAG Chromatogram Immersion Device (III)

Die HPTLC wurde in dieser Diplomarbeit sowohl für präparative Zwecke (siehe Kapitel 2.3.1, Seite 13) als auch zur Erstellung des phytochemischen Fingerprint-Materialvergleichs (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 16), zum Nachweis auf Zucker und Tannine (siehe Kapitel 2.3.2, Seite 14) und im Rahmen des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays (siehe Kapitel 2.6, Seite 26) verwendet.

2.3.1 Präparative HPTLC

Die präparative HPTLC wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit zur Gewinnung der α -glucosidasehemmenden Substanzen aus den Fraktionen V4 und V6, die aus der Säulenchromatographie erhalten wurden (siehe Tabelle 8, Seite 24) und im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay Aktivität zeigten (siehe Kapitel 3.4.3, Seite 57), eingesetzt.

Dazu wurden zunächst 1%ige Lösungen der Fraktionen V4 und V6 in 50%igem Methanol hergestellt. Je 340 μ L dieser Probelösungen wurden anschließend mittels CAMAG Automatic TLC Sampler 4 automatisiert und in Form einer durchgehenden 18 cm langen Bande auf einer 10x20 cm DC-Kieselgelplatte 60 F₂₅₄ aufgetragen. Die Entwicklung der Platten erfolgte mithilfe der CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2), wobei im Falle von Fraktion V4 System 1 und im Falle von Fraktion V6 System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9) zur Anwendung kam. Um nun die gewünschten Substanzen gewinnen zu können, wurden die entsprechenden Banden mithilfe eines Spatels von der DC-Platte abgekratzt. Aufgrund von Zuordnungsproblemen basierend auf dem mehrmals beobachteten Wanderungseffekt der Banden im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay (siehe Phänomen „Wandern“ auf Seite 29) wurden sowohl die Zone, welche dem im Assay aktiven Bereich entsprach, als auch die Zone darüber und darunter ausgekratzt (siehe Kapitel 3.5 und Abbildung 24 auf Seite 60). Die abgekratzten Zonen wurden anschließend in Eppendorfgefäße überführt, mit je 1 mL Methanol versetzt und für 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt, um die zu isolierenden Verbindungen vom anhaftenden Kieselgel zu eluieren. Die daraus erhaltenen Suspensionen wurden zuletzt bei 10xg für 10 Minuten zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden anschließend in Phiolen überführt und eingeeengt.

Nach dieser Anleitung wurde die präparative HPTLC für die Fraktionen V4 und V6 je dreimal durchgeführt, um ausreichende Mengen der jeweiligen Verbindungen für nachfolgende Analysen gewinnen zu können.

2.3.2 Nachweis auf Zucker und Tannine

Sowohl Zucker als auch Tannine stellen häufig unerwünschte Verbindungen in natürlichen Extrakten dar, weshalb es nötig war auf jene Stoffklassen zu testen und diese bei Vorhandensein entsprechend abzutrennen.

Tannine haben das Potential, Enzyme zu denaturieren und können so in entsprechenden Enzym-Assays zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Tannine bilden dabei meist über Wasserstoffbrückenbindungen unselektive Komplexe mit den Proteinen [7].

Zucker hingegen sind häufig aufgrund ihres hohen Gewichtanteils störend. Zudem könnten sie im in dieser Arbeit verwendeten α -Glucosidase-Inhibitions-Assay (siehe Kapitel 2.6, Seite 26) das eigentliche Substrat kompetitiv von der Angriffsstelle des oligosaccharidsplattendes Enzyms verdrängen. Um also falsch-positive Ergebnisse durch Zucker und Tannine im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay zu vermeiden, wurde auf das Vorhandensein dieser Stoffklassen getestet.

Der Nachweis auf Zucker und Tannine erfolgte mittels HPTLC. Auf einer 10x20 cm DC-Kieselgelplatte 60 F₂₅₄ der Firma MERCK wurden dreimal je 15 μ L einer hochkonzentrierten Lösung von JS H EC und JS M EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) in 50%igem Methanol mit dem CAMAG Automatic TLC Sampler 4 aufgetragen. Die Platte wurde danach in der CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2) in DC-System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) entwickelt und anschließend abschnittsweise mit Reagenz 1, 2 und 3 (siehe Tabelle 2, Seite 10) besprüht. Die Auswertung erfolgte bei Tages- und unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm.

Außerdem wurde mit 15 μ L der Lösung von JS H EC in 50%igem Methanol zusätzlich eine DC-Analyse, unter Verwendung von System 4 (siehe Tabelle 1, Seite 9) durchgeführt und mit Zucker-Reagenz (= Reagenz 3; siehe Tabelle 2, Seite 10) detektiert. Dabei wurden wässrige Lösungen von Glucose, Fructose und Saccharose als Referenzsubstanzen aufgetragen.

Da durch die HPTLC- und die DC-Analyse das Vorhandensein von Zuckern in JS H EC eindeutig nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.3, Seite 51), wurde anschließend eine Zuckerabtrennung mittels Säulenchromatographie, deren Vorgehensweise in Kapitel 2.5 auf Seite 21 beschrieben ist, durchgeführt.

2.3.3 Phytochemischer Fingerprintvergleich von JS EC und JS FG

Da für die vorliegende Diplomarbeit Pflanzenmaterial sowohl aus Ecuador (JS EC) als auch aus Französisch-Guyana (JS FG) zur Verfügung stand (siehe Kapitel 2.1, Seite 4), war es von großem Interesse, beide Blattdrogen hinsichtlich ihres Fingerprints miteinander zu vergleichen. Als Grundlage für diesen Vergleich diente das Project-P223-68-Worksheet der Firma CAMAG. Insgesamt wurden je 14 verschiedene Extrakte sowohl für JS EC als auch für JS FG hergestellt. Zur Herstellung der Extrakte wurden, ausgehend von der „SOP 70.002.01 Evaluation, Optimization, Development and Validation of Methods for Identification of Medicinal Plants and Products thereof“, je 0,5 g pulverisierte Droge mit je 5 mL Lösungsmittel für 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurden je 500 µL entnommen und in Eppendorfgefäßen bei 10xg für 10 Minuten zentrifugiert. Die genaue Zusammensetzung der zur Extrakterstellung verwendeten Lösungsmittel ist aus der folgenden Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Lösungsmittel zur Herstellung der Extrakte für JS EC und JS FG im Rahmen des phytochemischen Fingerprint-Vergleichs mittels HPTLC

Extrakt 1	Heptan
Extrakt 2	Toluol
Extrakt 3	Dichlormethan
Extrakt 4	Chloroform
Extrakt 5	Aceton
Extrakt 6	Ethanol
Extrakt 7	Methanol
Extrakt 8	Wasser
Extrakt 9	Ethanol-Wasser (7-3)
Extrakt 10	Methanol-Wasser (8-2)
Extrakt 11	Methanol-konz. Essigsäure (9-1)
Extrakt 12	Wasser-konz. Essigsäure (9-1)
Extrakt 13	Methanol-Ammoniak 25% (8-2)
Extrakt 14	Wasser-Ammoniak 25% (8-2)

Die so hergestellten Extrakte wurden anschließend mittels HPTLC hinsichtlich ihres Fingerprints analysiert. Insgesamt wurde dazu, ausgehend von dem auf Seite 16 erwähnten Worksheet, auf fünf verschiedene Stoffklassen gescreent. Dazu wurden je 5 µL des jeweiligen Extraktes über die CAMAG-HPTLC-Anlage automatisiert auf hochwertige 10x20 cm HPTLC-Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ der Firma MERCK aufgetragen. Die Entwicklung und das Tauchen der Platten in die entsprechenden Reagenzien erfolgte ebenfalls über die Gerätschaften der Firma CAMAG (siehe Tabelle 3, Seite 12). Je nach zu detektierender Stoffklasse wurden geeignete mobile Phasen und Tauchreagenzien, welche ebenfalls vom Project-P223-68-Worksheet der Firma CAMAG vorgegeben waren, verwendet. Die Substanzklassen und die dafür vorgesehenen DC-Systeme und Tauchreagenzien sind in der folgenden Tabelle überblicksmäßig dargestellt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Auflistung der im Rahmen des HPTLC-Fingerprint-Vergleichs zu detektierenden Substanzklassen, der geeigneten DC-Systeme und der Tauchreagenzien

Stoffklassen	DC-System (siehe Tabelle 1, Seite 9)	Tauchreagenz (siehe Tabelle 2, Seite 10)
Flavonoide	System 3	Reagenz 1
Polare Komponenten	System 6	Reagenz 4
Aminosäuren	System 7	Reagenz 5
Saponine & Lignane	System 2	Reagenz 4
Apolare Komponenten	System 5	Reagenz 4

Um den Fingerprint-Vergleich durchführen zu können, wurden alle fertig entwickelten und derivatisierten HPTLC-Platten bei Tageslicht, 254 nm und 366 nm betrachtet und fotografiert. Die Fingerprints der jeweils gleichen Extrakte für JS EC und JS FG wurden einander direkt gegenübergestellt und auf mögliche qualitative und z.T. auch quantitative Unterschiede im Inhaltsstoffspektrum untersucht.

2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC (= High Performance Liquid Chromatography) stellt eine etablierte chromatographische Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse sowie zur präparativen Trennung von Stoffen dar [9]. Voraussetzung dafür ist die Löslichkeit der zu untersuchenden Substanzen in der flüssigen mobilen Phase, welche zu Transport und Elution der Stoffe durch die HPLC-Anlage dient [10]. Im Unterschied zur klassischen Säulenchromatographie, bei der die Probelösung in der Regel nur durch die Schwerkraft durch die Säule befördert wird, wird die Probe bei der HPLC durch Anlegen von Druck durch die Säule gepresst [9]. Je nach Wechselwirkung der Substanzen mit der stationären Phase, die sich innerhalb der Säule befindet, kommen die Verbindungen nach unterschiedlichen Zeiten (sog. Retentionszeiten) beim Detektor an. Als stationäre Phase kommen vor allem sogenannte RP-Säulen (RP = Reversed Phase) zum Einsatz. Diese sind im Gegensatz zu den seltener verwendeten NP-Säulen (NP = Normal Phase), die polaren Charakter aufweisen, apolar. Bei der mobilen Phase handelt es sich meist um ein Gemisch aus verschiedenen Lösungsmitteln.

Die HPLC stellte in dieser Diplomarbeit eine wichtige Methode zur Analyse der qualitativen Zusammensetzung verschiedenster Probelösungen dar. Außerdem wurde sie auch für semi-präparative Zwecke zur Isolierung von Reinsubstanzen in kleinen, aber zur Strukturaufklärung genügenden Mengen eingesetzt. Für die praktische Arbeit wurde ausschließlich eine RP-18e-Säule, welche ein mit Oktadecylgruppen modifiziertes Kieselgel als stationäre Phase enthielt und somit apolaren Charakter aufwies, verwendet. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus bidestilliertem Wasser, welches mit konzentrierter Ameisensäure versetzt wurde (0,1%; = LM A), um die Trennschärfe zu erhöhen und das sogenannte Tailing der Peaks möglichst einzuschränken, und Acetonitril (ACN = LM B). Eluiert wurde dabei mittels Gradientenelution, was bedeutet, dass die Konzentration des Acetonitrils, je nach verwendeter Methode, laufend erhöht wurde.

Zum Nachweis der Substanzen kamen zwei unterschiedliche Detektoren zum Einsatz. Der Dioden-Array-Detektor (DAD) eignet sich durch die Erfassung der Absorptionsspektren gut zur qualitativen Analyse, kann als UV/Vis-Detektor jedoch ausschließlich chromophore Systeme nachweisen. Der Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (ELSD- engl. Evaporating Light Scattering Detector) kann hingegen alle Verbindungen detektieren und eignet sich im Gegensatz zum DAD auch zur Quantifizierung von Substanzen.

Analytische HPLC

Für die analytische HPLC zur qualitativen Analyse bestimmter Extrakte und Fraktionen wurden entsprechende Lösungen der zu untersuchenden Proben in Methanol (HPLC Qualität) hergestellt. Die zur Analyse verwendeten HPLC-Parameter sind der Tabelle 6 auf Seite 20 zu entnehmen.

Semi-präparative HPLC

Zur Gewinnung von Reinsubstanzen in einer für eine nachfolgende Strukturaufklärung ausreichenden Menge kam die semi-präparative HPLC zum Einsatz. Dafür wurde eine 5%ige Lösung der entsprechenden Probe in Methanol (HPLC Qualität) verwendet. Die semi-präparative HPLC wurde mit den in Tabelle 6 auf Seite 20 dargestellten Parametern durchgeführt und die Detektion der zu isolierenden Verbindung erfolgte mittels DAD bei 320 nm. Zur Gewinnung der Reinsubstanz wurde beim Ansteigen des zugehörigen Peaks im Chromatogramm des DAD mit dem Sammeln begonnen. Das Sammeln wurde gestoppt, sobald der Peak der nachfolgenden Substanz im Chromatogramm anzusteigen begann. Die gewonnenen Lösungen wurden anschließend im Rotationsverdampfer durch Anlegen von Vakuum bei 45°C zur Trockene gebracht. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die gewünschte Menge (mindestens 1 mg) der Verbindung isoliert werden konnte.

Tabelle 6: HPLC-Parameter

GERÄTE		
SHIMADZU Degasser DGU-20A ₅ SHIMADZU Pump LC-20AD SHIMADZU Autosampler SIL-20AC HT SHIMADZU Interface CBM-20A SHIMADZU Column Oven CTO-20AC		
DETEKTOREN		
DAD: SHIMADZU SPD-M20A ELSD: SHIMADZU ELSD-LT		
SOFTWARE		
SHIMADZU LAB-Solution-LC-Solution		
SÄULE		
LiChrospher® 100 RP-18e Durchmesser: 4 mm Länge: 250 mm		
STATIONÄRE PHASE		
RP-18e, Teilchengröße: 5 µm		
MOBILE PHASEN		
Analytische HPLC	Gradient: 0,5% pro Minute 0 min: 5% ACN 40 min: 25% ACN	Fluss: 0,8 mL pro Minute Injektionsvolumen: 15 µL
Semi-präparative HPLC	Gradient: 0,5% pro Minute 0 min: 10% ACN 16 min: 18% ACN	Fluss: 0,8 mL pro Minute Injektionsvolumen: 10 µL

2.5 Säulenchromatographie (SC)

Bei der Säulenchromatographie erfolgt die Trennung von Stoffgemischen an in Säulen aus z.B. Glas, Edelstahl oder Kunststoff gepackten stationären Phasen. Die entsprechende Probelösung wird, am besten in hochkonzentrierter Form, am oberen Ende der Säule aufgetragen und wandert gemeinsam mit der mobilen Phase durch die Säule. Je nach Wechselwirkung der Komponenten mit der stationären Phase unterscheidet man zwischen Adsorptions-, Ionenaustausch-, Verteilungs- und Größenausschlusschromatographie [10].

Im Gegensatz zur HPLC reicht hier die Schwerkraft aus, um die Substanzen durch die Säule zu transportieren. In der vorliegenden Diplomarbeit diente die SC vor allem zur Abtrennung der Zucker aus JS H EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) und zur Fraktionierung. Das Vorhandensein von Zuckern konnte mittels HPTLC nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3, Seite 51).

Als stationäre Phase diente Polystyrol (= PS) in Form des synthetischen Adsorbens Diaion® HP-20

von Supelco Analytical® der Firma SIGMA ALDRICH. Diaion® HP-20 hat apolaren Charakter und weist eine polyphenolische Struktur und eine Partikelgröße von $>250\ \mu\text{m}$ auf. Daraus resultiert ein relativ großes Adsorptionspotential für organische, apolare Substanzen. Als Elutionsmittel wurden Wasser und Methanol eingesetzt. Das gewünschte Ziel des Eluierens mit Wasser war die Abtrennung der polaren Zucker, während das Waschen mit Methanol dazu dienen sollte, die zuckerfreien Reste wieder von der Säule zu eluieren.

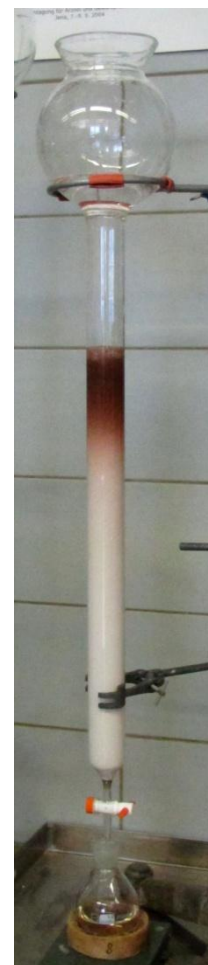


Abbildung 6:
Polystyrol-Säule
(siehe Tabelle 7, S.22)

Zuckerabtrennung aus JS H EC und anschließende chromatographische Analysen:

Zu Beginn wurden im Kleinmaßstab zwei Versuche auf einer Säule mit einer Länge von 30 cm und einem Durchmesser von 1,5 cm durchgeführt, um das Packen der Säule mit der stationären Phase entsprechend zu optimieren. Dies stellte sich als problematisch heraus, da das leichte Polystyrol auf dem Wasser schwamm und es somit beim Befüllen der Säule zum Aufwirbeln des Polystyrols und zur massiven Einlagerung von Luft kam. Für die Versuche im Kleinmaßstab kamen insgesamt 2 g JS H EC zum Einsatz. Die dabei gewonnenen Fraktionen wurden zuletzt mit denen der größeren Säule vereinigt. Die allgemeinen Parameter für die anschließende SC im Großmaßstab sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Allgemeine Säulenparameter für die SC an Polystyrol

Säule	Glassäule mit Reservoir
Länge	70 cm
Durchmesser	4,5 cm
Stationäre Phase	Polystyrol (Diaion® HP-20)
Elutionsmittel 1	Wasser
Elutionsmittel 2	Methanol
Aufgetragene Menge	2 x 15 g JS H EC

Das Polystyrol wurde vor dem Einfüllen in die Säule mit Methanol, Ethanol und zuletzt mit 50%igem Methanol im Ultraschallbad für je 10 Minuten gewaschen. Vor dem Einfüllen der stationären Phase wurde ein Wattestopfen mithilfe eines Glasstabs in die untere Verengung der Säule gedrückt. Das anschließende Packen der Säule erfolgte durch Einfüllen einer Suspension von Polystyrol in 50%igem Methanol, wodurch, aufgrund des Methanols, das Aufwirbeln des Polystyrols verhindert werden konnte. Durch ständiges Klopfen mit einem Korkring an die Säulenwand konnte außerdem die Einlagerung von Luftblasen weitgehend vermieden werden.

Um das für das Befüllen der Säule mit der stationären Phase benötigte Methanol wieder aus der Säule zu waschen, wurde das Ventil geöffnet und die Säule vorsichtig mit Wasser gespült. Durch die dabei entstehende Sogwirkung konnte das Aufwirbeln des Polystyrols verhindert werden. Die so gepackte Säule wurde anschließend für 24 Stunden mit Wasser equilibriert. 15 g JS H EC (siehe 2.2 auf Seite 6 und Abbildung 5 auf Seite 7) wurden in so wenig Wasser als möglich gelöst und mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig am Säulenkopf aufgetragen. Dann wurde das Ventil geöffnet und begonnen mit Wasser (= 1.Elutionsmittel) und anschließend mit Methanol (= 2.Elutionsmittel) zu eluieren. Dabei wurden Fraktionen zu je 100 mL (Wasserfraktionen) bzw. zu je 500 mL (Methanolfraktionen) gesammelt. Die Wasserfraktionen wurden eingefroren und anschließend lyophilisiert, während die Methanolfraktionen im Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei einer Temperatur von 45°C zur Trockene gebracht wurden.

Die so durchgeführte Säulenchromatographie wurde unter Wiederverwendung der Polystyrolsäule ein weiteres Mal wiederholt, wobei erneut 15 g JS H EC auf die Säule aufgetragen wurden. Insgesamt konnten 30 Wasserfraktionen und 12 Methanolfraktionen gesammelt werden. Diese wurden mittels DC unter Verwendung von System 4 (siehe Tabelle 1, Seite 9) und Sprühreagenz 3 (siehe Tabelle 2, Seite 10) analysiert. Fraktionen mit gleichem Fingerprint wurden vereinigt, wobei auch die im Kleinmaßstab erhaltenen Fraktionen der beiden Vorversuche inkludiert wurden. Dadurch konnten, ausgehend von insgesamt 32 g JS H EC, schlussendlich sieben Fraktionen (siehe Tabelle 8, Seite 24) gewonnen werden, welche in der Folge als Fraktionen V1 bis V7 bezeichnet werden. Abschließend wurden alle Fraktionen gewogen und eine Gewichtsbilanz (siehe Abbildung 7, Seite 24) erstellt.

Tabelle 8: Übersicht über die aus der SC an Polystyrol gewonnenen Fraktionen V1-V7

Fraktion	Elutionsmittel	Ausbeute (g)
V1	Wasser	0,555
V2	Wasser	2,610
V3	Wasser	16,125
V4	Wasser	1,866
V5	Wasser	0,660
V6	Methanol	8,110
V7	Methanol	0,210
Summe		30,136
Ausgangsmenge		32,000

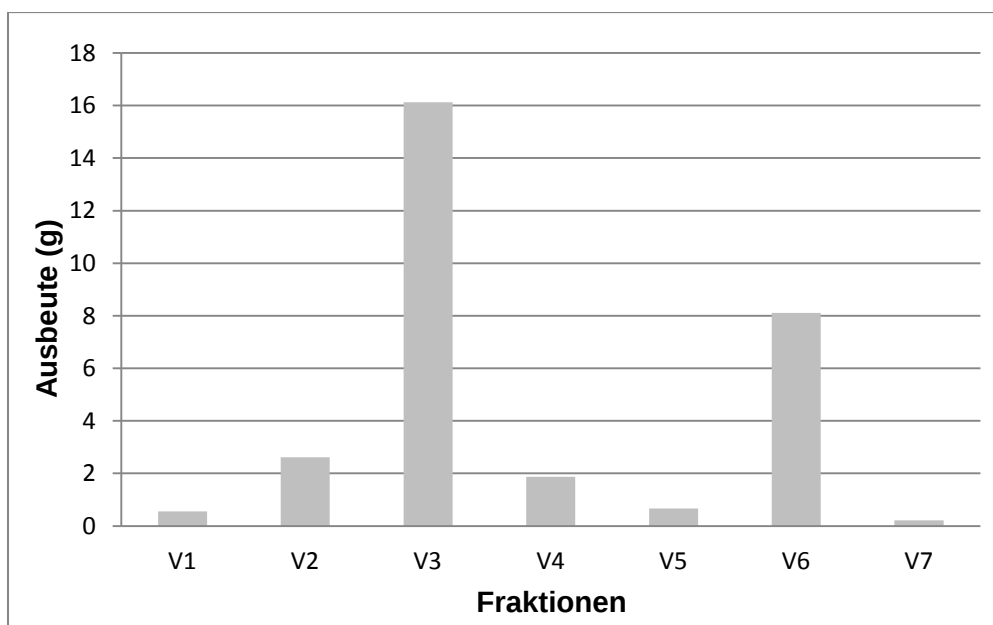


Abbildung 7: Gewichtsanzahl der aus der SC an Polystyrol gewonnenen Fraktionen V1-V7

Mit den Fraktionen V1-V7 wurden anschließend sowohl DC- als auch HPLC-Analysen durchgeführt, um zu testen, ob die Zucker über die Polystyrolsäule erfolgreich aus JS H EC abgetrennt werden konnten.

Für die DC wurden die zur Trockene gebrachten Fraktionen V1-V7 (siehe Tabelle 8, Seite 24) sowie JS H EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) als Referenz unter Erwärmen in so wenig 50%igem Methanol als möglich gelöst. Von diesen Lösungen wurden je 10 µL für die DC-Analyse, für welche System 4 (siehe Tabelle 1, Seite 9) und Reagenz 3 (siehe Tabelle 2, Seite 10) zum Einsatz kamen, verwendet (siehe Abbildung 20, Seite 54).

Für die analytische HPLC, die mit den in Tabelle 6 auf Seite 20 dargestellten Parametern durchgeführt wurde, wurden 1%ige Lösungen der Fraktionen V1-V7 (siehe Tabelle 8, Seite 24) und von JS H EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) in 5%igem Methanol (HPLC Qualität) hergestellt. Die Detektion erfolgte mittels ELSD (siehe Abbildung 21, Seite 56).

Die Fraktionen V1-V7 wurden außerdem im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay auf eine potentiell enzymhemmende Wirkung getestet (siehe Kapitel 2.6.3, Seite 33).

2.6 α -Glucosidase-Inhibitions-Assay

Justicia secunda wird in Ecuador traditionell bei Diabetes mellitus eingesetzt (siehe Kapitel 1.1, Seite 1). Deshalb war es für die vorliegende Diplomarbeit von großem Interesse, verschiedenste Extrakte und Fraktionen dieser Pflanze auf α -glucosidasehemmendes und damit eventuell blutzucker-senkendes Potential zu testen. Die Testung erfolgte über den sogenannten α -Glucosidase-Inhibitions-Assay. Bei diesem Enzym-Assay handelt es sich um eine einfache, schnelle und kostengünstige Methode, die direkt auf einer DC-Platte durchgeführt wird und zum Nachweis von α -glucosidase-hemmenden Substanzen aus z.B. komplexen Pflanzenextrakten verwendet werden kann.

Zur Durchführung des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays wurden verschiedenste Lösungen benötigt, für deren Herstellung die in der folgenden Tabelle angeführten Reagenzien zur Anwendung kamen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Im Rahmen des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays benötigte Reagenzien

Enzym	α -D-Glucosidase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> G5003; SIGMA
Puffer	Natriumacetat wasserfrei; MERCK
	0,1 M Essigsäure
Substrat	2-Naphthyl- α -D-glucopyranosid 18051; GLYCOSYNTH
Reagenz	Echtblausalz B; MERCK
Lösungsmittel	Bidestilliertes Wasser
	Ethanol
Positivkontrolle 1	Castanospermin C3784; SIGMA
Positivkontrolle 2	Acarbose - Glucobay® 100 mg Tabletten; BAYER

Das Prinzip des Assays beruht auf einer Farbreaktion, welche durch die Spaltung von 2-Naphthyl- α -D-glucopyranosid durch die α -D-Glucosidase herbeigeführt wird. Das dabei entstehende Spaltprodukt 2-Naphthol reagiert

mit Echtblausalz B unter Bildung eines violetten Azofarbstoffs (siehe Abbildung 8, Seite 27) [12] [13].

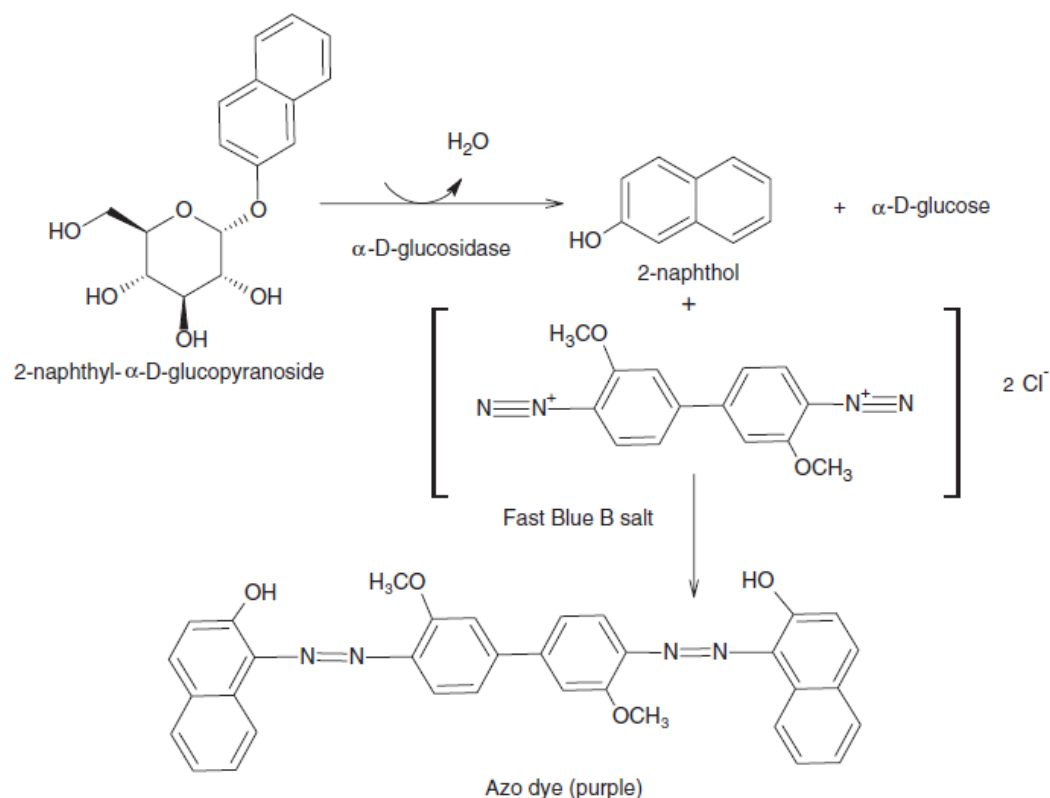


Abbildung 8: Spaltung von 2-Naphthyl- α -D-glucopyranosid durch die α -D-Glucosidase und anschließende Bildung des Azofarbstoffs durch die Reaktion von 2-Naphthol mit Echtblausalz B [12] [13]

Wird die Spaltung von 2-Naphthyl- α -D-glucopyranosid jedoch durch α -glucosidasehemmende Substanzen verhindert, so kommt es folglich nicht zur Bildung von 2-Naphthol, weshalb auch die anschließende Farbreaktion mit Echtblausalz B unterbleibt. Verbindungen mit α -glucosidasehemmendem Potential zeichnen sich somit durch weiße Stellen auf der mit dem Enzym vorinkubierten und anschließend durch Behandeln mit Echtblausalz B violett gefärbten DC-Platte aus.

Als Grundlage für die Bereitung der Enzym- und Substratlösung und für die anschließende Durchführung des Assays diene ein von Claudia A. Simões-Pires et al. verfasster Artikel, in dem es um die Detektion von α - und β -Glucosidase-Inhibitoren mithilfe einer bioautographischen DC-Methode geht [13]. Zur Herstellung der Lösungen, welche entweder auf die Platten gesprüht, oder durch die Tauchvorrichtung der Firma CAMAG aufgebracht wurden, kamen die auf Seite 26 in Tabelle 9 aufgelisteten Reagenzien zum Einsatz. Für die Enzymlösung wurde zuerst eine Pufferlösung bereit, indem 10,25 g wasserfreies Natriumacetat in 250 mL bidestilliertem Wasser gelöst und mit 0,1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt wurden. 2000 Units der α -D-Glucosidase wurden anschließend in 200 mL der kurz zuvor hergestellten Pufferlösung gelöst (siehe Abbildung 9, Seite 28). Zur Herstellung der Substratlösung wurden einerseits 200 mg 2-Naphthyl- α -D-glucopyranosid in 100 mL 50%igem Ethanol und andererseits 250 mg Echtblausalz B in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst. Die so bereiteten Lösungen wurden erst kurz vor der Durchführung des Assays vereinigt (siehe Abbildung 9, Seite 28).

Zum Besprühen wurden anstelle der 200 mL, welche zum Tauchen benötigt wurden, analog je 10 mL Enzym- und Substratlösung hergestellt.

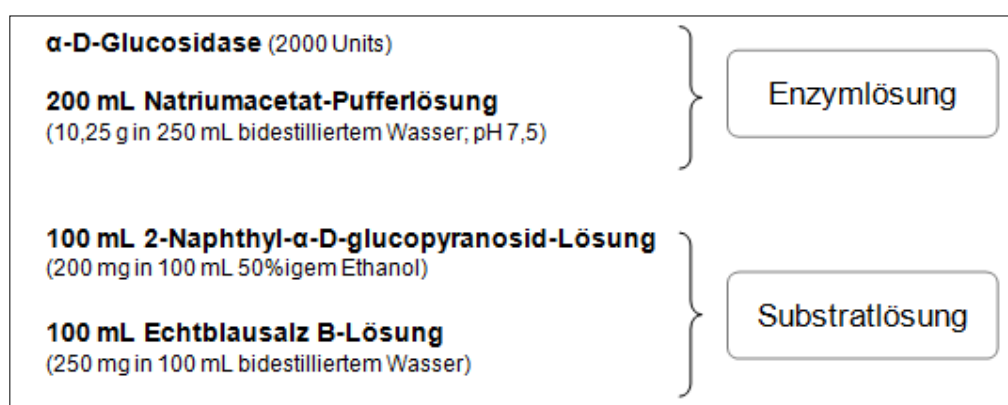


Abbildung 9: Zusammensetzung der Enzym- und Substratlösung im Rahmen des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays

Durchführung des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays

Die Durchführung der einzelnen Assays erfolgte über HPTLC auf 10x10 cm DC-Platten 60 F₂₅₄ der Firma MERCK (siehe Kapitel 2.3, Seite 8). Die zu untersuchenden Probelösungen wurden dazu mithilfe der Apparaturen der Firma CAMAG (siehe Tabelle 3, Seite 12) aufgetragen und in einer geeigneten mobilen Phase entwickelt. Danach wurde die entsprechende DC-Platte mit der Enzymlösung (siehe Abbildung 9, Seite 28) behandelt. Die mit α -D-Glucosidase benetzte DC-Platte wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter feuchten Bedingungen in einem Exsikkator inkubiert. Zur Schaffung des feuchten Milieus wurde in den Exsikkator anstelle des Trocknungsmittels eine Kristallisierschale mit Wasser gestellt. Die mit Enzym benetzte Platte wurde dabei horizontal im Exsikkator positioniert. Nach der Inkubation erfolgte die Behandlung der Platte mit der Substratlösung (siehe Abbildung 9, Seite 28). In der Regel war nach ca. 20 Minuten eine leichte Violett- bis Rosafärbung der Platte zu erkennen, welche jedoch meist erst über Nacht ihre volle Intensität erreichte. Die Behandlung der Platten mit Enzym- und Substratlösung erfolgte sowohl mittels Tauchen, wodurch eine bessere Benetzung der DC-Platten und somit auch bessere Ergebnisse resultierten, als auch durch herkömmliches Besprühen, welches vor allem für einzelne Assays zum Einsatz kam, da dadurch im Vergleich zum Tauchen der Verbrauch von Enzym- und Substratlösung möglichst gering gehalten werden konnte.

Phänomen „Wandern“

Bei den im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten α -Glucosidase-Inhibitions-Assays zeigte sich eine deutliche, reproduzierbare Wanderung der einzelnen Banden zum oberen Rand der DC-Platten, was eine nachfolgende Zuordnung der im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay aktiven Zonen zu den Banden des DC-Fingerprints oft als schwierig gestaltete. Dieses Phänomen ist auf das Behandeln der einzelnen Platten mit der Enzymlösung (siehe Abbildung 9, Seite 28) zurückzuführen, da es sich dabei um eine wässrige Lösung handelt, welche relativ langsam trocknet

und somit Diffusionseffekte der einzelnen Zonen ermöglicht. Während der horizontalen Lagerung der mit Enzymlösung benetzten Platten im Exsikkator konnten außerdem weitere Diffusionsvorgänge beobachtet werden. Der Diffusionseffekt erfolgte dabei jedoch nicht wie zu erwarten in alle Richtungen, sondern ausschließlich zum oberen Rand der Platten. In Abbildung 14 auf Seite 42 ist beispielsweise deutlich zu erkennen, dass die aktive Bande der Acarbose mit einem Rf-Wert von 0,45 deutlich oberhalb der Startzone, welche einen Rf-Wert von 0,30 aufweist, liegt.

Dieses Wanderungsphänomen war reproduzierbar und musste somit bei der Auswertung der einzelnen α -Glucosidase-Inhibitions-Assays und der Zuordnung der aktiven Stellen zu den Banden im DC-Fingerprint berücksichtigt werden.

Auswertung des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays

War das Enzym intakt, kam es zur Bildung des Azofarbstoffs und zur Violettfärbung der DC-Platte (siehe Abbildung 8, Seite 27). Substanzen, welche die α -D-Glucosidase und damit auch die Bildung des violetten Azofarbstoffs hemmen konnten, erschienen in Folge dessen als weiße Banden auf der ansonsten violett gefärbten DC-Platte.

Positivkontrollen

Als Positivkontrollen kamen sowohl der α -Glucosidase-Hemmer Acarbose als auch Castanospermin zum Einsatz. Letzteres wurde in dem von Claudia A. Simões-Pires et al. verfassten Artikel als α - und β -Glucosidase-Hemmer bezeichnet [13].

Zur Herstellung der Acarbose-Lösung wurden 1½ Glucobay®-Tabletten zu je 100 mg in einer Reibschale verrieben, in Eppendorfgefäße überführt und mit 5 mL Methanol versetzt. Die Suspension wurde gevortext und anschließend bei 10xg für 10 Minuten zentrifugiert. 50 μ L (entsprechen 1,5 mg Acarbose) der so gewonnenen Acarboselösung wurden erst nach dem Entwickeln der jeweiligen Platte in der entsprechenden mobilen Phase automatisiert über HPTLC etwa zwei Zentimeter über dem unteren Plattenrand aufgetragen, da man zu diesem Zeitpunkt den Wanderungs-

effekt zum oberen Plattenrand (siehe Phänomen „Wandern“ auf Seite 29) noch nicht beobachten hatte können und stattdessen einen Diffusionseffekt in alle Richtungen erwartet hatte. Die weiteren Schritte des Assays erfolgten wie auf Seite 29 beschrieben.

Für die Bereitung der Castanospermin-Lösung wurde 1 mg Castanospermin in 1 mL Methanol gelöst. 10 μ L dieser Lösung (entsprechen 0,01 mg Castanospermin) wurden für den Assay verwendet, wobei die Lösung ebenfalls erst nach dem Entwickeln der jeweiligen Platte aufgetragen wurde.

Mithilfe des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit sowohl die Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) als auch die Fraktionen aus der SC an Polystyrol (siehe Tabelle 8, Seite 24) und die beiden Materialien JS EC und JS FG (siehe Kapitel 2.1, Seite 4) im Vergleich auf α -glucosidasehemmendes Potential getestet.

2.6.1 Aktivitätsvergleich der Materialien JS EC und JS FG

Um den Materialvergleich zwischen JS EC und JS FG (siehe Kapitel 2.1, Seite 4) abzuschließen, wurden die beiden Pflanzenmaterialien zusätzlich zum Fingerprint-Vergleich (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 16) noch hinsichtlich ihrer Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay untersucht. Getestet wurden die Methanol-Extrakte JS M EC bzw. JS M FG und die Original-Wasser-Extrakte JS OWE EC bzw. JS OWE FG (siehe Kapitel 2.2, Seite 6). Zur Durchführung des Assays wurden 1%ige Lösungen der Extrakte in 5%igem Methanol hergestellt. Von diesen Lösungen wurden anschließend je 10 μ L (JS M EC und JS M FG) bzw. je 20 μ L (JS OWE EC und JS OWE FG) auf die für den Assay verwendete DC-Platte aufgetragen. Die Entwicklung wurde in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) durchgeführt. Die weiteren Schritte des Assays erfolgten wie auf Seite 29 beschrieben, wobei sowohl die Enzym- als auch die Substratlösung auf die Platte gesprüht wurden.

2.6.2 Testung der Mutterfraktionen aus JS EC

Die im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler ausgehend vom Material aus Ecuador hergestellten Mutterfraktionen (siehe Kapitel 2.2, Seite 6 und Abbildung 5, Seite 7) wurden ebenfalls auf α -glucosidase-hemmende Aktivität getestet. Dazu wurden 1%ige Lösungen von JS M EC, JS P EC, JS C EC, JS B EC, JS H EC und JS OWE EC in 50%igem Methanol hergestellt. Von diesen Lösungen wurden je 10 μ L bzw. 20 μ L im Falle von JS OWE EC für die DC, welche anschließend in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) entwickelt wurde, verwendet. Die weitere Durchführung des Assays erfolgte wie auf Seite 29 beschrieben, wobei die entwickelte DC-Platte sowohl in die Enzymlösung als auch in die Substratlösung getaucht wurde.

Aus dem Assay ging hervor, dass alle Mutterfraktionen aus JS EC α -glucosidasehemmendes Potential aufwiesen (siehe Kapitel 3.2.1 und Abbildung 15, Seite 45). Um herauszufinden, ob es sich um eine gemeinsame Substanz handelte, die in allen Mutterfraktionen enthalten und für deren Aktivität im Assay verantwortlich war, wurden je 10 μ L der 1%igen Lösungen für zwei anschließende HPTLC-Analysen verwendet, deren Entwicklung in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) erfolgte. Zur Detektion wurde für die eine Platte Reagenz 1 verwendet, während die zweite Platte in Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, Seite 10) getaucht wurde (siehe Abbildung 16, Seite 47 und Abbildung 17, Seite 48). Anschließend wurden die 1%igen Lösungen der Mutterfraktionen auch mittels HPLC, unter Verwendung der in Tabelle 6 auf Seite 20 dargestellten Parameter der analytischen HPLC, analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ELSD und DAD bei 290 nm (siehe Kapitel 3.2.3, auf Seite 50, Abbildung 80 auf Seite 104 und Abbildung 81 auf Seite 105).

2.6.3 Testung der aus der SC an Polystyrol gewonnenen Fraktionen

Zur Untersuchung des α -glucosidasehemmenden Potentials der Fraktionen V1-V7 (siehe Tabelle 8, Seite 24) wurden 1%ige Lösungen in 5%igem Methanol hergestellt. Von den bereiteten Lösungen wurden je 15 μ L auf zwei separate DC-Platten aufgetragen. Anschließend wurden auf eine der Platten zusätzlich 10 μ L einer Saccharoselösung aufgetragen, um zu testen, ob Zucker zu einer kompetitiven Verdrängung des eigentlichen Substrats und somit zu falsch-positiven Ergebnissen im Assay führen können. Die Entwicklung dieser Platte erfolgte in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9), während für die Entwicklung der zweiten Platte System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9) zur Anwendung kam. Die folgenden Schritte wurden, wie auf Seite 29 beschrieben, durchgeführt, wobei die Platten in die entsprechenden Lösungen getaucht wurden.

Bei der Auswertung der Assays zeigte sich eine deutliche α -glucosidasehemmende Aktivität der Fraktionen V4 und V6 (siehe Kapitel 3.4.3, Seite 57).

Gewinnung und Analyse der α -glucosidasehemmenden Substanzen aus Fraktion V4 und V6:

Um die aktiven Verbindungen aus den 1%igen Lösungen der Fraktionen V4 und V6 gewinnen zu können, kam die präparative HPTLC, deren Durchführung in Kapitel 2.3.1 auf Seite 13 genau beschrieben ist, zum Einsatz. Die Entwicklung der Platten erfolgte dazu im Falle von Fraktion V4 in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9), während für Fraktion V6 System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9) verwendet wurde.

Die über HPTLC erhaltenen Substanzen wurden anschließend mittels HPLC analysiert. Dazu wurden die Verbindungen in 70 μ L Methanol (HPLC Qualität) gelöst. Jeweils 15 μ L dieser Lösungen wurden für die analytische HPLC, welche mit der in Tabelle 6 auf Seite 20 angeführten Methode durchgeführt wurde, verwendet. Die Detektion erfolgte mittels ELSD und DAD bei 290 nm (siehe Kapitel 3.5.1, Seite 61).

Um die α -glucosidasehemmende Aktivität der über präparative HPTLC gewonnenen Substanzen zu verifizieren, wurden mit jeweils 15 μ L der bereits für die HPLC hergestellten Lösungen erneut α -Glucosidase-Inhibitions-Assays durchgeführt. Die Entwicklung der DCs erfolgte dabei in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) und die einzelnen Schritte der Assays wurden, wie auf Seite 29 beschrieben, durchgearbeitet (siehe Kapitel 3.5.2, Seite 66).

Außerdem wurden die aktiven Fraktionen V4 und V6 auch einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen, um das Molekulargewicht der aktiven Substanzen zu ermitteln und einen ersten Vorschlag für die Molekülstruktur machen zu können (siehe Kapitel 2.7.1, Seite 35).

Die aktive Substanz in Fraktion V6 konnte durch die Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden (siehe Kapitel 3.6.1, Seite 71), da es sich dabei um eine bekannte Verbindung handelte, die bereits im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler isoliert und strukturell aufgeklärt worden war.

Für eine genaue Strukturaufklärung der aktiven Verbindung aus Fraktion V4 musste jedoch eine NMR-Analyse (siehe Kapitel 3.6.2, Seite 76) durchgeführt werden. Da dafür Mengen von >1 mg nötig waren, wurde die aktive Substanz aus Fraktion V4 mittels semi-präparativer HPLC isoliert (siehe Kapitel 3.5.3, Seite 70).

2.7 Strukturaufklärung

Da die Fraktionen V4 und V6 (siehe Tabelle 8, Seite 24) im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay Aktivität zeigten (siehe Kapitel 3.4.3, Seite 57), war es von großem Interesse, die Struktur der α -glucosidasehemmenden Substanzen aufzuklären. Dazu kamen sowohl die Massenspektrometrie als auch die Kernresonanzspektroskopie zum Einsatz.

2.7.1 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie macht es möglich, ausgehend von äußerst geringen Substanzmengen, die relative Molmasse sowie die Elementarzusammensetzung einer Verbindung zu bestimmen. Darüber hinaus können durch den Zerfall der Substanz im Massenspektrometer Informationen über deren molekulare Struktur gewonnen werden [14]. Das Prinzip der hier angewendeten MS besteht darin, entsprechendes Probenmaterial zu ionisieren, die dabei entstehenden Ionen nach deren Masse-Ladungs-Verhältnis aufzutrennen und sie mithilfe geeigneter Detektoren und Analysatoren nach Masse und Häufigkeit zu charakterisieren [10].

Bei der Vermessung wurde eine standardisierte Vorgangsweise gewählt, welche in der von Lisa Lueger verfassten Diplomarbeit wie folgt beschrieben ist: *„Um die molekularen Massen der einzelnen Verbindungen zu bestimmen, wurde eine LC-MS Analyse auf einem Ultimate 3000 RSLC-Series System (Dionex, Germering, Germany), das an ein 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) gekoppelt ist, durchgeführt. Der Elutionsfluss wurde ca. 1:4 vor der ESI-Quelle gesplittet, welche mit folgenden Einstellungen betrieben wurde: Kapillarspannung: -3,7/+3,5 kV, Vernebelungsgas: 26 psi (N₂), Trockengasfluss: 9 L/min (N₂), und Trockengastemperatur: 340°C. Positiv- und Negativ-Ionenmodus Mehrstufenmassenspektren bis zu MS⁴ wurden in einem automatischen data-dependent acquisition (DDA) Modus mit Helium als Kollisionsgas,*

einem Isolationsfenster von 4 Th und einer Fragmentierungsamplitude von 1,0 V gemessen.“ [15]

Die Parameter für die analytische HPLC sind der Tabelle 6 auf Seite 20 zu entnehmen. Zur LC-MS-Analyse wurden je 20 µL einer 1%igen Lösung der Fraktionen V4 und V6 in Methanol (HPLC Qualität) verwendet.

2.7.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernresonanzspektroskopie gibt Auskunft über die Art, Anzahl und Wechselwirkungen von Atomen eines Moleküls sowie über deren räumliche Anordnung, wodurch allein mittels NMR bereits die vollständige Molekülstruktur einer Substanz aufgeklärt werden kann [16]. Die NMR wurde im Rahmen der praktischen Arbeit zur Strukturaufklärung der Verbindung SI1, welche mittels semi-präparativer HPLC aus der im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay aktiven Fraktion V4 isoliert werden konnte (siehe Kapitel 3.5.3, Seite 70), verwendet.

Die NMR wurde am Department für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien durchgeführt. Die zur Vermessung herangezogene standardisierte Vorgangsweise ist in der von Lisa Lueger verfassten Diplomarbeit folgendermaßen beschrieben: *„Die NMR Spektren wurden auf einem Bruker Avance 500 NMR spectrometer (UltraShield) aufgenommen unter Verwendung eines schaltbaren Probengebers (PA BBO 500SB BBF-H-D-05-Z, ^1H , BB = 19F und 31P – 15N) mit z-Achsen Gradient, automatischem Tuning und passendem Zubehör (Bruker BioSpin). Die Resonanzfrequenz für ^1H NMR betrug 500.13 MHz und für ^{13}C NMR 125.75 MHz. Alle Messungen wurden in quantitativ deuteriertem Methanol bei 298 K durchgeführt. Die Standard 1D Experimente kamen in der vom Ausrüster zur Verfügung gestellten Form zur Anwendung. Die chemischen Verschiebungen wurden bezogen auf das interne Standardsignal, das vom restlichen nicht-deuterierten Rest des Methanol-Lösungsmittelsignals ^1H (δ 3.31 ppm) stammte, beziehungsweise auf das Kohlenstoffsignal von Methanol ^{13}C (δ 49.00 ppm).“ [15]*

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden alle relevanten Resultate, die aus den verschiedenen Analysen hervorgingen, genau beschrieben. Eine anschließende Diskussion der Ergebnisse folgt in Kapitel 4 auf Seite 77.

3.1 Vergleich der Pflanzenmaterialien JS EC und JS FG

Für diese Diplomarbeit stand sowohl Pflanzenmaterial aus Ecuador (JS EC) als auch aus Französisch-Guyana (JS FG) zur Verfügung (siehe Kapitel 2.1, Seite 4). Deshalb war es von großem Interesse, beide Materialien einerseits bezüglich ihres DC-Fingerprints und andererseits bezüglich ihres α -glucosidasehemmenden Potentials miteinander zu vergleichen.

3.1.1 Fingerprintvergleich von JS EC und JS FG

Um die Fingerprints der beiden Materialien JS EC und JS FG (siehe Kapitel 2.1, Seite 4) einander gegenüberstellen zu können, wurde mithilfe der HPTLC ein phytochemischer Fingerprintvergleich, dessen Durchführung in Kapitel 2.3.3 auf Seite 16 genau beschrieben ist, erstellt.

Auf den folgenden Seiten werden ausschließlich aussagekräftige Fingerprints bestimmter Extrakte einander gegenübergestellt. Die Abbildungen aller HPTLC-Platten sind im Anhang auf den Seiten 84-103 zu finden.

Unterschiede im Fingerprint einiger Extrakte konnten vor allem beim Screening auf Flavonoide (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11, Seite 38), auf polare Komponenten (siehe Abbildung 12, Seite 39) und auf Aminosäuren (siehe Abbildung 13, Seite 40) gefunden werden. Die Gegenüberstellung der Fingerprints des Systems zur Detektion apolarer Komponenten und des Systems zur Untersuchung von Saponinen und Lignanen lieferte hingegen keine relevanten Unterschiede der beiden Materialien JS EC und JS FG.

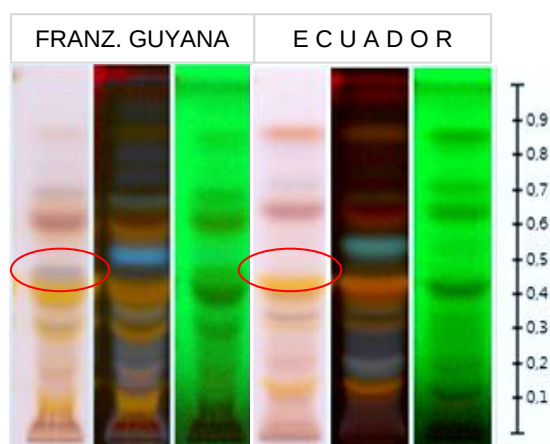


Abbildung 10: Screening auf Flavonoide

Extrakt 8 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG (links) und JS EC (rechts; siehe Kapitel 2.1, Seite 4), derivatisiert mit Reagenz 1 (siehe Tabelle 2, Seite 10) bei Tageslicht und unter 366 nm und ohne Reagenz 1 unter 254 nm, entwickelt in DC-System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9)

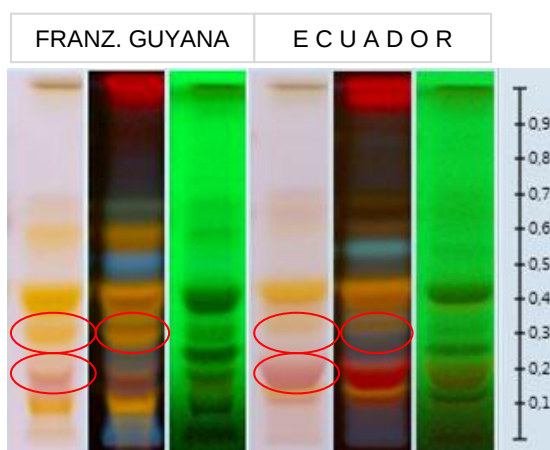


Abbildung 11: Screening auf Flavonoide

Extrakt 9 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG (links) und JS EC (rechts; siehe Kapitel 2.1, Seite 4), derivatisiert mit Reagenz 1 (siehe Tabelle 2, Seite 10) bei Tageslicht und unter 366 nm und ohne Reagenz 1 unter 254 nm, entwickelt in DC-System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9)

Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen die Gegenüberstellung der Fingerprints von Extrakt 8 (Extraktionsmittel Wasser) bzw. Extrakt 9 (Extraktionsmittel Ethanol 70%) der beiden Pflanzenmaterialien JS EC und JS FG (siehe Tabelle 4, Seite 16), entwickelt im System der Flavonoide (siehe Tabelle 5, Seite 17).

Im Fingerprint des Extraktes Nr. 8 ist bei Tageslicht im Material von Französisch-Guyana bei $R_f = 0,48$ deutlich eine blaue Bande zu erkennen, welche im Material aus Ecuador gänzlich fehlt (siehe Abbildung 10, Seite 38).

Beim direkten Vergleich von Extrakt 9 (siehe Abbildung 11, Seite 38) kann man anhand der bei Tageslicht und unter 366 nm gelb gefärbten Banden bei $R_f = 0,32$ erkennen, dass das Pflanzenmaterial aus Französisch-Guyana deutlich mehr Flavonoide enthält als *Justicia secunda* aus Ecuador. Im Gegensatz dazu ist im selben Extrakt des Materials aus Ecuador ein höherer Farbstoffgehalt zu finden als im Fingerprint des Materials aus Französisch-Guyana, was anhand der bei Tageslicht rot gefärbten Banden bei $R_f = 0,2$ deutlich zu erkennen ist.

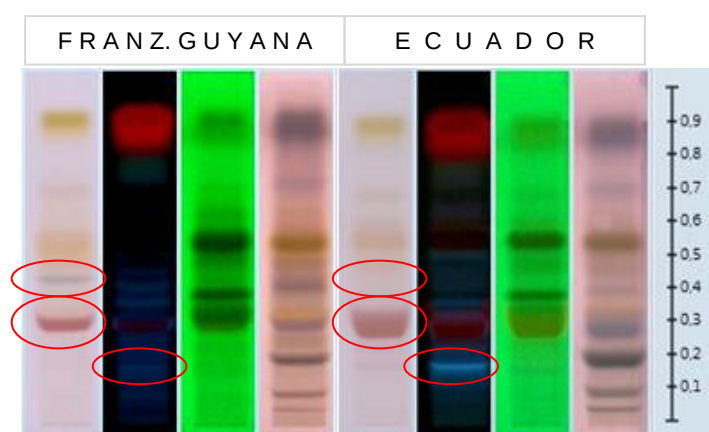


Abbildung 12: Screening auf polare Komponenten

Extrakt 9 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG (links) und JS EC (rechts; siehe Kapitel 2.1, Seite 4), entwickelt in DC-System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht, unter 366 und 254 nm und derivatisiert mit Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, Seite 10) bei Tageslicht

In Abbildung 12 ist die Gegenüberstellung der Fingerprints von Extrakt 9 (Extraktionsmittel Ethanol 70%) der Materialien JS FG und JS EC (siehe Tabelle 4, Seite 16), entwickelt im DC-System für polare Komponenten (siehe Tabelle 5, Seite 17), dargestellt.

Beim Vergleich des Extraktes Nr. 9 kann man im Fingerprint von JS FG bei Tageslicht bei $R_f = 0,44$ eine schwache blaue Bande erkennen, welche im selben Extrakt aus JS EC nicht vorhanden ist (siehe Abbildung 12, Seite 39). Im Gegensatz dazu, zeigt sich im Fingerprint des Materials aus Ecuador unter UV 366 nm bei $R_f = 0,18$ eine blau fluoreszierende Bande, welche jedoch im Material aus Französisch-Guyana nur sehr schwach ausgeprägt ist.

Ebenfalls in Abbildung 12 auf Seite 39 ist anhand der bei Tageslicht rot gefärbten Banden bei $R_f = 0,31$ deutlich zu erkennen, dass JS EC einen höheren Gehalt an Farbstoffen aufweist als JS FG. Dies konnte auch bereits beim Vergleich von Extrakt 9, durchgeführt im Flavonoid-System, beobachtet werden (siehe Abbildung 11, Seite 38).

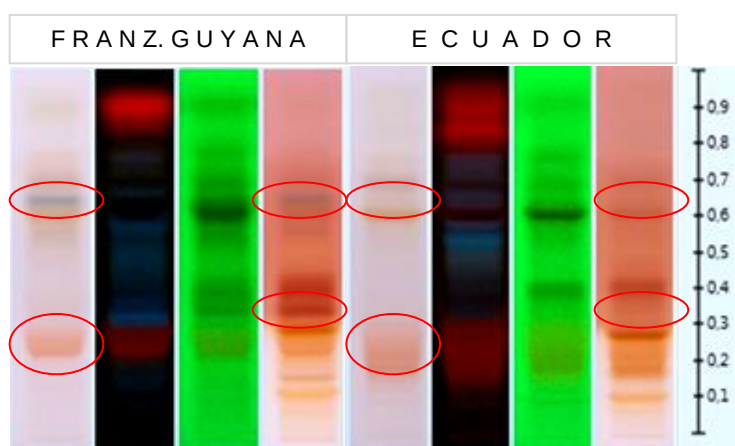


Abbildung 13: Screening auf Aminosäuren

Extrakt 10 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG (links) und JS EC (rechts; siehe Kapitel 2.1, Seite 4), entwickelt in DC-System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht, unter 366 und 254 nm und derivatisiert mit Reagenz 5 (siehe Tabelle 2, Seite 10)

Abbildung 13 zeigt die Gegenüberstellung der Fingerprints von Extrakt 10 (Extraktionsmittel Methanol 80%) der beiden Drogenmaterialien JS FG und JS EC (siehe Tabelle 4, Seite 16), analysiert im System für Aminosäuren (siehe Tabelle 5, Seite 17).

Der Fingerprint des Extraktes 10 aus JS FG zeigt bei $R_f = 0,64$ sowohl bei Tageslicht als auch nach Behandlung der Platte mit Ninhydrin-Reagenz (=Reagenz 5; siehe Tabelle 2, Seite 10) eine deutliche blaue Bande, welche jedoch im selben Extrakt aus JS EC nicht vorhanden ist (siehe Abbildung 13, Seite 40).

Ebenfalls zeigt sich, dass im Fingerprint von Extrakt 10 aus dem Material aus Ecuador deutlich mehr Farbstoff vorhanden ist als im selben Extrakt von JS FG, was anhand der bei Tageslicht rötlich gefärbten Banden bei $R_f = 0,27$ deutlich zu erkennen ist.

Des Weiteren kann man in Abbildung 13 auf Seite 40 im Fingerprint von JS FG durch Behandlung der Platte mit Ninhydrin-Reagenz (=Reagenz 5; siehe Tabelle 2, Seite 10) eine zusätzliche rot gefärbte Bande bei $R_f = 0,34$ erkennen, die im selben Extrakt aus JS EC nicht vorhanden ist. Bei dieser Verbindung könnte es sich um ein aromatisches Amin oder eine Aminosäure mit aromatischer Seitenkette handeln, da die Bande unter 254 nm zusätzlich löscht.

Zusammenfassend konnten also durchaus Unterschiede im Fingerprint der beiden Materialien JS EC und JS FG gefunden werden. Diese waren besonders gut in den Systemen zur Detektion von Flavonoiden, polaren Komponenten und Aminosäuren zu sehen. Eindeutig nachgewiesen werden konnte ein erhöhter Farbstoffgehalt im Material aus Ecuador (siehe Abbildung 11 auf Seite 38, Abbildung 12 auf Seite 39 und Abbildung 13 auf Seite 40) und im Gegensatz dazu, ein höherer Gehalt an Flavonoiden im Material aus Französisch-Guyana (siehe Abbildung 11, Seite 38). Zur genauen qualitativen und quantitativen Bestimmung des Inhaltsstoffspektrums beider Materialien wären jedoch weiterführende Analysen nötig.

3.1.2 Aktivitätsvergleich von JS EC und JS FG im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay

Da durch den phytochemischen HPTLC-Vergleich der beiden Materialien JS EC und JS FG (siehe Kapitel 2.1, Seite 4) in bestimmten Extrakten deutliche Unterschiede im Fingerprint nachgewiesen werden konnten (siehe Kapitel 3.1.1, Seite 37), war es angebracht, JS EC und JS FG im Vergleich auch auf mögliche Unterschiede in ihrer α -glucosidasehemmenden Aktivität zu untersuchen. Die Durchführung des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays erfolgte wie in Kapitel 2.6.1 auf Seite 31 beschrieben. Als Positivkontrolle wurde Acarbose (siehe Kapitel 2.6, Seite 30 unten) verwendet. Der α -Glucosidase-Inhibitions-Assay zum Vergleich der beiden Pflanzenmaterialien ist in der folgenden Abbildung dargestellt (siehe Abbildung 14).

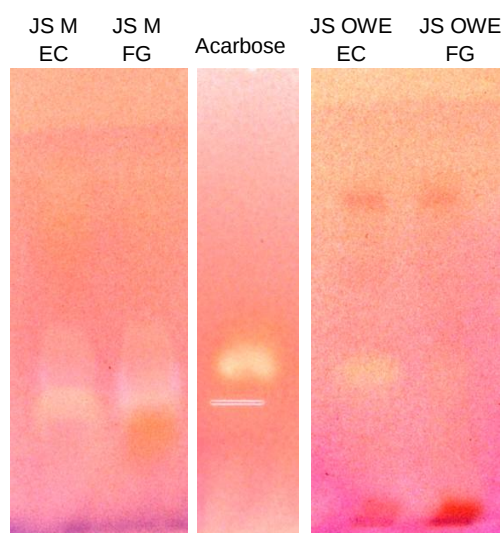


Abbildung 14: α -Glucosidase-Inhibitions-Assay - Materialvergleich
JS M EC, JS M FG, JS OWE EC, JS OWE FG (siehe Kapitel 2.2, Seite 6),
entwickelt in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) und
Acarbose (siehe Kapitel 2.6, Seite 30), aufgetragen nach dem Entwickeln

Da sowohl die Enzym- als auch die Substratlösung durch Besprühen auf die Platte aufgebracht wurden (siehe Kapitel 2.6.1, Seite 31), kam es aufgrund der schlechteren Benetzung der Platte mit den Lösungen erst nach 24 Stunden zu einer Verfärbung der Platte. Trotz der eher schwachen Violettfärbung sind eindeutige weiße Banden, welche das Vorhandensein α -glucosidasehemmender Verbindungen anzeigen, in allen untersuchten Extrakten zu erkennen.

Die Methanolextrakte beider Materialien (JS M EC und JS M FG) zeigen vergleichbare Aktivität, welche durch die weißen Banden bei einem R_f -Wert von 0,30 zu erkennen ist.

Auch die Original-Wasser-Extrakte beider Pflanzenmaterialien (JS OWE EC und JS OWE FG) weisen α -glucosidasehemmendes Potential auf, jedoch liegen die weißen Banden im Vergleich zu den Methanolextrakten etwas weiter oben ($R_f = 0,38$) und sind schwächer ausgeprägt. Dies könnte darauf hinweisen, dass es sich bei den aktiven Verbindungen in den Methanol- und den Original-Wasser-Extrakten entweder um unterschiedliche Substanzen handelt oder, dass die aktiven Komponenten durch den Zusatz von Trifluoressigsäure im Rahmen der Herstellung der OWEs (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) entsprechend verändert bzw. beeinflusst werden und auf der Platte somit weiter nach oben wandern.

Die α -glucosidasehemmende Aktivität des OWEs von *Justicia secunda* aus Französisch-Guyana scheint außerdem weniger stark ausgeprägt zu sein als jene von JS OWE EC, da bei JS OWE FG nur eine sehr schwache weiße Bande zu erkennen ist.

In Abbildung 14 auf Seite 42 ist außerdem anhand der ausgeprägten weißen Bande bei einem R_f -Wert von 0,45 deutlich zu sehen, dass sich die Acarbose-Lösung (siehe 2.6, Seite 30 unten) gut als Positivkontrolle für den α -Glucosidase-Inhibitions-Assay eignet.

Aufgrund des Behandeln mit der wässrigen Enzymlösung (siehe Abbildung 9, Seite 28) kam es zu einer starken Wanderung der Acarbose auf der Platte, was ebenfalls in Abbildung 14 auf Seite 42 gut zu erkennen ist, da sich die weiße Bande deutlich oberhalb der Stelle, an der die Acarbose aufgetragen wurde, befindet (siehe Phänomen „Wandern“ auf Seite 29 unten). Aufgrund dessen sollte die Acarboseelösung eher in der Mitte der Platte aufgetragen werden, um sicherzustellen, dass es durch das Tauchen in die wässrige Enzymlösung nicht zum Herunterwaschen der Positivkontrolle kommt.

3.2 Untersuchungen der Mutterfraktionen aus JS EC

Die im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler hergestellten Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Kapitel 2.2 auf Seite 6 und Abbildung 5 auf Seite 7) wurden ebenfalls auf Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay getestet. Anschließend wurden sie auch einer HPTLC- und einer HPLC-Analyse unterzogen.

3.2.1 Testung auf Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay

Die Durchführung des α -Glucosidase-Inhibitions-Assays zur Untersuchung der Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Abbildung 5 auf Seite 7) erfolgte wie in Kapitel 2.6.2 auf Seite 32 beschrieben. Als Positivkontrolle wurde Castanospermin (= Csp) verwendet (siehe Kapitel 2.6, Seite 30 unten). Abbildung 15 (siehe unten) zeigt das Ergebnis des Assays der Mutterfraktionen aus JS EC.

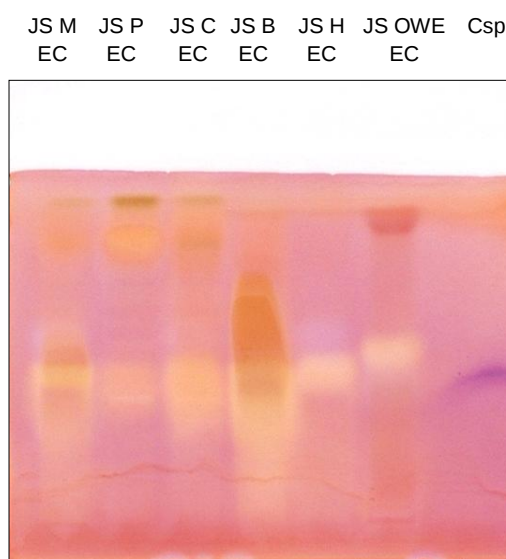


Abbildung 15: α -Glucosidase-Inhibitions-Assay – Mutterfraktionen
JS M EC, JS P EC, JS C EC, JS B EC, JS H EC und JS OWE EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6), entwickelt in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) und Castanospermin (siehe Kapitel 2.6, Seite 30), aufgetragen nach dem Entwickeln

In Abbildung 15 auf Seite 45 ist deutlich zu sehen, dass alle Mutterfraktionen aus JS EC α -glucosidasehemmendes Potential aufweisen, da im Fingerprint jedes Extraktes eine weiße Bande erkennbar ist. Die weißen Banden liegen bei JS M EC, JS P EC, JS C EC, JS B EC und JS H EC alle bei einem R_f -Wert von 0,50, wobei bei JS M EC und JS B EC zusätzlich ein weißer Schatten erkennbar ist, der sich über die gesamte untere Laufstrecke zieht. Die weiße Bande von JS OWE EC liegt mit einem R_f -Wert von 0,55 etwas oberhalb der weißen Stellen der anderen Extrakte.

Die Positivkontrolle mit Castanospermin, welches in der Literatur als α - und β -Glucosidase-Hemmer bezeichnet wurde [13], funktionierte weder in dem in Abbildung 15 auf Seite 45 abgebildeten Assay, da keine weiße Bande zu erkennen war, noch in weiteren Assays, die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführt wurden. Nach Rücksprache mit der Erstautorin des Artikels stellte sich heraus, dass Castanospermin in diesem Enzym-Assay ausschließlich unter Verwendung der β -Glucosidase, welche an der Spaltung von Cellulose beteiligt ist, zu positiven Ergebnissen führte. Somit konnte ein Fehler in der Publikation aufgeklärt werden. Castanospermin war also nicht als Positivkontrolle für diesen α -Glucosidase-Inhibitions-Assay geeignet.

Um herauszufinden, ob alle Mutterfraktionen eine gemeinsame Substanz enthielten, die für die Aktivität im Assay verantwortlich war, oder ob das α -glucosidasehemmende Potential aufgrund unterschiedlicher Verbindungen zustande kam, wurden die Mutterfraktionen anschließend mittels HPTLC (siehe Kapitel 3.2.2, Seite 47) und HPLC (siehe Kapitel 3.2.3, Seite 50) analysiert.

3.2.2 Resultate der HPTLC-Analyse

Alle Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Abbildung 5, Seite 7) zeigten deutliche Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay (siehe Kapitel 3.2.1., Seite 45). Um herauszufinden, ob es sich bei der aktiven Verbindung um eine gemeinsame Substanz, die in allen Mutterfraktionen enthalten war, handelte, wurden zwei HPTLC-Analysen durchgeführt (siehe 2.6.2., Seite 32). Die Ergebnisse beider HPTLC-Analysen sind in Abbildung 16 (siehe unten) und in Abbildung 17 auf Seite 48 dargestellt.

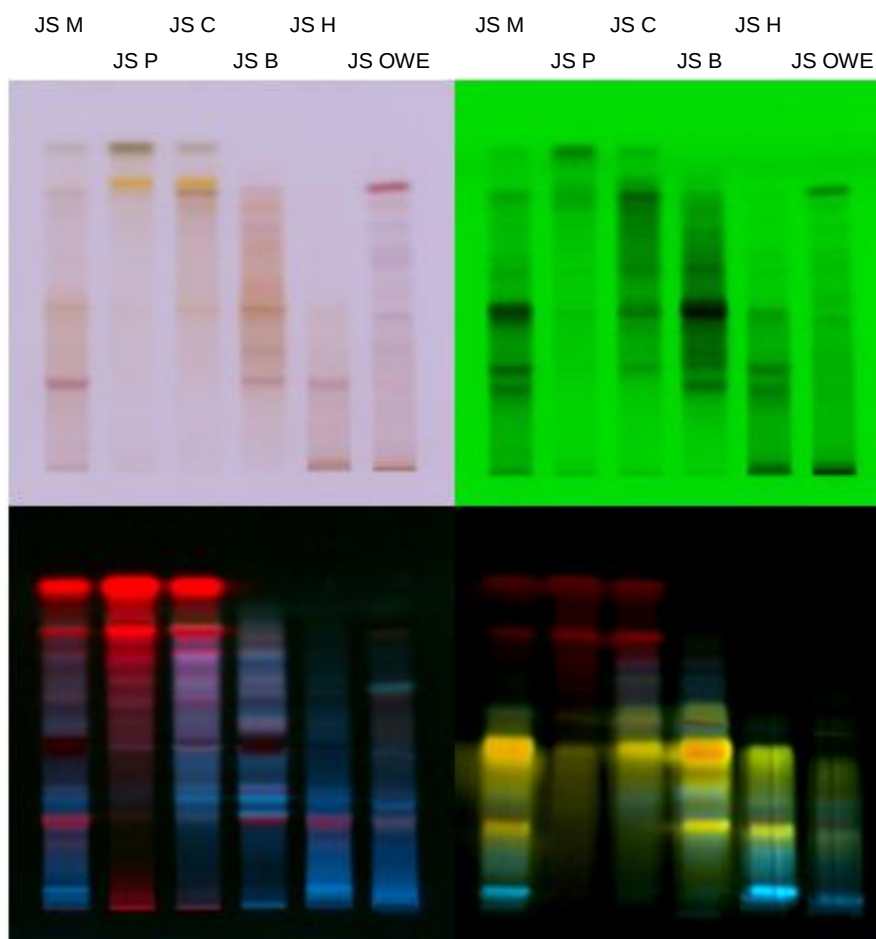


Abbildung 16: HPTLC 1 der Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Abbildung 5, Seite 7), entwickelt in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht (links oben), unter 254 nm (rechts oben), unter 366 nm (links unten) und derivatisiert mit Reagenz 1 (rechts unten; siehe Tabelle 2, Seite 10)

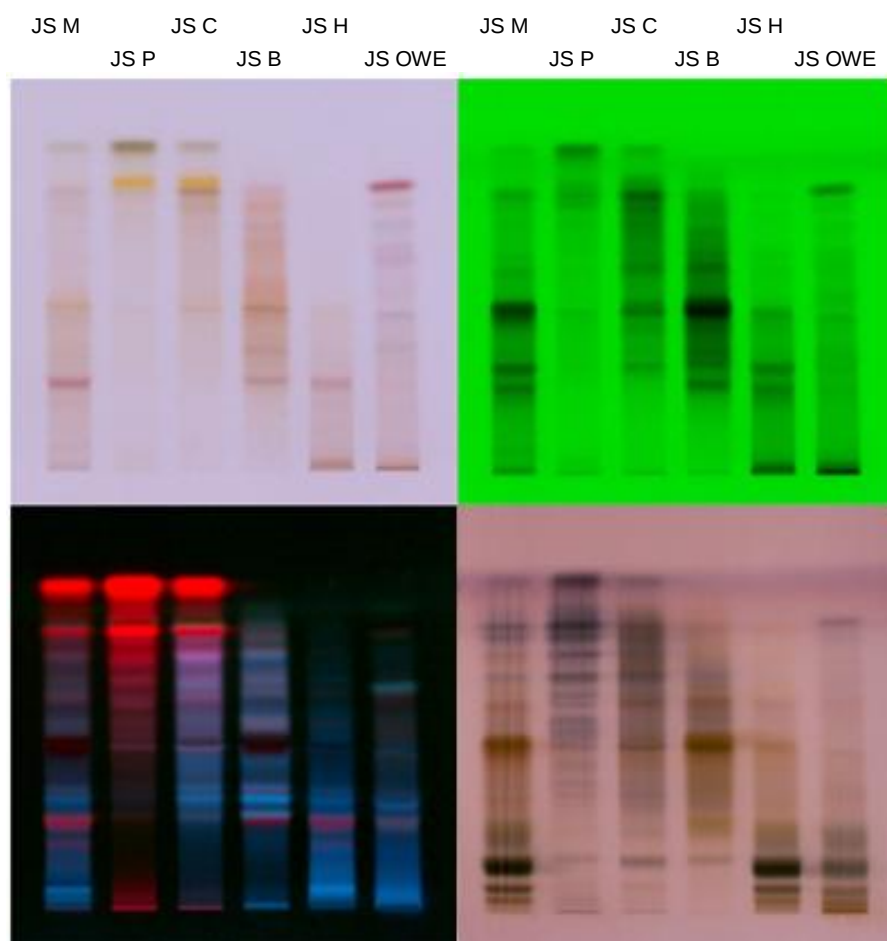


Abbildung 17: HPTLC 2 der Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Abbildung 5, Seite 7),
entwickelt in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht (links oben),
unter 254 nm (rechts oben), unter 366 nm (links unten) und
derivatisiert mit Reagenz 4 (rechts unten; siehe Tabelle 2, Seite 10)

Außer der unter 366 nm gelb fluoreszierenden Bande bei $R_f = 0,50$ (siehe Abbildung 16 auf Seite 47; rechts unten) ist weder in Abbildung 16 auf Seite 47 noch in Abbildung 17 auf Seite 48 eine eindeutige gemeinsame Bande zu finden, die in allen Mutterfraktionen enthalten ist und einheitlich mit den Reagenzien 1 und 4 (siehe Tabelle 2, Seite 10) reagiert.

Diese unter 366 nm gelb fluoreszierende Bande stammt von einem Flavonoid, das bereits von Koffi et al. als Luteolinderivat identifiziert werden konnte [17]. Eine α -glucosidasehemmende Wirkung durch reines Luteolin konnte außerdem von Yan et al. nachgewiesen werden [18].

Im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay liegt die gelbe Flavonoidbande jedoch etwas oberhalb der aktiven Zonen, was vor allem bei JS B EC deutlich zu erkennen ist (siehe Abbildung 15, Seite 45). Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass die α -glucosidasehemmende Aktivität der Mutterfraktionen auf andere Verbindungen zurückzuführen ist. Um vollständig klären zu können, ob nicht doch das Luteolinderivat für die α -glucosidasehemmende Aktivität der Mutterfraktionen von JS EC verantwortlich ist, wären weitere Untersuchungen vonnöten.

Außerdem kam es aufgrund des Tauchens in die wässrige Enzymlösung zu einer ausgeprägten Wanderung der einzelnen Banden (siehe Phänomen „Wandern“ auf Seite 29), sodass im Nachhinein keine eindeutige Zuordnung der im Assay aktiven weißen Stellen (siehe Abbildung 15, Seite 45) zu den Banden, die aus der HPTLC-Analyse der Mutterfraktionen resultierten (siehe Abbildung 16 auf Seite 47 und Abbildung 17 auf Seite 48), getroffen werden konnte.

3.2.3 Resultate der HPLC-Analyse

Die Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Abbildung 5, Seite 7) wurden außerdem mittels HPLC (siehe Kapitel 2.6.2, Seite 32), analysiert. Die HPLC-Chromatogramme des ELSD (siehe Abbildung 80, Seite 104) und des DAD bei 290 nm (siehe Abbildung 81, Seite 105) und die UV-Spektren der Hauptpeaks (siehe Seite 106-110) sind im Anhang zu finden.

Die HPLC-Analyse bestätigte das Ergebnis der zuvor durchgeführten HPTLC-Analyse (siehe Kapitel 3.2.2, Seite 47). In den HPLC-Chromatogrammen ist außer dem Peak des Luteolinderivates (siehe Abbildung 80, Seite 104 und Abbildung 81, Seite 105, jeweils bei Minute 43) kein relevanter Peak zu sehen, der in allen Mutterfraktionen enthalten ist. Somit wären weitere Untersuchungen nötig, um feststellen zu können, ob die α -glucosidasehemmende Aktivität der Mutterfraktionen aus JS EC auf unterschiedliche Verbindungen oder auf das Luteolinderivat zurückzuführen ist.

Des Weiteren geht aus den HPLC-Chromatogrammen und den UV-Spektren hervor, dass es sich bei den Hauptkomponenten der Mutterfraktionen um Flavonoide und um teilweise noch unbekannte Substanzen handelt. Einige dieser Verbindungen wurden bereits im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler isoliert und stellen Arylpyrrolidone dar [8]. Diese Arylpyrrolidone konnten teilweise bestimmten Banden bzw. Peaks einiger DC- und HPLC-Chromatogramme, die im Rahmen dieser Diplomarbeit erstellt wurden, zugeordnet werden (siehe Peak 1 und 2 in Abbildung 25 auf Seite 61 und die Bande von CD1 in Abbildung 29 auf Seite 67).

3.3 Nachweis auf Zucker und Tannine

Da Zucker und Tannine häufig störende Stoffe in Enzym-Assays darstellen (siehe Kapitel 2.3.2, Seite 14), war es nötig auf das Vorhandensein jener Substanzen zu testen. Der Nachweis, dessen Durchführung in Kapitel 2.3.2 auf Seite 14 beschrieben ist, erfolgte mittels HPTLC. Getestet wurden dabei die im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler hergestellten Extrakte JS H EC und JS M EC aus dem Material aus Ecuador (siehe Kapitel 2.2, Seite 6). Das Ergebnis des Nachweises auf Zucker und Tannine mittels HPTLC ist in Abbildung 18 dargestellt.

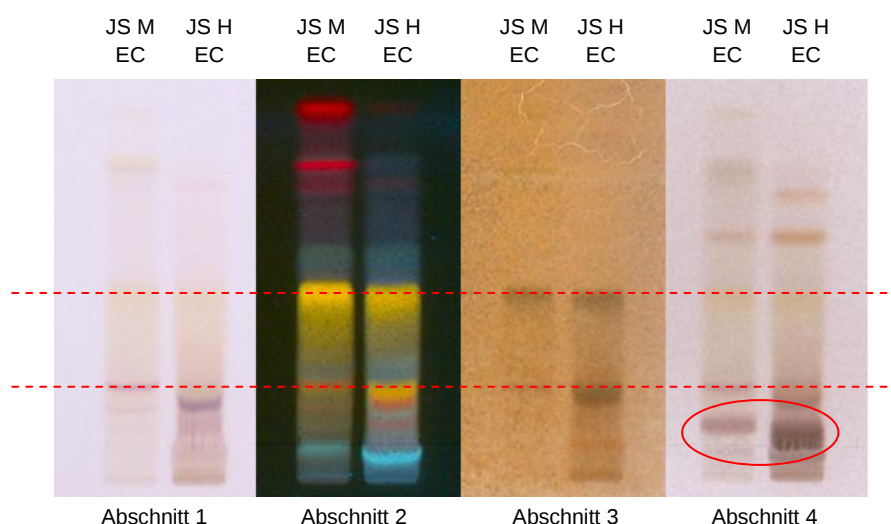


Abbildung 18: Nachweis auf Zucker und Tannine

JS M EC und JS H EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6), entwickelt in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht (Abschnitt 1) und besprüht mit Reagenz 1 (Abschnitt 2), Reagenz 2 (Abschnitt 3) und Reagenz 3 (Abschnitt 4; siehe Tabelle 2, Seite 10)

Durch Behandeln der Platte mit Naturstoffreagenz A (= Reagenz 1; siehe Tabelle 2, Seite 10) konnten die Flavonoide, welche in Abbildung 18 anhand der in Abschnitt 2 unter 366 nm gelb fluoreszierenden Banden bei $R_f = 0,50$ und $R_f = 0,25$ zu erkennen sind, detektiert werden.

Aus Abbildung 18 auf Seite 51 geht ebenfalls hervor, dass genau jene Flavonoid-Banden, aufgrund der phenolischen Struktur, auch mit Eisen-III-Chlorid (= Reagenz 2; siehe Tabelle 2, Seite 10) reagierten, was anhand der grau gefärbten Banden im 3. Abschnitt der Platte deutlich zu sehen ist. Da es sich bei Tanninen ebenfalls um polyphenolische Komponenten handelt, hätten etwaige Tannin-Banden ebenfalls eine Reaktion mit Eisen-III-Chlorid zeigen müssen. In Abschnitt 3 der Abbildung 18 auf Seite 51 sind jedoch außer den grauen Banden, welche eindeutig von den Flavonoiden stammen, da diese auch mit Naturstoff-reagenz A detektiert werden konnten, keine zusätzlichen grauen Banden zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass weder in JS H EC, noch in JS M EC Tannine enthalten sind.

Zum Nachweis auf Zucker wurde der rechte Teil der Platte (Abschnitt 4) mit Zucker-Reagenz (= Reagenz 3; siehe Tabelle 2, Seite 10) besprüht. Dadurch konnte das Vorhandensein von Zuckern sowohl in JS H EC als auch in JS M EC nachgewiesen werden, da es nach dem Besprühen mit Reagenz 3 zur Ausbildung braun gefärbter Banden kam, die im 4. Abschnitt der Abbildung 18 auf Seite 51 bei einem R_f -Wert von 0,10 (JS H EC) bzw. 0,15 (JS M EC) deutlich zu sehen sind.

Um das Vorhandensein von Zuckern in JS H EC zu bestätigen und um diese zu identifizieren, wurde eine weitere DC-Analyse, unter Verwendung von Glucose, Fructose und Saccharose als Referenzsubstanzen durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.2, Seite 14). Das Ergebnis der DC-Analyse ist in Abbildung 19 auf Seite 53 dargestellt.



Abbildung 19: Nachweis auf Zucker in JS H

JS H EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6), Glucose (=G), Fructose (=F) und Saccharose (=S), entwickelt in System 4 (siehe Tabelle 1, Seite 9) und besprüht mit Reagenz 3 (siehe Tabelle 2, Seite 10)

Das in Abbildung 19 dargestellte Dünnschichtchromatogramm zeigt die Banden der Referenzen Glucose (= G) bei einem R_f -Wert von 0,40, Fructose (= F) bei einem R_f -Wert von 0,43 und Saccharose (= S) bei einem R_f -Wert von 0,25. Im Fingerprint von JS H EC ist sowohl eine dunkle Bande bei einem R_f -Wert von 0,25 als auch eine rote Bande bei einem R_f -Wert von 0,43 zu erkennen. Aus der Übereinstimmung jener Banden mit denen der Zuckerreferenzen geht hervor, dass sowohl Saccharose als auch Fructose in JS H EC enthalten sind. Die blaue Bande der Glucose scheint im Fingerprint von JS H EC von der roten Bande der Fructose überdeckt und ist somit nicht eindeutig zuordenbar. Da das Vorhandensein von störenden Zuckern in JS H EC eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend eine Säulenchromatographie an Polystyrol durchgeführt, um die Zucker aus der Wasserfraktion abzutrennen (siehe Kapitel 2.5., Seite 21).

3.4 Zuckerabtrennung – Untersuchungen der Fraktionen V1-V7

Um die Zucker, welche im nachfolgenden α -Glucosidase-Inhibitions-Assay zur kompetitiven Verdrängung des Substrats und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnten, aus JS H EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) abzutrennen, wurde eine Säulenchromatographie an Polystyrol durchgeführt. Diese erfolgte wie in Kapitel 2.5 auf Seite 21 beschrieben. Aus der SC gingen sieben Fraktionen V1-V7 hervor (siehe Tabelle 8, Seite 24), welche anschließend mittels DC und HPLC analysiert wurden, um den Erfolg der Zuckerabtrennung beurteilen zu können.

3.4.1 Resultate der DC-Analyse

Die Durchführung der DC-Analyse der Fraktionen V1-V7 (siehe Tabelle 8, Seite 24) ist in Kapitel 2.5 auf Seite 25 oben beschrieben und das zugehörige DC-Chromatogramm ist in Abbildung 20 (siehe unten) dargestellt.

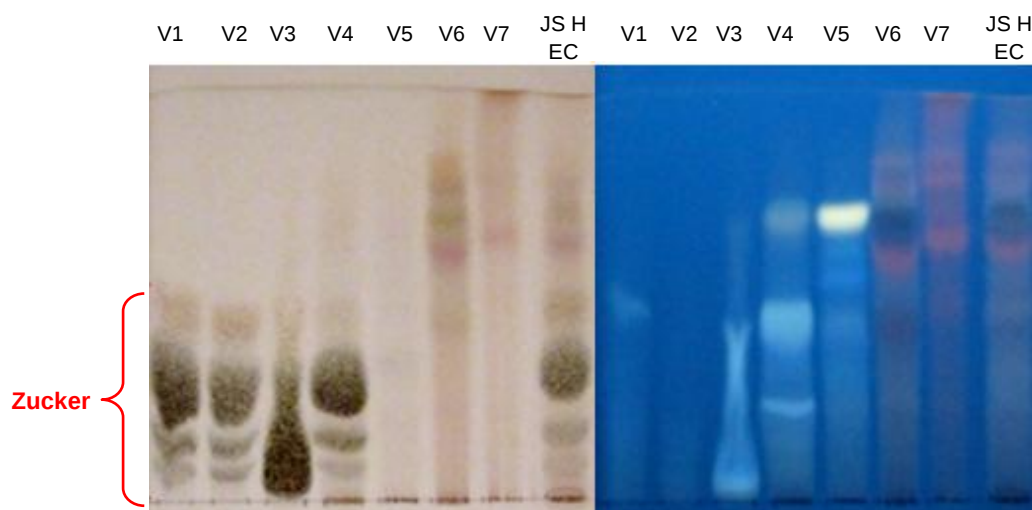


Abbildung 20: DC-Resultat der Zuckerabtrennung

Fraktion V1-V7 (siehe Tabelle 8, Seite 24) und JS H EC, entwickelt in System 4 (siehe Tabelle 1, Seite 9), besprüht mit Reagenz 3 (links; siehe Tabelle 2, Seite 10) und unter 366 nm (rechts)

In dem in Abbildung 20 auf Seite 54 dargestellten Dünnschichtchromatogramm ist anhand der dunklen Banden, die durch Besprühen mit Zucker-Reagenz (= Reagenz 3; siehe Tabelle 2, Seite 10) detektiert werden konnten und sich über den unteren Bereich der Platte bis hin zu einem R_f -Wert von 0,50 erstrecken, deutlich zu erkennen, dass die Zucker in Fraktion V1-V4 angereichert sind. Fraktion V6 und V7, die durch Eluieren mit Methanol gewonnen wurden, enthalten hingegen die zuckerfreien Reste, was besonders gut im Vergleich mit dem Fingerprint von JS H EC zu sehen ist. Die Zucker konnten also mithilfe der Polystyrolsäule erfolgreich aus JS H EC abgetrennt werden und befinden sich in den Fraktionen V1-V4. Im Hinblick auf die Gewichtsbilanz, die in Abbildung 7 auf Seite 24 angeführt ist, geht außerdem hervor, dass die Zucker einen Gewichtsanteil von über 70% in JS H EC ausmachen.

In Fraktion V3 und V4 sind unter 366 nm zusätzlich ausgeprägte blau fluoreszierende Banden zu erkennen, die von unbekannten Substanzen stammen und gemeinsam mit den Zuckern durch Eluieren mit Wasser aus JS H EC abgetrennt wurden.

Fraktion V5, welche die letzte Fraktion, bei der Wasser als Elutionsmittel zum Einsatz kam, darstellt, enthält zwar keine Zucker mehr, jedoch ist unter 366 nm bei einem R_f -Wert von 0,72 deutlich eine hell fluoreszierende Bande zu sehen, bei der es sich ebenfalls um eine uns unbekannte Verbindung handelt.

Der Erfolg der Zuckerabtrennung wurde zusätzlich mittels HPLC überprüft (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 56).

3.4.2 Resultate der HPLC-Analyse

Um das Ergebnis der Zuckerabtrennung zu bestätigen, wurde zusätzlich eine HPLC-Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.5, Seite 25). Die folgende Abbildung zeigt die direkte Gegenüberstellung der HPLC-Chromatogramme (detektiert mittels ELSD) der zuckerhaltigen Mutterfraktion JS H EC und der zuckerfreien Fraktion V6 (siehe Abbildung 21).

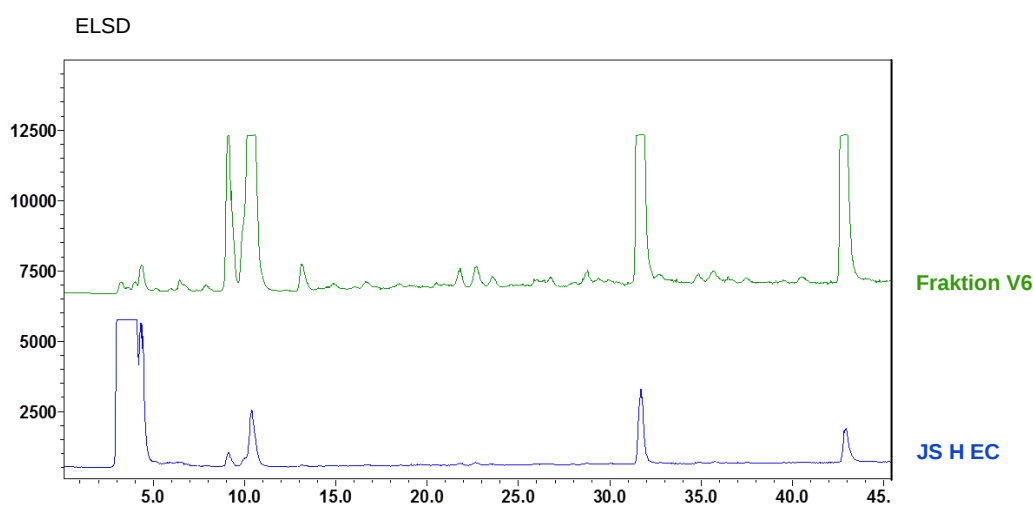


Abbildung 21: HPLC-Resultat der Zuckerabtrennung

JS H EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) und Fraktion V6 (siehe Tabelle 8, Seite 24), untersucht mittels HPLC (siehe Tabelle 6, Seite 20; analytische HPLC) und detektiert mittels ELSD

Das Ergebnis der HPLC bestätigt das Resultat der in Abbildung 20 auf Seite 54 dargestellten DC-Analyse. In Abbildung 21 ist deutlich zu erkennen, dass der große Peak bei 4 Minuten, welcher in JS H EC enthalten ist und die polaren Zucker repräsentiert, im Chromatogramm von Fraktion V6 fehlt. Die Zucker konnten also durch die in Kapitel 2.5 auf Seite 21 beschriebene Säulenchromatographie an Polystyrol erfolgreich abgetrennt werden. Des Weiteren ist anhand der Signalstärke der anderen Peaks im ELSD, die Retentionszeiten von 9 Minuten, 10,5 Minuten, 32 Minuten und 43 Minuten aufweisen, zu sehen, dass die restlichen Verbindungen im Vergleich zu JS H EC in der zuckerfreien Fraktion V6 angereichert sind.

3.4.3 Testung auf Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay

Um die Fraktionen, die aus der SC an Polystyrol erhalten wurden (siehe Tabelle 8, Seite 24), auf potentiell blutzuckersenkende Aktivität zu testen, wurden zwei separate α -Glucosidase-Inhibitions-Assays, unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen, durchgeführt. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 2.6.3 auf Seite 33 beschrieben.

Fraktion V1 und V2 wurden vereinigt und in der Folge als V1 bezeichnet auf Aktivität im Assay getestet, da das Resultat der vorhergehenden DC-Analyse einen identischen Fingerprint der beiden Fraktionen lieferte (siehe Kapitel 3.4.1, Seite 54).

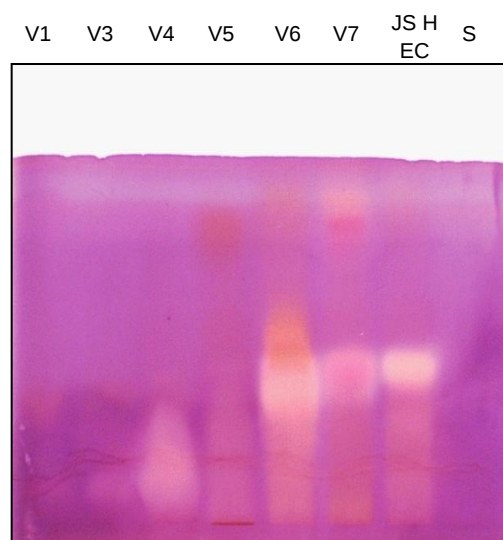


Abbildung 22: α -Glucosidase-Inhibitions-Assay 1 der Fraktionen aus der SC
(siehe Tabelle 8, Seite 24) gemeinsam mit JS H EC und Saccharose (= S),
entwickelt in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9)

Abbildung 22 zeigt das Resultat des in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) durchgeführten α -Glucosidase-Inhibitions-Assays der Fraktionen aus der SC an Polystyrol gemeinsam mit JS H EC und Saccharose. Aus der Abbildung geht hervor, dass nicht nur JS H EC, dessen weiße Bande bei einem R_f -Wert von 0,50 zu sehen ist, sondern auch die Fraktionen V4 und V6 eindeutig α -glucosidasehemmendes Potential aufweisen. Die deutliche weiße Bande der zuckerfreien Fraktion V6 liegt bei einem R_f -Wert von 0,45,

während die weiße Zone der zuckerhaltigen Fraktion V4 einen ungefähren R_f -Wert von 0,15 aufweist. Aufgrund der Tatsache, dass es bei der zusätzlich aufgetragenen Saccharose nicht zur Ausbildung einer weißen Bande im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay kam (siehe Abbildung 22, Seite 57), konnte gezeigt werden, dass Zucker scheinbar nicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Eine positive Reaktion durch Zucker ist dadurch jedoch nicht gänzlich auszuschließen, da durch eine höhere Konzentration an Zuckern sehr wohl eine kompetitive Verdrängung des Substrats möglich wäre und somit ein falsch-positives Ergebnis resultieren könnte.

Der zweite α -Glucosidase-Inhibitions-Assay der Fraktionen, der in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9) durchgeführt wurde, ist in Abbildung 23 dargestellt.

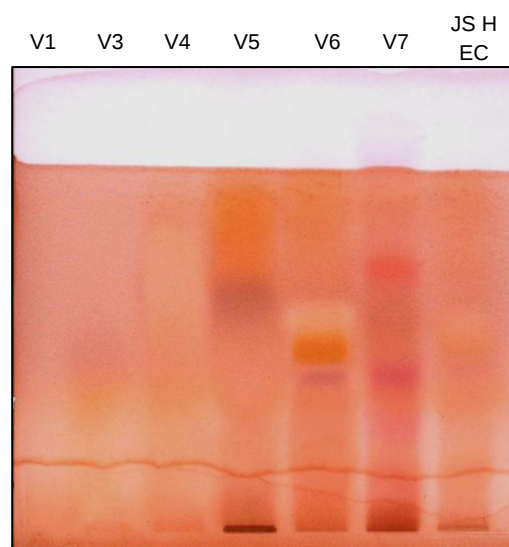


Abbildung 23: α -Glucosidase-Inhibitions-Assay 2 der PS-Fraktionen

(siehe Tabelle 8, Seite 24) gemeinsam mit JS H EC
entwickelt in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9)

Die Färbung des zweiten Assays, der in Abbildung 23 dargestellt ist, ist nur relativ schwach ausgeprägt. Die geringe Farbintensität geht auf den hohen Säuregehalt von DC-System 3 zurück (siehe Tabelle 1, Seite 9), da dadurch die α -Glucosidase, welche bei einem pH-Wert von 7,5 die höchste Aktivität

zeigt, teilweise inaktiviert wird. Trotz der geringen Farbintensität bestätigt das Resultat des zweiten Assays die α -glucosidasehemmende Aktivität von Fraktion V4 und V6, da dennoch weiße Stellen zu erkennen sind. Die weiße Bande von Fraktion V6 befindet sich bei einem R_f -Wert von 0,60, während bei Fraktion V4 anstelle einer eindeutigen Bande ein schwacher weißer Bereich zu sehen ist, der sich von einem R_f -Wert von 0,60 bis hin zu einem R_f -Wert von 0,90 erstreckt.

Es konnte also eine eindeutige, reproduzierbare α -glucosidasehemmende Aktivität der Fraktionen V4 und V6 nachgewiesen werden. Mit diesen Fraktionen wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, mit dem Ziel, jene Substanzen zu identifizieren, die zur Aktivität im Assay führten (siehe Kapitel 3.5, Seite 60).

3.5 Untersuchungen der aktiven Fraktionen V4 und V6

Um herauszufinden, welche Substanzen für die α -glucosidasehemmende Aktivität von Fraktion V4 und V6, die in Kapitel 3.4.3 auf Seite 57 eindeutig nachgewiesen werden konnte, verantwortlich waren, wurden jene Fraktionen einer präparativen HPTLC, deren Durchführung in Kapitel 2.3.1 auf Seite 13 beschrieben ist, unterzogen. Anschließend wurden die so gewonnenen Verbindungen mittels HPLC analysiert und in einem erneuten α -Glucosidase-Inhibitions-Assay auf Aktivität getestet. Die im Rahmen der präparativen HPTLC ausgekratzten Zonen und die daraus gewonnenen Verbindungen werden in der Folge als V6 bzw. V4 O (Obere Bande), V4 M (Mittlere Bande) und V4 U (Untere Bande) bezeichnet.

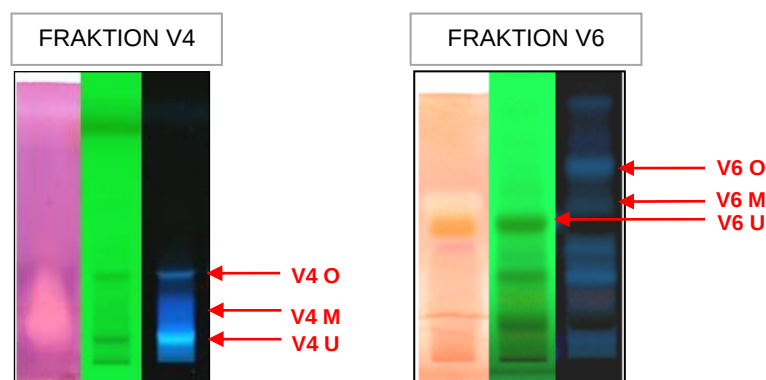


Abbildung 24: Gewinnung der aktiven Substanzen mittels präparativer HPTLC
 α -Glucosidase-Inhibitions-Assay von Fraktion V4 (links) und Fraktion V6 (rechts),
 verglichen mit den DC-Fingerprints unter 254 und 366 nm, entwickelt in System 1 (links)
 bzw. in System 3 (rechts; siehe Tabelle 1, Seite 9)

In Abbildung 24 ist zu sehen, welche Zonen im Rahmen der präparativen HPTLC ausgekratzte wurden. Im Falle von Fraktion V4 handelte es sich dabei um die unter 366 nm bei einem R_f -Wert von 0,15 breite blau fluoreszierende Bande, welche auf der Höhe der aktiven Zone im Assay lag (= V4 M), die unter 366 nm bei einem R_f -Wert von 0,35 blau fluoreszierende Bande (= V4 O) und die unter 366 nm hellblau fluoreszierende Bande mit einem R_f -Wert von 0,08 (= V4 U). Bei Fraktion V6 wurde jene Zone, welche unter 366 nm bei einem R_f -Wert von 0,60 schwach blau fluoreszierte und im Assay auf der Höhe der aktiven Stelle lag (= V6 M), die unter 366 nm blau fluoreszierende

Bande mit einem R_f -Wert von 0,70 (= V6 O) und die unter 254 nm löschende Zone mit einem R_f -Wert von 0,55 (= V6 U) ausgekratzt.

3.5.1 Resultate der HPLC-Analyse

V6 U, V6 M, V6 O bzw. V4 U, V4 M und V4 O (siehe Kapitel 3.5, Seite 60) wurden anschließend wie in Kapitel 2.6.3 auf Seite 33 beschrieben mittels HPLC vermessen, um herauszufinden, ob Substanzen in den entsprechenden Lösungen angereichert waren, welche eventuell zur α -glucosidasehemmenden Aktivität von Fraktion V4 und V6 geführt haben könnten. Die HPLC-Chromatogramme und die UV-Spektren der Hauptpeaks sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

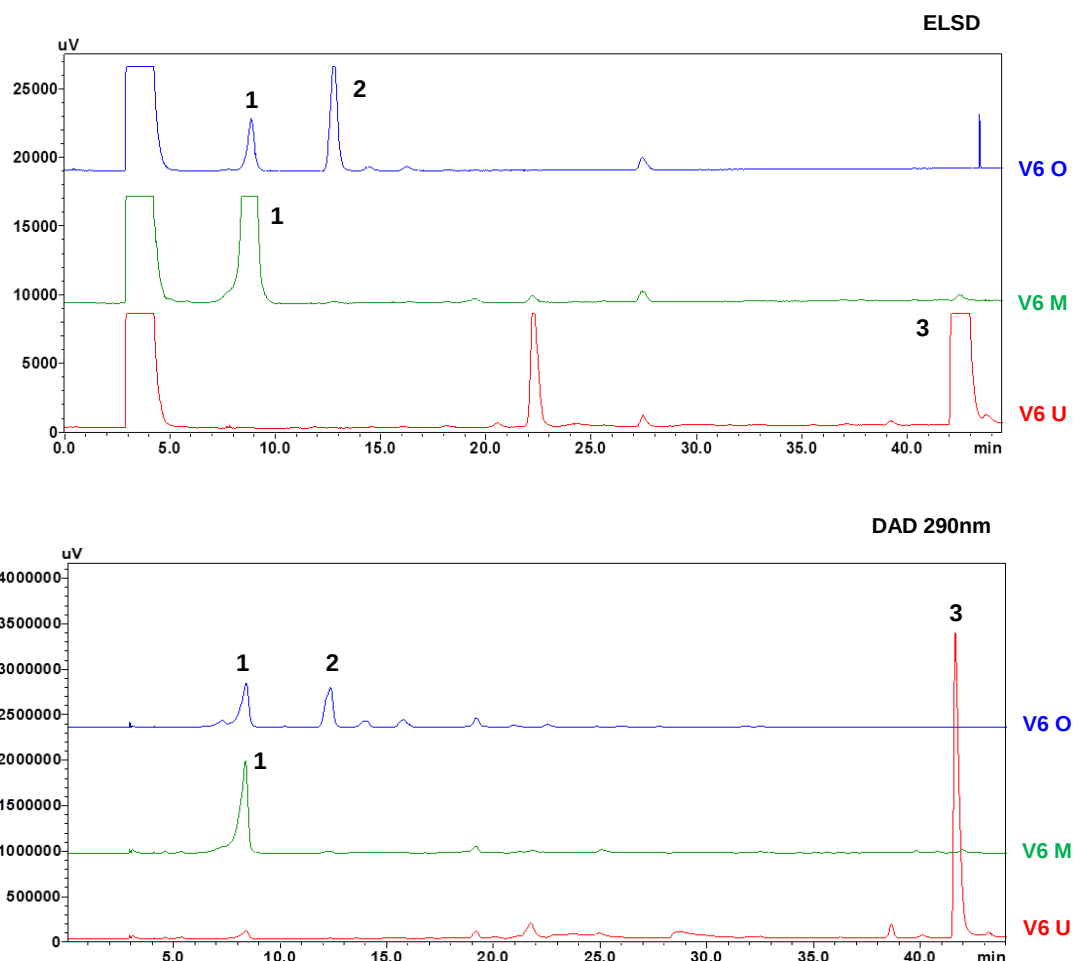


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramme von V6 O, V6 M und V6 U

(siehe Abbildung 24, Seite 60), analysiert mit der in Tabelle 6 auf Seite 20 angeführten Methode der analytischen HPLC und detektiert mittels ELSD (oben) und DAD bei 290 nm (unten)

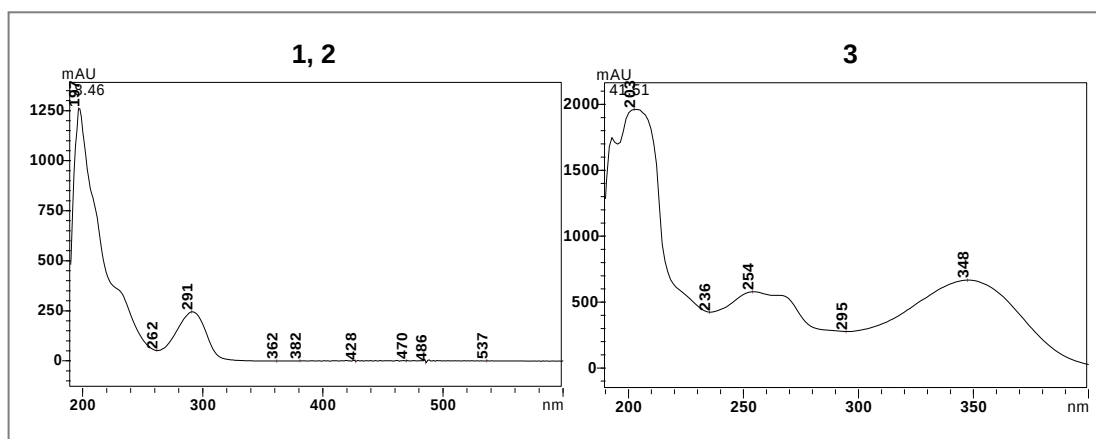


Abbildung 26: UV-Spektren der Hauptpeaks von V6 O, V6 M und V6 U
(siehe Abbildung 25, Seite 61)

In Abbildung 25 auf Seite 61 ist deutlich zu sehen, dass in jeder der drei Lösungen von V6 O, V6 M und V6 U gewisse Verbindungen angereichert sind.

Im Falle von V6 O sind zwei Hauptverbindungen mit Retentionszeiten von 9 und 13 Minuten zu erkennen, die jedoch das selbe UV-Spektrum, welches zwei Maxima bei 200 und 291 nm und ein Minimum bei 262 nm aufweist (siehe Abbildung 26, Seite 62), besitzen und sich somit strukturell nur geringfügig unterscheiden dürften.

In V6 U ist eine Substanz angereichert, welche eine Retentionszeit von 43 Minuten aufweist. Bei dieser Verbindung, die in Abbildung 25 auf Seite 61 mit der Nummer 3 gekennzeichnet ist, handelt es sich um ein Flavonoid, was anhand des charakteristischen UV-Spektrums (siehe Abbildung 26, Seite 62) deutlich zu erkennen ist. Dieses Flavonoid konnte bereits von Koffi et al. als Luteolinderivat identifiziert werden [17].

V6 M enthält eine relevante Verbindung in sehr hoher Konzentration. Dabei handelt es sich um die selbe Substanz, die in geringerer Menge ebenfalls in V6 O zu finden ist, da beide Peaks bei einer Retentionszeit von 9 Minuten (siehe Abbildung 25, Seite 61, Peak Nr. 1) auftreten und ein identisches UV-Spektrum (siehe Abbildung 26, Seite 62) aufweisen. Aufgrund der Retentionszeit von 9 Minuten und des charakteristischen UV-Spektrums der

in V6 M und teilweise auch in V6 O angereicherten Verbindung konnte festgestellt werden, dass es sich dabei höchstwahrscheinlich um die bereits im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler isolierte und strukturell aufgeklärte Substanz CD1 handelte [8]. Da diese Verbindung in so hoher Konzentration in V6 M vorhanden war und V6 M im Rahmen der präparativen HPTLC genau jene Stelle repräsentierte, welche im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay Aktivität zeigte (siehe Abbildung 24, Seite 60), wurde V6 M gemeinsam mit der Reinsubstanz CD1 in einem erneuten Assay auf α -glucosidasehemmende Aktivität getestet (siehe Kapitel 3.5.2, Seite 66).

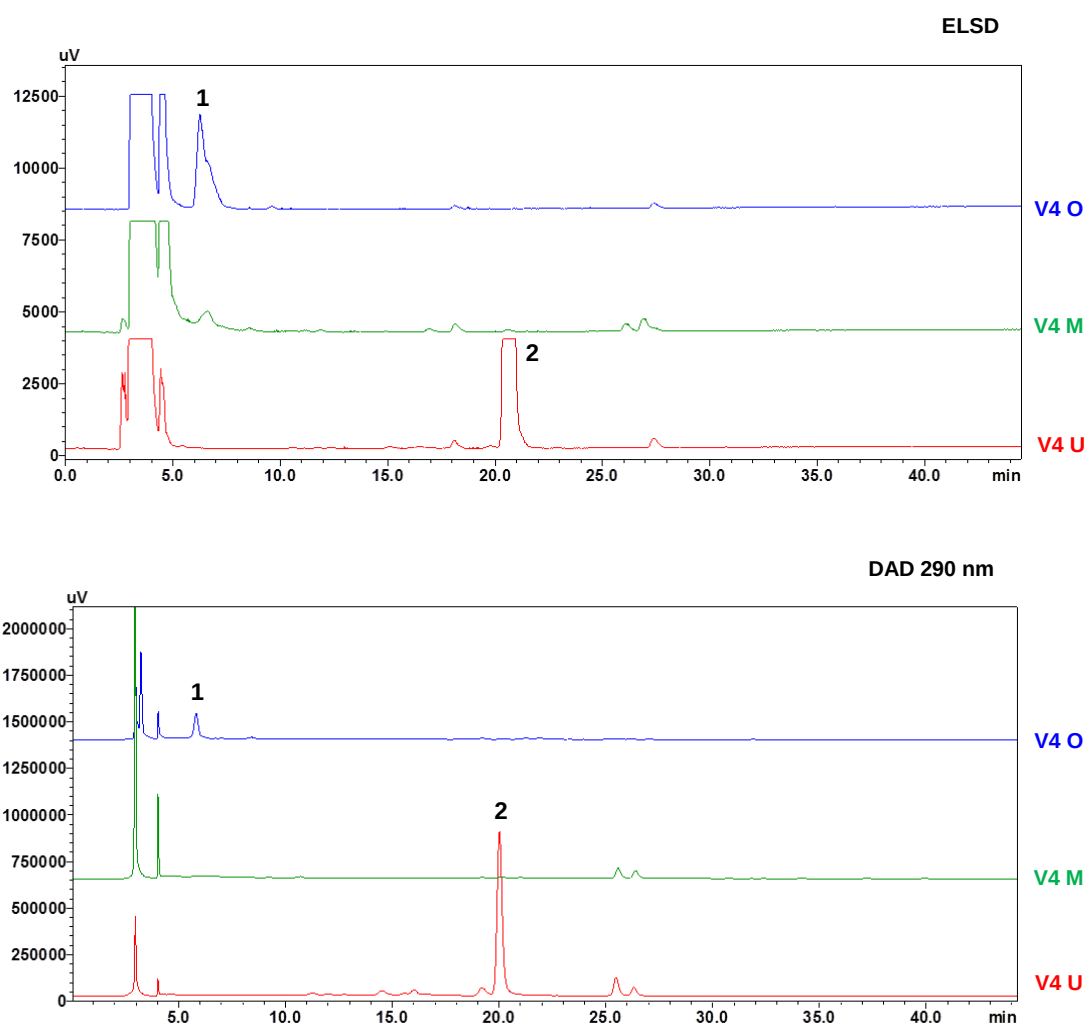


Abbildung 27: HPLC-Chromatogramme von V4 O, V4 M und V4 U
(siehe Abbildung 24, Seite 60), analysiert mit der in Tabelle 6 auf Seite 20 angeführten Methode der analytischen HPLC und detektiert mittels ELSD (oben) und DAD bei 290 nm (unten)

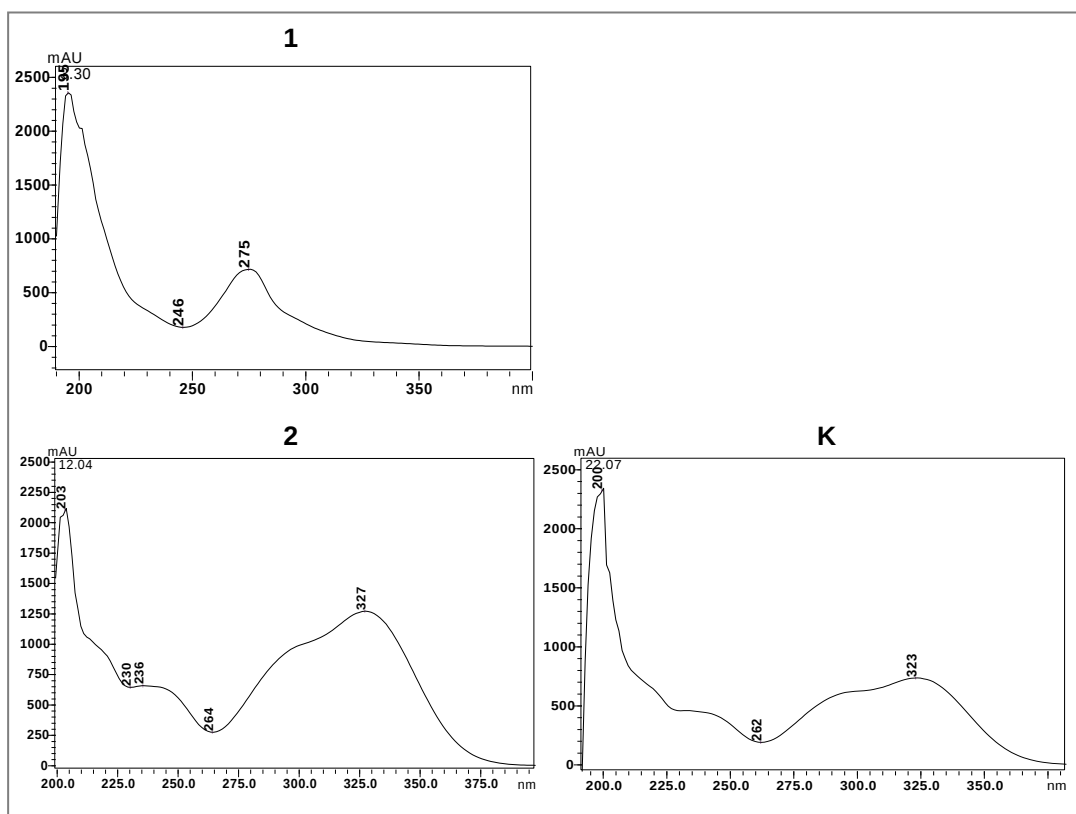


Abbildung 28: UV-Spektren der Hauptpeaks von V4 O, V4 M und V4 U
(siehe Abbildung 27, Seite 63) und das UV-Spektrum von Kaffeesäure (= K)

In Abbildung 27 auf Seite 63 ist zu sehen, dass in V4 O und vor allem in V4 U Verbindungen angereichert sind, während in V4 M keine relevanten Peaks zu erkennen sind.

Die Substanz in V4 O weist eine Retentionszeit von 6,5 Minuten und ein UV-Spektrum mit zwei Maxima bei 195 nm und 275 nm und einem Minimum bei 246 nm auf (siehe Abbildung 28, Seite 64), liefert im ELSD jedoch nur einen Peak mit relativ schwacher Intensität und kommt somit nur in geringer Konzentration in V4 O vor.

Die angereicherte Verbindung in V4 U zeigt hingegen im HPLC-Chromatogramm des ELSD bei Minute 20,3 einen ausgeprägten Peak mit hoher Signalstärke (siehe Abbildung 27, Seite 63; Peak Nr. 2). Jene Substanz weist außerdem ein UV-Spektrum mit zwei Maxima bei 203 nm und 327 nm und einem Minimum bei 264 nm auf, welches stark an das UV-Spektrum einer Kaffeesäure (= K), zum Vergleich ebenfalls in

Abbildung 28 auf Seite 64 dargestellt, erinnert. Das UV-Spektrum der reinen Kaffeesäure zeigt zwei Maxima bei 200 nm und 323 nm und ein Minimum bei 262 nm. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit des UV-Spektrums der in V4 U angereicherten Verbindung mit dem UV-Spektrum der Kaffeesäure war es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der angereicherten Substanz in V4 U um ein Kaffeesäurederivat handelte.

Da jedoch in Abbildung 27 auf Seite 63 bei V4 M keine relevanten Peaks zu erkennen sind, V4 M im Rahmen der präparativen HPTLC aber genau jene Stelle repräsentierte, welche im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay Aktivität zeigte (siehe Abbildung 24, Seite 60), wurden in weiterer Folge sowohl V4 M, als auch V4 O und V4 U erneut auf Aktivität im Assay getestet, um die eigentliche α -glucosidasehemmende Substanz identifizieren zu können (siehe Kapitel 3.5.2, Seite 66).

3.5.2 Verifizierung der Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay

Um endgültig herausfinden zu können, welche Verbindungen für die α -glucosidasehemmende Aktivität der Fraktionen V4 und V6 (siehe Tabelle 8, Seite 24) verantwortlich waren, wurden die über präparative HPTLC gewonnenen Substanzen (siehe Abbildung 24, Seite 60) erneut auf Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay getestet. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.6.3 auf Seite 33 beschrieben.

Im Falle von Fraktion V6 wurde V6 M (siehe Abbildung 24, Seite 60 und Abbildung 25, Seite 61; Peak Nr. 1) erneut im Assay getestet. Da sowohl die Retentionszeit von 9 Minuten, als auch das zugehörige UV-Spektrum (siehe Abbildung 26, Seite 62) stark an die bereits im Rahmen der Dissertation von Barbara Theiler isolierte Verbindung CD1 erinnerte, wurden zusätzlich 5 μ L der Reinsubstanz CD1 auf α -glucosidasehemmende Aktivität im Assay getestet.

Im Falle von Fraktion V4 konnte mittels HPLC gezeigt werden, dass in V4 M keine relevanten Verbindungen angereichert waren (siehe Abbildung 27, Seite 63), obwohl V4 M im Rahmen der präparativen HPTLC genau jene Stelle repräsentierte, welche im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay Aktivität zeigte (siehe Abbildung 24, Seite 60). Deshalb wurden sowohl V4 M, als auch V4 O und V4 U erneut auf Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay untersucht.

Die α -Glucosidase-Inhibitions-Assays von V6 M und CD1 bzw. von V4 U, V4 M und V4 O sind in den folgenden Abbildungen dargestellt (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30, Seite 67).

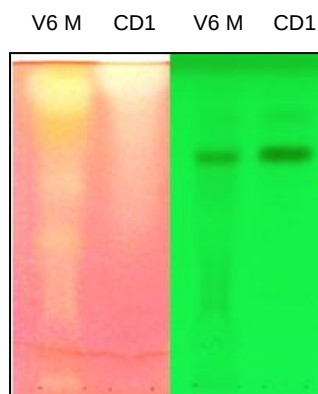


Abbildung 29: α -Glucosidase-Inhibitions-Assay von V6 M (siehe Abbildung 24, Seite 60) und CD1

entwickelt in System 1 (links; siehe Tabelle 1, Seite 9) und verglichen mit dem DC-Fingerprint unter 254 nm (rechts)

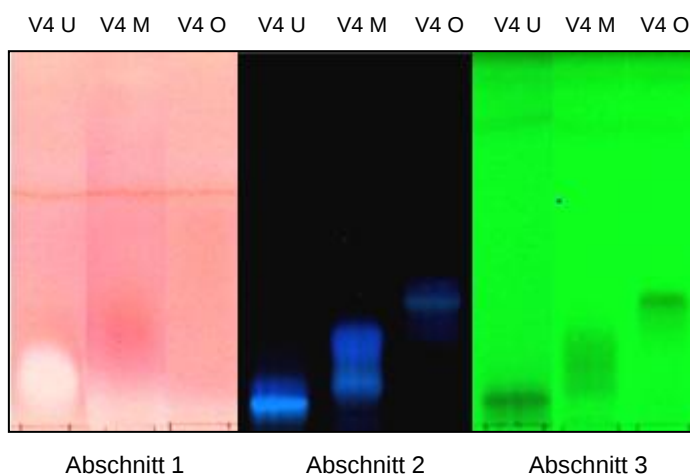


Abbildung 30: α -Glucosidase-Inhibitions-Assay von V4 U, V4 M und V4 O (siehe Abbildung 24, Seite 60; Abschnitt 1)

entwickelt in System 1 (siehe Tabelle 1, Seite 9) und verglichen mit den DC-Fingerprints unter 366 nm (Abschnitt 2) und unter 254 nm (Abschnitt 3)

Aus Abbildung 29 (siehe oben) geht hervor, dass es sich bei der in V6 M angereicherten Verbindung (siehe Abbildung 25, Seite 61; Peak Nr. 1) höchstwahrscheinlich um die bereits bekannte Verbindung CD1 handelt, da sowohl bei V6 M als auch im Fingerprint von CD1 eine unter 254 nm löschende Bande mit einem R_f -Wert von 0,77 zu erkennen ist.

Der zugehörige α -Glucosidase-Inhibitions-Assay, der im linken Abschnitt der Abbildung 29 auf Seite 67 dargestellt ist, lieferte jedoch kein eindeutiges Ergebnis. Zwar ist sowohl bei V6 M als auch bei CD1 α -glucosidase-hemmendes Potential zu erkennen, jedoch befinden sich die weißen Stellen, welche die Aktivität im Assay anzeigen, deutlich oberhalb der unter 254 nm löschenden Banden. Im Falle von V6 M kommt es bei einem R_f -Wert von 0,95 zu einer ausgeprägten eher hellgelb gefärbten Bande, wobei zusätzlich ein weißer Schatten zu erkennen ist, der sich über die gesamte Laufstrecke zieht. Bei CD1 befindet sich die weiße Zone, die ebenfalls einen weißen Schatten hinterlässt, mit einem R_f -Wert von 0,99 am obersten Rand der Platte. Höchstwahrscheinlich kommt es durch das Tauchen in die wässrige α -Glucosidase-Lösung hier wiederum zu einer ausgeprägten Wanderung der zugehörigen Banden von CD1 und V6 M in Richtung oberer Plattenrand (siehe Phänomen „Wandern“ auf Seite 29), was erklären würde, warum sich die weißen Stellen im Assay deutlich über den unter 254 nm löschenden Banden befinden.

Der α -Glucosidase-Inhibitions-Assay von V4 U, V4 M und V4 O, der im 1. Abschnitt der Abbildung 30 auf Seite 67 dargestellt ist, lieferte hingegen ein eindeutiges Ergebnis. Bei V4 U zeigt sich deutlich α -glucosidase-hemmendes Potential, da bei einem R_f -Wert von 0,17 eine ausgeprägte weiße Bande zu erkennen ist, während sowohl V4 O als auch V4 M keine Aktivität zeigen. Die potentiell blutzuckersenkende Aktivität der Fraktion V4 (siehe Tabelle 8, Seite 24) ist also auf die in V4 U angereicherte Verbindung, die in der HPLC-Analyse eine Retentionszeit von 20,3 Minuten (siehe Abbildung 27, Seite 63; Peak Nr. 2) und ein kaffeensäureähnliches UV-Spektrum (siehe Abbildung 28, Seite 64; UV-Spektrum Nr. 2) aufweist, zurückzuführen. Die aktive Verbindung von Fraktion V4 war somit nicht in V4 M angereichert, obwohl V4 M im Rahmen der präparativen HPTLC jene Zone darstellte, die auf derselben Höhe der weißen Bande im Assay lag (siehe Abbildung 24, Seite 60).

Dies kann wiederum durch den Wanderungseffekt der zugehörigen Bande beim Tauchen in die wässrige Enzymlösung erklärt werden (siehe Phänomen „Wandern“ auf Seite 29). So befindet sich die weiße Zone im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay etwas oberhalb der zugehörigen Bande im DC-Fingerprint, welche bei einem R_f -Wert von 0,10 unter 366 nm blau fluoresziert und zusätzlich unter 254 nm löscht (siehe Abbildung 30, Seite 67).

Die in V4 U angereicherte aktive Verbindung wurde in der Folge als SI1 bezeichnet.

3.5.3 Isolierung der aktiven Verbindung SI1 aus Fraktion V4

Um die Struktur der aktiven Verbindung SI1 (siehe Kapitel 3.5.2, Seite 66) mittels NMR aufklären zu können, war eine Ausbeute von mindestens 1 mg nötig. Aus diesem Grund wurde SI1 mittels semi-präparativer HPLC, deren Durchführung in Kapitel 2.4 auf Seite 19 beschrieben ist, aus der Fraktion V4 (siehe Tabelle 8, Seite 24) isoliert.

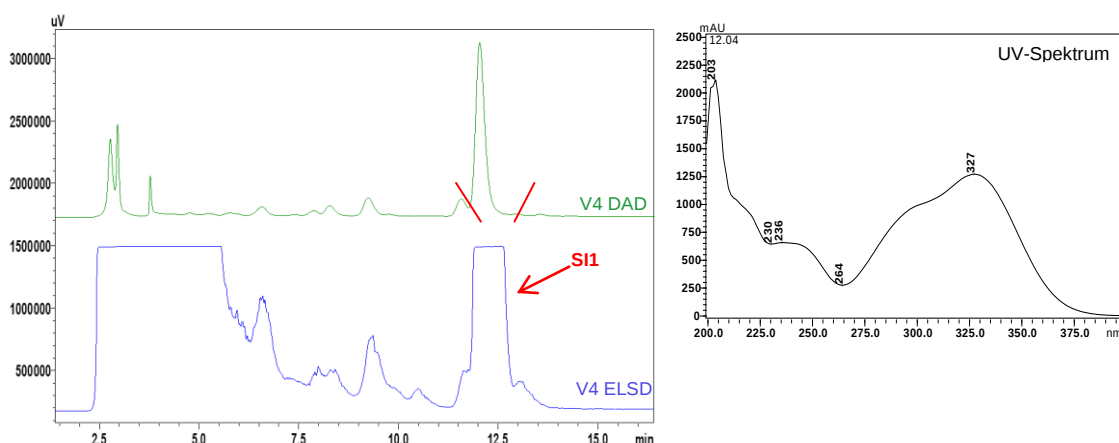


Abbildung 31: Isolierung von SI1 (siehe Kapitel 3.5.2, Seite 66) aus Fraktion V4 (siehe Tabelle 8, Seite 24) mittels semi-präparativer HPLC (siehe Tabelle 6, Seite 20)
Detektiert mittels DAD bei 320 nm (links oben) und ELSD (links unten) und das zugehörige UV-Spektrum von SI1 (rechts)

In Abbildung 31 ist zu sehen, dass der zugehörige Peak von SI1 im HPLC-Chromatogramm der Fraktion V4, analysiert mit der Methode zur semi-präparativen HPLC (siehe Tabelle 6, Seite 20), eine Retentionszeit von 12,3 Minuten aufweist. Der Gehalt an Acetonitril in der mobilen Phase beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa 16,2%. Um eine für die nachfolgende NMR ausreichende Reinheit zu gewährleisten, wurde versucht, die Peaks der jeweiligen Substanz davor und danach abzutrennen und so wurde bei Minute 11,7 mit dem Sammeln begonnen, während die Isolierung bei Minute 13,2 gestoppt wurde. Insgesamt waren 170 Einspritzungen nötig, um 1,3 mg an SI1 isolieren zu können. Die so gewonnene Verbindung wurde anschließend, wie in Kapitel 2.7.2 auf Seite 36 beschrieben, mittels NMR vermessen.

3.6 Strukturaufklärung der aktiven Verbindungen aus den Fraktionen V4 und V6

Um die molekulare Masse und einen ersten Vorschlag für die Molekülstruktur von SI1 erhalten zu können und um zu bestätigen, dass es sich bei der in V6 M angereicherten Verbindung (siehe Abbildung 25, Seite 61; Peak Nr. 1) tatsächlich um die bereits im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler isolierte Verbindung CD1 handelte, wurde mit den Fraktionen V4 und V6 (siehe Tabelle 8, Seite 24) eine LC-MS-Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.7.1, Seite 35).

SI1 wurde außerdem, wie in Kapitel 3.5.3 auf Seite 70 beschrieben, mittels semi-präparativer HPLC isoliert und abschließend zur Aufklärung der molekularen Struktur mittels NMR (siehe Kapitel 2.7.2, Seite 36) vermessen.

3.6.1 Resultate der Massenspektrometrie

Die Ergebnisse und die entsprechenden Spektren der LC-MS-Analyse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Abbildung 32 (siehe unten) und Abbildung 35 auf Seite 73 zeigen die mit der in Tabelle 6 auf Seite 20 angeführten analytischen HPLC-Methode aufgenommenen HPLC-Chromatogramme von Fraktion V4 und V6. Die entsprechenden Peaks von SI1 und von der in V6 M angereicherten Verbindung, die anschließend mittels MS analysiert wurden, sind durch eine rote Markierung gekennzeichnet.

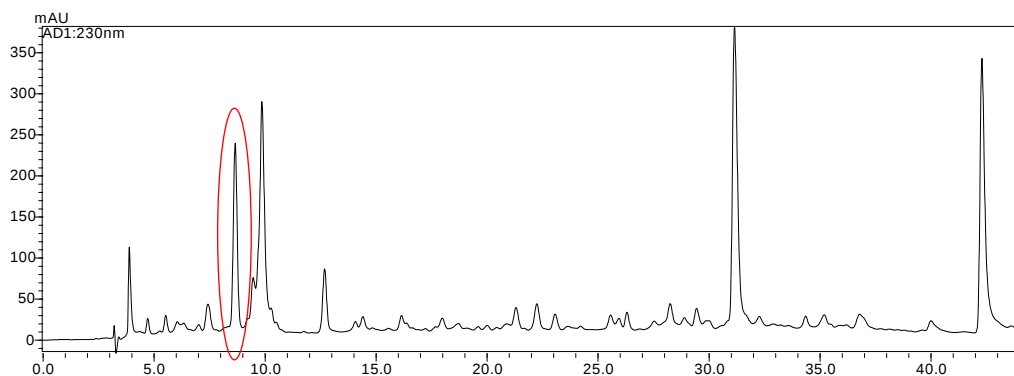


Abbildung 32: HPLC-Chromatogramm der Fraktion V6 (siehe Tabelle 8, Seite 24), analysiert mit der in Tabelle 6 auf S.20 angeführten analytischen HPLC-Methode und detektiert mittels DAD bei 230 nm

3. Ergebnisse

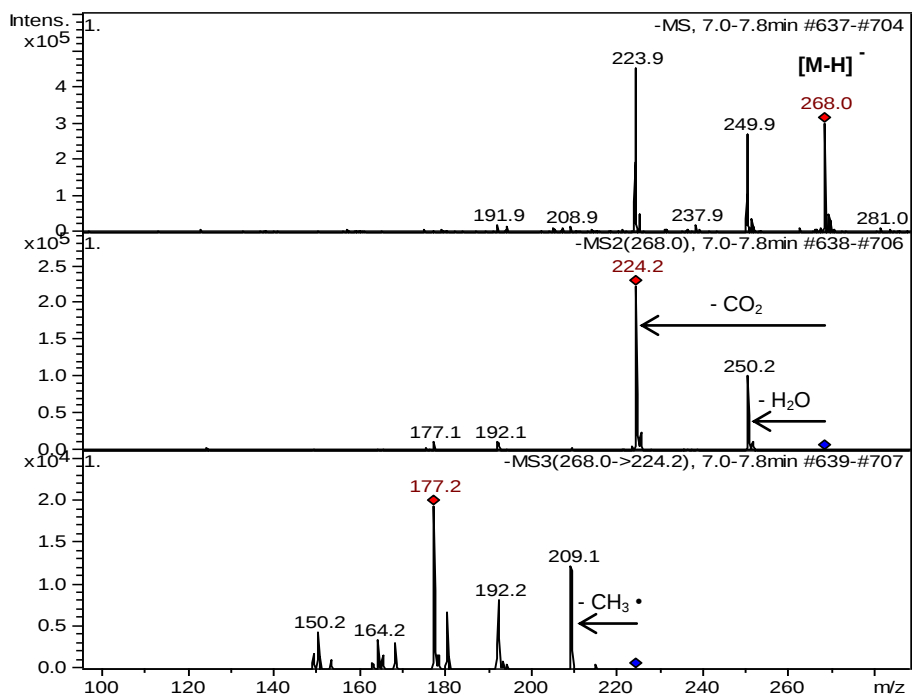


Abbildung 33: ESI-MS Spektren (negativer Ionenmodus) der in V6 zu untersuchenden Verbindung (siehe Abbildung 32, Seite 71; rote Markierung) mittels LC-MS (siehe 2.7.1, Seite 35)

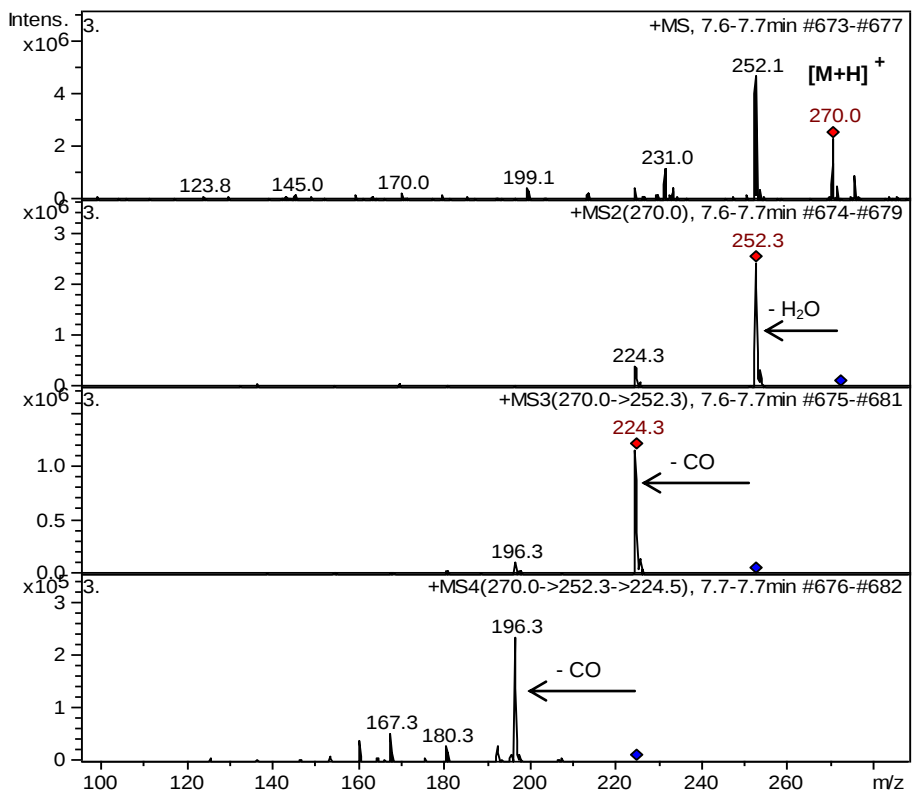


Abbildung 34: ESI-MS Spektren (positiver Ionenmodus) der in V6 zu untersuchenden Verbindung (siehe Abbildung 32, Seite 71; rote Markierung) mittels LC-MS (siehe 2.7.1, Seite 35)

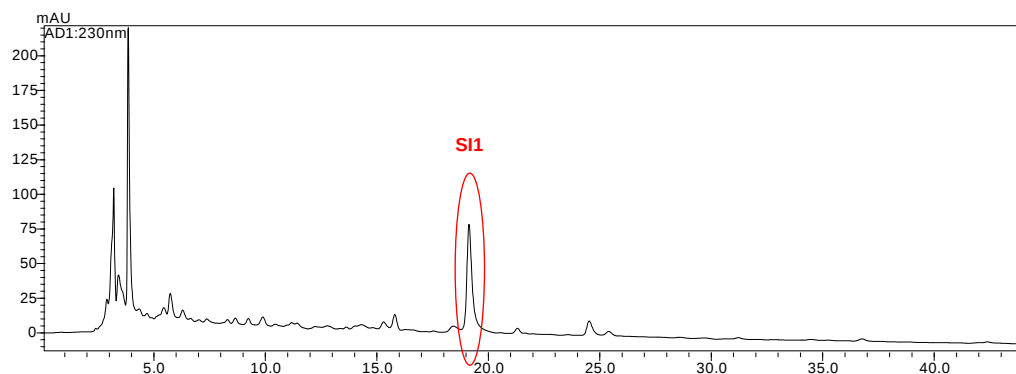


Abbildung 35: HPLC-Chromatogramm der Fraktion V4 (siehe Tabelle 8, Seite 24), analysiert mit der in Tabelle 6 auf S.20 angeführten analytischen HPLC-Methode und detektiert mittels DAD bei 230 nm

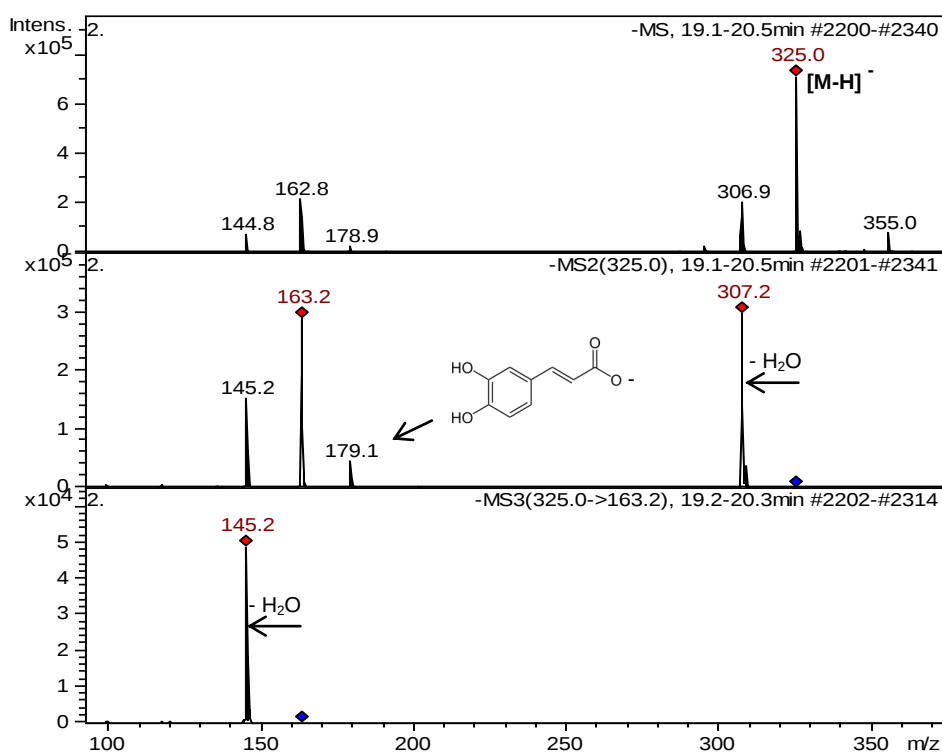


Abbildung 36: ESI-MS Spektren (negativer Ionenmodus) von SI1 (siehe Abbildung 35, Seite 73; rote Markierung) mittels LC-MS (siehe 2.7.1, Seite 35)

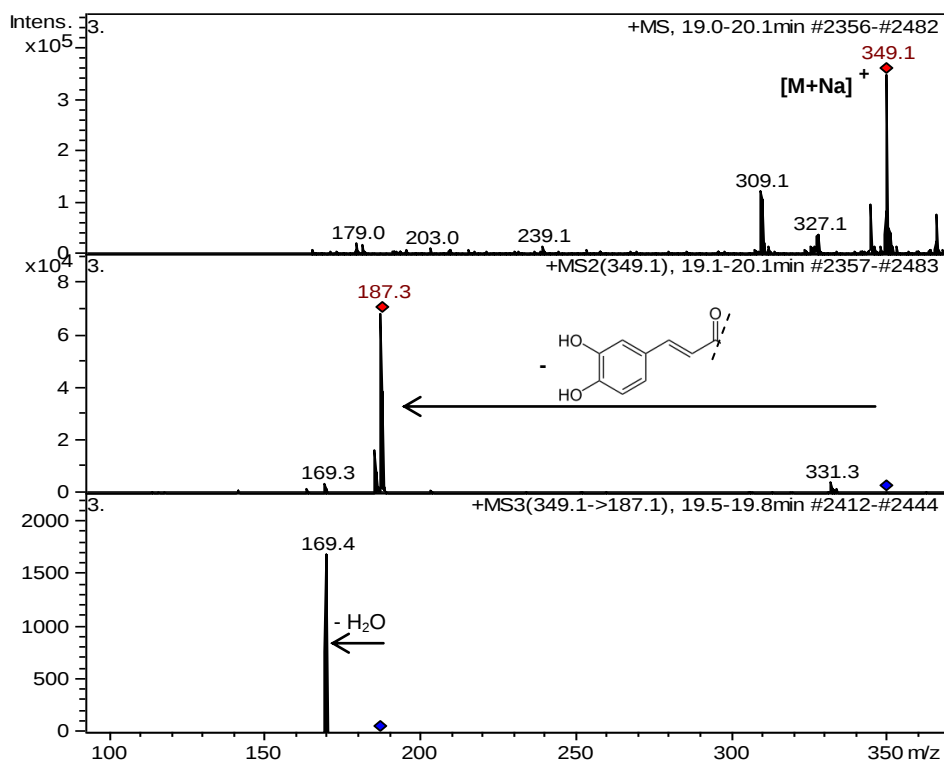


Abbildung 37: ESI-MS Spektren (positiver Ionenmodus) von SI1
(siehe Abbildung 35, Seite 73; rote Markierung)
mittels LC-MS (siehe 2.7.1, Seite 35)

Im Falle von Fraktion V6 konnte mithilfe der MS-Spektren im positiven und negativen Ionenmodus, welche in Abbildung 33 und Abbildung 34 auf Seite 72 dargestellt sind, für die in V6 M angereicherte Verbindung (siehe Abbildung 25, Seite 61; Peak Nr. 1) ein Molekulargewicht von 269 Da ermittelt werden. Aus dem ungeraden Molekulargewicht konnte auf eine ungerade Anzahl von Stickstoff im Molekül geschlossen werden. Außerdem ist die Abspaltung einiger charakteristischer Fragmente, welche zusätzlich in Abbildung 33 und Abbildung 34 auf Seite 72 eingetragen sind, zu erkennen. Aufgrund der Übereinstimmung dieser Daten mit denen der LC-MS-Analyse der Verbindung CD1, welche bereits im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler durchgeführt wurde, konnte die in V6 M angereicherte Verbindung als CD1 identifiziert werden.

CD1 scheint also für das α -glucosidasehemmende Potential von Fraktion V6 verantwortlich zu sein. Die Struktur von CD1 wurde bereits im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler vollständig mittels NMR aufgeklärt und ist in Abbildung 38 dargestellt [8].

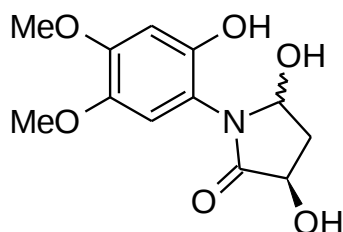


Abbildung 38: Struktur von CD1 [8]

Bei der Analyse von Fraktion V4 konnte anhand der MS-Spektren im negativen und positiven Ionenmodus (siehe Abbildung 36, Seite 73 und Abbildung 37, Seite 74) ein Molekulargewicht von 326 Da für die Verbindung SI1 ermittelt werden. Außerdem konnte anhand einiger Fragmente, die ebenfalls den oben genannten Abbildungen zu entnehmen sind, bestätigt werden, dass es sich bei SI1 um ein Kaffeesäurederivat handelte, was bereits durch die HPLC-Analyse der über präparative HPTLC gewonnenen Verbindungen (siehe Kapitel 3.5.1, Seite 61) vermutet wurde.

Die Daten der MS-Analyse reichten jedoch nicht aus, um eine genaue Vorhersage der Struktur von SI1 zu treffen, weshalb eine anschließende NMR-Analyse vonnöten war, deren Resultate in Kapitel 3.6.2 auf Seite 76 besprochen werden. Durch die MS konnte aber bereits festgestellt werden, dass es sich bei SI1 am wahrscheinlichsten um eine Kaffeesäure handelt, die mit einem unbekannten Rest, welcher als Anion vorliegen kann und somit eine saure Gruppierung enthalten dürfte, verestert ist.

3.6.2 Resultate der NMR

Die NMR-Analyse von SI1, die am Department für Pharmazeutische Chemie durchgeführt wurde (siehe Kapitel 2.7.2, Seite 36), bestätigte das Ergebnis der HPLC- (siehe Kapitel 3.5.1, Seite 61) und der LC-MS-Analyse (siehe Kapitel 3.6.1, Seite 71). Bei der im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay aktiven Verbindung SI1 handelt es sich eindeutig um einen Kaffeesäureester. Durch die NMR konnte zwar festgestellt werden, dass der Kaffeesäureester mit einer Dicarbonsäure, welche in Position 2 und 4 hydroxyliert ist und zwei chirale Zentren aufweist, ausgebildet wird, jedoch war die Ausbeute an SI1 zu gering, um die ^{13}C -Spektren vollständig auswerten zu können.

Abbildung 39 (siehe unten) zeigt folglich einen Strukturvorschlag für SI1, der eine noch unbekannte Verbindung darstellt. Für eine genaue, endgültige Strukturaufklärung wären größere Mengen von SI1 und weitere NMR-Analysen bzw. die Aufnahme von CD-Spektren sowie die Bestimmung des Drehwerts vonnöten.

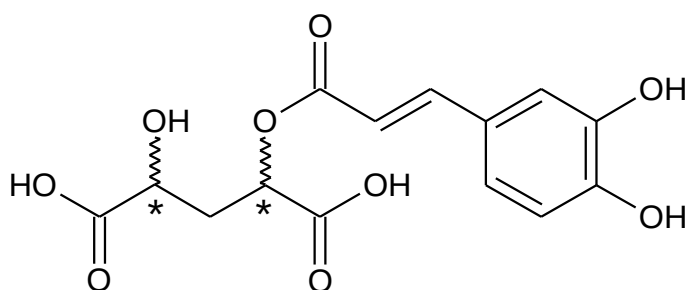


Abbildung 39: Strukturvorschlag für SI1

4. Diskussion

Vergleich der Pflanzenmaterialien JS EC und JS FG

Der Vergleich der beiden Pflanzenmaterialien lieferte deutliche Unterschiede im Fingerprint von JS EC und JS FG. Diese waren besonders gut in den Systemen zur Detektion von Flavonoiden, polaren Komponenten und Aminosäuren zu erkennen. Eindeutig nachgewiesen werden konnte ein erhöhter Farbstoffgehalt im Material aus Ecuador und im Gegensatz dazu, ein höherer Gehalt an Flavonoiden im Material aus Französisch-Guyana.

Beim Vergleich der Materialien im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay zeigten sich jedoch keine relevanten Unterschiede. Die Methanolextrakte von JS EC und JS FG zeigten vergleichbare Aktivität und auch die Original-Wasser-Extrakte wiesen α -glucosidasehemmendes Potential auf, welches jedoch schwächer ausgeprägt war als jenes der Methanolextrakte. Dies könnte darauf hinweisen, dass es sich bei den aktiven Verbindungen in den Methanol- und den Original-Wasser-Extrakten entweder um unterschiedliche Substanzen handelt, oder, dass die aktiven Komponenten durch den Zusatz von Trifluoressigsäure im Rahmen der Herstellung der OWEs entsprechend verändert bzw. beeinflusst werden.

α -Glucosidase-Inhibitions-Assay

Der α -Glucosidase-Inhibitions-Assay erwies sich als schnelle und einfache Methode, um Substanzen mit α -glucosidasehemmendem Potential nachweisen zu können. Beim Behandeln der entsprechenden DC-Platten mit der Enzym- und Substratlösung stellte sich heraus, dass das Tauchen der Platte in die Lösungen zu einer besseren Benetzung der Platte und somit auch zu aussagekräftigeren Resultaten führte. Das herkömmliche Besprühen war jedoch für die Durchführung einzelner Assays zu bevorzugen, da dadurch der Verbrauch der benötigten Lösungen und Reagenzien möglichst gering gehalten werden konnte.

Ein Problem stellte jedoch der mehrfach beobachtete Wanderungseffekt der Banden durch das Behandeln mit der wässrigen Enzymlösung dar, was eine nachträgliche Zuordnung der aktiven Zonen zu Banden des DC-Fingerprints oft schwierig gestaltete.

Des Weiteren ging aus den Versuchen hervor, dass Acarbose durchaus als Positivkontrolle verwendet werden konnte, sofern die Lösung nicht zu nah am Plattenrand aufgetragen wurde, während Castanospermin nicht als Positivkontrolle für den α -Glucosidase-Inhibitions-Assay geeignet war.

Eine positive Reaktion durch Zucker konnte in dieser Arbeit zwar nicht nachgewiesen werden, jedoch könnten höhere Zuckerkonzentrationen sehr wohl zu einer kompetitiven Verdrängung des Substrats und somit zu einer falsch-positiven Reaktion im Assay führen.

Untersuchungen der Mutterfraktionen aus JS EC

Es konnte gezeigt werden, dass alle Mutterfraktionen aus JS EC (JS M EC, JS P EC, JS C EC, JS B EC, JS H EC und JS OWE EC) α -glucosidase-hemmendes Potential aufwiesen. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, welche Verbindungen für deren Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay verantwortlich waren. Weitere Untersuchungen, besonders in Bezug auf das bereits identifizierte Luteolinderivat, wären vonnöten.

Zuckerabtrennung und Untersuchungen der Fraktionen V1-V7

Durch die HPTLC- und eine anschließende DC-Analyse konnte das Vorhandensein von Zuckern in JS H EC eindeutig nachgewiesen werden. Die anschließende Zuckerabtrennung mittels Säulenchromatographie an Polystyrol erwies sich als erfolgreich und es konnte gezeigt werden, dass sich die Zucker in den ersten vier Fraktionen V1-V4 befanden und die restlichen Verbindungen aus JS H EC in der zuckerfreien Fraktion V6 angereichert waren. Es stellte sich heraus, dass sowohl Fraktion V6 als auch Fraktion V4 Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay zeigten und somit potentiell blutzuckersenkende Aktivität aufwiesen.

Identifizierung und Strukturaufklärungen der aktiven Verbindungen

Durch die präparative HPTLC, eine nachfolgende HPLC-Analyse und einen abschließenden α -Glucosidase-Inhibitions-Assay mit den aus der präparativen HPTLC gewonnenen Verbindungen konnten schlussendlich zwei Substanzen isoliert werden, die für die α -glucosidasehemmende Aktivität von Fraktion V4 und V6 verantwortlich waren.

Die Aktivität von Fraktion V6 ist wahrscheinlich auf die bereits im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler isolierte und strukturell aufgeklärte Verbindung CD1 zurückzuführen. Die Testung von CD1 im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay lieferte jedoch kein eindeutiges Resultat, da die weiße Bande deutlich oberhalb der für CD1 charakteristischen unter 254 nm löschenden Bande lag. Dies könnte jedoch am ausgeprägten Wanderungseffekt der Verbindung durch das Tauchen in die wässrige Enzymlösung liegen.

Im Falle von Fraktion V4 konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei der aktiven Substanz, welche als SI1 bezeichnet wurde, um die in V4 U angereicherte Verbindung handelte. Aus der NMR-Analyse von SI1 ging hervor, dass ein Kaffeesäureester mit einer zweifach hydroxylierten Carbonsäure vorlag, dessen Struktur jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Die Ausbeute von SI1 war zu gering, um die aufgenommenen ^{13}C -Spektren gänzlich interpretieren zu können. Für eine genaue Strukturaufklärung von SI1 wäre also eine erneute Isolierung nötig, um eine für nachfolgende NMR-Analysen genügende Menge gewinnen zu können. Außerdem wäre die Aufnahme von CD-Spektren und die Erfassung des Drehwerts wünschenswert.

5. Zusammenfassung

α -Glucosidase-Hemmer, wie z.B. Acarbose und Miglitol, stellen wichtige Arzneistoffe in der Therapie von Diabetes mellitus Typ II dar. Aufgrund der beeinträchtigenden Nebenwirkungen jener Präparate wird jedoch laufend nach neuen, spezifischen α -Glucosidase-Hemmern natürlichen Ursprungs gesucht. *Justicia secunda* VAHL wird in Ecuador volksmedizinisch zur Behandlung von Diabetes eingesetzt und stellt somit eine potentielle Quelle α -glucosidasehemmender Verbindungen für die Herstellung neuer blutzuckersenkender Medikamente dar.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war sowohl die Testung verschiedenster Extrakte jener Pflanze auf α -glucosidasehemmende Wirkung, als auch die anschließende Identifizierung und Strukturaufklärung der aktiven Verbindungen. Da nicht nur Pflanzenmaterial aus Ecuador, sondern auch aus Französisch-Guyana zur Verfügung stand, wurde außerdem ein Materialvergleich bezüglich des phytochemischen Fingerprints und der α -glucosidasehemmenden Aktivität erstellt.

Zur Fraktionierung und zur Abtrennung störender Begleitstoffe kam die Säulenchromatographie an Polystyrol zum Einsatz. Zum Nachweis einer möglichen blutzuckersenkenden Aktivität diente der sogenannte α -Glucosidase-Inhibitions-Assay. Dünnschicht-, Hochleistungs dünnschicht- und Hochleistungsflüssigchromatographie kamen zur vergleichenden Analyse sowie zur Charakterisierung und Isolierung aktiver Substanzen zum Einsatz. Die Strukturaufklärung aktiver Verbindungen erfolgte über Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie.

Zwei Verbindungen namens CD1 und SI1, die Aktivität im α -Glucosidase-Inhibitions-Assay zeigten, konnten identifiziert werden. Bei der einen handelte es sich um das Arylpyrrolidon CD1, welches bereits im Rahmen der Dissertation von DI Barbara Theiler isoliert und strukturell aufgeklärt werden konnte. Die zweite Verbindung namens SI1 stellte einen Kaffeesäureester dar, dessen genaue Struktur aufgrund einer zu geringen Ausbeute zwar noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Es gelang jedoch mittels LC-MS und NMR einen ersten Strukturvorschlag zu erstellen.

6. Abstract

α -Glucosidase inhibitors, such as acarbose and miglitol, represent important agents in the treatment of type 2 diabetes mellitus. Due to their unpleasant adverse effects, new specific α -glucosidase inhibitors from natural origin are constantly searched for. In Ecuador, *Justicia secunda* VAHL is traditionally used for the treatment of diabetes, so this plant represents a potential source of α -glucosidase inhibiting compounds to establish new hypoglycaemic agents.

The primary aim of this work was the testing of various extracts of this plant on α -glucosidase inhibition and the subsequent identification and structure elucidation of the active compounds. Since not only plant material from Ecuador but also from French Guiana was available, a material-comparison with regard to the phytochemical fingerprint and the α -glucosidase inhibiting activity was performed.

For fractionation and for the removal of interfering substances, column chromatography on polystyrol was used. The so-called α -glucosidase-inhibition-assay was used to detect a possible hypoglycaemic activity. Thin-layer, high performance thin-layer and high performance liquid chromatography were used for comparative analysis as well as for the characterization and isolation of active compounds. Structure elucidation of active compounds was carried out by mass spectrometry and NMR spectroscopy.

Finally, two compounds which showed activity in the α -glucosidase-inhibition-assay, could be identified. One of those was the arylpyrrolidone CD1, which has already been isolated and structurally elucidated as part of the PhD thesis of DI Barbara Theiler. The second compound, termed SI1, represents a caffeic acid ester, but its yield was too low for a full elucidation of the molecular structure. However, it succeeded to create a first structural proposal by LC-MS and NMR.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Woodson R. E. Jr., Schery R. W., Durkee L. H. (1978), Flora of Panama Part IX, Annals of the Missouri Botanical Garden, **65** (1): S.155-283
- [2] Manda P., Abrogoua D. P., Bahi C., Dano D. S., Gnahoui G., Kablan B. J. (2011), Evaluation of the antihypertensive activity of total aqueous extract of *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae), African Journal of Pharmacy and Pharmacology, **5** (16): S.1838-1845
- [3] Mpiana P. T., Ngbolua K. N. N., Bokota M. T., Kasonga T. K., Atibu E. K., Tshibangu D. S. T., Mudogo V. (2010), *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes, Blood Transfusion, **8** (4): S.248-254
- [4] Cade W. T. (2008), Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting, Physical Therapy, **88** (11): S.1322-1335
- [5] Bastaki S. (2005), Diabetes mellitus and its treatment, International Journal of Diabetes & Metabolism, **13** (3): S.111-134
- [6] Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Menzel S., Ruth P. (2012), Mutschler Arzneimittelwirkungen, 10. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S.386-387
- [7] Li D. Q., Zhao J., Xie J., Li S. P. (2014), A novel sample preparation and on-line HPLC-DAD-MS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts: Case study of α -glucosidase, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **88**: S.130-135
- [8] Theiler B., Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung
- [9] Böcker J. (1997), Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, 1. Auflage, Vogel Buchverlag, Würzburg

- [10] Adam K. P., Becker H. (2000), Analytik biogener Arzneistoffe, Band 4, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- [11] Reich E., Schibli A. (2007), High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants, Thieme, New York, Stuttgart
- [12] Marston A. (2011), Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry, Journal of Chromatography A, **1218** (19): S.2676-2683
- [13] Simões-Pires C. A., Hmicha B., Marston A., Hostettmann K. (2009), A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts, Phytochemical Analysis, **20** (6): S.511-515
- [14] Hesse M., Meier H., Zeeh B. (2011), Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.270
- [15] Lueger L. (2013), Phytochemische Untersuchungen wässriger Extrakte von *Justicia secunda* VAHL (Acanthaceae), Diplomarbeit, Univ. Wien
- [16] Lambert J. B., Gronert S., Shurvell H. F., Lightner D. A. (2012), Spektroskopie - Strukturaufklärung in der Organischen Chemie, 2. Auflage, Pearson Verlag, München, S.10
- [17] Koffi E.N., Le Guernevé C., Lozano P.R., Meudec E., Adjé F.A., Bekro Y.A., Lozano Y.F. (2013), Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda* Vahl leaves for traditional medicinal uses, Ind. Crops Prod, **49**: S.682-689.
- [18] Yan J., Zhang G., Pan J., Wang Y. (2014), α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking, International Journal of Biological Macromolecules, **64**: S.213-223

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

8. Anhang

Phytochemischer Fingerprint-Vergleich – Material JS EC

Screening auf Flavonoide: DC-System 3 (siehe Tabelle 1, S. 9)
Reagenz 1 (siehe Tabelle 2, S. 10)

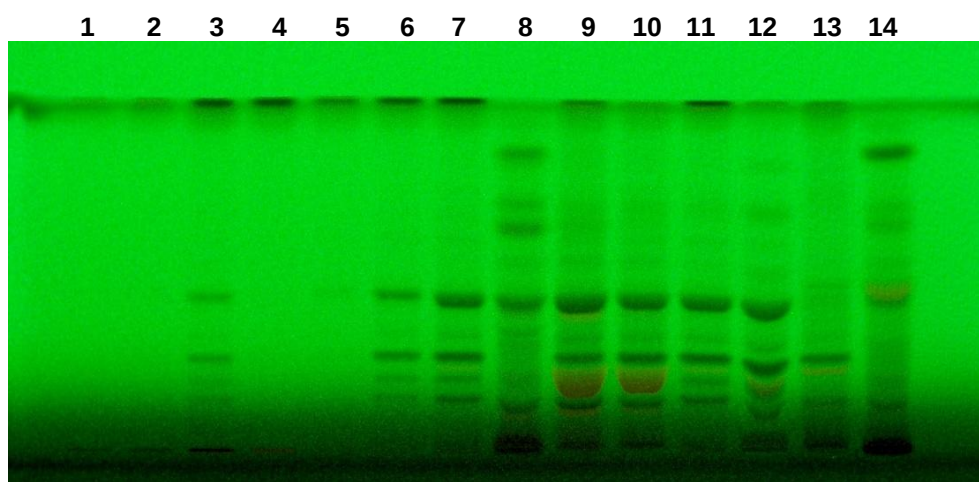


Abbildung 40: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

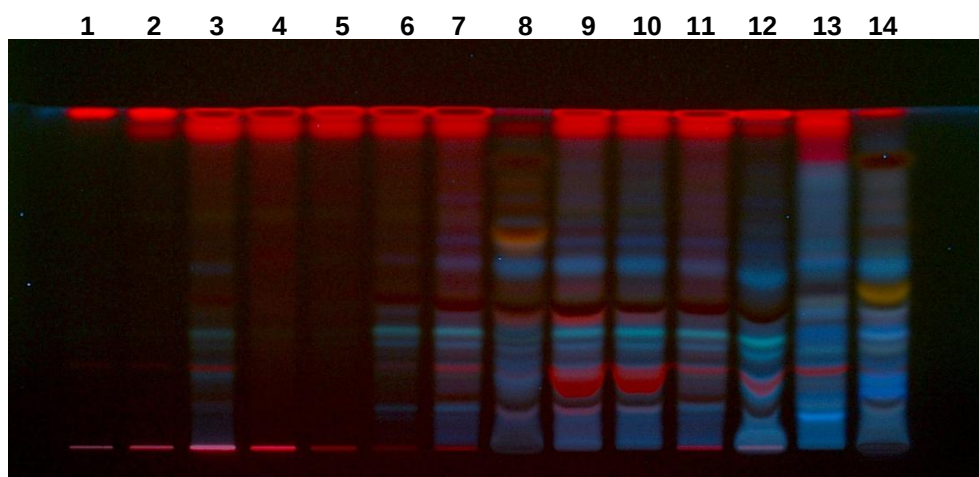


Abbildung 41: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

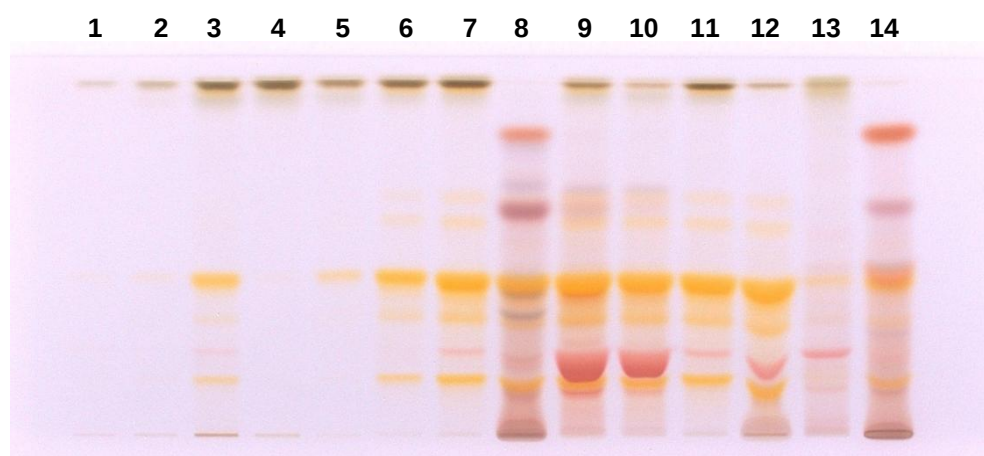


Abbildung 42: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 1 (siehe Tabelle 2, Seite 10), bei Tageslicht

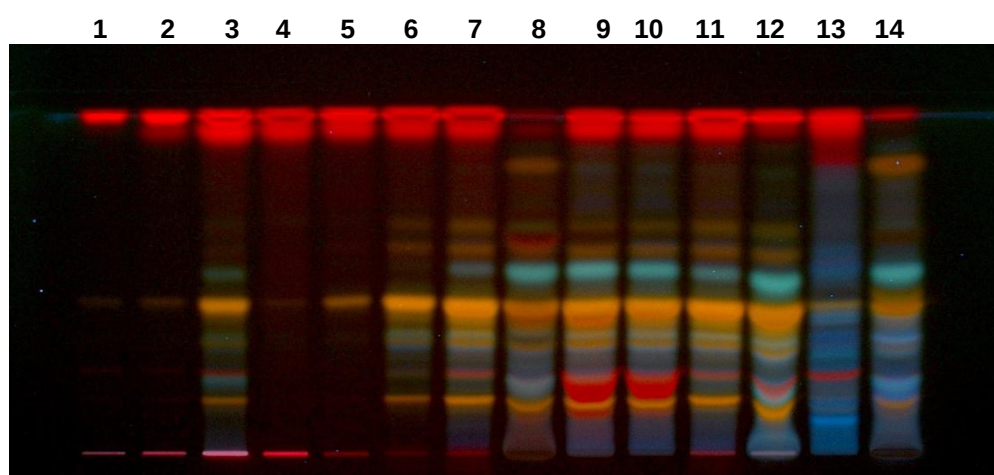


Abbildung 43: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 1 (siehe Tabelle 2, Seite 10), unter UV 366 nm

Screening auf polare Komponenten: DC-System 6 (siehe Tabelle 1, S. 9)
Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, S. 10)

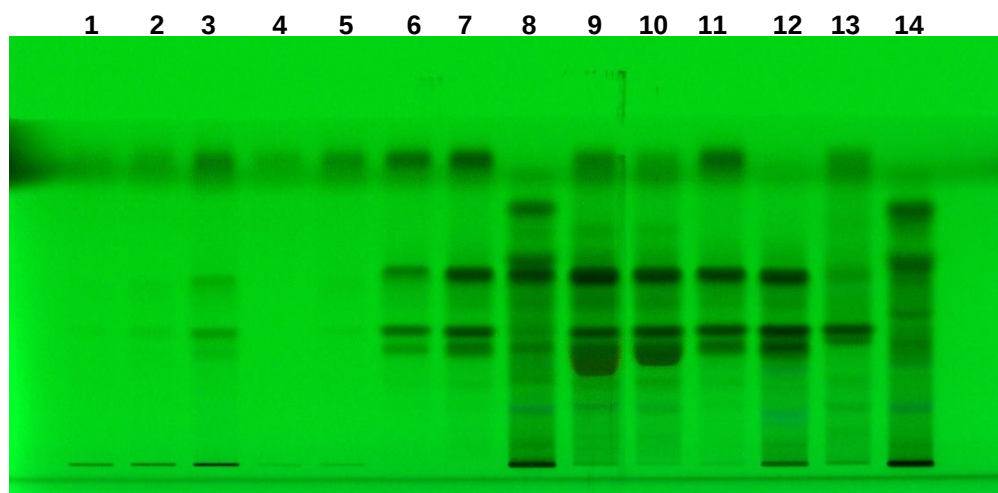


Abbildung 44: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

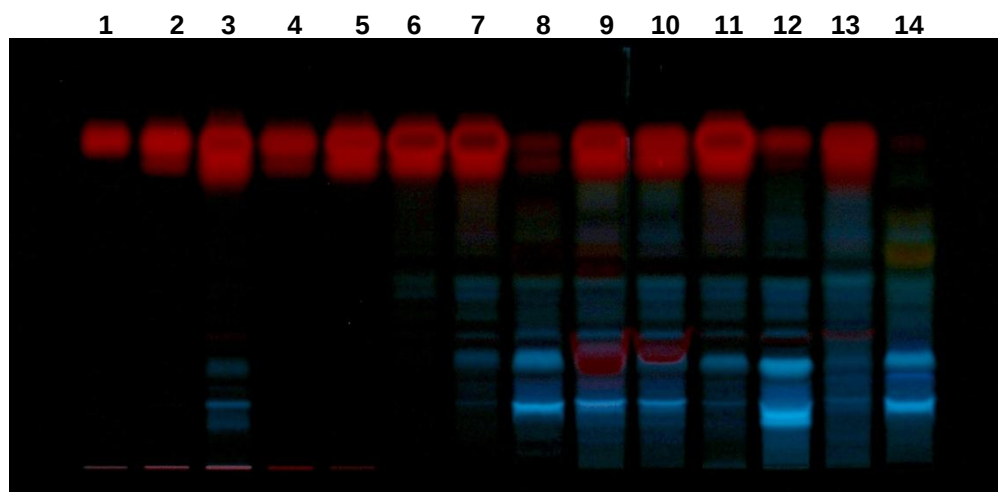


Abbildung 45: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

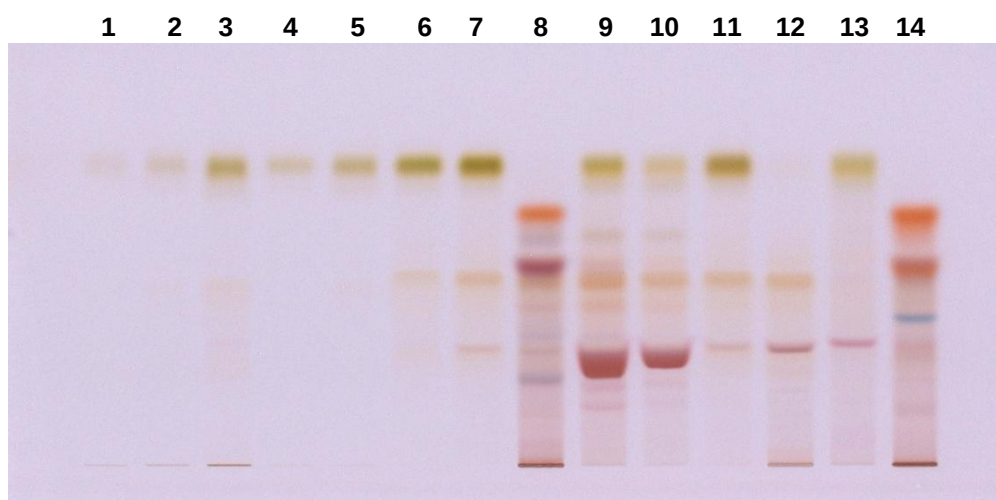


Abbildung 46: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht

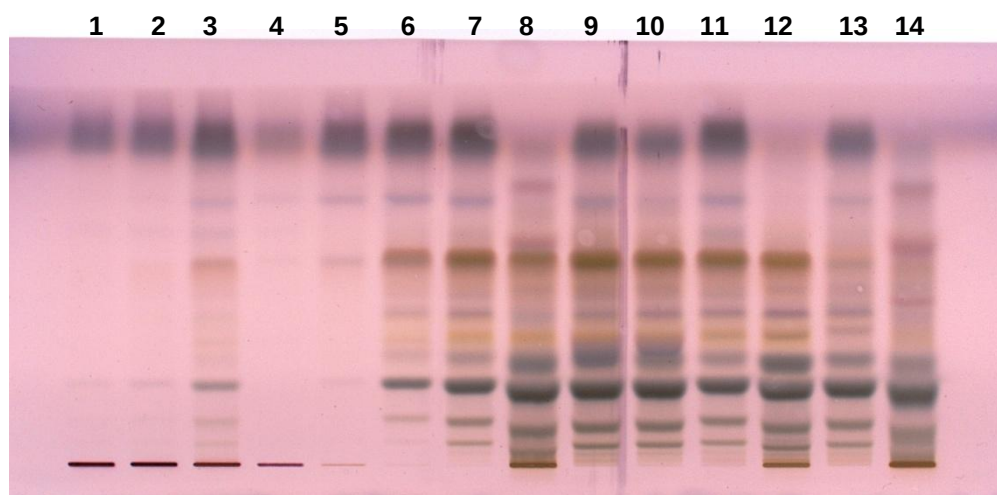


Abbildung 47: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, Seite 10), bei Tageslicht

Screening auf Aminosäuren: DC-System 7 (siehe Tabelle 1, S. 9)
Reagenz 5 (siehe Tabelle 2, S. 10)

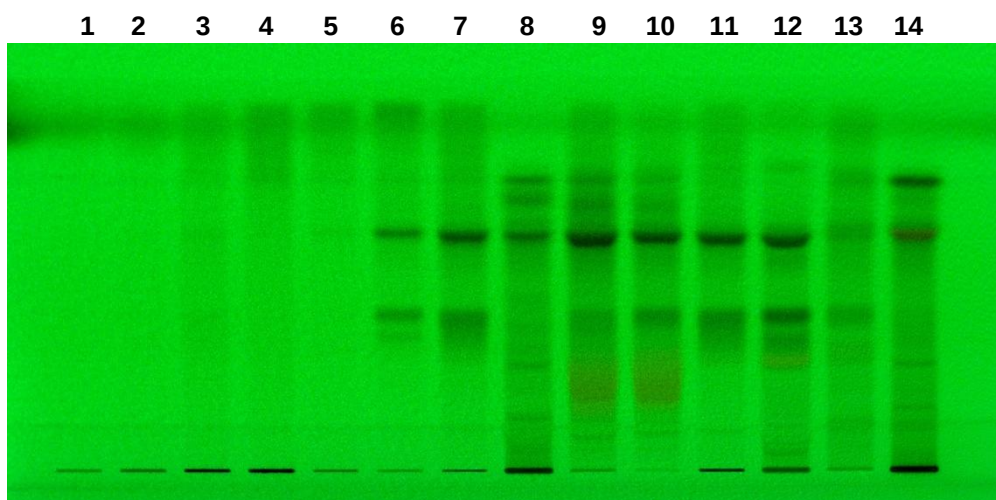


Abbildung 48: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

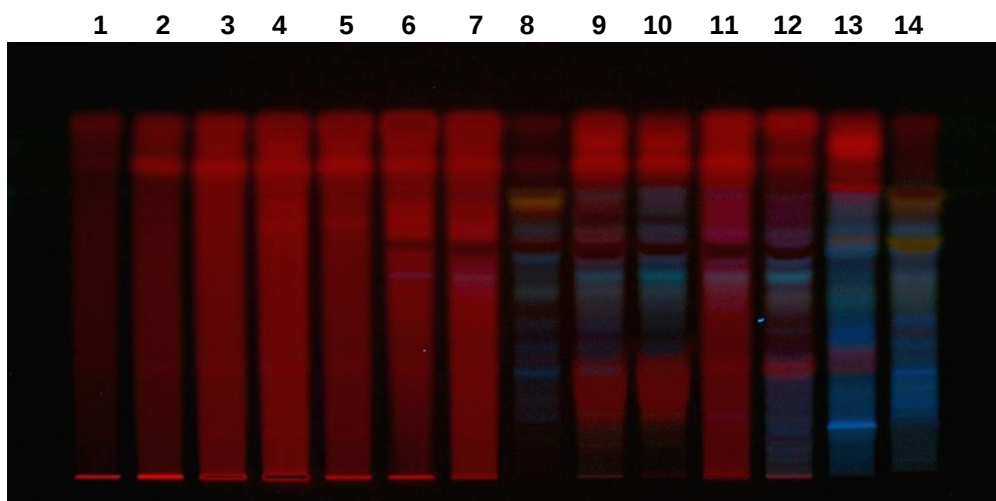


Abbildung 49: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

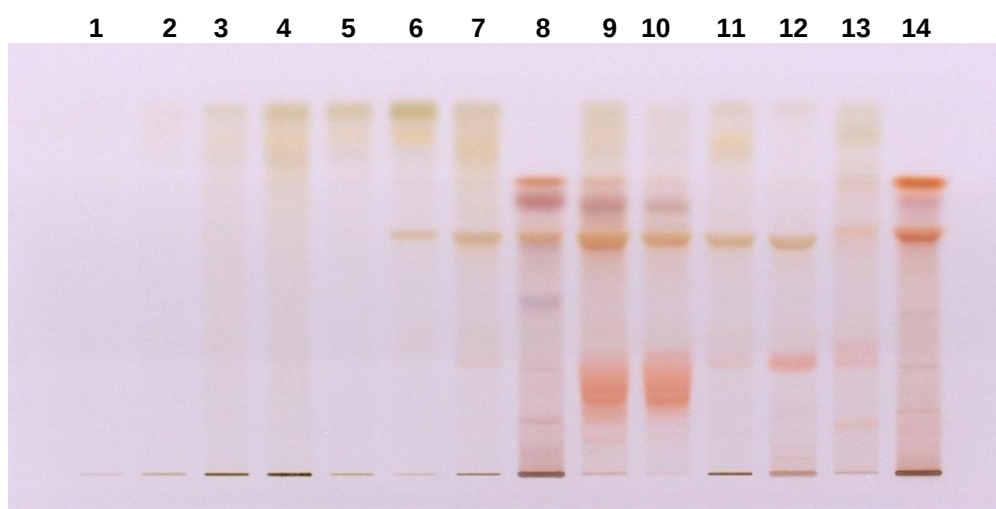


Abbildung 50: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht

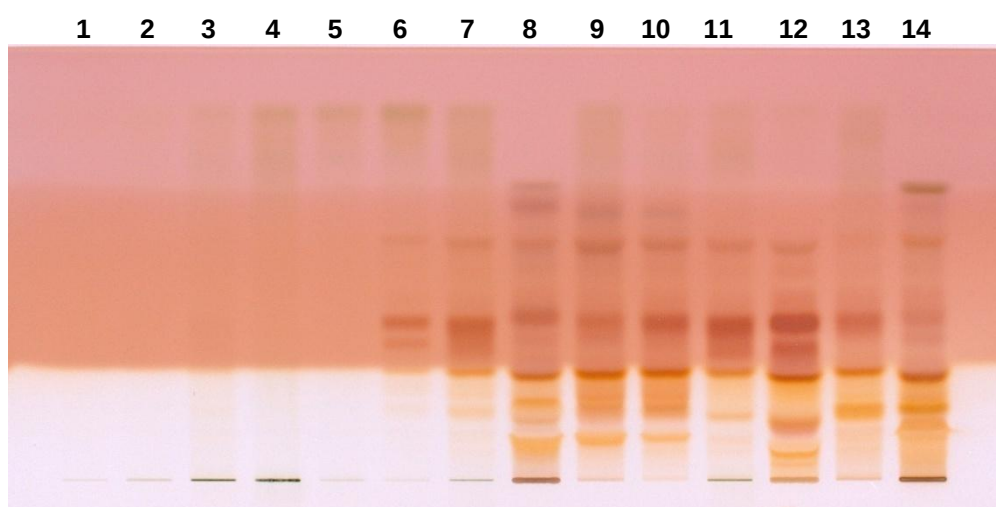


Abbildung 51: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 5 (siehe Tabelle 2, Seite 10), bei Tageslicht

Screening auf Saponine & Lignane: DC-System 2 (siehe Tabelle 1, S. 9)
Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, S. 10)

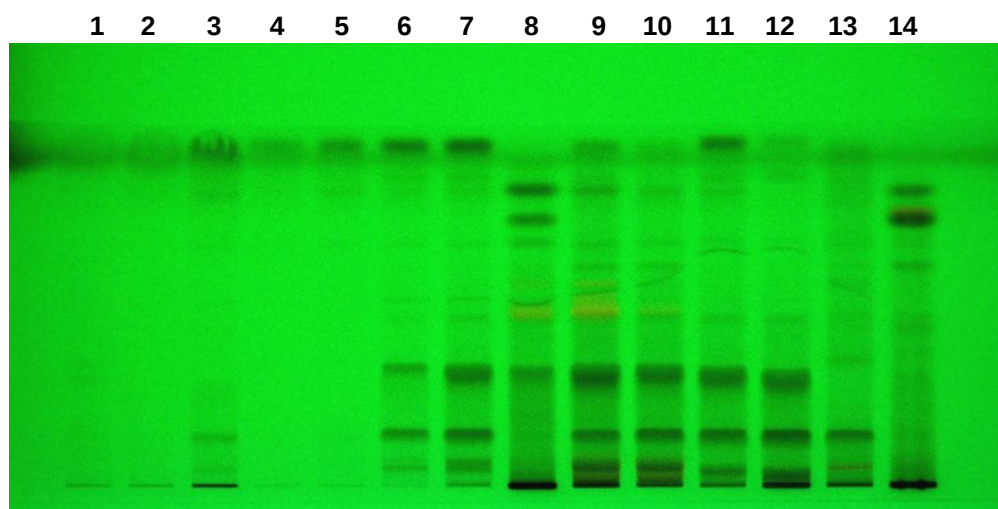


Abbildung 52: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 2 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

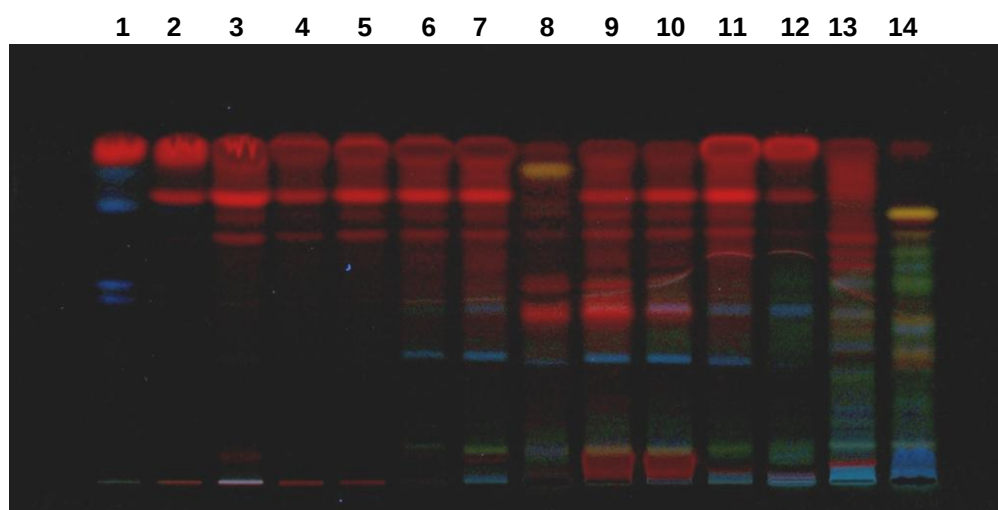


Abbildung 53: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 2 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

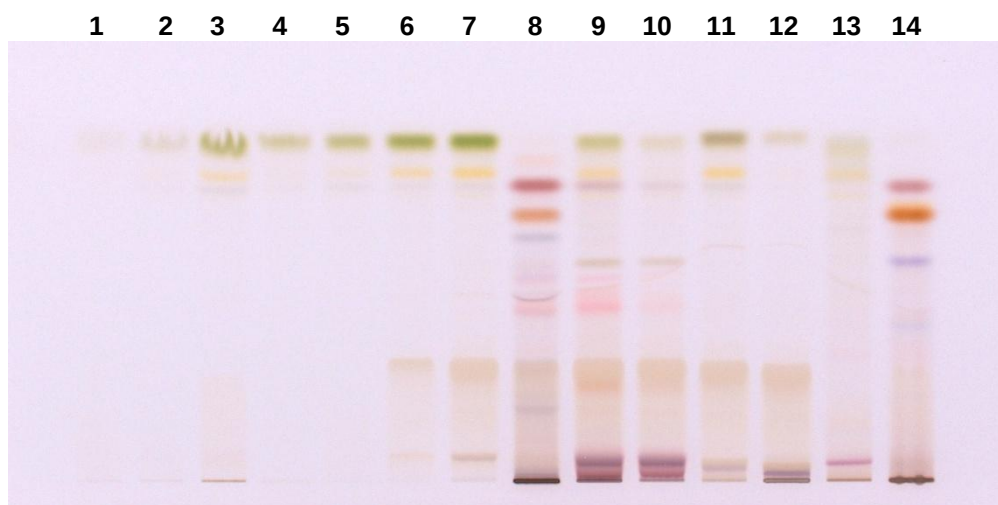


Abbildung 54: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 2 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht

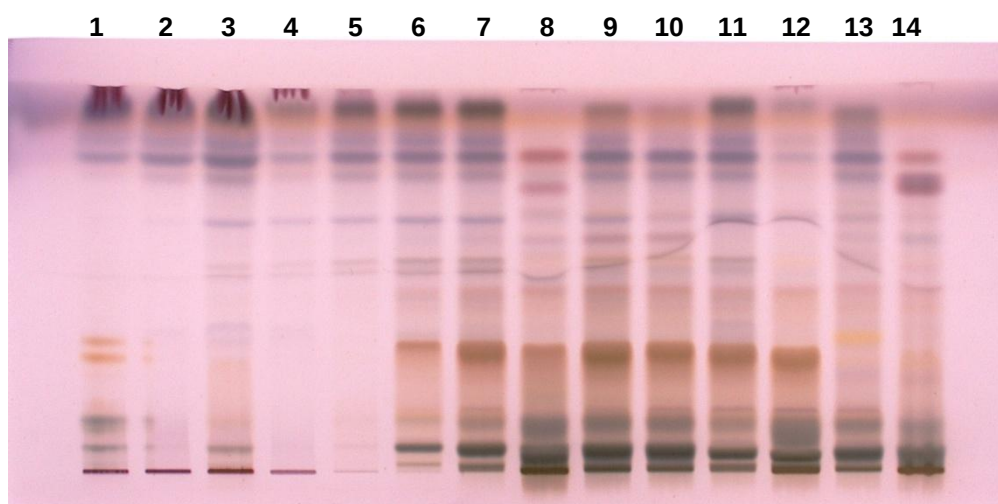


Abbildung 55: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 2 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, Seite 10), bei Tageslicht

Screening auf apolare Komponenten: DC-System 5 (siehe Tabelle 1, S. 9)

Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, S. 10)

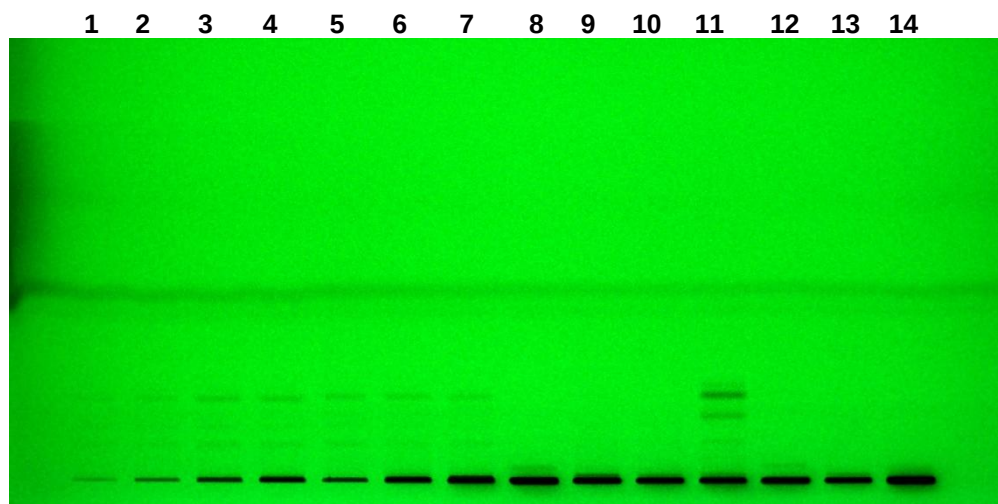


Abbildung 56: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 5 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

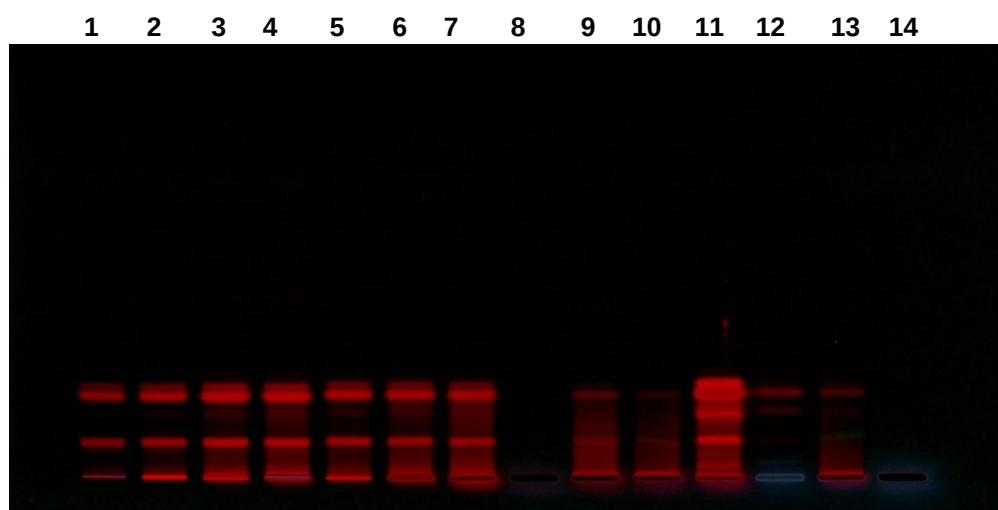


Abbildung 57: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 5 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

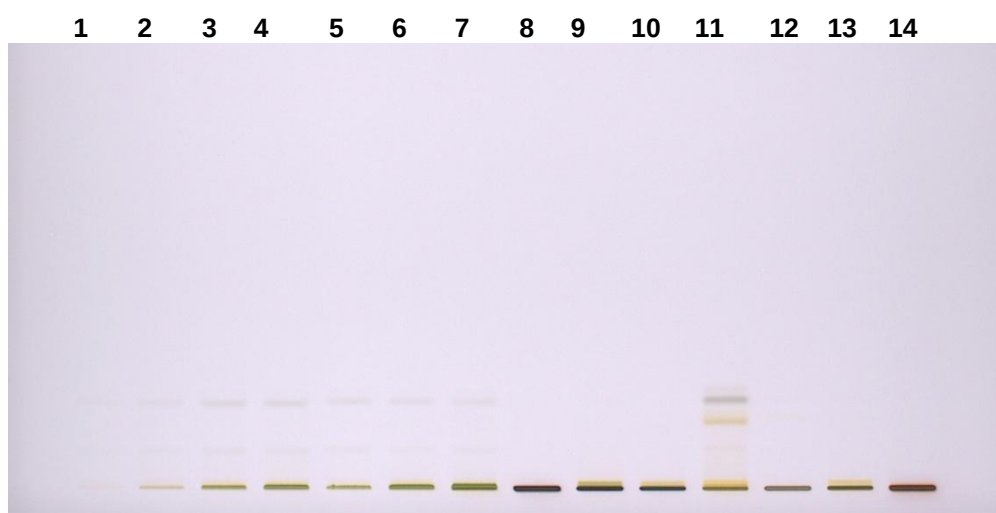


Abbildung 58: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 5 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht

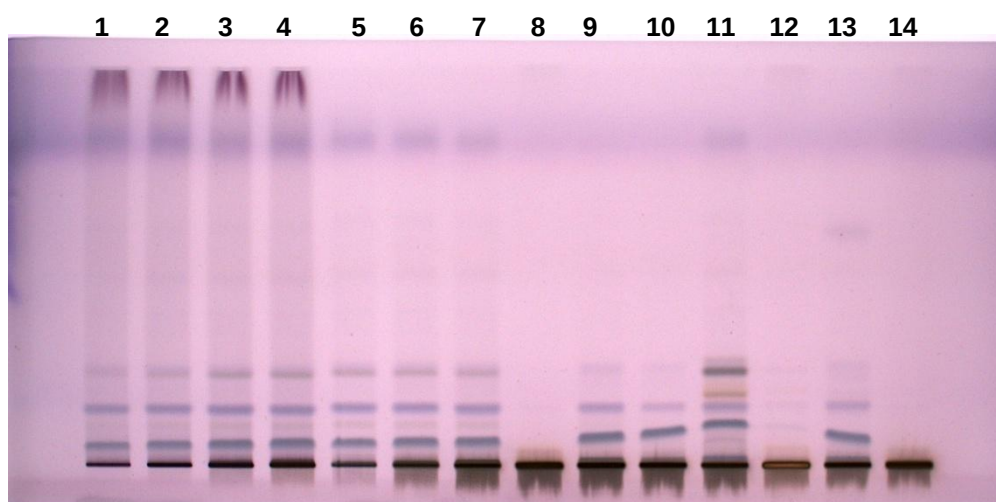


Abbildung 59: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS EC in System 5 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, Seite 10), bei Tageslicht

Phytochemischer Fingerprint-Vergleich – Material JS FG

Screening auf Flavonoide: DC-System 3 (siehe Tabelle 1, S. 9)
Reagenz 1 (siehe Tabelle 2, S. 10)

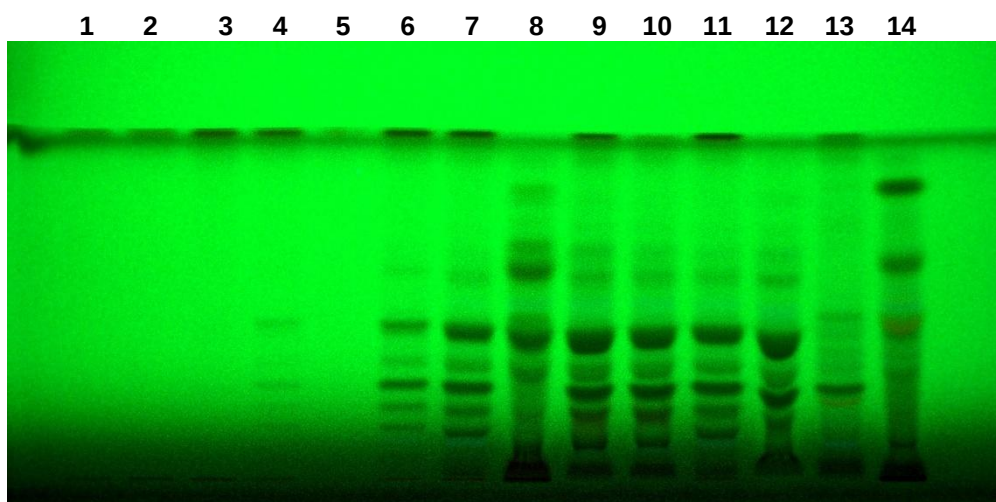


Abbildung 60: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

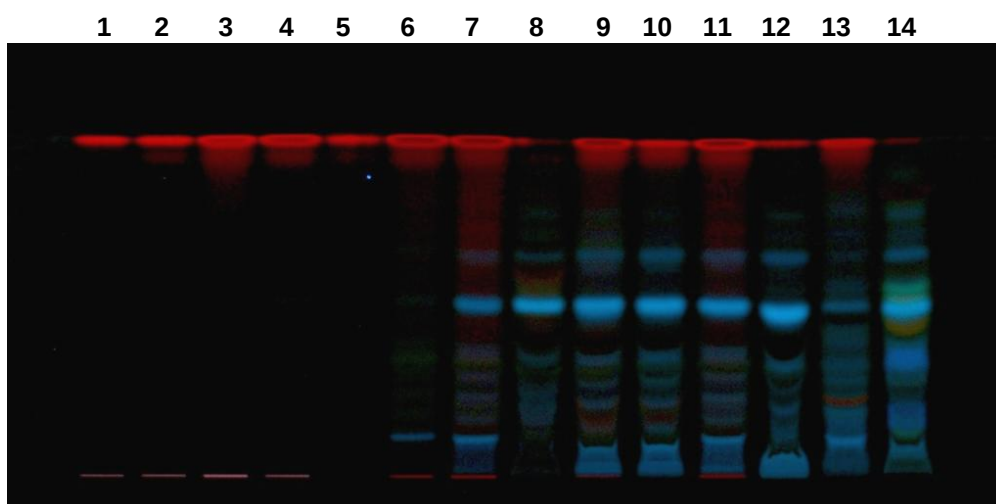


Abbildung 61: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

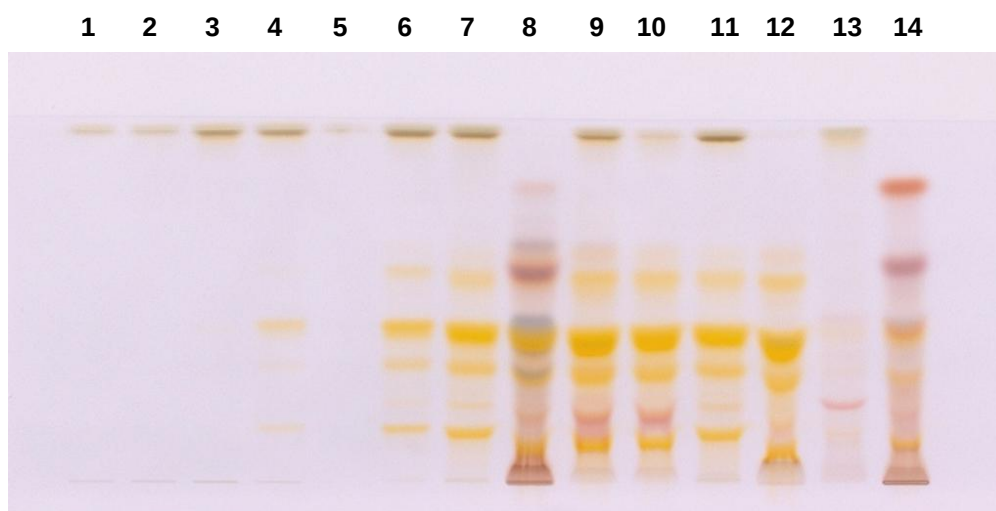


Abbildung 62: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 1 (siehe Tabelle 2, S. 10), bei Tageslicht

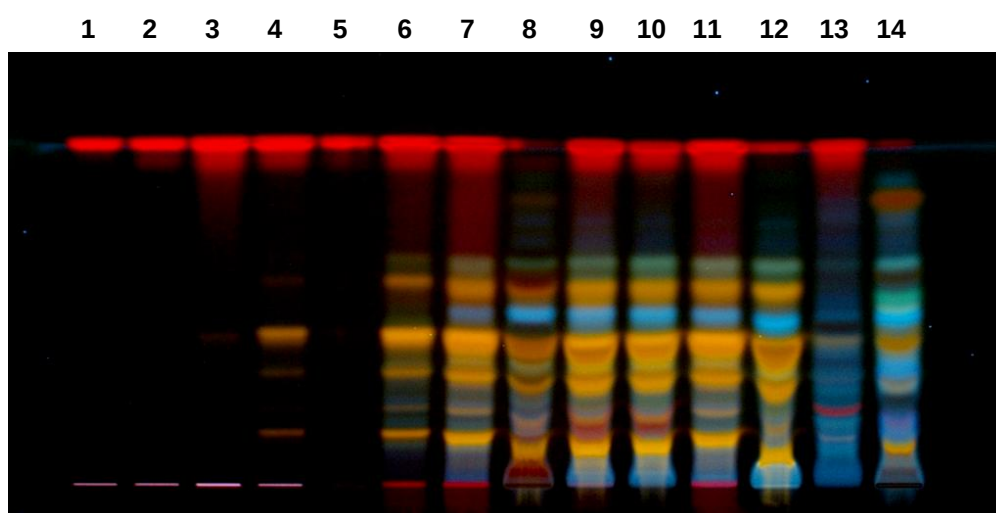


Abbildung 63: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 3 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 1 (siehe Tabelle 2, S. 10), unter UV 366 nm

Screening auf polare Komponenten: DC-System 6 (siehe Tabelle 1, S. 9)
Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, S. 10)

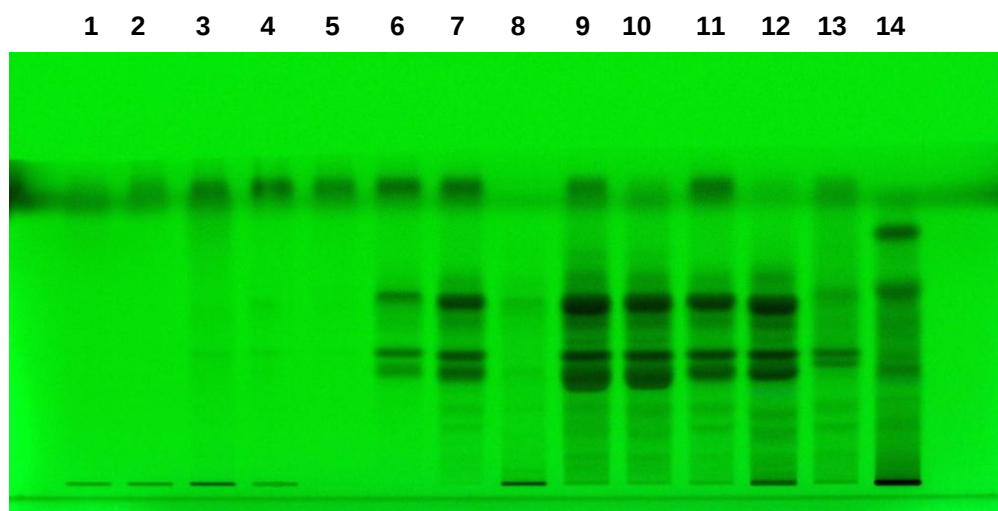


Abbildung 64: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

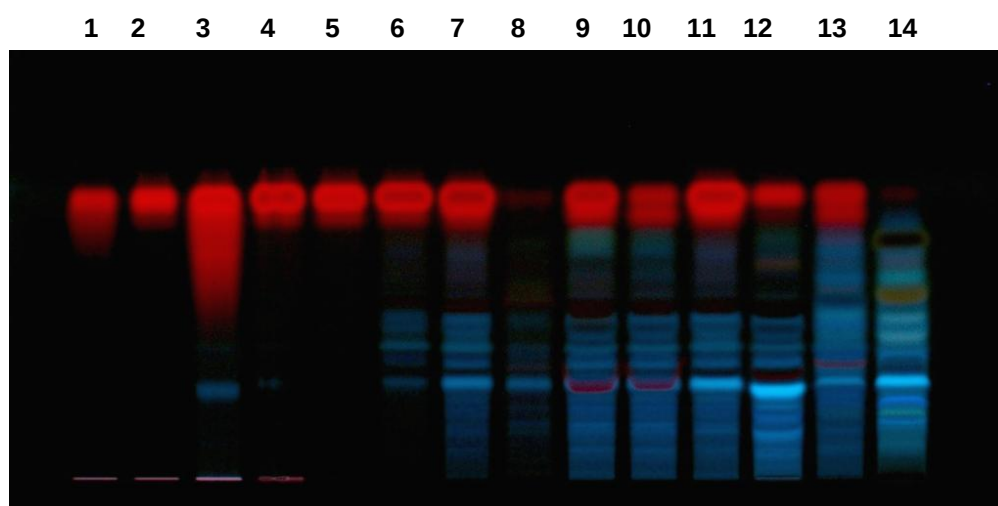


Abbildung 65: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

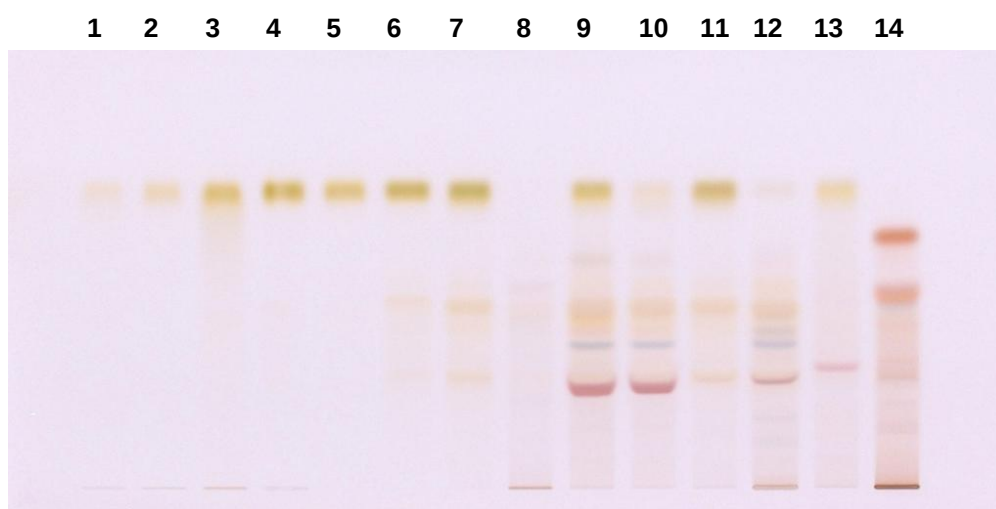


Abbildung 66: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht

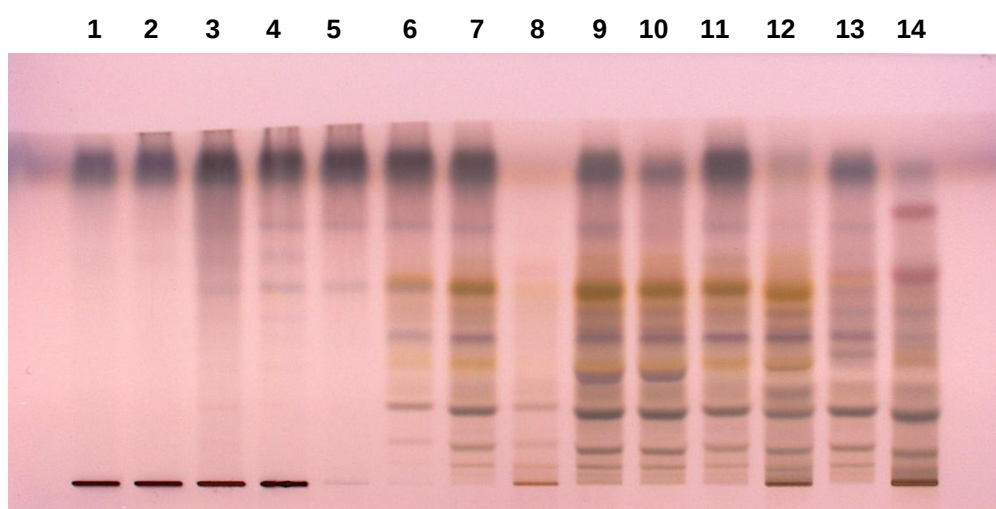


Abbildung 67: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 6 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, Seite 10), bei Tageslicht

Screening auf Aminosäuren: DC-System 7 (siehe Tabelle 1, S. 9)
Reagenz 5 (siehe Tabelle 2, S. 10)

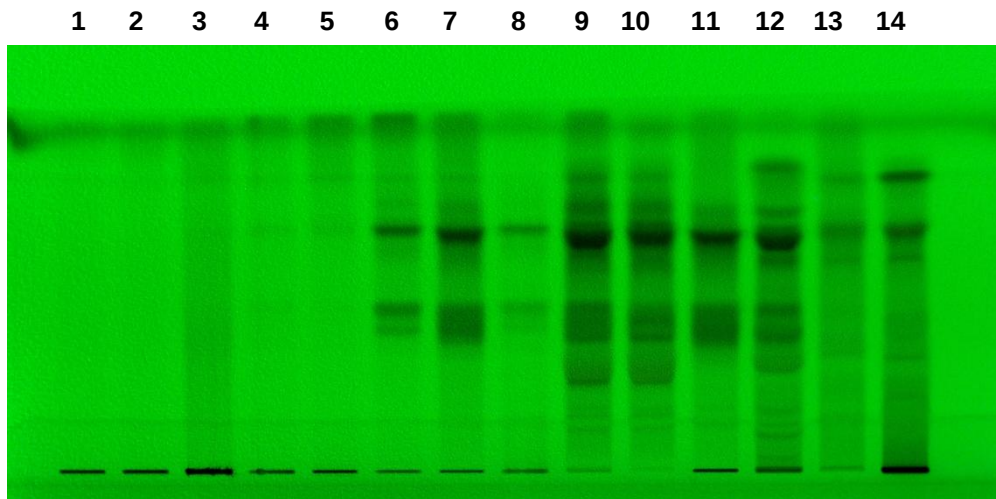


Abbildung 68: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

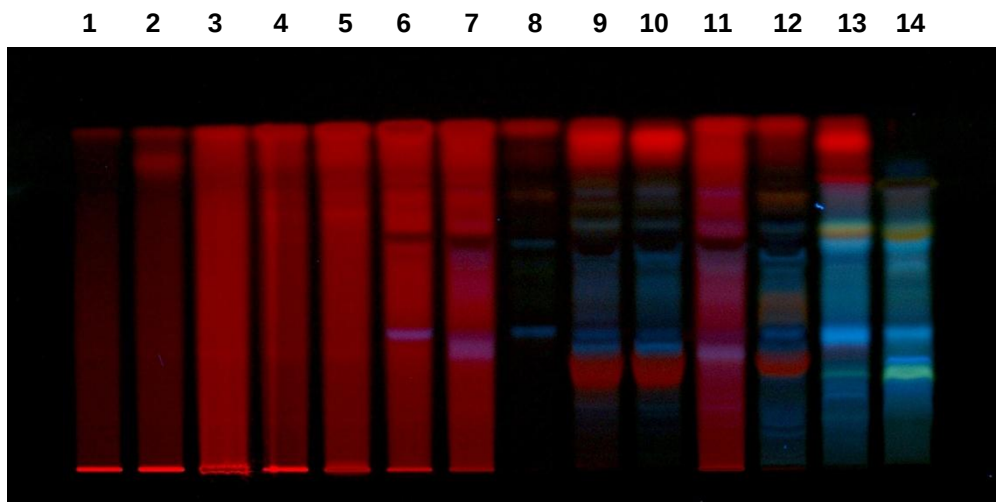


Abbildung 69: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

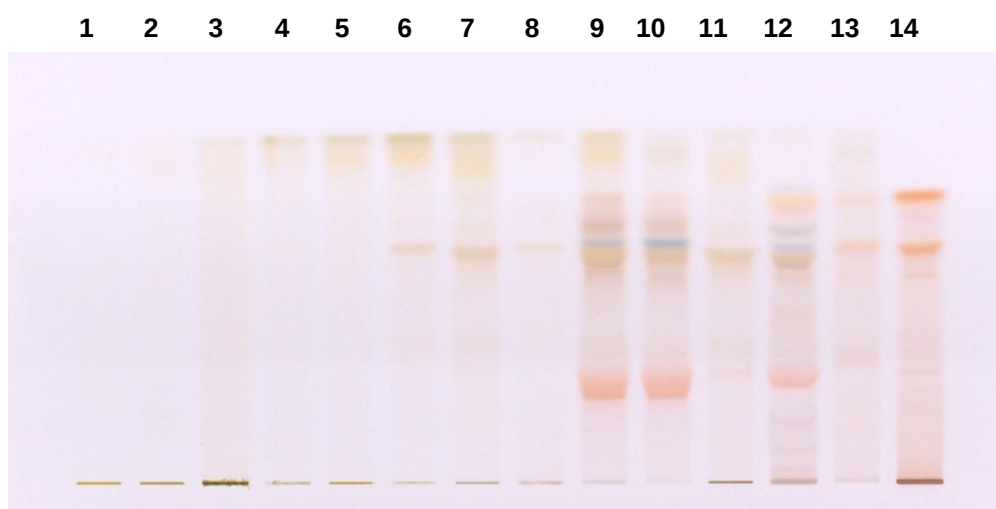


Abbildung 70: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht

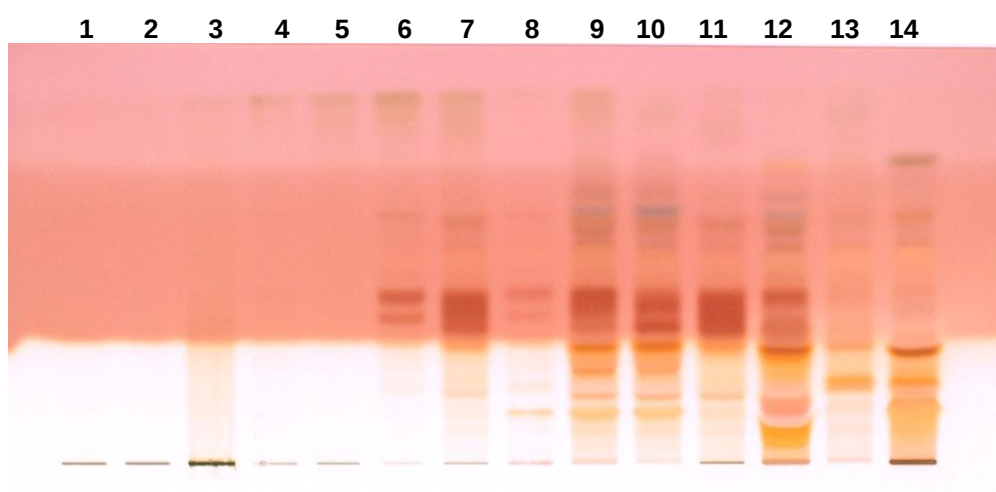


Abbildung 71: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 7 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 5 (siehe Tabelle 2, S. 10), bei Tageslicht

Screening auf Saponine & Lignane: DC-System 2 (siehe Tabelle 1, S. 9)
Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, S. 10)

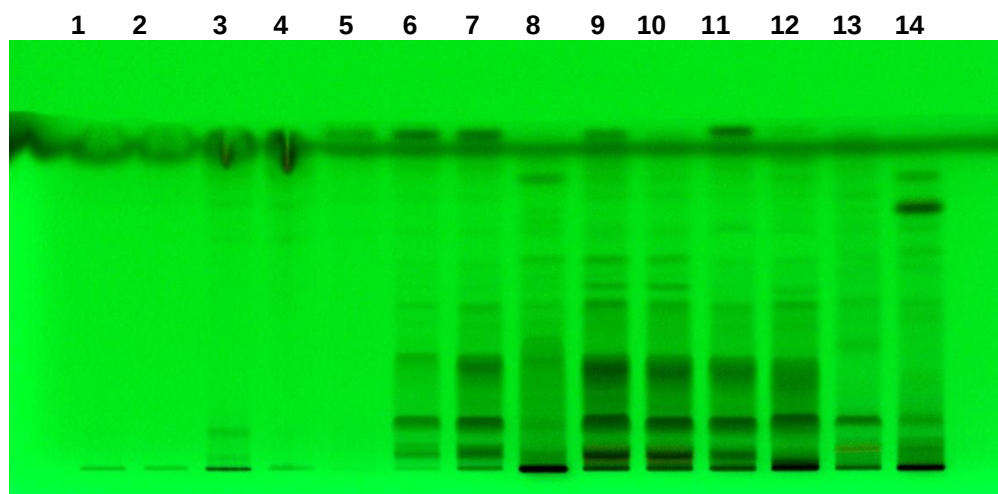


Abbildung 72: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 2 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

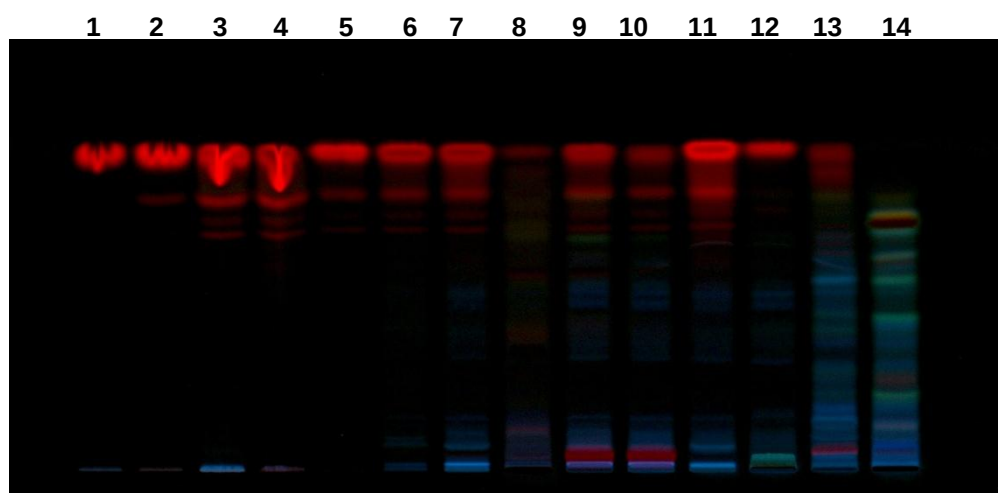


Abbildung 73: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 2 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

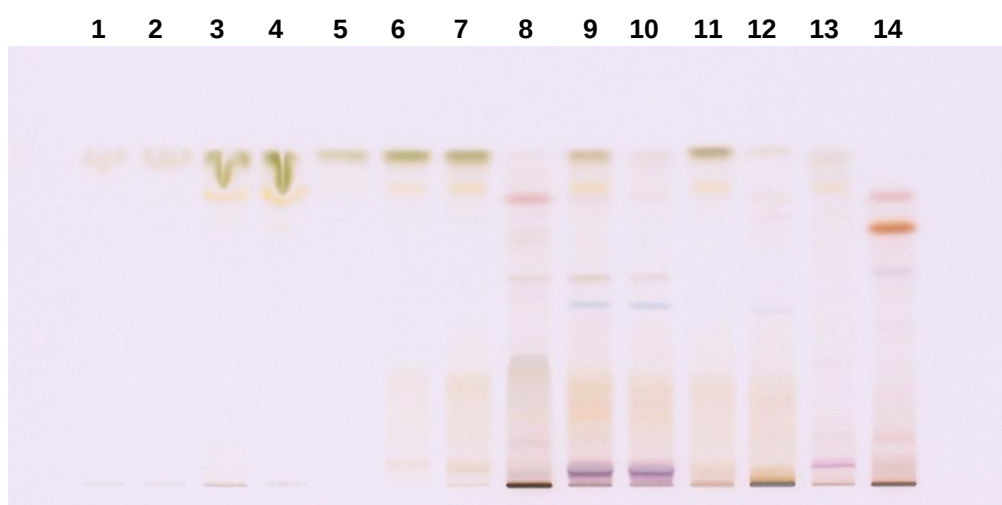


Abbildung 74: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 2 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht

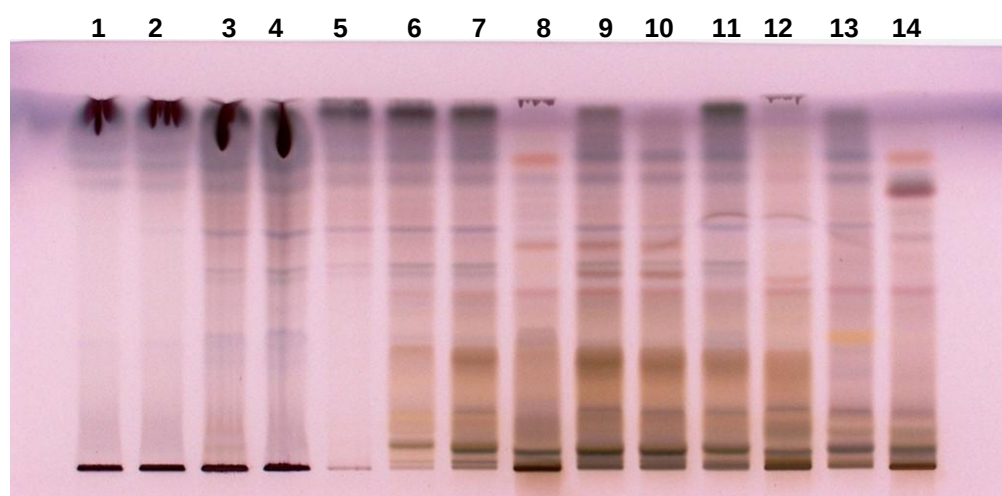


Abbildung 75: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 2 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, S. 10), bei Tageslicht

Screening auf apolare Komponenten: DC-System 5 (siehe Tabelle 1, S. 9)

Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, S. 10)

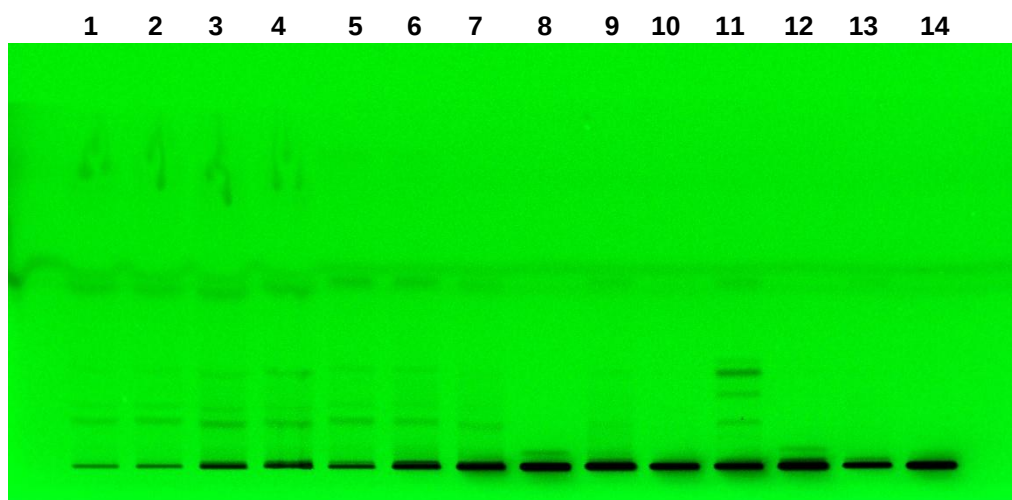


Abbildung 76: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 5 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 254 nm

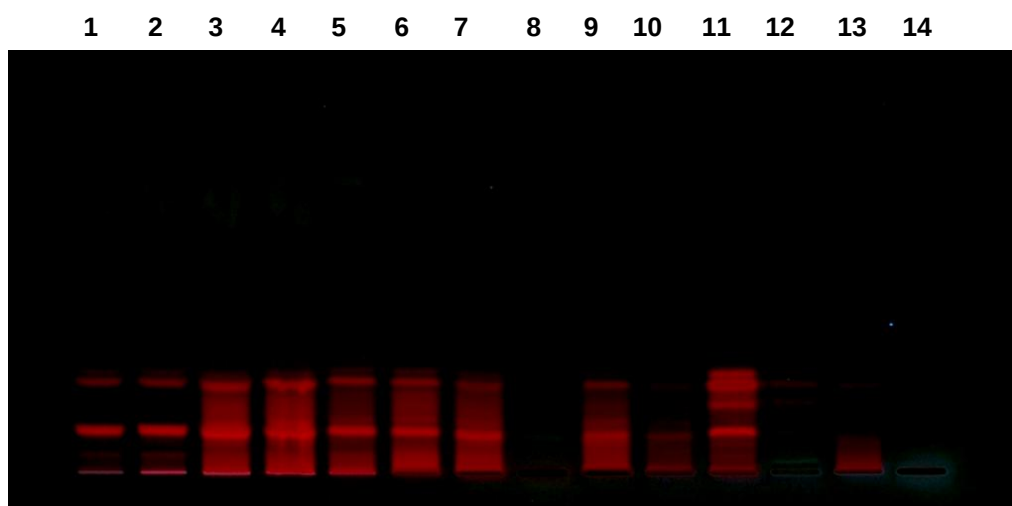


Abbildung 77: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 5 (siehe Tabelle 1, Seite 9), unter UV 366 nm

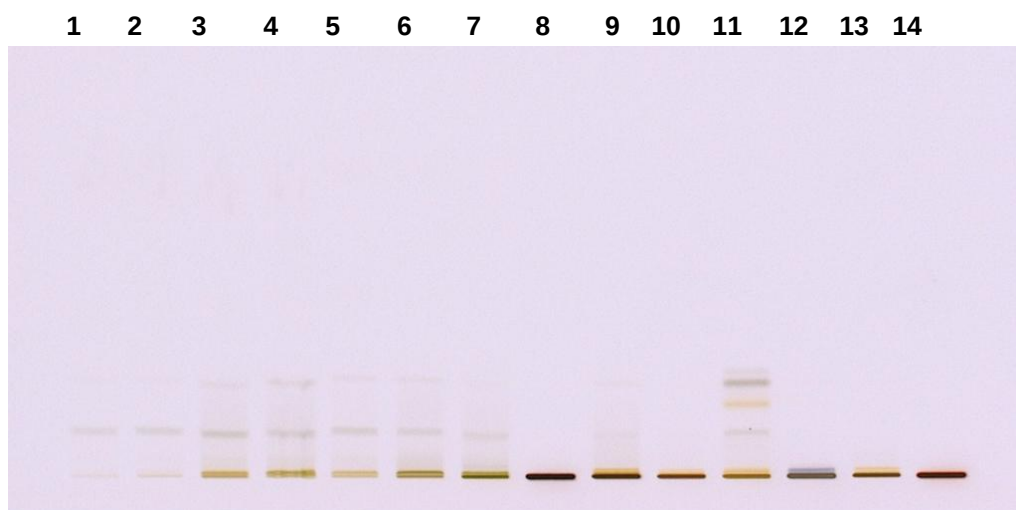


Abbildung 78: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 5 (siehe Tabelle 1, Seite 9), bei Tageslicht

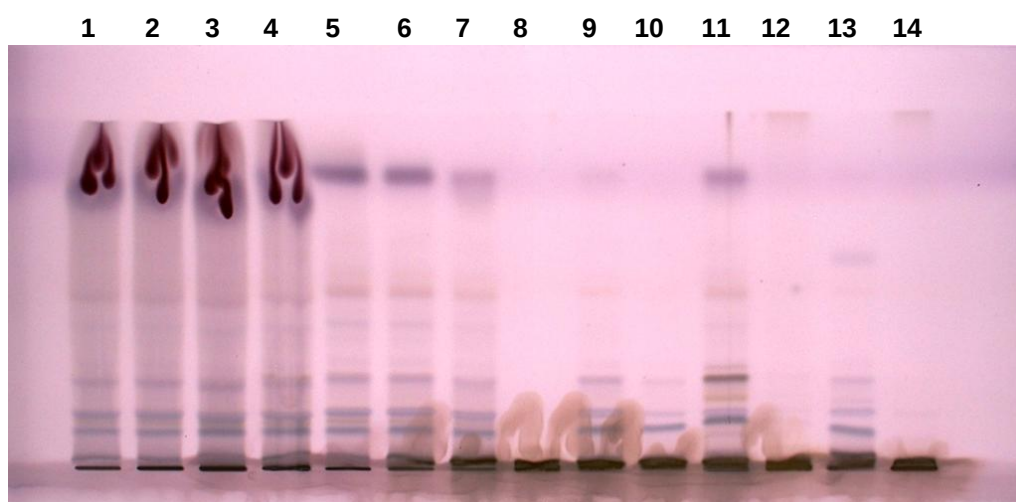


Abbildung 79: Extrakt 1-14 (siehe Tabelle 4, Seite 16) aus JS FG in System 5 (siehe Tabelle 1, Seite 9), derivatisiert mit Reagenz 4 (siehe Tabelle 2, Seite 10), bei Tageslicht

HPLC-Analyse der Mutterfraktionen aus JS EC

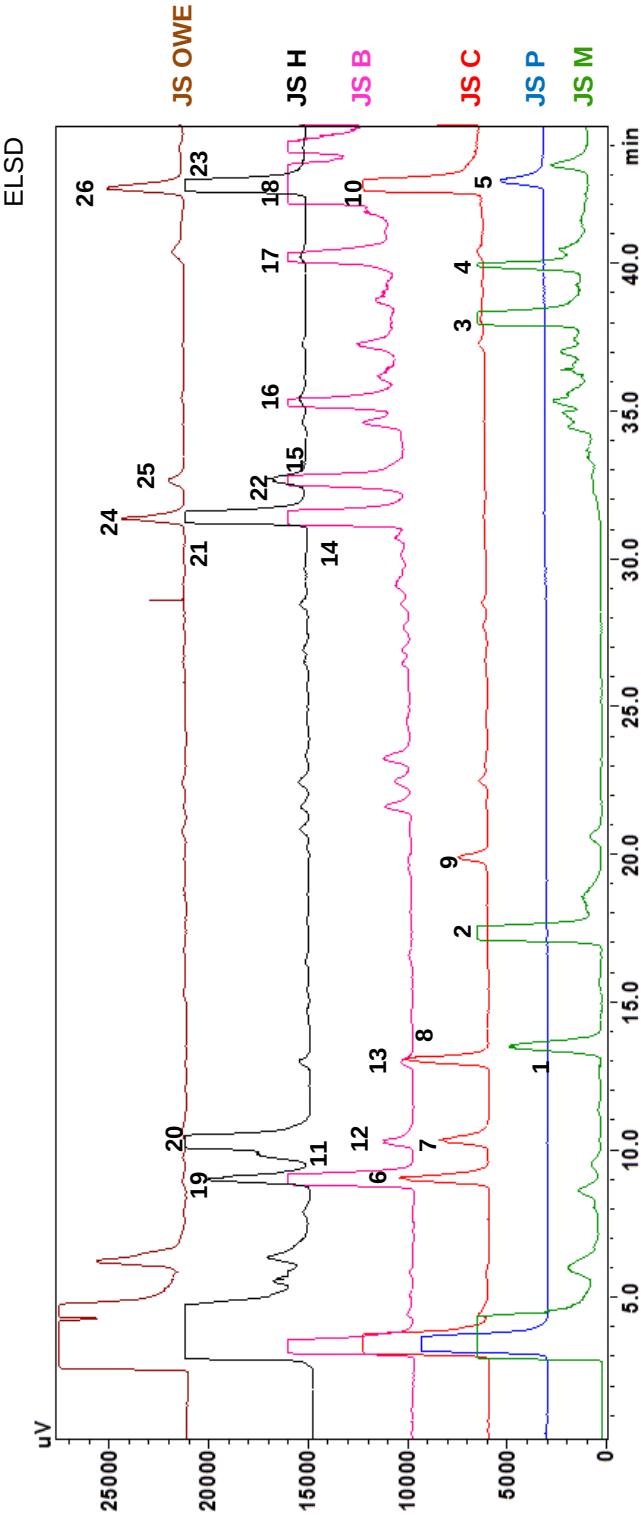


Abbildung 80: Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6 und Abbildung 5, Seite 7), analysiert mit der analytischen HPLC-Methode (siehe Tabelle 6, Seite 20) und detektiert mittels ELSD

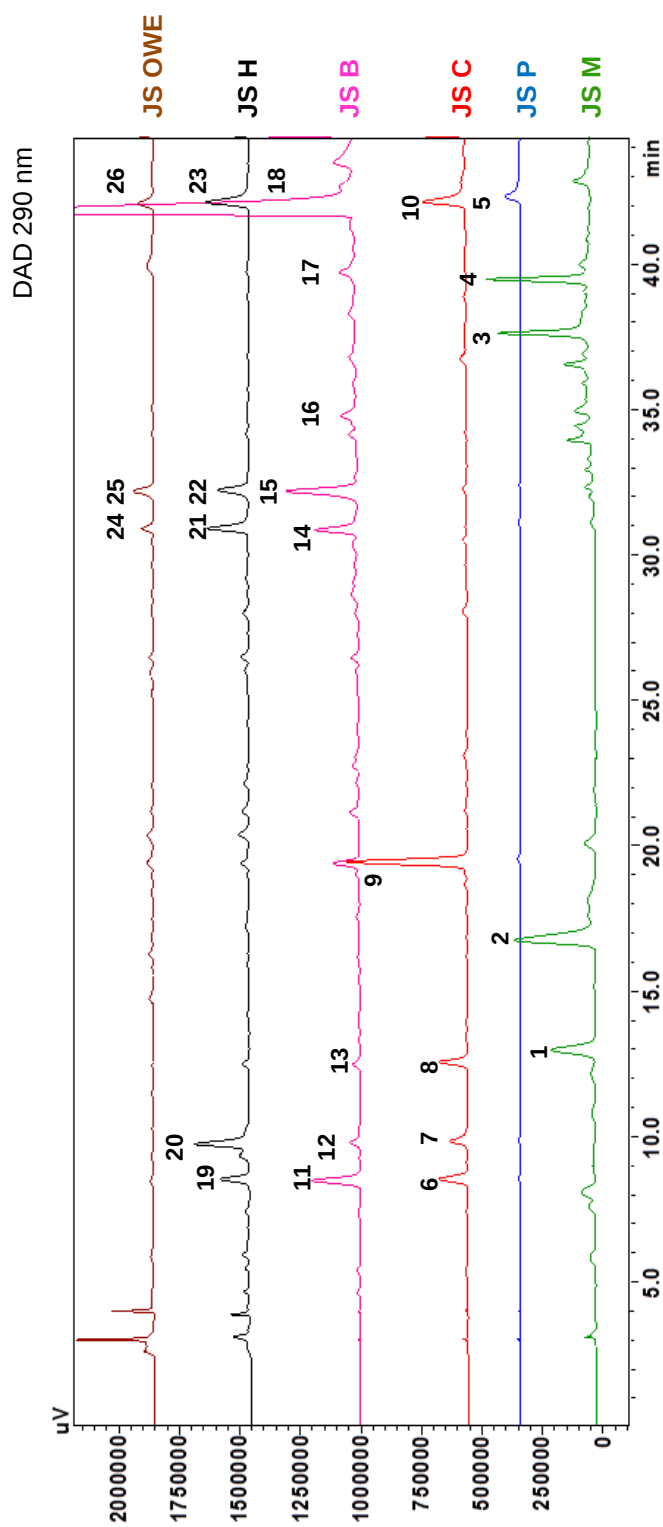
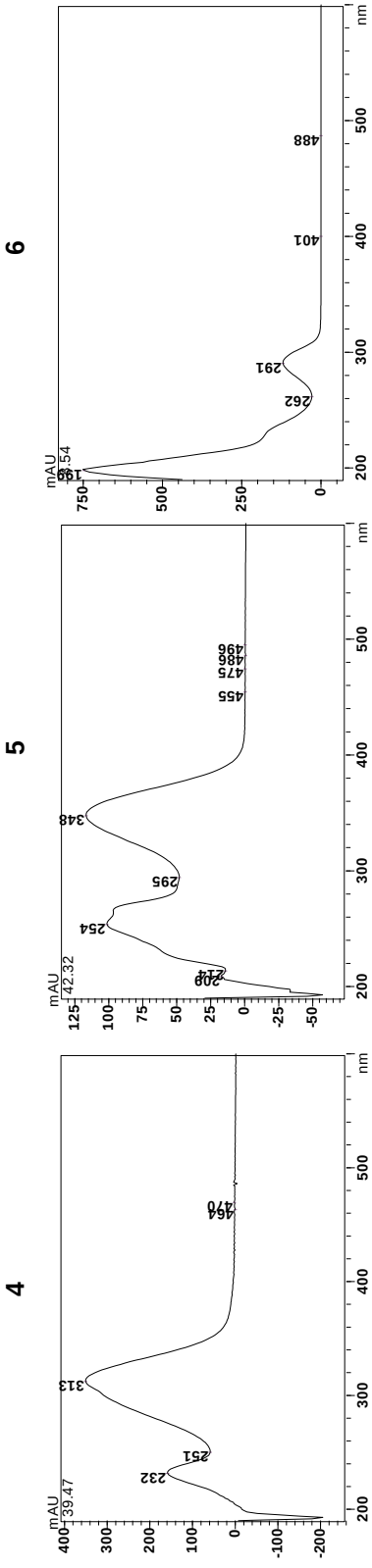
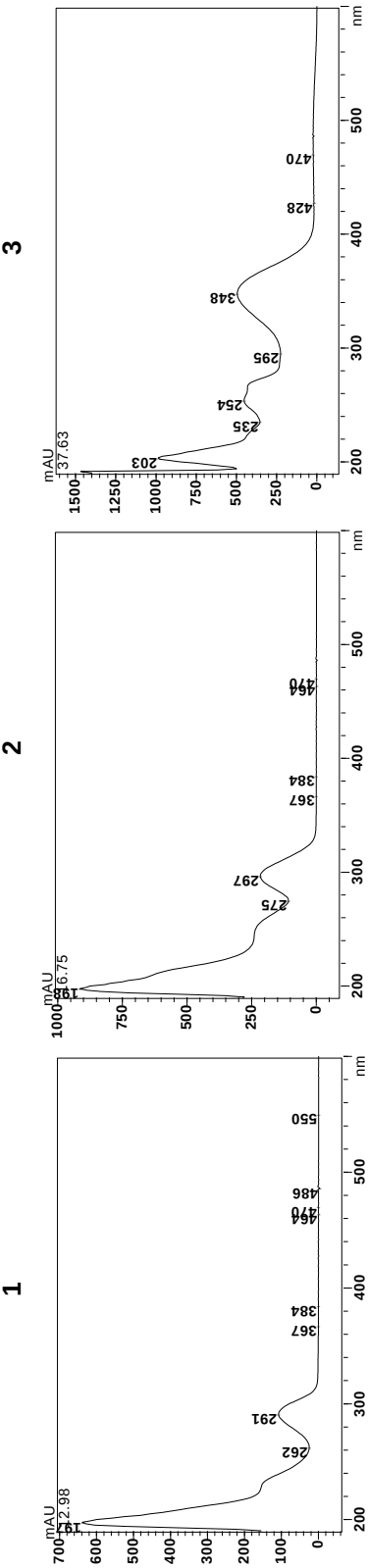
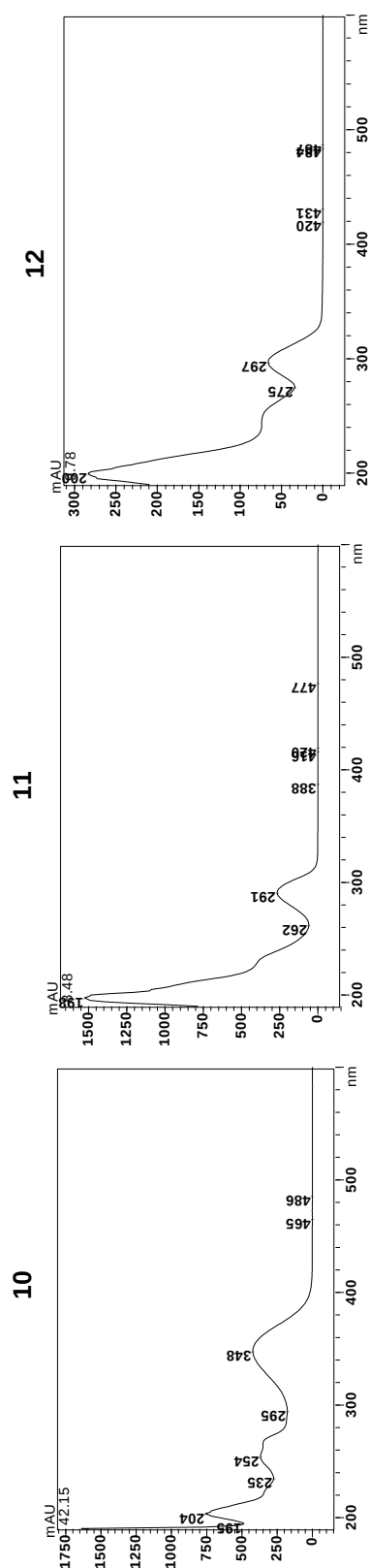
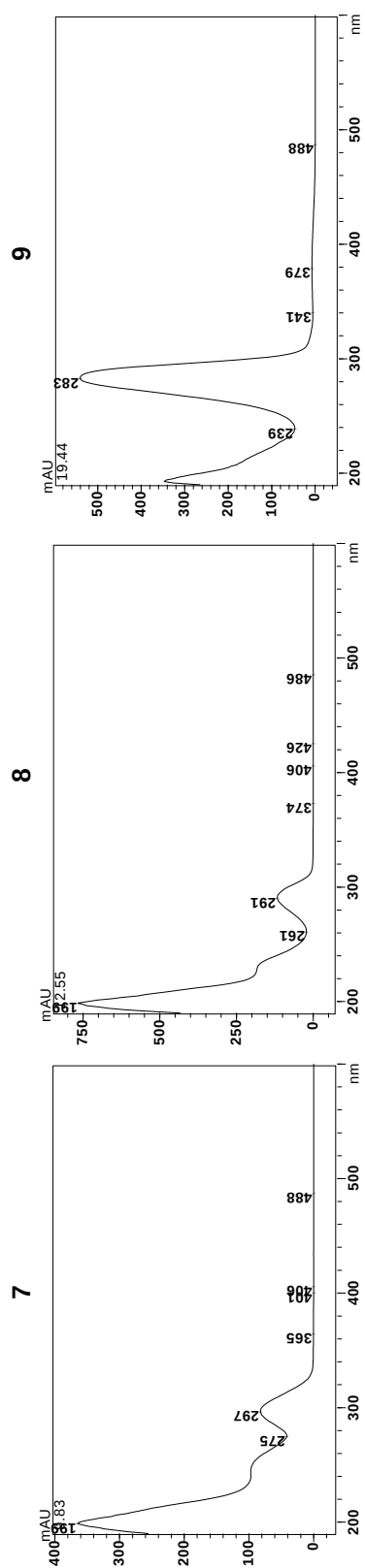
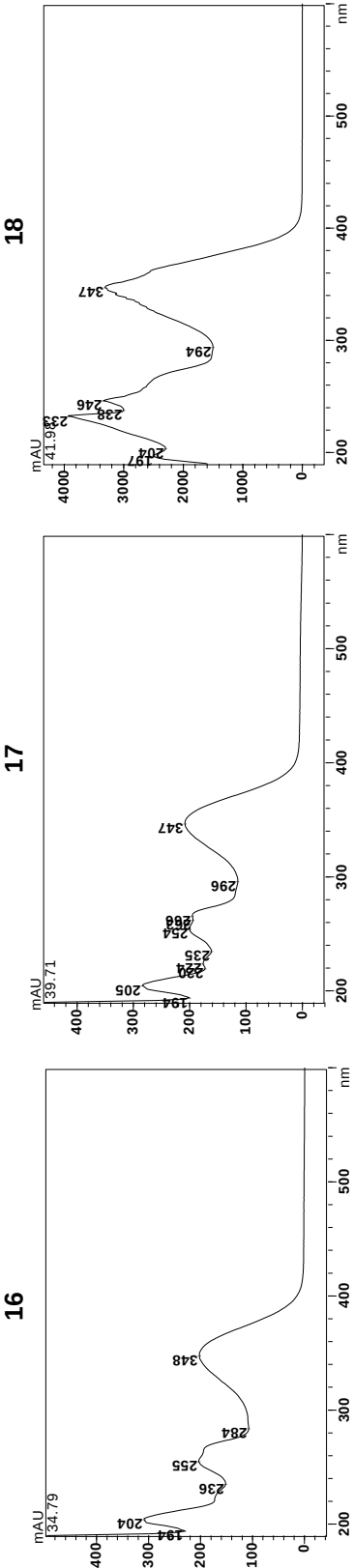
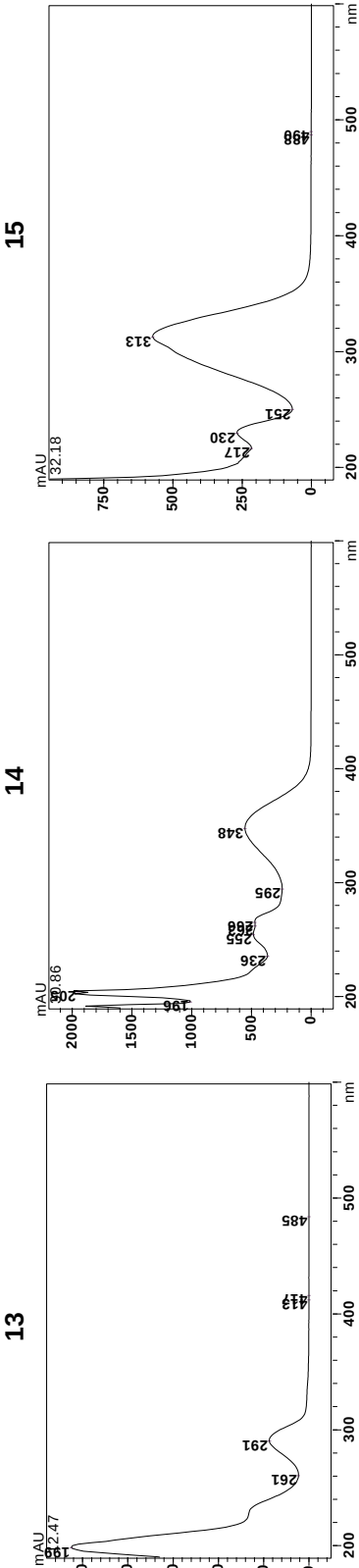


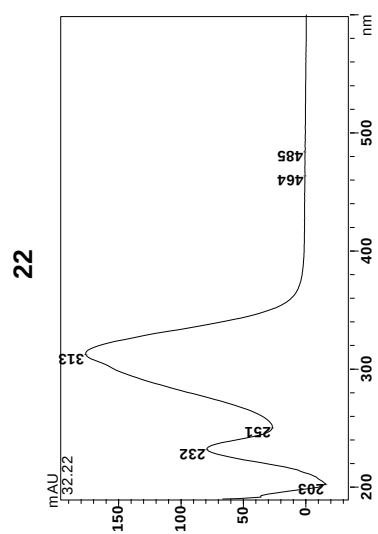
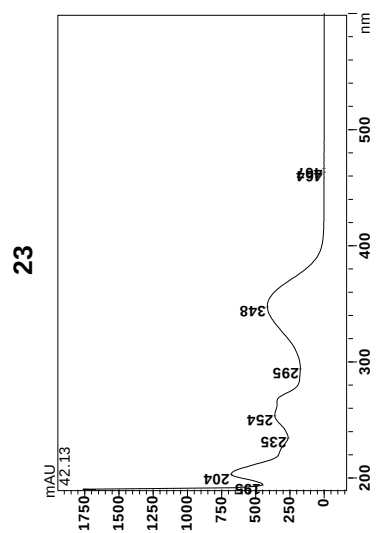
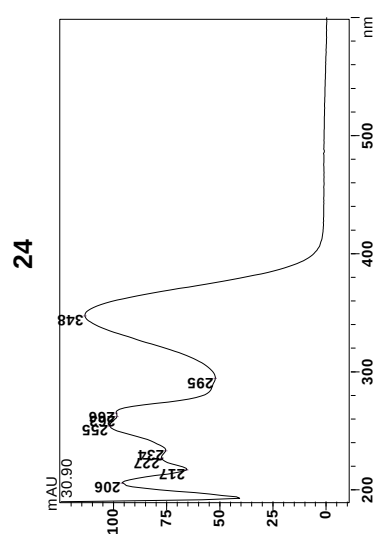
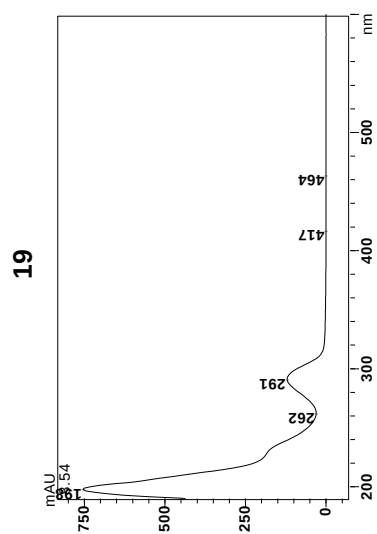
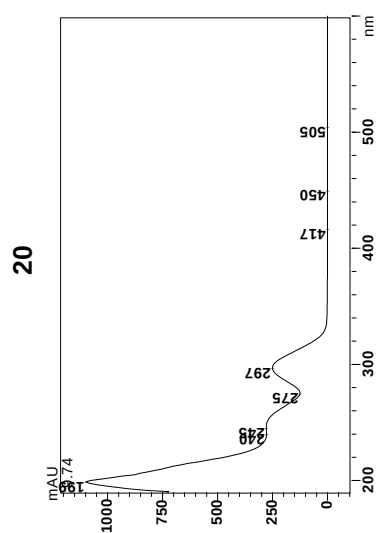
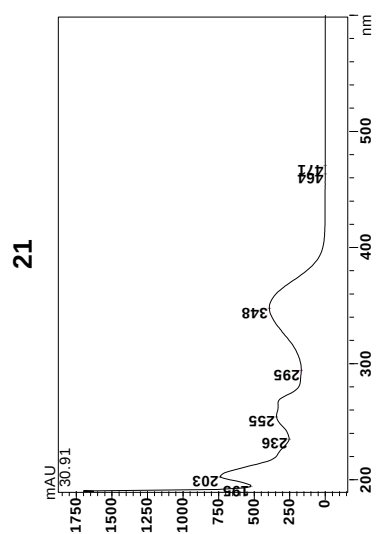
Abbildung 81: Mutterfraktionen aus JS EC (siehe Kapitel 2.2, Seite 6 und Abbildung 5, Seite 7), analysiert mit der analytischen HPLC-Methode (siehe Tabelle 6, Seite 20) und detektiert mittels DAD bei 290 nm

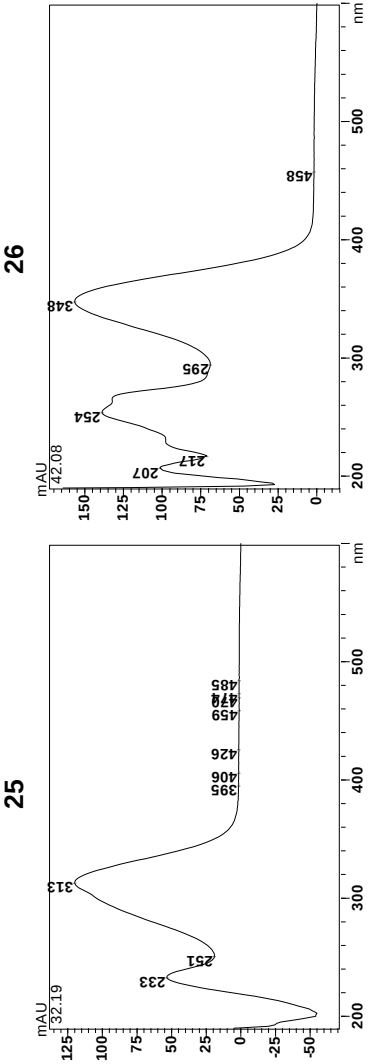
UV-Spektren der Hauptpeaks der Mutterfraktionen aus JS EC











9. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Stefanie Istvanits
Geburtsdatum: 17.11.1987
Geburtsort: Oberwart
Staatsbürgerschaft: Österreich



Ausbildung:

1994-1998: Volksschule Oberschützen
1998-2002: Unterstufe des BG/ BRG/ BORG
Oberschützen
2002-2006: Oberstufe des BG/ BRG/ BORG
Oberschützen
Juni 2006: Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
seit Oktober 2006: Studium der Pharmazie an der
Universität Wien
Juli 2008 & 2009: Feriapraxis in einer Wiener Apotheke
Oktober 2013-Februar 2014: Praktische Arbeit zur Diplomarbeit
am Department für Pharmakognosie
an der Universität Wien