



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Methodenentwicklung zur Durchführung von
ökogeographischen Studien
am Beispiel von *Urtica dioica* L., *Rubus idaeus* L.,
Plantago lanceolata L. und *Fragaria vesca* L.

verfasst von

Réka Tenkei

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. Dr. Johannes Saukel

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel für die fachliche Unterstützung, die guten Ratschläge, das Sammeln von Vergleichsmaterial, die Bereitstellung von Literatur und dass er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn Unklarheiten bei meiner Arbeit aufkamen. Ich danke ihm ebenfalls für die Auswertung einiger Daten, und die hilfreiche Erklärung und Wegweisung zur selbstständigen Auswertung meiner Analysen. Ich bedanke mich ebenfalls für das gute Arbeitsklima und die Ruhe die er stets auch in schwierigen Situationen ausgestrahlt hat.

Des Weiteren danke ich MSc. Ramin Nikzad, dass er mir die Grundlagen an allen Geräten und bei vielen Auswertungsverfahren beigebracht hat und sofort zur Stelle war, falls die Geräte repariert oder Unklarheiten aus dem Weg geräumt werden mussten. Ebenfalls danke ich ihm für die Hauptkomponenten- und Diskriminanzanalyse der Daten welche mit dem Infrarotspektrometer aufgenommen wurden, die ich ohne sein Fachwissen nicht hätte durchführen können, sowie für das Bereitstellen von Literatur für viele Bereiche meiner Arbeit.

Ich danke auch Dr. Christoph Dobeš für die Bereitstellung von Literatur und für gute fachliche Vorschläge und Anregungen zu meiner Arbeit.

Mein Dank richtet sich auch an alle Angestellten in der Spange F4 des Pharmaziezentrum für die hilfreichen Ratschläge und Hinweise, vor allem ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter und ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek, DI Barbara Theiler für die Hilfe mit dem HPTLC-Gerät, Mag. Christina Sykora, und besonders Christina Dangl für die große Hilfe bei der Suche nach allen Substanzen und Utensilien für meine Analysen.

Ein besonders großer Dank gilt meinen Eltern, die mich in meinem gesamten Studium unterstützt haben, schon immer an mich geglaubt haben und mir den Start ins Leben ermöglicht haben den ich mir gewünscht habe.

Ich danke auch meinem Mann, der mir im Laufe meines Studiums und im Leben zur Seite steht, und mir ebenfalls eine große Stütze war und ist.

Ein Dankeschön auch an meine gesamte Familie, die immer hinter mir gestanden hat.

Ich möchte mich auch bei meinem Chef und allen Angestellten der Apotheke zum Schwarzen Adler bedanken, die mir den Rücken gestärkt haben und mich stets motiviert haben weiter zu machen und mein Studium zu beenden.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	1
Inhaltsverzeichnis	2
Verwendete Abkürzungen	4
1. Einleitung.....	5
1.1.Ökogeographie	5
1.2. <i>Urtica dioica</i> L.	6
1.3. <i>Rubus idaeus</i> L.	6
1.4. <i>Plantago lanceolata</i> L.	7
1.5. <i>Fragaria vesca</i> L.	7
2. Zielsetzung.....	8
3. Material und Methoden	9
3.1.Herkunft des verwendeten Pflanzenmaterials.....	9
3.2.Aufarbeitung des verwendeten Pflanzenmaterials	10
3.3. <i>Fragaria vesca</i> L.: Zuordnung und makroskopische Analyse des Pflanzenmaterials	10
3.4.Infrarotspektroskopie.....	13
3.4.1. Einführung und Vorstellung des verwendeten Geräte	13
3.4.2. Arbeitsvorgang.....	14
3.5.HPTLC.....	15
3.5.1. Einführung und Vorstellung des verwendeten Geräte	15
3.5.2. Arbeitsvorgang.....	16
3.5.3. Methodenfindung.....	16
a) Methodenscreening nach Camag	18
b) Arzneibuchmethoden.....	19
3.5.4. Verwendungsoptimierte Analysemethoden.....	21
4. Ergebnisse.....	25
4.1.Infrarotspektroskopie.....	25
4.1.1. Ergebnisse der Versuche an <i>Fragaria vesca</i> L., <i>Fragaria moschata</i> L., <i>Fragaria viridis</i> L.	27
4.2.HPTLC.....	32
4.2.1. Problematik am HPTLC-Gerät – Fragestellungen und deren Beantwortung.....	32

4.2.2. Ergebnissen für <i>Urtica dioica</i> L.	43
4.2.3. Ergebnissen für <i>Rubus idaeus</i> L.	46
4.2.3.1. Definition einzelner Substanzpeaks	46
4.2.3.2. Auswertung und Quantifizierung	50
4.2.3.3. Korrelation der erhaltenen Daten	53
5. Diskussion.....	56
5.1. Anwendbarkeit der Infrarotspektroskopie	
Bei Ökogeographischen Studien	56
5.2. Anwendbarkeit der HPTLC bei Ökogeographischen Studien	57
6. Zusammenfassung.....	58
7. Summary.....	59
8. Literaturverzeichnis.....	60
9. Abbildungsverzeichnis	62
10. Tabellenverzeichnis.....	65
11. Anhänge.....	66
11.1. Untersuchungsmaterial: Herkunft und Daten.....	66
11.2. Vergleichsmaterial: Herkunft und Daten	67
11.3. HPTLC – Detektionsreagentien und –Verfahren laut Camag.....	68
11.4. HPTLC – Fließmittel und Detektionsverfahren	
laut (abgewandelter) Arzneibuchmethode	68
11.5. HPTLC – Arbeitsprotokoll für <i>Urtica dioica</i> L.	69
11.6. HPTLC – Arbeitsprotokoll für <i>Rubus idaeus</i> L.	70
11.7. Formel zur Berechnung der ppm-normierten Werte	71
11.8. Formel zur Berechnung der vektornormierten Werte.....	71
11.9. Formel zur Berechnung des Variationskoeffizienten	71
12. Curriculum vitae	72

Verwendete Abkürzungen

- Verfahren

IR Infrarotspektroskopie

HPTLC High-Performance Thin-Layer Chromatography

DC Dünnschichtchromatographie bzw. Dünnschichtchromatogramm

- Substanzen

DCM Dichlormethan

MeOH Methanol

LM Lösungsmittel, eigens hergestellt aus Methanol, Dichlormethan und Wasser im
Verhältnis 40:50:10

- Einheiten

Hz Hertz

1. Einleitung

1.1. Ökogeographie

Die Ökogeographie beschäftigt sich mit diversen Faktoren am Standort einer Pflanze, welche einen Einfluss auf die Verbreitung und Entwicklung dieses Individuums ausüben.

Beispiele für entsprechende ökogeographische Einflussfaktoren sind generelle Umweltfaktoren, wie Wetter, Temperatur oder Luftfeuchtigkeit, sowie Höhenlage, Nord- bzw. Südlage und die Bodenbeschaffenheiten und –Zusammensetzung. Auch Herbivoren bzw. Nützlinge in direkter Umgebung des Standortes können einen ökogeographischen Einfluss auf die Pflanze haben, da diese folglich “Schutzstoffe” oder “Lockstoffe” produziert.

Es wurden bereits zahlreiche Ökogeographische Studien durchgeführt, ein Beispiel ist die Untersuchung der Cyanogenese bei *Trifolium repens* L. (Daday, 1954).

In den frühen 1950er Jahren wurde eine Studie durchgeführt, welche den HCN-Gehalt von *Trifolium repens* L. Populationen in Europa untersucht hatte. Man beobachtete tatsächlich starke Unterschiede zwischen Populationen im Süden bzw. Südwesten und im Nordosten Europas. Auch in Abhängigkeit von der Höhenlage ließen sich deutliche Unterschiede feststellen. Die Studie ergab, dass im Süden und Südwesten Europas, sowie in ca. 580m Seehöhe in den Alpen die HCN-positiven Individuen innerhalb der Population überwiegen, wobei im Nordosten Europas sowie in einer Höhenlage von 1950m vor allem HCN-freie Individuen vorkommen.

Als Ursache für dieses Phänomen gibt es verschiedene Theorien. Auch in späteren Studien, welche an die oben genannte anknüpfen, wurde versucht die Einflussfaktoren zu finden. Unter anderem wurden Herbivoren, Temperaturunterschiede und Feuchtigkeitsangebot als mögliche Ursache in den Vordergrund gestellt, wobei sich fast alle Studien darüber einig sind, dass unterschiedliche Inhaltsstoffspektren meist auf eine komplexe Mischung verschiedenster Faktoren zurückzuführen sind (Bohm 2009, S.25-28).

Ergänzend ist zu erwähnen, dass auch Veränderungen auf genetischer Ebene Einfluss auf die Verbreitung und vor allem die Entwicklung von Pflanzen haben können. Mit den im Rahmen meiner Arbeit angewendeten Methoden, konnte ich jedoch ausschließlich die Auswirkung ökogeographischer Einflussfaktoren behandeln, da für genetische Untersuchungen eine andere Methodik zu wählen ist.

1.2. *Urtica dioica* L., Urticaceae

Die große Brennnessel ist eine zweihäusige Pflanze, welche eine 60-120cm hohe Staude bildet, mit eiförmigen, zugespitzten Blättern mit grob gesägtem Rand, sowie Brenn- und Borstenhaaren. Die Blütenrispen sind länger als die benachbarten Blattstiele. Die männliche Pflanze besitzt zudem gelbliche Blüten, aufgrund der gelben Pollenkörner in den Antheren. Die Früchte sind Spitze eiförmige Nüsschen.

Die Pflanze kommt in Auwäldern, sowie feuchten und stickstoffreichen Unkrautfluren, in den gemäßigten Breiten der nördlichen Hemisphäre vor. (Schönfelder 2010, S.324, Wichtl 2009, S.679)

Laut Definition enthält die Droge *Urticae folium* (Brennnesselkraut) nach der Monographie im Europäischen Arzneibuch, die „getrockneten, ganzen oder geschnittenen Blätter von *Urtica dioica* L., *Urtica urens* L., oder einer Mischung beider Arten“ (EuAB 2011, S.1889-1671).

Die enthaltenen Inhaltsstoffe in *Urticae folium* sind zu 1% Flavonoide, d.h. Glycoside des Isorhamnetins, Kämpferols, Quercetins, (v.a. Rutin, Kämpferol-3-O-(6-O-rhamnosyl)glucosid und Isorhamnetin-3-O-glucosid), Phytosterole, v.a. β -Sitosterol und β -Sitosterol-3-O- β -D-glucosid, und Hydroxyzimtsäurederivate, v.a. Caffeoyläpfelsäure. Die Droge enthält sowohl eine relativ hohe Konzentration an Kaliumionen, als auch 1-5% teilweise wasserlösliche Silikate (Teuscher 2004, S.321).

1.3. *Rubus idaeus* L., Rosaceae

Die Himbeere ist ein 1-2m hoher Strauch, mit verholzten, zweijährigen Trieben, welche kurze Stacheln besitzen. Die Blätter sind meist 3- bis 5-zählig gefiedert und weisen auf der Unterseite eine weißfilzige, feine Behaarung auf. Die 5 weißen, ca. 5mm langen Kronblätter der Blüten sind etwas kürzer als die Kelchblätter, welche nach der Blüte zurückgeschlagen abstehen. Die Pflanze trägt rote Sammelfrüchte. (Wichtl 2009, S.579, Schönfelder 2010, S.58)

Laut Definition enthält die Droge *Rubi idaei folium* (Himbeerblätter) nach der Monographie im Deutschen Arzneimittelcodex die „im Frühjahr und Frühsommer gesammelten, getrockneten, ganzen oder geschnittenen Laubblätter von *Rubus idaeus* L. (Rosaceae).“ (DAC 2013, Monographie f. Himbeerblätter, S.1-5).

Die enthaltenen Inhaltsstoffe in *Rubi idaei folium* sind Gerbstoffe vom Gallus- und Ellagsäuretyp und Flavonoide (Kämpferol- und Quercetinglycoside). In geringen Mengen sind sowohl Ascorbinsäure, als auch wenig ätherisches Öl enthalten. (DAC, 2013).

1.4. *Plantago lanceolata* L., Plantaginaceae

Der Spitzwegerich ist eine weit verbreitete, ausdauernde Pflanze, deren Blätter in einer grundständigen Rosette wachsen. Die Blätter sind lineallanzettlich, mit 3-7 Parallelnerven. Die Blüte bildet eine 1-3cm lange walzliche Ähre, mit einem rippigen Stiel, welcher länger ist als die Blätter. Die Krone besitzt 4 bräunliche Zipfel, die Staubblätter sind gelblichweiß und abstehend (Wichtl 2009, S.514, Schönfelder 2010, S.336).

Laut Definition enthält die Droge *Plantaginis lanceolatae folium* (Spitzwegerichblätter) nach der Monographie im Europäischen Arzneibuch „die getrockneten, ganzen oder zerkleinerten Blätter und Blütenschäfte von *Plantago lanceolata* L.s.l.“ (EuAB 2011, S.1881-1882).

Die enthaltenen Inhaltsstoffe in *Plantaginis lanceolatae folium* sind Iridoide (v.a. Aucubin (1-4%) und Catalpol (1-2%)), sowie Schleimstoffe und mit Kaffeesäure veresterte Phenylethanoidglucoside (v.a. Verbascosid, 1,5-7%) (Teuscher 2004, S.186).

1.5. *Fragaria vesca* L., Rosaceae

Die Walderdbeere ist eine mehrjährige, niedrige, krautige Pflanze, welche lange oberirdische, sich bewurzelnde Ausläufer bildet. Die Blätter sind 3-zählig gefiedert, mit scharf gesägtem Rand. Die Blüte hat 5 weiße Kronblätter, die Krone ist 10-15mm breit, und die Blütenstiele sind angedrückt behaart. Die Pflanze bildet rote Scheinfrüchte, welche reif vom abstehenden Kelch leicht abfallen (Wichtl 2009, S.268, Schönfelder 2010, S. 60).

Laut Definition enthält die Droge *Fragariae folium* (Erdbeerblätter) nach der Monographie im Österreichischen Arzneibuch die „zur Blütezeit gesammelten, getrockneten Blätter von *Fragaria vesca* L., *Fragaria moschata* WESTON, *Fragaria viridis* WESTON, *Fragaria x ananassa* (WESTON) DUSCHESNE EX ROZIER [sowie Hybriden mit anderen *Fragaria*-Arten, lt. DAC] oder einer Mischung dieser Arten.“ (ÖAB 2014, S.279-282).

Die enthaltenen Inhaltsstoffe in *Fragariae folium* sind überwiegend Ellagitannine und vermutlich auch Agrimoniin. (Teuscher 2004, S.368)

2. Zielsetzung

Die ursprünglichen Ziele dieser Arbeit waren jene Frage zu klären, ob eine Variabilität der sekundären Inhaltsstoffe bei unseren gesammelten Individuen vorliegt, und inwiefern diese Variabilität auf ökogeographische Einflussfaktoren zurückzuführen ist. Um diese Fragestellung entsprechend einer wissenschaftlichen Qualitätsanforderung beantworten zu können, bräuchte man jedoch umfassenderes Probenmaterial und detailliert dokumentierte Standortangaben (inklusive Klima, Bodenbeschaffenheiten, z.B. mithilfe von Bodenproben und deren anschließender chemischen Analyse).

Daher ist die Zielsetzung für diese Diplomarbeit, die Etablierung und Validierung chemometrischer Methoden zur Durchführung ökogeographischer Studien, am Beispiel des vorliegenden Probenmaterials (*Urtica dioica* L., *Rubus idaeus* L., *Plantago lanceolata* L. und *Fragaria vesca* L.), mithilfe von Infrarotspektroskopie (IR), High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) und diversen computergestützten, rechnerischen Analyseverfahren.

3. Material und Methoden

3.1. Herkunft des verwendeten Pflanzenmaterials

Das Untersuchungsmaterial, insgesamt 208 Individuen, welche die Arten *Urtica dioica* L., *Rubus idaeus* L., *Plantago lanceolata* L. und *Fragaria vesca* L. umfassen, wurde in der Schweiz und in Österreich im Juli und August 2013 gesammelt. Die Individuen aus Österreich wurden am Hochkar (NÖ), am Kleinen Gölzer (NÖ), am Hochstaff (NÖ), in Payerbach (NÖ), auf der Rax (ST) und in Fuschel am See (S) gesammelt, jene aus der Schweiz am Furkapass und bei Mund. Von allen Individuen wurden Datum der Sammlung, Seehöhe, sowie die genauen GPS-Koordinaten des Standortes erfasst. Sie wurden an der Luft getrocknet und in einem Drogendepot des Pharmakognosie-Departments in offenen Papiersäckchen gelagert. Für alle Messungen und Analysen wurden ausschließlich die Blätter der gesammelten Individuen verwendet (*Anhang 11.1.*).

Zusätzlich wurde im Mai 2014 Vergleichsmaterial, von den Arten *Fragaria moschata* L., *Fragaria viridis* L., *Fragaria vesca* L., *Plantago lanceolata* L. und *Plantago altissima* L. gesammelt. Die Sammelorte befanden sich in Niederösterreich, bei Laab im Wald, am Hermannskogel, bei Maria Dreieichen, in Steinegg, bei Altenburg und in Salmansdorf in Wien. Weiters wurden wenige Individuen *Potentilla rupestris* L. (Rosaceae), ebenfalls in Steinegg, als Vergleichsmaterial gesammelt. Die Individuen wurden an der Luft in einem Drogendepot des Pharmakognosie-Departments getrocknet und in demselben Drogendepot in offenen Papiersäckchen gelagert (*Anhang 11.2.*).

Als weiteres Vergleichsmaterial dienten offizinelle Teedrogen von der Fa. Kottas Pharma. Es wurden je 100g von *Urticae folium*, *Rubi idaei folium*, *Plantaginis lanceolatae folium* und *Fragariae folium* eingekauft. Nach dem Öffnen der Originalverpackung wurden die Teedrogen in einem Drogendepot des Pharmakognosie-Departments in der Originalverpackung gelagert (*Anhang 11.2.*).

3.2. Aufarbeitung des verwendeten Pflanzenmaterials

Aufarbeitung für die IR-Messungen:

Für die Vermessung mittels IR wurden die Individuen nicht weiter aufgearbeitet. Es wurde lediglich ein getrocknetes Blatt pro Charge entnommen, und in den Infrarotspektrometer eingespannt. So wurden von jeder Charge jeweils zweimal die Blattunterseite und zweimal die Blattoberseite an jeweils verschiedenen Stellen desselben Blattes vermessen.

Aufarbeitung für die HPTLC:

Für die HPTLC-Messungen mussten Flüssigextrakte hergestellt werden. Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde zerkleinert und mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert. Die reinen Extrakte wurden auf die HPTLC-Platte aufgetragen, entwickelt und mittels Computersoftware vermessen.

Auf die Schritte der Aufarbeitung, sowie Details zu den Lösungsmitteln und den Verfahren wird in *Kapitel 3.4.* genauer eingegangen.

3.3. *Fragaria vesca* L.: Zuordnung und makroskopische Analyse des Pflanzenmaterials

Das Untersuchungsmaterial aus dem Jahr 2013, welches ursprünglich für die Versuche vorgesehen war, wurde im Juli und August gesammelt. Dies erschwerte eine genaue Identifikation der *Fragaria*-Arten, welche sich zu jener Zeit bereits über Blüte- und Fruchstadium hinaus entwickelt hatten.

Für diese Arbeit ist es jedoch essentiell, dass genau definierte Arten untersucht werden – in diesem Fall ausschließlich *Fragaria vesca* L. – da ein Grundpfeiler dieser Arbeit das Aufzeigen der Diversität innerhalb der angegebenen Arten mithilfe unterschiedlicher Verfahren ist. Es hätte lediglich die Ergebnisse verfälscht, wenn die Arten *Fragaria moschata* L. oder *Fragaria viridis* L. mitvermessen worden wären, da andere Arten vermutlich andere IR-Spektren oder andere Banden in der HPTLC hervorgebracht hätten. Somit läge kein ökogeographischer Einfluss auf die sekundären Inhaltsstoffe vor, sondern ein genetischer, welcher bei meiner Arbeit, wie bereits erwähnt, nicht miteinbezogen werden kann.

Daher wurde im Mai 2014 Vergleichsmaterial gesammelt, und noch im frischen, blühenden bzw. fruchtenden Stadium makroskopisch identifiziert. Die Pflanzen waren in einem sehr guten Zustand, viele mit Ausläufern und zum Teil auch mit Wurzeln. Basierend auf Literatur zu dem Thema ließ sich folgende Tabelle (*Tabelle 1*) mit den wichtigsten Merkmalen zur Unterscheidung der Arten erstellen:

Tabelle 1: Makroskopische Unterschiede bei der Gattung *Fragaria*

<i>Fragaria vesca</i> L.	<i>Fragaria moschata</i> L.	<i>Fragaria viridis</i> L.
Diploid	Hexaploid	Diploid
Blüte zweigeschlechtig	Blüte eingeschlechtig	Blüte zweigeschlechtig
Stängelbehaarung aufwärts (angedrückt)	Stängel und Blattstiele lang, abstehend bis rückwärtsabstehend behaart	Blattstiele lang, waagrecht abstehend behaart
Seitliche Teilblätter +/- ungestielt	Seitliche Teilblätter kurz gestielt	Seitliche Teilblätter +/- ungestielt
Endzahn des mittleren Teilblattes gleich geformt wie die anderen Zähne	Endzahn des mittleren Teilblattes länglich und schmaler als die anderen Zähne	Endzahn des mittleren Teilblattes kürzer als die anderen Zähne, und Nachbarzähne sind sichelförmig zum Endzahn hingebogen
Ausläufer sympodial	Ausläufer sympodial	Ausläufer monopodial
Blütendurchmesser 10 – 16(19) mm	Blütendurchmesser (15)17 – 29 mm	Blütendurchmesser 15 – 23(25) mm
	Kelchblätter (von der Frucht) waagrecht abstehend	Kelchblätter an die Frucht anliegend

(Eggenberg 2009, S.438+439; Fischer 2008, S.486+487)

Anhand dieser Daten konnte das Vergleichsmaterial eindeutig zugeordnet werden, und wurde anschließend an der Luft in einem Drogendepot des Pharmakognosie-Departments getrocknet und in offenen Papiersäckchen gelagert. Einzelne Individuen wurden herbarisiert (d.h. gepresst, bei 40°C 2 Tage im Trockenschrank aufbewahrt und anschließend ebenfalls im Drogendepot der Pharmakognosie-Departments gelagert).

Wie man in der *Tabelle 1* erkennen kann, beziehen sich die meisten Identifizierungsmerkmale auf die Blüten, Früchte und Ausläufer der Pflanzen. Das Probenmaterial ist jedoch, wie bereits erwähnt, nicht im Blüte- bzw. Fruchtstadium gesammelt worden und blieb daher selbst mit Zuhilfenahme dieser Tabelle im getrockneten Zustand unidentifizierbar (*Abbildung 1*).



Abbildung 1: Beispiel für ein Individuum des Probenmaterials

Selbst mithilfe der oben erwähnten Tabelle sind die Grenzen zwischen den Arten und den typischen Merkmalen fließend. Zum Beispiel kann das laut *Tabelle 1* ungestielte Blatt der *Fragaria vesca* L. auch leicht gestielt sein und der Endzahn weist in der Realität bei *Fragaria vesca* L. und *Fragaria moschata* L. ebenfalls keine eindeutigen Unterschiede auf (*Abbildung 2*).



Abbildung 2: Blatt von *Fragaria vesca* L., *Fragaria moschata* L., *Fragaria viridis* L. (von links nach rechts), aus dem gepressten Vergleichsmaterial

Das Vergleichsmaterial ließ sich anhand der Vielzahl an auffindbaren Merkmalen dennoch genau identifizieren, da wenn z.B. die Blätter nicht eindeutig gestielt waren, man zur Identifizierung auf Blüten, Frucht und Ausläufer ausweichen konnte.

Bei dem Probenmaterial war diese Möglichkeit leider nicht gegeben, daher lässt sich zusammenfassend sagen, dass das Probenmaterial makroskopisch definitiv nicht unterschieden werden konnte.

Daher wurden andere Methoden gesucht um diese Unterscheidung zu ermöglichen. Schließlich wurden das getrocknete Vergleichsmaterial, sowie das getrocknete Probenmaterial mittels Infrarotspektroskopie vermessen und computergestützte Analysen durchgeführt (siehe *Kapitel 3.4.2. und 4.1.1.*).

3.4. Infrarotspektroskopie

3.4.1. Einführung und Vorstellung der verwendeten Geräte

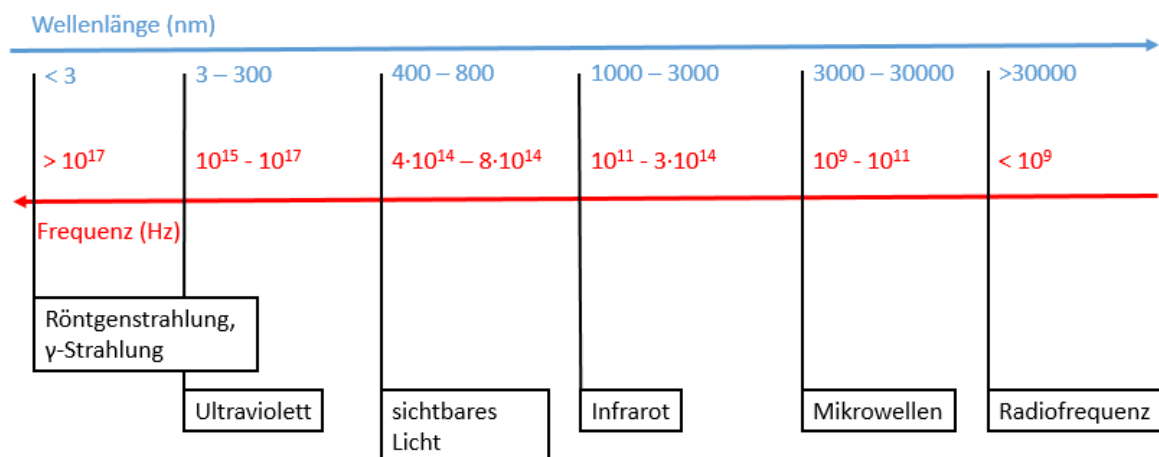


Abbildung 3: Das elektromagnetische Spektrum

Bei der Infrarotspektroskopie wird durch Anregung eines Moleküls in einem Wellenlängenbereich (λ) zwischen 400 – 4000 nm eine Frequenz erzeugt, welche sich proportional zur Energie der Schwingung verhält und als Wellenzahl ($\tilde{\nu} = 1/\lambda$) dargestellt wird. Dieser Wellenlängenbereich ist vor allem in der Organischen Chemie von Bedeutung (Abbildung 3).

Das Grundprinzip hinter dieser Messmethode ist, dass sich Atome als harmonische Oszillatoren verhalten, d.h. die interatomaren Bindungen gleichen einer elastischen Feder, welche durch Anregung mittels Infrarotstrahlung die Bindungslänge oder den Bindungswinkel ändern können. Je stärker diese Bindung zwischen den Atomen ist, umso höher ist die Frequenz der entstandenen Schwingung. Dies lässt sich am Beispiel von Kohlenstoff-Kohlenstoff Einfach-, Doppel- und Dreifachbindungen veranschaulichen: Die gemessene Frequenz ($\tilde{\nu}$) bei Alkanen beträgt 1000 cm^{-1} , bei Alkenen 1640 cm^{-1} und bei Alkinen 2200 cm^{-1} , d.h. sie steigt proportional zur Bindungsstärke an¹.

Mit einem Infrarotspektrometer lassen sich Proben in der Gasphase, in Lösung und als Feststoffe vermessen. Das Spektrum spiegelt die molekulare Zusammensetzung der Probenoberfläche wieder, da die anregende Strahlung nur minimal in die Probe eindringt.

Das Gerät an dem die Messungen vorgenommen wurden, ist ein Tensor 27 FT-IR der Fa. Bruker, mit der Software OPUS 5.0. Dieses ist ein Fourier-Transform-IR-Spektrometer welches gleichzeitig alle Frequenzen des IR-Spektrums vermisst, und die Dauer der Messung somit stark verkürzt wird. Die Software erstellt ein entsprechendes IR-Spektrum, dessen x-Achse die Wellenzahl (cm^{-1}) und die y-Achse die Durchlässigkeit (%) darstellt.

Mit diesem Gerät werden an unserem Institut vor allem Feststoffe vermessen, hauptsächlich in kristalliner Form, bzw. bei pflanzlichem Material als pulverisierte Droge².

3.4.2. Arbeitsvorgang

Der Ansatz, dass ganze getrocknete Blätter im Infrarotspektrometer vermessen werden, wurde bereits in vorherigen Studien mit gutem Erfolg ausprobiert. Z.B. wurde an der Fakultät der Universität von Ljubljana, Slovenien versucht, durch die Vermessung ganzer Blattstücke im IR und anschließender Diskriminanzanalyse der Daten, Herbarbeläge von *Epilobium*-Arten zu identifizieren (Krajšek S.S., 2008).

Für die Infrarotspektroskopie war keine aufwendige Probenvorbereitung notwendig. Das gesamte Untersuchungsmaterial wurde, wie oben beschrieben, getrocknet und in Papiersäckchen aufbewahrt. Vor jeder Vermessung einer neuen Charge wurde ein Hintergrundspektrum (im leeren Gerät) aufgenommen.

Anschließend wurde von jedem Individuum ein Blatt entnommen und dessen Oberseite und Unterseite je zweimal vermessen. Hierfür wurde lediglich das Blatt in den Infrarotspektrometer eingeklemmt (Abbildung 4). Die Spektren wurden als Datenpunkttabelle gespeichert, anschließend

vektornormiert und diese normierten Spektren erneut als Datenpunkttabelle gespeichert.

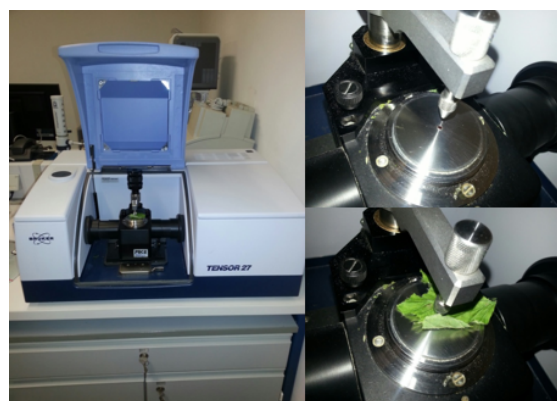


Abbildung 4: Vermessung der Proben im IR

Das Vergleichsmaterial wurde auf dieselbe Weise vorbereitet und vermessen. Mithilfe dieser Daten konnte eine genauere Analyse der *Fragaria*-Arten durchgeführt werden (siehe Kapitel 4.1.1.).

3.5. HPTLC

HPTLC steht für High-Performance Thin-Layer Chromatography, auf Deutsch Hochleistungsdünnschichtchromatographie.

3.5.1. Einführung und Vorstellung der verwendeten Geräte

Das Grundprinzip der HPTLC ist jenes einer gewöhnlichen Dünnschichtchromatographie (DC).

Die Stationäre Phase ist eine Beschichtung auf einem innerten Material, in diesem Fall Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Glas. Kieselgel hat an der Oberfläche freie Hydroxygruppen und ermöglicht dadurch eine Wechselwirkung mit, bzw. Absorption von polaren Substanzen.

Die mobile Phase ist ein Fließmittelgemisch, das in erster Linie darauf abgestimmt ist, welche Komponenten im Chromatogramm dargestellt werden sollen. Dabei richtet sie sich hauptsächlich nach der Polarität des Lösungsmittels. Auf die genauen Zusammenhänge und Lösungsmittleigenschaften wird in *Kapitel 3.5.3.* eingegangen.

Die Proben müssen in gelöster Form vorliegen, d.h. es dürfen ausschließlich klare Lösungen (Extrakte, Tinkturen,...) aufgetragen werden.

Die Serie an Geräten welche mir für meine Untersuchungen zur Verfügung standen ist von der Fa. Camag.

Mittels der Software VisionCATS lässt sich jede Vorgabe für das Auftragen und Vermessen der Proben einstellen.

Der Autosampler trägt die flüssige Probe auf. Für alle Messungen wurde für das Auftragen ein Sprühverfahren verwendet, wobei je 2,0µl der Probe bandenförmig aufgetragen wurden.

Anschließend wird die Platte entwickelt. Dies erfolgt im Anschluss an eine Kammersättigung, welche den Zweck erfüllt, dass der Dampfraum in der Entwicklungskammer mit dem Fließmittelgemisch aufgesättigt wird und somit optimale Bedingungen für eine gleichmäßige Entwicklung der Platte geschaffen werden.

Zur Derivatisierung der Platte wird das Derivatisierungsreagenz in den Trog der Tauchapparatur gefüllt. Für die Derivatisierung wurden alle Platten mit höchster Geschwindigkeit und mit der kürzest möglichen Zeiteinstellung eingetaucht, damit diese Methode mit dem bevorzugt verwendeten Sprühverfahren vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Der Visualizer nimmt Bilder von den Platten bei den Wellenlängen 366nm und 254nm im UV-Bereich, sowie bei Tageslicht auf und macht diese sofort im Programm VisionCATS

sichtbar. Hier können die Aufnahmen bearbeitet, und die Spektren der Proben als Datenpunkt-tabelle für weitere Quantifikation gespeichert werden (Abbildung 5).



Abbildung 5: HPTLC-Geräte und Software von der Firma Camag³

Das Ziel und gleichzeitig der Vorteil dieser Methode sind, dass durch die Automatisierung des Verfahrens mithilfe dieser Geräte wiederholbar gleichmäßig aussehende DCs hergestellt werden können. Dies ermöglicht im Optimalfall einen Vergleich der Platten miteinander, der vor allem auf dem Gebiet der Quantifizierung einen großen Fortschritt im Vergleich zu manuellen DCs bedeuten würde.

3.5.2. Arbeitsvorgang

Der geplante Arbeitsvorgang war das getrocknete Probenmaterial zu zerkleinern, dieses Drogenpulver zu extrahieren und die Extrakte mittels HPTLC zu vermessen. Es wurden mehrere Ansätze und Verfahren ausprobiert, mit dem Ziel möglichst viele Banden im Chromatogramm darstellen zu können, um eine vorhandene Variabilität sekundärer Inhaltsstoffe auffindbar zu machen.

3.5.3. Methodenfindung

Für die Methodenfindung wurde das Vergleichsmaterial verwendet, d.h. die Teedrogen *Urticae folium*, *Rubi idaei folium*, *Plantaginis lanceolatae folium* und *Fragariae folium*, sowie die am 9.5.2014 am Hermannskogel gesammelte *Fragaria vesca* L. . Von diesen 5 Proben wurden je 10g auf eine Siebgröße 1,5 zerkleinert.

Fragestellung 1: Welches ist das am besten geeignete Lösungsmittel (Extraktionsmittel) um eine höchst mögliche Variabilität sekundärer Inhaltsstoffe in der HPTLC darstellen zu können?

Aus vorherigen Messungen in unserer Arbeitsgruppe ist hervorgegangen, dass eine Mischung von Methanol, Dichlormethan und Wasser im Verhältnis 40:50:10, (des Weiteren als

„LM“ bezeichnet), für viele Pflanzensysteme optimal geeignet ist, um eine große Vielfalt an Inhaltsstoffen darstellen zu können.

Dies beruht auf den jeweiligen chemischen Eigenschaften der Lösungsmittelkomponenten. Wenn man die elutrope Reihe betrachtet, eine Auflistung der Lösungsmittel nach ihrer Fähigkeit Substanzen von der stationären Phase zu lösen und diese in Laufrichtung zu transportieren, unterscheiden sich diese Komponenten erheblich voneinander (Tabelle 2). Die „Solvent strength“ (Lösungsmittelstärke) ist umso höher je geringer die Retention und je höher der R_F -Wert der Substanz ist.

Tabelle 2: Elutrope Reihe der reinen Lösungsmittel auf Kieselgel

Lösungsmittel	Lösungsmittelstärke ϵ°	Polaritätsindex P'
Dichlormethan	0,32	3,1
Methanol	0,70-0,73	5,1
Wasser		10,2

Je nach Mischungsverhältnis dieser reinen Lösungsmittel miteinander lassen sich andere Lösungsmittelstärken erzielen. Z.B. erreicht die Lösungsmittelstärke von Methanol in Dichlormethan je nach Mischungsverhältnis einen Wert zwischen 0,32-0,73. Das heißt in unserem Fall, dass wir durch die Beimischung von Methanol zu Dichlormethan höhere Lösungsmittelstärken erreichen können als mit Dichlormethan alleine.

Die Polarität ist ein Indiz dafür, auf welche funktionellen Gruppen das jeweilige Lösungsmittel selektiv wirkt. Je höher der Polaritätsindex ist, desto polarer ist das Lösungsmittel und desto stärker ist die Anziehung zu apolaren bzw. die Abstoßung von polaren Substanzen.

(Reich, Schibli 2007, S.49-52)

Für diesen Versuch wurde je 1g Drogenpulver in Falcon Tubes zu 3 Ansätzen mit je 10ml Dichlormethan (weilers als „DCM“ bezeichnet), 10ml Methanol (weilers als „MeOH“ bezeichnet) und 10ml LM versetzt und 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde bei 1500 U/min 10 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und über Watte in HPTLC-Vials transferiert. Die Extrakte wurden bis zur Vermessung im Kühlschrank gelagert.

Alle HPTLC-Entwicklungen wurden auf, auf 10cm x 20cm Größe zugeschnittenen Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Fertigplatten der Firma Merck, durchgeführt.

a) *Methodenscreening nach Camag*

Die ersten Versuche zur Auswahl des Fließmittels erfolgten nach Vorgabe der Fa. Camag, aus dem Buch „High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medical Plants“ von Reich E. und Schibli A. Hier wird ein Screening vorgeschlagen um das passende Fließmittel, in Abhängigkeit davon welche Komponenten man eluieren möchte, ausfindig zu machen.

Dafür wurden 5 Fließmittelsysteme, mit auf diese abgestimmten Detektionsmethoden ausprobiert (*Tabelle 4*). (Detektionsreagentien und –Verfahren siehe *Anhang 11.3.*).

Tabelle 4: Methodenscreening

Komponenten	Fließmittel	Detektion
Apolare Komponenten und ätherische Öle	Toluol, Ethylacetat (95:5)	Anisaldehyd-Reagens
Saponine und Lignane	Chloroform, Methanol, Wasser (70:30:4)	Anisaldehyd-Reagens
Flavonoide	Ethylacetat, konzentrierte Essigsäure, konzentrierte Ameisensäure, Wasser (100:11:11:27)	Naturstoff-Reagens
Aminosäuren	Acetonitril, Wasser, konzentrierte Ameisensäure (30:8:2)	Ninhydrin-Reagens
Polare Komponenten	1-Butanol, konzentrierte Essigsäure, Wasser (7:1:2)	Anisaldehyd-Reagens

b) Arzneibuchmethoden

Der zweite Ansatz war, die Proben nach (leicht abgewandelten) Arzneibuchmethoden zu Analysieren. Die Analyse lief wie folgt ab:

1. Urtica dioica L.

Es wurden stichprobenartig 6 Individuen des Untersuchungsmaterials, sowie die Teedroge *Urticae folium* ausgewählt. Die Vorschrift zur Dünnschichtchromatographie laut Europäischem Arzneibuch (2011) wurde wie folgt abgeändert:

Je 150mg mithilfe einer Reibschale zerkleinertes Untersuchungsmaterial wurden einmal mit 1,2ml Methanol und einmal mit 1,2ml LM versetzt und in Falcon Tubes (*Abbildung 6*) 10 Minuten lang im Ultraschallbad extrahiert. Diese Extrakte wurden anschließend bei 1500 U/min 10 Minuten lang abzentrifugiert, in HPTLC-Vials umpipetiert und mittels HPTLC vermessen (Fließmittel und Detektionsverfahren siehe *Anhang 11.4.*). Als Referenzlösung wurde ca. 1mg Chlorogensäure in 10ml Methanol gelöst.

Zuvor wurde ein Ansatz mit derselben Einwaage desselben Untersuchungsmaterials ausprobiert, bei dem das Material mit einer Kaffeemühle zerkleinert und die Extraktion in DeepWell Platten durchgeführt wurde (*Abbildung 6*). Anschließend wurde bei 4400U/min 10 Minuten lang abzentrifugiert. Diese Art der Extraktion war einerseits problematisch, da die Kaffeemühle das Untersuchungsmaterial nicht gleichmäßig zerkleinern konnte. Andererseits ist die Platte im Ultraschallbad in der Mitte leicht eingeschmolzen, wo zwar kein Extrakt in den Wells enthalten war, aber sich die Ursache für diese Störung zu diesem Zeitpunkt nicht eruieren ließ.

Nach vielen weiteren Versuchen mit Falcon Tubes lässt sich retrospektiv sagen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit lediglich das verwendete Ultraschallbad dazu neigt, die Plastikbehälter in welchen extrahiert wird über den Schmelzpunkt hinaus zu erhitzen, wenn nicht bis zum äußersten Maximum Wasser in den Trog eingefüllt wird. Diese Fehlerquelle wurde im Laufe der Arbeit relativ rasch behoben, zu Beginn dahingehend, dass in Falcon Tubes extrahiert wurde, welche weniger störanfällig sind, und fortlaufend durch regelmäßiges Reinigen und optimales Befüllen des Ultraschallbades.

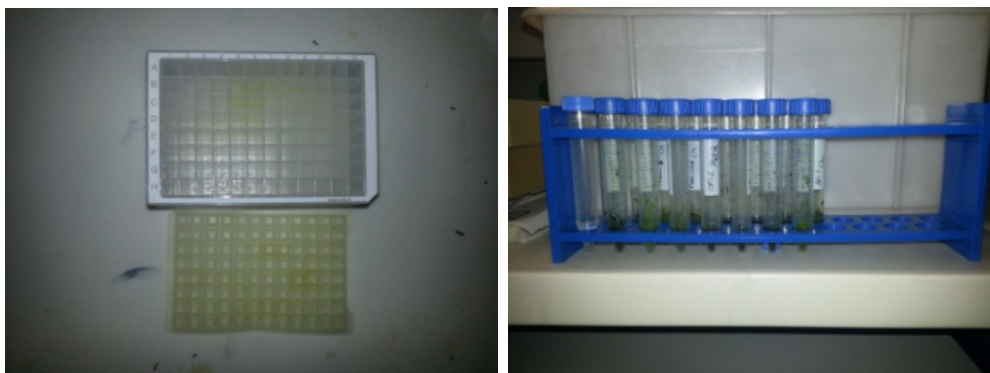


Abbildung 6: DeepWell Platte (links) und Falcon Tubes (rechts)

2. *Rubus idaeus* L.

Es wurden stichprobenartig 6 Individuen des Untersuchungsmaterials, sowie die Teedroge *Rubi idaei folium* ausgewählt. Die Vorschrift zur Dünnschichtchromatographie laut Deutschem Arzneimittelcodex (2007) wurde wie folgt abgeändert:

Je 150mg mithilfe einer Reibschale zerkleinertes Untersuchungsmaterial wurden einmal mit 1,2ml Methanol und einmal mit 1,2ml LM versetzt und in Falcon Tubes 10 Minuten lang im Ultraschallbad extrahiert. Diese Extrakte wurden anschließend bei 1500 U/min 10 Minuten lang abzentrifugiert, über Watte filtriert, in HPTLC-Vials umpipettiert und mittels HPTLC vermessen (Fließmittel und Detektionsverfahren siehe *Anhang 11.4.*). Als Referenzlösung wurde ca. 3mg Hyperosid *R* und ca. 1mg Kaffeesäure *R* in 10ml Methanol gelöst.

3. *Plantago lanceolata* L.

Es wurden stichprobenartig 6 Individuen des Untersuchungsmaterials, sowie die Teedroge *Plantaginis lanceolatae folium* ausgewählt. Die Vorschrift zur Dünnschichtchromatographie laut Europäischem Arzneibuch (2011) wurde wie folgt abgeändert:

Je 150mg mithilfe einer Reibschale zerkleinertes Untersuchungsmaterial wurden einmal mit 1,2ml Methanol und einmal mit 1,2ml LM versetzt und in Falcon Tubes 10 Minuten lang im Ultraschallbad extrahiert. Diese Extrakte wurden anschließend über Watte filtriert, in HPTLC-Vials umpipettiert und mittels HPTLC vermessen (Fließmittel und Detektionsverfahren siehe *Anhang 11.4.*). Bei diesem Ansatz wurde ohne Referenzsubstanz entwickelt.

3.5.4. Verwendungsoptimierte Analysemethoden

Das Ziel dieser Versuche mittels HPTLC war, jene Methode zu finden, mit welcher möglichst viele Banden, und somit Inhaltsstoffe bei den verschiedenen Pflanzensystemen sichtbar gemacht werden können. Das heißt dieser erste Schritt ist eine Analyse auf qualitativer Ebene, mit dem Ziel eine Methode zu entwickeln, welche anschließend als Grundlage für die Durchführung ökogeographischer Studien herangezogen werden kann.

Es lässt sich kollektiv für alle Systeme sagen, dass das LM (DCM/MeOH/Wasser 50:40:10) bei jeder Screening-Methode mit Abstand die besten Ergebnisse erzielen konnte, dahingehend, dass deutlich mehr Banden sichtbar gemacht, und somit mehr Inhaltsstoffe extrahiert werden konnten. Mit reinem Dichlormethan hingegen ließen sich deutlich weniger Inhaltsstoffe extrahieren, daher konnte es als Lösungsmittel für weitere Versuche ausgeschlossen werden (*Abbildung 7*). Auf den nachfolgenden Bildern (*Abbildung 8-12*) sind somit jeweils der Extrakt mit reinem Methanol und jener mit dem LM vertreten.

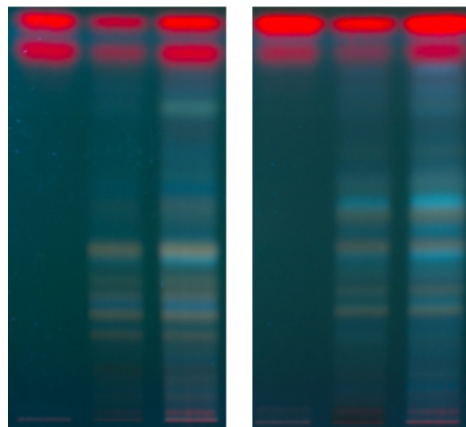


Abbildung 7: von links nach rechts: Folium Fragaria extrahiert mit DCM, MeOH, LM; Folium Rubi idaei extrahiert mit DCM, MeOH, LM; Entwicklung mittels Flavonoid-Methode

Die Screening-Methode auf polare Komponenten konnte ebenfalls nicht in die engere Auswahl aufgenommen werden, da die Platte, obwohl zwei Versuche gemacht wurden, beide Male nicht auswertbar war. Ursache für die verschwommenen, sehr unklaren Banden, könnte möglicherweise sein, dass das vorgeschlagene Fließmittelgemisch sich nicht homogen mischen ließ, sondern sich trotz Herstellung nach Vorschrift entmischt und Phasen gebildet hatte.

Anhand der Resultate des Methodenscreenings und der Arzneibuch basierten Analysen, haben sich folgende Analysemethoden für die 4 Pflanzensysteme etabliert.

1.) *Urtica dioica* L.

Bei diesem System haben sich die Arzneibuch- sowie die Flavonoid-Methode als optimal erwiesen (Abbildung 8). Für weitere Versuche habe ich die Arzneibuch-Methode ausgewählt (Arbeitsprotokoll siehe Anhang 11.5.).

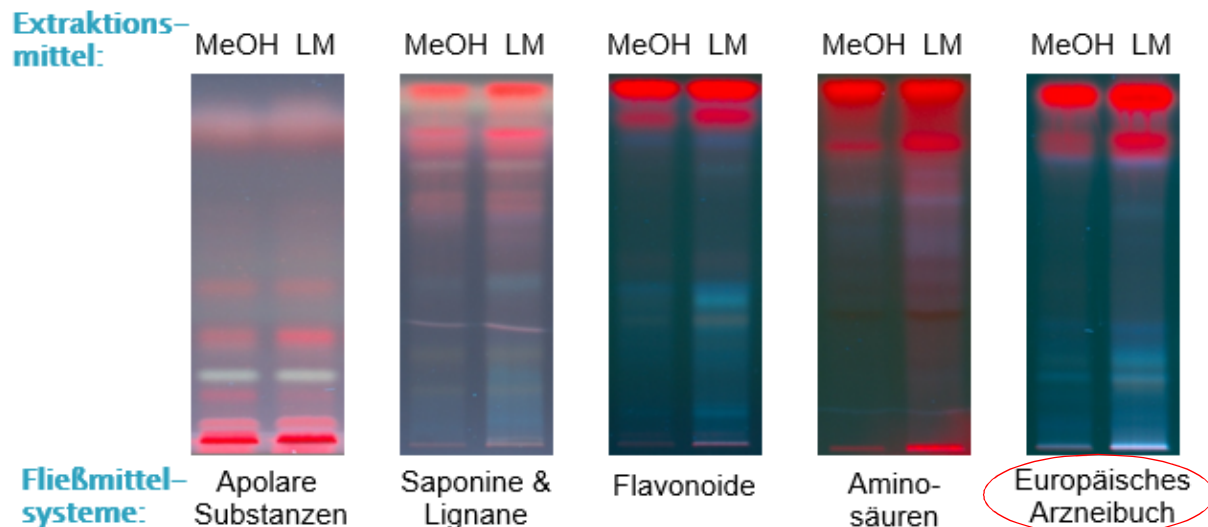


Abbildung 8: Methoden Screening nach Camag und Arzneibuch mit Urticae folium, Postderivatized UV366

2.) *Rubus idaeus* L.

Bei diesem System haben sich die Arzneibuch- sowie die Flavonoid-Methode als optimal erwiesen (Abbildung 9). Für weitere Versuche habe ich die Flavonoid-Methode ausgewählt (Arbeitsprotokoll siehe, Anhang 11.6.).

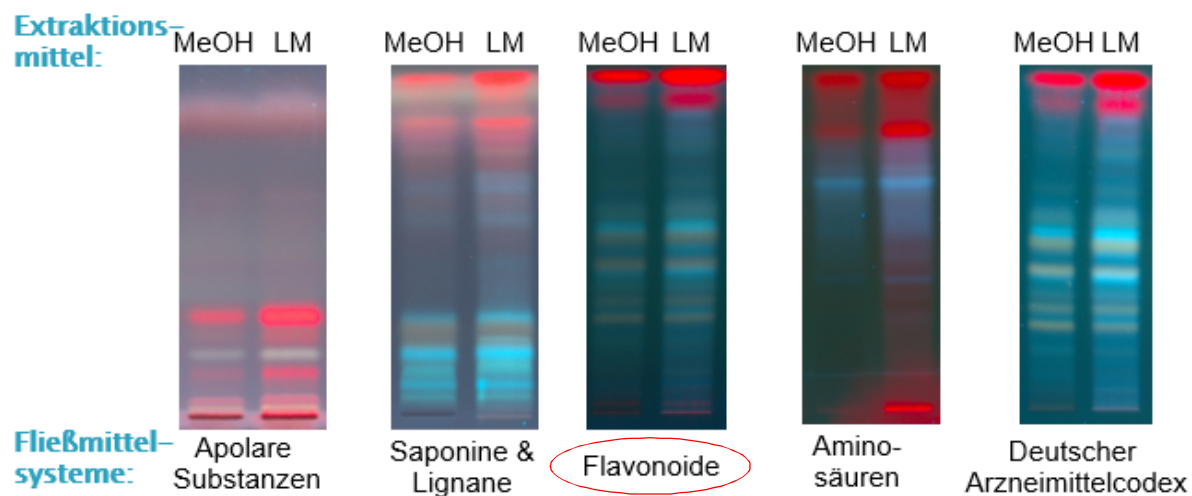


Abbildung 9: Methoden Screening nach Camag und Arzneibuch mit Rubi idaei folium, Postderivatized UV366

3.) *Plantago lanceolata* L.

Bei diesem System hat sich die Methode für Saponine und Lignane als optimal erwiesen (Abbildung 10). Es wurden zwar keine weiteren Versuche mit dem Untersuchungsmaterial *Plantago lanceolata* L. gemacht, ich würde aber für weitere Versuche diese Methode vorschlagen.

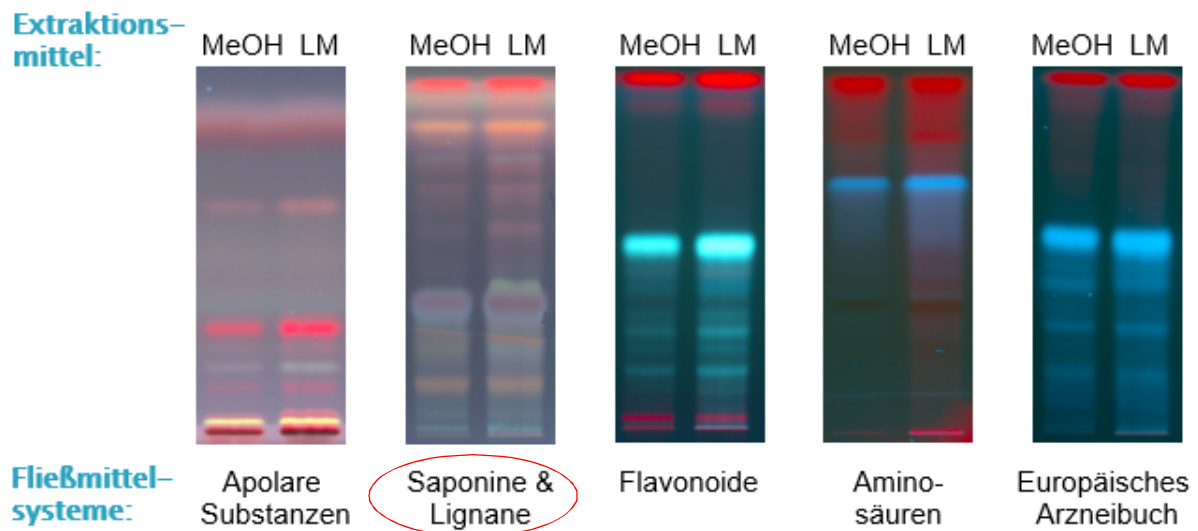


Abbildung 10: Methoden Screening nach Camag und Arzneibuch mit *Plantaginis lanceolatae folium*, Postderivatized UV366

4.) *Fragaria vesca* L.

Wie oben erwähnt, wurden bei dem Methoden Screening *Fragariae folium* sowie eine Charge von *Fragaria vesca* L. untersucht. Dabei ließ sich zum ersten Mal feststellen, was sich auch bei späteren Versuchen nur bestätigte, dass die Inhaltsstoffe in dem gesammelten (Vergleichs-)material weitaus mehr und intensivere Banden geben als jene in der Teedroge. Es lässt sich hier bereits mit freiem Auge erkennen, wie signifikant dieser Unterschied ist.

Bei diesem System hat sich die Methode für Flavonoide als optimal erwiesen (Abbildung 11+12). Es wurden zwar keine weiteren Versuche mit dem Untersuchungsmaterial *Fragaria* sp. gemacht, ich würde aber für weitere Versuche diese Methode vorschlagen.

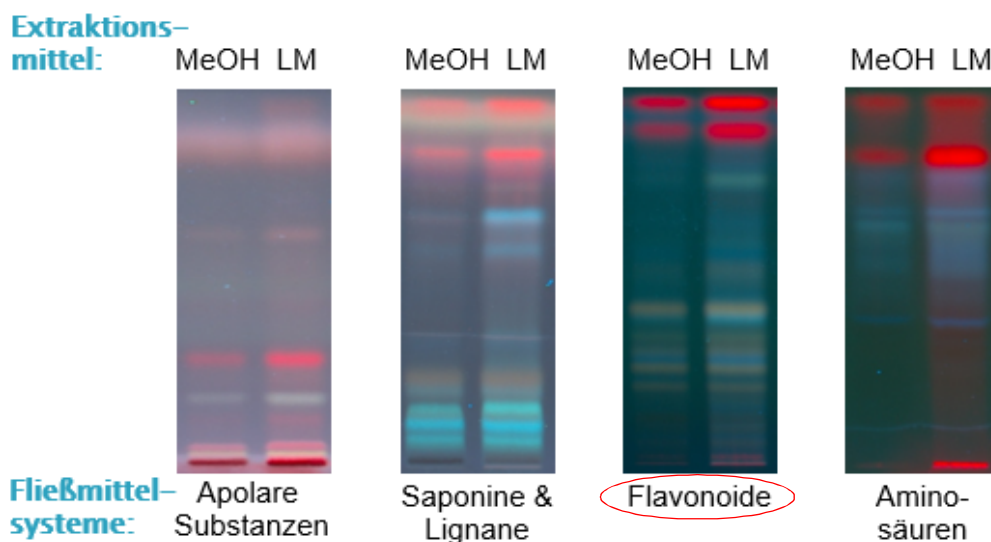


Abbildung 11: Methoden Screening nach Camag mit *Fragariae folium*, Postderivatized UV366

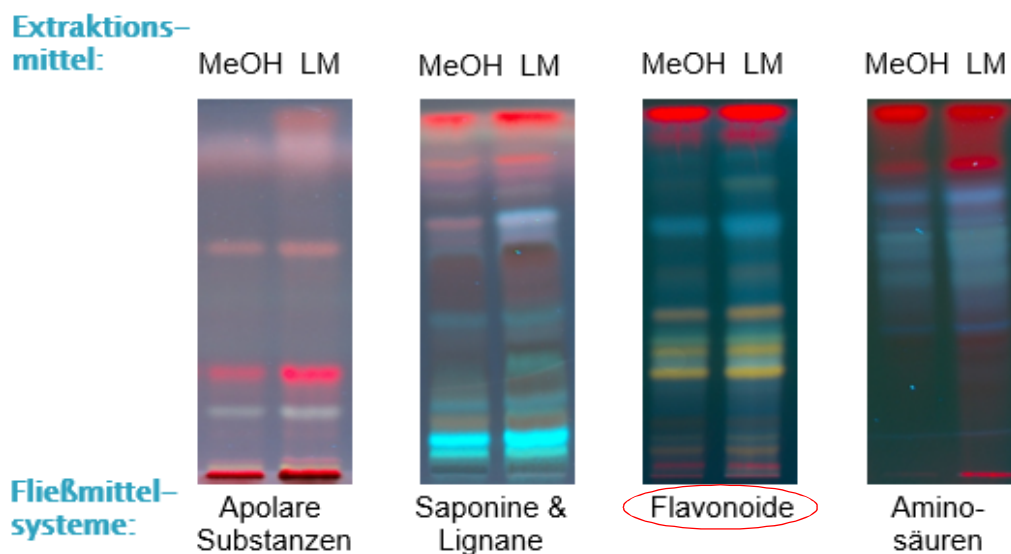


Abbildung 12: Methoden Screening nach Camag mit *Fragaria vesca* L.

4. Ergebnisse

4.1. Infrarotspektroskopie

Wie bereits in *Kapitel 3.4.2.* erwähnt, wurden die Spektren mittels Software vektornormiert und die normierten Spektren als Datenpunkttabelle gespeichert.

Eine einfache Möglichkeit diese Rohdaten zu veranschaulichen, ist die erhaltenen Werte der untersuchten Individuen in Gruppen aufzuteilen. Z.B. bietet es sich an, die Vermessung ganzer Blätter, wie in diesem Fall, in Ober- und Unterseite zu gruppieren.

Dies lässt sich am Beispiel des Untersuchungsmaterials von *Urtica dioica* L. veranschaulichen. Es wurden insgesamt 49 Individuen von *Urtica dioica* L. vermessen, jeweils zweimal an der Ober- und Unterseite. Somit erhält man 196 Spektren. Diese wurden auf je 98 Spektren von Ober- und Unterseite aufgeteilt. Jeder Wellenzahl des Spektrums wurde ein Mittelwert aller Werte der Durchlässigkeit dieser 98 Messungen zugeordnet (*Abbildung 13*).

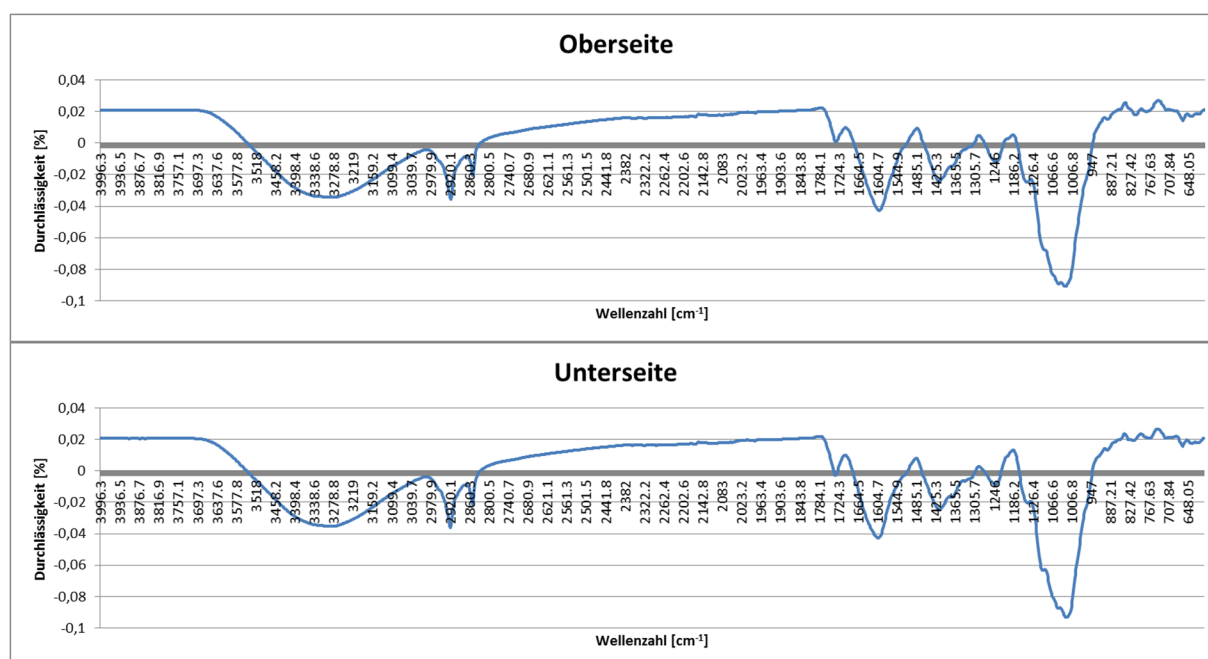


Abbildung 13: Mittelwert der Spektren von 49 Individuen des Untersuchungsmaterials von *Urtica dioica* L.

Zwar bietet diese Methode keine Informationen darüber ob Variabilitäten im sekundären Inhaltsstoffspektrum der Proben vorliegen, da die Individuen hierbei nicht einzeln differenziert werden. Dennoch lassen sich, falls vorhanden, markante Unterschiede zwischen, in diesem Fall, Ober- und Unterseite feststellen.

Bei dem Untersuchungsmaterial von *Urtica dioica* L. lassen sich keine ausschlaggebenden Unterschiede feststellen.

Im Vergleich dazu, sind bei den, nach demselben Schema vermessenen, 47 *Rubus idaeus* L. Individuen des Untersuchungsmaterials, deutlich unterschiedliche Peaks im Spektrum zu erkennen (Abbildung 14).

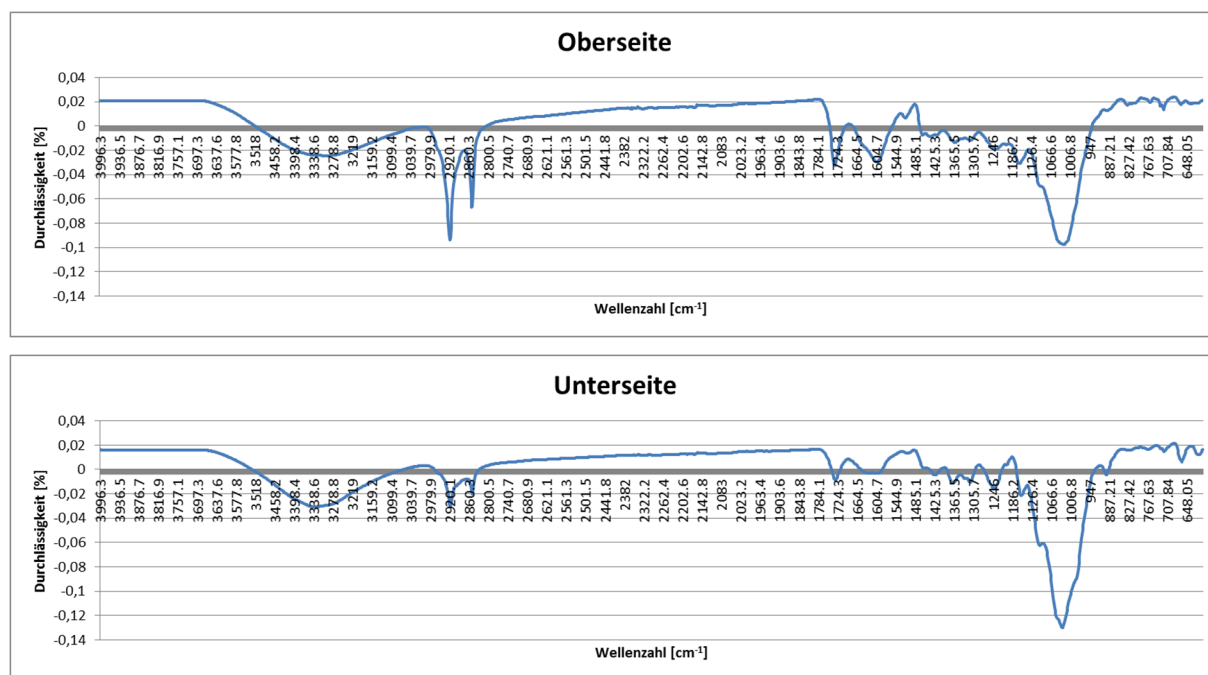


Abbildung 14: Mittelwert der Spektren von 47 Individuen des Untersuchungsmaterials von *Rubus idaeus* L.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die starke, durchgehende Behaarung der Blattunterseite sein, worin sich *Rubus idaeus* L. von den anderen 3 untersuchten Pflanzensystemen deutlich abhebt. Zwar sind auch bei *Urtica dioica* L. (Drüsen-)haare vorhanden, aber diese bilden, im Gegensatz zu *Rubus idaeus* L., keine einheitliche, weißfilzige Behaarung, sondern liegen auf dem Blatt verteilt vor.

4.1.1. Ergebnisse der Versuche an *Fragaria vesca* L., *Fragaria moschata* L., *Fragaria viridis* L.

Das zugrundeliegende Problem bei der Gattung *Fragaria* ist, dass sich diese 3 Arten, wie bereits erwähnt, nur bei optimalen Bedingungen, d.h. an blühenden und/oder fruchtenden, ganzen, möglichst frischen Pflanzen mit Ausläufern bestimmen lassen. Das vorliegende Untersuchungsmaterial entsprach nicht diesen Bedingungen, daher wurden diverse mathematische Verfahren angewendet, um eine mögliche Zuordnung dieser Daten zu einer der drei oben erwähnten Arten zu ermöglichen.

Anhand eines Stammbaumes lässt sich feststellen, dass die Arten *Fragaria vesca* L. und *F. moschata* L. deutlich näher miteinander verwandt sind als mit *F. viridis* L. (Abbildung 15). Hiermit ergibt sich zusätzlich eine Fragestellung, ob dies mithilfe der IR-Daten auch erkennbar wird und falls sich die Arten ähneln, inwiefern sie noch mit den zugrundeliegenden Methoden voneinander unterscheidbar sind.

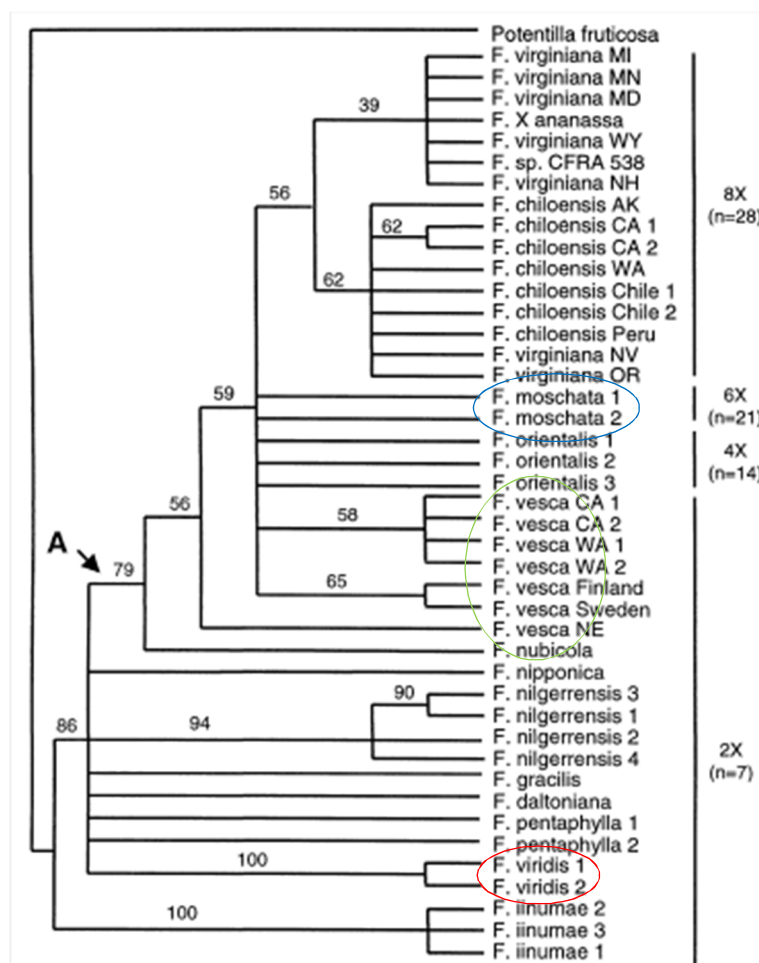


Abbildung 15: Stammbaum von *Fragaria* sp. (Potter et al. 2000)

Die erste sinnvoll anwendbare Analysemethode ist eine Hauptkomponentenanalyse.

Hierbei werden die von dem Untersuchungsmaterial erhobenen Daten in einem virtuellen Vektorfeld platziert, dessen Dimensionen in diesem Fall der Anzahl der Wellenzahlen (cm^{-1}) der Spektren entspricht. Dieses Bild würde einer „Wolke“ an Datenpunkten entsprechen, welche im nächsten Schritt auf ein 2-Dimensionales Feld „projiziert“ wird.

Somit wird die Zahl der Variablen reduziert, und in einem niedriger dimensionierten Vektorfeld sichtbar gemacht. Das bedeutet, dass die zu Beginn korrelierten Daten nun voneinander unabhängig gemacht, d.h. unkorreliert vorliegen. Dies hat den Vorteil, dass sich auf diesem 2D-Vektorfeld „neue“ Zusammenhänge erkennbar machen lassen. (Roggo et al., 2007, S.685)

Wie bereits erwähnt, wurde das Vergleichsmaterial von diversen Standorten zuerst makroskopisch identifiziert, und anschließend ebenfalls mit dem IR-Gerät vermessen. Die Daten dieses Vergleichsmaterials dienten ebenfalls als Grundlage für die Analysen.

Diese Individuen von *Fragaria vesca* L., *F. moschata* L. und *F. viridis* L. ergaben bei der Hauptkomponentenanalyse folgendes Bild (*Abbildung 16*).

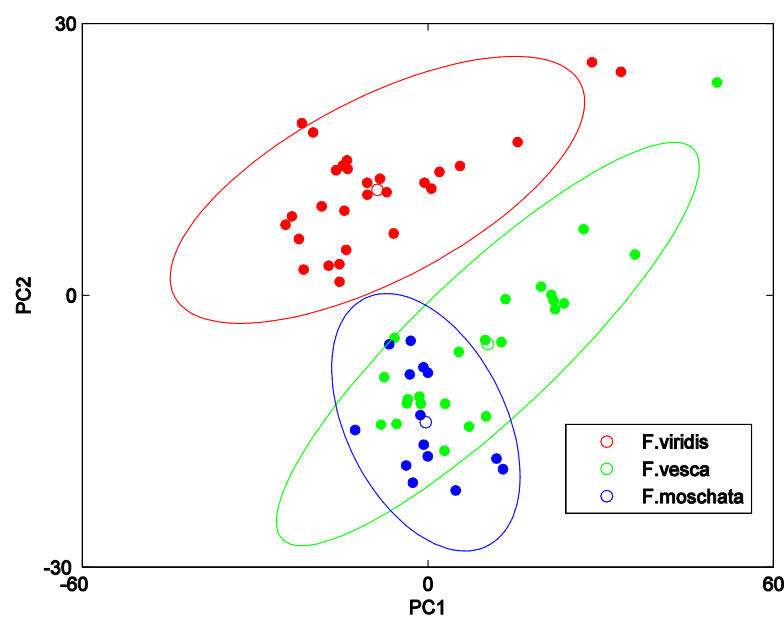


Abbildung 16: Hauptkomponentenanalyse der Blattoberseite des identifizierten Vergleichsmaterials

An dieser Grafik lässt sich erkennen, dass man anhand der unkorrelierten Datenpunkte dennoch Gruppierungen auffinden kann. Die jeweiligen Individuen der 3 Arten finden sich im Vektorfeld tatsächlich in erfassbaren Gruppen auf.

Da die Lage dieser 3 Gruppen im Vektorfeld nun bekannt ist, ergibt eine Hauptkomponentenanalyse des Untersuchungsmaterials, über welches man lediglich das Gruppierungsschema des oben gezeigten Feldes legt, folgendes Bild (*Abbildung 17*).

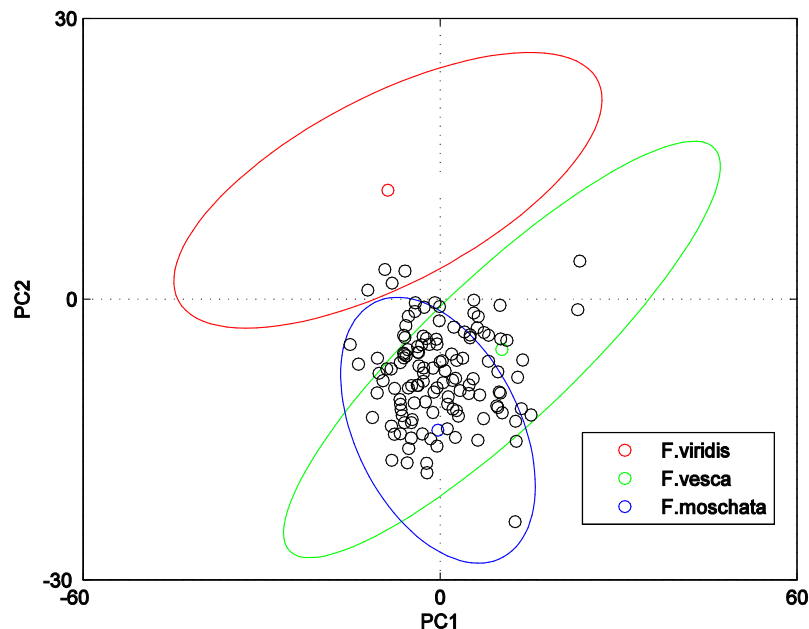


Abbildung 17: Hauptkomponentenanalyse der Blattoberseite des Untersuchungsmaterials von *Fragaria* sp.

Basierend auf diese Analyse, lässt sich annehmen, dass das Untersuchungsmaterial mit großer Wahrscheinlichkeit nur *F. moschata* L. und/oder *F. vesca* L. enthält.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hauptkomponentenanalyse sehr gut geeignet ist, um unbekanntes Material zu analysieren, indem es die Daten neu ordnet, und somit neue Analysemöglichkeiten bietet. Auf diese Weise ließ sich das vorgegebene Gruppierungsschema des Vergleichsmaterials auf das Untersuchungsmaterial übernehmen.

Dennoch konnten mit dieser Methode die Arten *F. moschata* L. und *F. vesca* L. nicht differenziert werden. Einerseits bestätigt sich hiermit die Aussage des Stammbaumes (*Abbildung 15*), dass diese 2 Arten näher miteinander verwandt sind, andererseits steht noch immer die Frage offen, wie sich diese Arten nun voneinander unterscheiden lassen.

Um diese Frage zu beantworten, wurde zweitens eine Diskriminanzanalyse durchgeführt. Hierbei wurden bestimmte Eckpunkte für jede einzelne der 3 Arten des Datenmusters des identifizierten Vergleichsmaterials festgelegt und diese auf das Untersuchungsmaterial übernommen. Diese „Eckpunkte“ werden so gewählt, dass die Analyse die größtmögliche Differenzierung der Daten ermöglicht. (Roggo et al., 2007, S.685)

D.h. die Daten wurden, im Gegensatz zur Hauptkomponentenanalyse, nach bestimmten Vorgaben korrelierter Daten im Vektorfeld platziert und nicht 2 Vektorfelder unkorrelierter Daten übereinandergelegt.

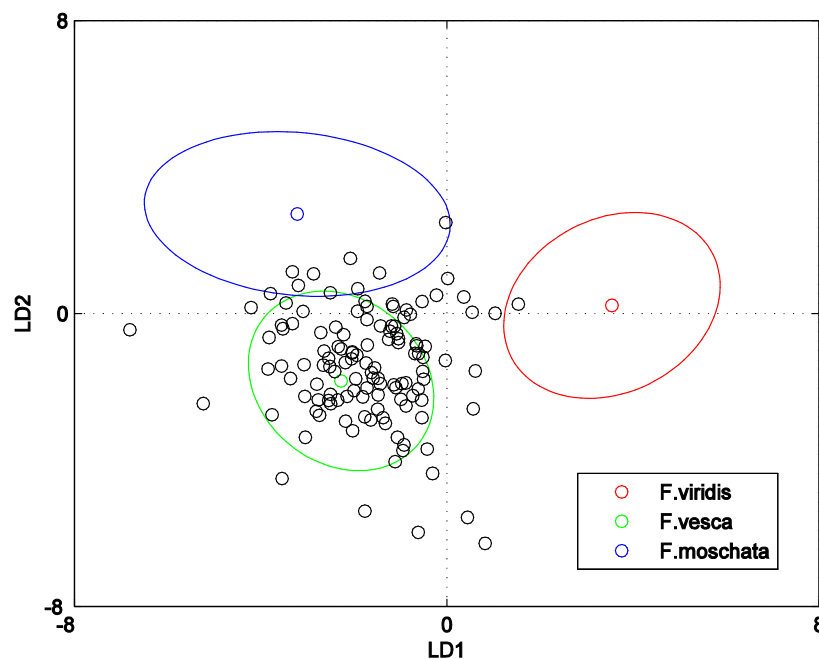


Abbildung 18: Diskriminanzanalyse der Blattoberseite des Untersuchungsmaterials von *Fragaria* sp.

Anhand der Grafik (Abbildung 18) lässt sich erkennen, dass man mittels Diskriminanzanalyse mit hoher Wahrscheinlichkeit die nah verwandten Arten *Fragaria moschata* L. und *Fragaria viridis* L. mittels IR-Messung voneinander unterscheiden kann.

Mit diesen Versuchen konnte die Problematik der Identifizierung dieser Individuen weitestgehend aufgeklärt werden. Das zugrundeliegende Untersuchungsmaterial enthält folglich mit hoher Wahrscheinlichkeit keine *F. viridis* L. und eventuell nur wenige Individuen von *F. moschata* L..

Ich habe keine weiteren Untersuchungen mit dem Material *Fragaria* sp. durchgeführt, würde aber für Analysen welche auf die ursprüngliche Fragestellung aufbauen, ob eine Variabilität der sekundären Inhaltsstoffe bei unseren gesammelten Individuen vorliegt und inwiefern diese Variabilität auf ökogeographische Einflussfaktoren zurückzuführen ist, mich an den Ergebnissen der Diskriminanzanalyse orientieren. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit, befinden sich innerhalb des grünen Kreises in der Grafik (*Abbildung 18*) ausschließlich Individuen der Art *Fragaria vesca* L., welche man für weitere Analysen verwenden könnte.

4.2. HPTLC

Mithilfe der Software VisionCats der Fa. Camag wurden die digitalen Bilder der jeweiligen Platten verarbeitet und als Datenpunkttabelle gespeichert. Die Software vermaß die Intensität jeder Bande an je 10000 Punkten, d.h. bei einer Laufstrecke von 10cm wurde die Laufstrecke in 10µm Schritten vermessen und die jeweilige Intensität von Rot, Grün und Blau in getrennten Datenreihen gespeichert. Somit enthält die Tabelle mit den Rohdaten 15-mal (da die Platte 15 Banden enthält) 10001 Punkte auf der Laufstrecke (0,0000-1,0000) und die entsprechende Intensität von Rot, Grün und Blau an den jeweiligen Punkten.

4.2.1. Problematik am HPTLC-Gerät - Fragestellungen und deren Beantwortung

Das Untersuchungsmaterial der *Urtica dioica* L. wurde laut Protokoll (siehe *Anhang 11.5.*) extrahiert und mittels HPTLC vermessen. Bei diesen Messungen ergab sich das Problem, dass das Gerät weiterhin unklare Banden auftrug, d.h. einige Banden wurden zu schwach, zu stark, ungleichmäßig, bzw. gar nicht aufgetragen. Dies lässt sich vor allem am Beispiel des 1:5 verdünnten internen Standards (*Urticae folium*) im Vergleich aller 5 entwickelten Platten erkennen, sowie an einzelnen ausgewählten Bahnen (*Abbildung 19*).

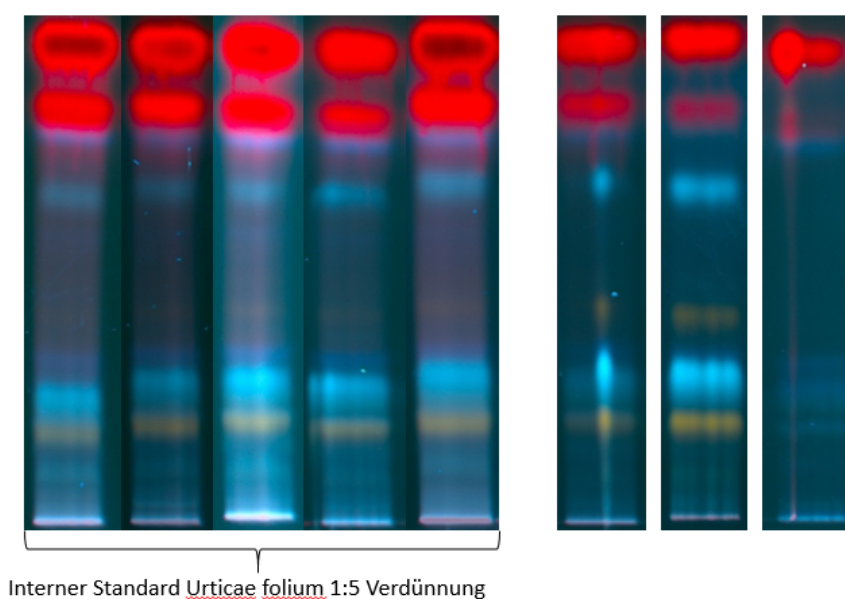


Abbildung 19: Beispiele für ungleichmäßige Banden; Interner Standard *Urticae folium* 1:5; Interner Standard *Urticae folium* 1:10, ADU3_4, CDU2_4 (von links nach rechts), Postderivatized UV366

Somit ergeben sich zwangsweise folgende Fragestellungen, welche einen Einschub weiterer Versuche und deren Auswertungen erforderlich gemacht haben:

1. Fragestellung: Wie reproduzierbar arbeitet das Gerät?

Diese Fragestellung ergab sich dadurch, dass der Autosampler des HPTLC-Gerätes, wie bereits erwähnt, bei einigen Platten keine gleichmäßigen Banden auftrug, und es nicht genau zu erkennen war, warum die Intensitäten unterschiedlich stark waren.

Um diese Frage zu beantworten, wurde derselbe Extrakt (*Urticae folium* 1:10, mit LM) 15-mal auf eine Platte aufgetragen (*Abbildung 20*). Dies müsste ergeben, dass die Banden nach der Entwicklung im Idealfall identisch aussehen und gleiche Chromatogramme liefern. Der einzige nicht konstante Faktor, welcher eine Veränderung der Chromatogramme bewirkt, kann hierbei ausschließlich von dem Gerät selbst ableitbar sein.

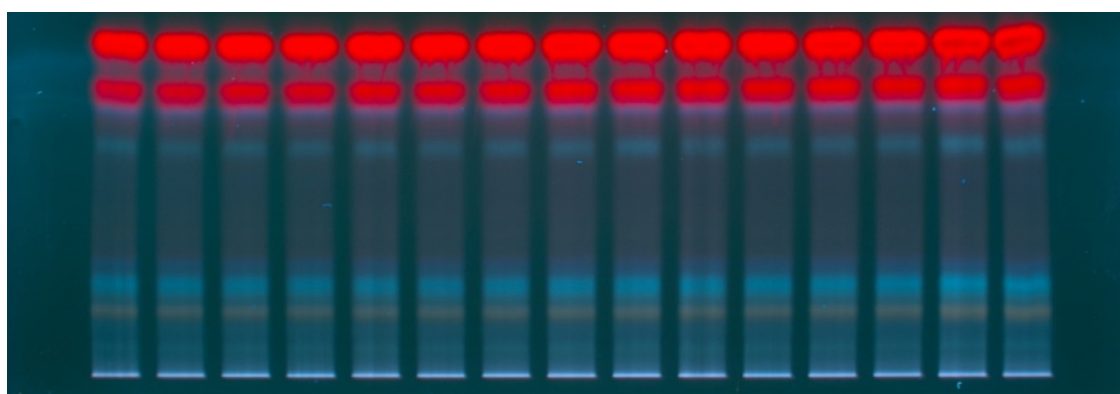


Abbildung 20: Platte 21 - 15 idente Extrakte aus *Urticae folium*, Postderivatized UV366

An dieser Platte (*Abbildung 20*) ist schon mit freiem Auge an der Aufnahme zu erkennen, dass einige Bahnen eine Längsstreifung aufweisen und dass die seitlichen Bahnen schräg gelaufen sind.

Eine Darstellung des Chromatogramms bestätigt die Annahme, dass das Gerät nicht reproduzierbar arbeitet (*Abbildung 21*). Dies lässt sich daraus ableiten, dass die gleichen Proben auf unterschiedlichen Bahnen unterschiedliche Peaks ergeben (siehe Erklärung bei der 3. *Fragestellung*).

Zusammenfassend lässt sich an diesem Punkt sagen, dass das Gerät nicht wirklich reproduzierbar arbeitet.

2. Fragestellung: Wie reproduzierbar hat das Gerät im Neuzustand gearbeitet?

Diese Fragestellung ergibt sich zwangsweise, da falls das Gerät auch im Neuzustand einen ähnlichen Variationskoeffizienten wie heute aufgewiesen hat, man davon ausgehen kann, dass dieser mit einkalkuliert werden muss, da der „Fehler“ nicht behebbar ist.

Für diesen Vergleich wurde eine Vermessung von *Hyperici herba* aus Juli 2013 herangezogen. Bei einem vergleichbaren Peak betrug auch hier der Variationskoeffizient (Berechnung siehe *Anhang 11.10.*) der grünen Farbintensitäten 0,1072, bei den ppm-Normierten Daten (Berechnung siehe *Anhang 11.8.*) hingegen 0,0727. Dies macht keinen relevanten Unterschied zu unseren aktuellen Daten (siehe *Tabelle 5*).

Tabelle 5: Vergleich der Daten im Neuzustand vs. im aktuellen Zustand des Gerätes, am Beispiel eines Peaks des grünen Farbspektrums

	Variationskoeffizient d. Rohdaten	Variationskoeffizient d. ppm-Normierten Daten
Platte Hypericum 2013	0,1072	0,0727
Platte 21 (Grüner Peak bei der Intensität 0,1996)	0,1003	0,0726

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Chromatogramme welche das Gerät produziert, einer bestimmten Schwankung unterliegen. Dies lässt sich nicht ändern und muss daher bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden, z.B. in dem man den Variationskoeffizienten mithilfe einer ppm-Normierung senkt.

3. Fragestellung: Wie kann man die Daten auswerten um den niedrigsten Variationskoeffizienten zu bekommen?

Dies möchte ich am Beispiel der grünen Farbintensität auf Platte 21, stellvertretend für die mit diesem korrelierenden Ergebnisse anderer Chromatogramme, veranschaulichen:

Wenn man sich die unveränderten Rohdaten anschaut, beträgt bei dem ersten großen Peak bei ca. 2,2 cm auf der Laufstrecke die niedrigste Intensität 0,0360 (Track 7) und die höchste 0,0543 (Track 14). Die Differenz dieser Intensitäten ergibt 0,0183. Der Variationskoeffizient aller 15 Tracks beträgt bei diesem Peak 0,1003 (*Abbildung 21*).

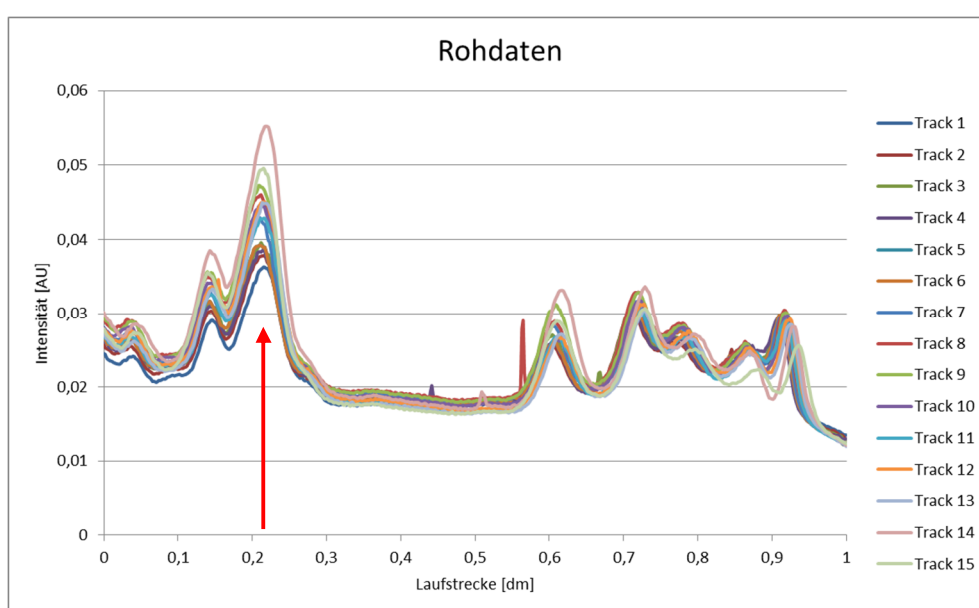


Abbildung 21: Platte 21 – Chromatogramm der Rohdaten der grünen Farbintensitäten aller 15 Bahnen

Nach einer ppm-Normierung (siehe *Anhang 11.7.*) der Daten erhält man folgendes Chromatogramm (*Abbildung 22*): Die niedrigste Intensität bei ca. 2,2cm beträgt 0,0118 (Track 7) und die höchste 0,0223 (Track 14). Die Differenz dieser Intensitäten ergibt nur mehr 0,0105. Der Variationskoeffizient aller 15 Tracks bei diesem Peak beträgt 0,0726 und ist somit deutlich geringer, jedoch werden die Kurve und somit die Daten bis zu einem bestimmten Grad verändert.

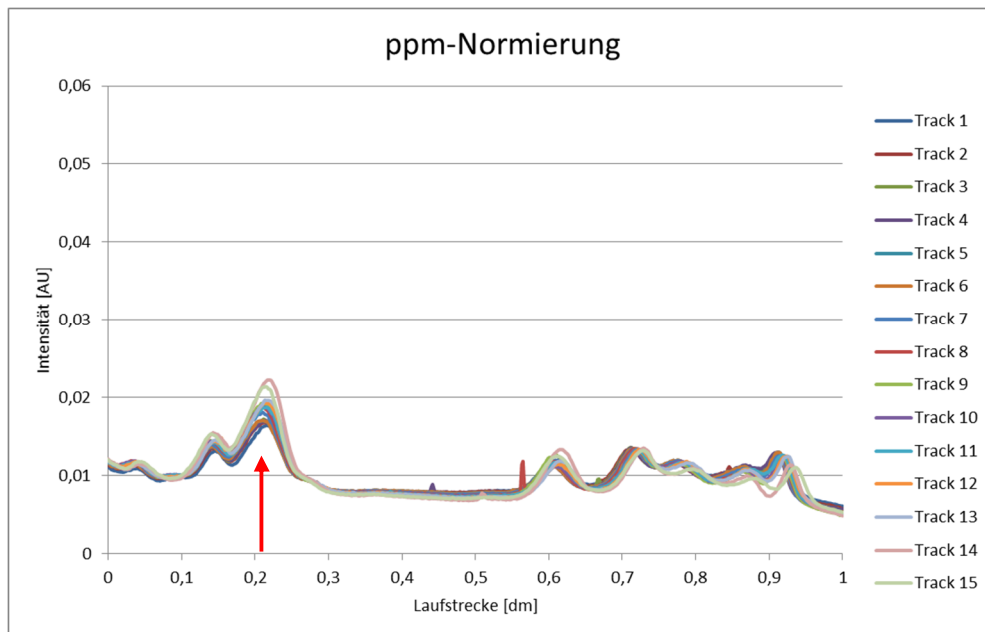


Abbildung 22: Platte 21 - Chromatogramm der ppm-normierten Daten der grünen Farbindensitäten aller 15 Bahnen

Nach einer Vektornormierung (siehe *Anhang 11.8.*) erhält man folgendes Chromatogramm (*Abbildung 23*): Der höchste Peak bei ca. 2,1cm erreicht eine Intensität von 1,0116 (Track 14), die Intensität des niedrigsten Peaks beträgt hier 1,0056 (Track 1). Damit ergibt sich die von allen Methoden geringste Differenz von 0,006. Jedoch beträgt der Variationskoeffizient hier 0,1635 und die Form des Kurvenverlaufs ist im Vergleich zu den Rohdaten deutlich verändert. Die Daten wurden sogar stärker als bei der ppm-Normierung verfälscht.

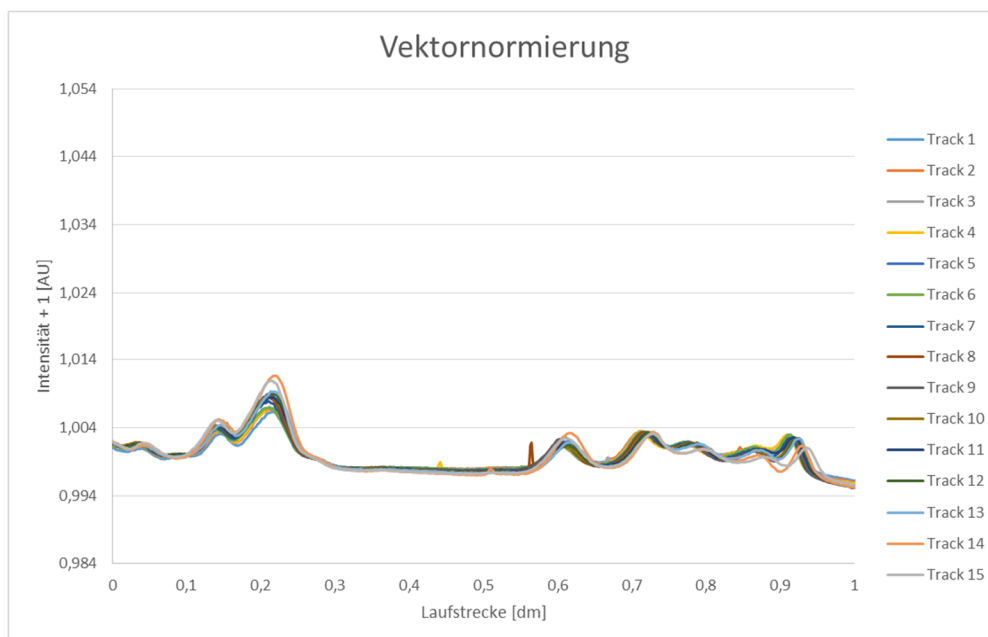


Abbildung 23: Platte 21 – Chromatogramm der vektornormierten Daten der grünen Intensitäten aller 15 Bahnen (Werte der Intensität = tatsächlicher Wert + 1)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man mittels ppm-Normierung die Daten am erfolgreichsten optimieren kann, da hierbei der Variationskoeffizient im Vergleich zu den Rohdaten und der Vektornormierung am niedrigsten ist (*Tabelle 6*).

Tabelle 6: Variationskoeffizienten von Rohdaten, ppm-normierten Daten und vektor-normierten Daten

	Variationskoeffizient d. Rohdaten	Variationskoeffizient d. ppm-normierten Daten	Variationskoeffizient d. vektornormierten Daten
Platte 21 (Grüner Peak bei der Inten- sität 0,1996)	0,1003	0,0726	0,1635

4. Fragestellung: Welche Normierung ist für eine tatsächliche Quantifizierung der Daten am besten geeignet?

Um dies zu beantworten, wurde folgendes Schema zum Auftragen der Extrakte auf die HPTLC-Platten entworfen: Es ist bei jeder Platte eine Verdünnungsreihe des Extraktes der jeweiligen Teedroge als interner Standard mit aufgetragen worden, sowie eine Referenzsubstanz laut Arzneibuch (*Abbildung 24*).

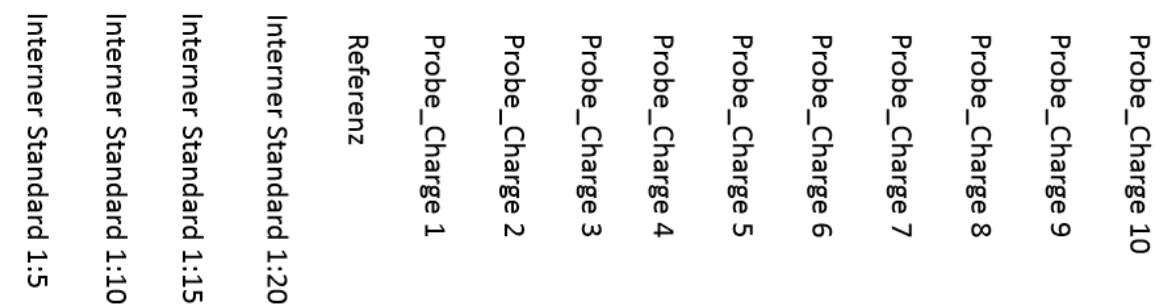


Abbildung 24: Schematische Darstellung einer HPTLC-Platte mit Vergleichs- und Untersuchungsmaterial

Der Interne Standard ist von Vorteil, da dieser immer parallel mit den Proben entwickelt wird, und somit als direkter Vergleich bei der Quantifizierung herangezogen werden kann.

Für die Auswertung der Daten musste zuerst ein geeignetes Normierungsverfahren gefunden werden. Das Ziel dabei war, mithilfe der Internen Standards, welche auf jeder Platte mitgelaufen sind, eine Eichgerade für die repräsentativsten Peaks des Chromatogramms zu erstellen. Auf dieser kann man im Idealfall, wenn man die Intensität der Peaks der einzelnen Chargen einfügt erkennen, welche Konzentrationen der jeweiligen Substanz, welche diesen Peak hervorbringt, die eingefügten Chargen enthalten. Daher ist ein Normierungsverfahren in diesem Fall optimal, wenn die Punkte der Internen Standards eine möglichst lineare Eichgerade bilden.

Um eine geeignete Normierung zu finden wurde die Platte Nr.15 mit einer Verdünnungsreihe der Internen Standards *Urticae folium* zu 1:5, 1:10, 1:15 und 1:20, der Referenz Chlorogensäure (2mg in 10ml Methanol *R*) und den Extrakten von den Chargen CDU1_1-5 und EDU1_1-5 herangezogen.

Zuerst wurden die Chromatogramme der Internen Standards ppm-normiert und vektornormiert. Anschließend wurde aus den roten, grünen und blauen Intensitätsspektren je ein deutlich abgegrenzter Peak ausgesucht, dessen Peakfläche (=Summe aller Intensitäten eines Peaks) ermittelt und anschließend ebenfalls ppm-normiert und vektornormiert wurde. Für denselben Peak wurden auch die ppm-normierten, sowie die vektornormierten Daten und die Rohdaten des Punktes der höchsten Intensität innerhalb des Peaks (Peakspitze) herangezogen. Die folgenden Daten sind den Peaks mit den Peakspitzen bei dem roten Spektrum bei ca. 1,29cm, bei dem grünen und blauen Spektrum bei ca. 5,9cm der Laufstrecke zuzuordnen.

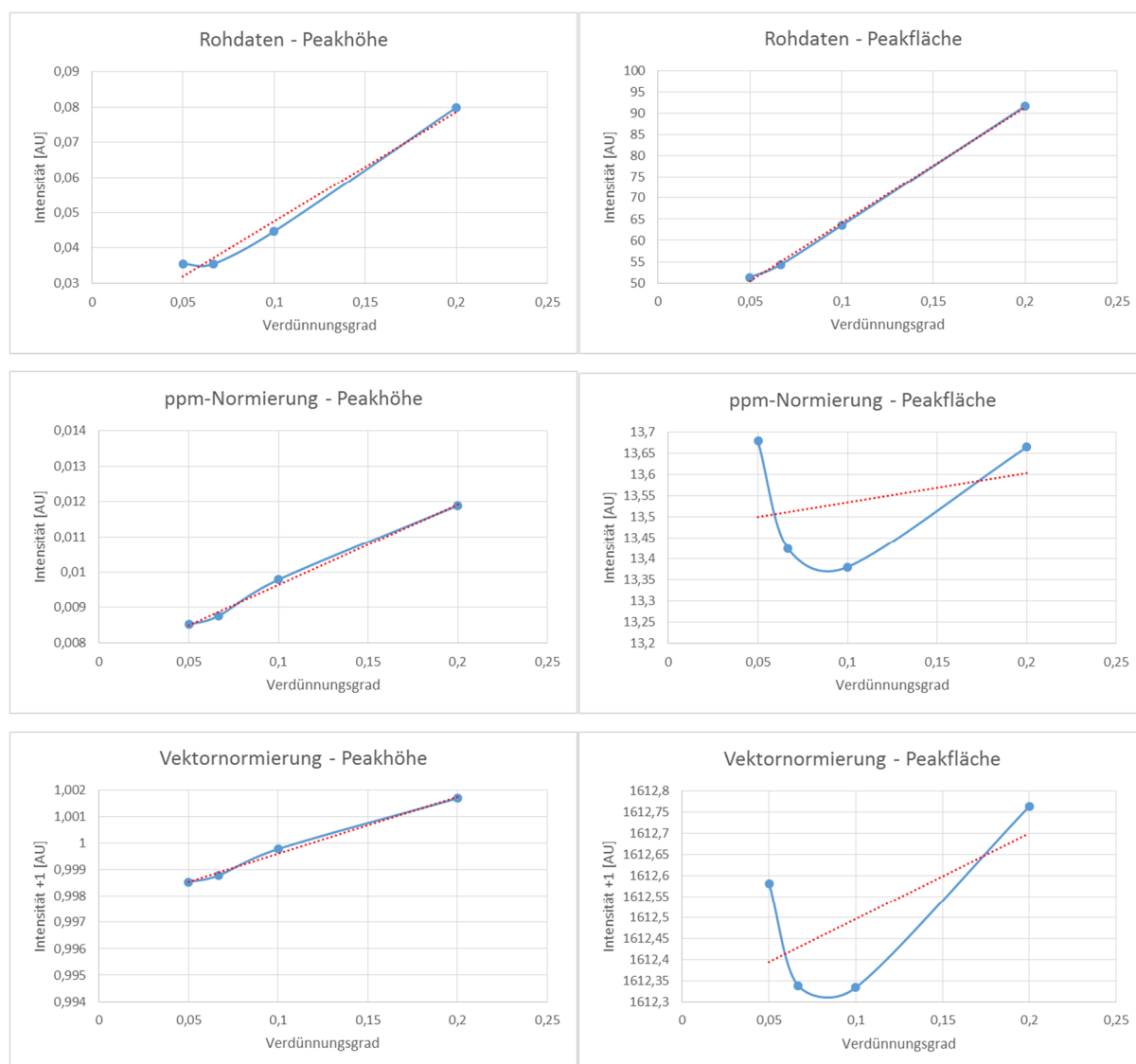
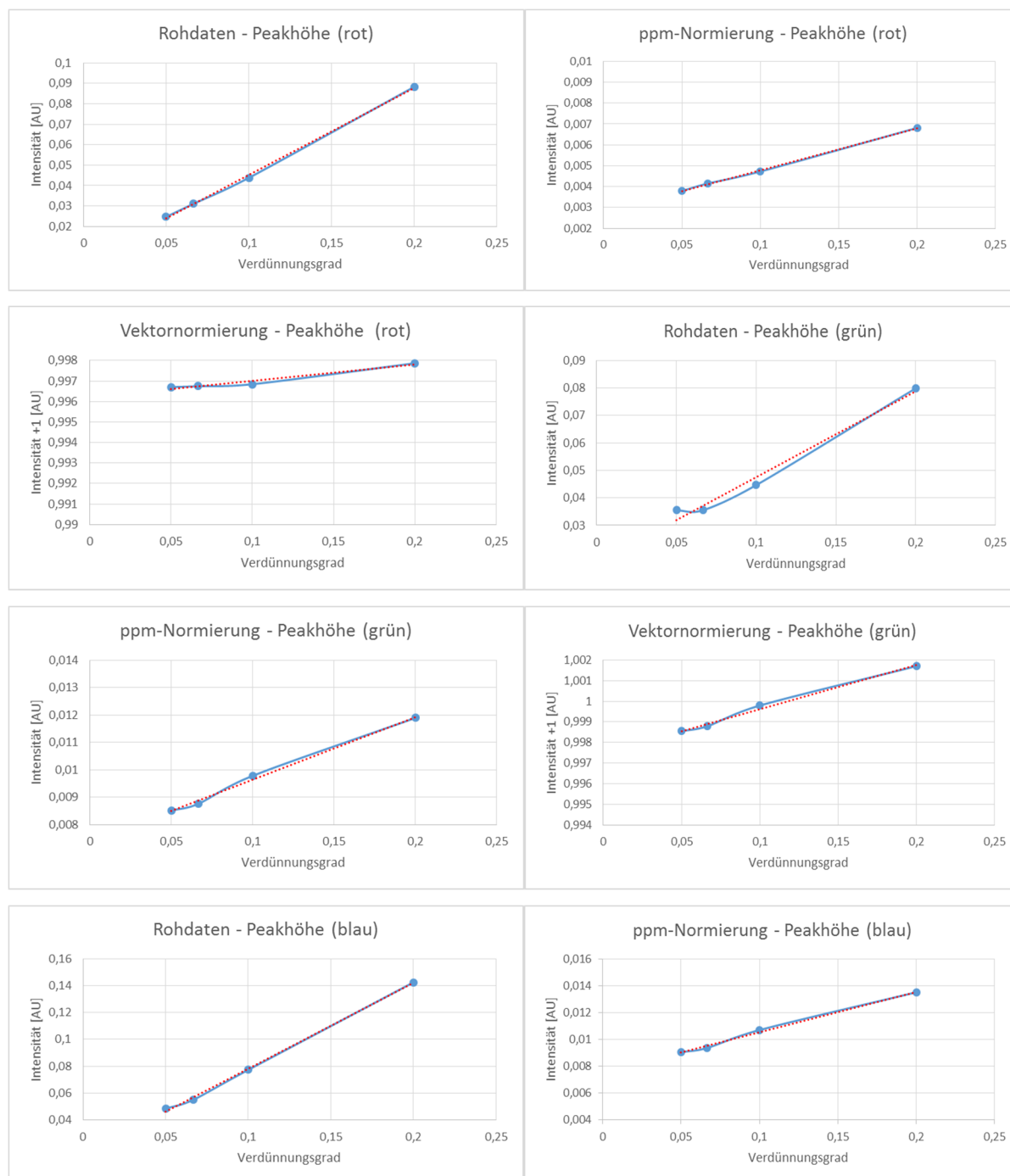


Abbildung 25: Platte 15 - Vergleich von Rohdaten, ppm-Normierung und Vektornormierung, berechnet über Peakhöhe vs. Peakfläche, vom Peak des grünen Intensitätsspektrums

Durch die erhaltenen Eichgeraden wurde eine lineare Trendlinie durchgelegt, welche im Optimalfall dem Verlauf der Eichgerade entsprechen sollte (*Abbildung 25*). Es ist eindeutig, dass die Berechnung der Eichgerade über die Peakfläche für dieses Verfahren nicht von Nutzen wäre, da – vor allem die normierten Daten – keinen linearen Zusammenhang mehr aufweisen. Daher wurden im nächsten Schritt die Daten bezogen auf die Peakhöhe der 3 Farbspektren miteinander verglichen (*Abbildung 26*).



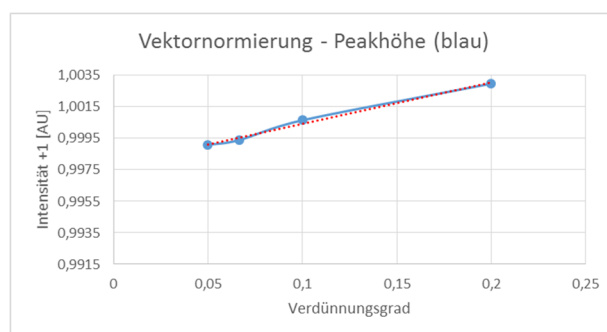


Abbildung 26: Platte 15 - Vergleich von Rohdaten, ppm-Normierung und Vektornormierung, berechnet über die Peakhöhe der Farbintensitäten von rot, grün und blau

Für die Quantifizierung der Daten wurden die Rohdaten ausgewählt, da diese im Vergleich mehrerer Peaks einer linearen Linie sehr nah kommen und den Vorteil haben, dass die Daten noch unverfälscht vorliegen.

5. Fragestellung: Warum trägt der Autosampler keine einheitlichen Banden auf?

Trotz der Feststellung, dass die Platten gewissermaßen auswertbar sind (siehe *Tabelle 5*), ist der eigentliche Vorteil dieses Gerätes gegenüber einer händischen DC, nämlich jener wiederholbar gleichmäßig aussehende DCs herzustellen, nicht im gewünschten Ausmaß gegeben. Hinzu kommt das Problem, dass scheinbar willkürlich einige Banden nicht aufgetragen werden und somit immer gewisse Chargen des Untersuchungsmaterials unauswertbar bleiben.

Um die Ursache dieses Fehlers herauszufinden wurden insgesamt 5 Platten mit immer demselben Extrakt, *Urticae folium 1:10* mit LM, entwickelt. Alle Platten wiesen mehr oder weniger dieselben Fehler beim Auftragen auf, wie es in *Abbildung 19* bereits veranschaulicht wurde. Obwohl für die zweite Platte eine HPTLC-Platte verwendet, nach der dritten Messung der Düsenkopf des Autosamplers gereinigt und nach der vierten Platte ein Techniker gerufen wurde, der nur marginale Fehler am Autosampler feststellen und beheben konnte, lieferten die Messungen nach wie vor kein auswertbares Ergebnis.

Somit drängte sich der Verdacht auf, dass die Proben selbst ein gleichmäßiges Auftragen verhindern. Um dies zu untersuchen wurde eine reine Farbstofflösung, (sonst für Testung und Einstellung des Gerätes verwendet), auf eine Platte aufgetragen. Diese Banden waren einheitlich, sauber und völlig identisch.

Somit wurde eine Serie verschiedener Lösungen dieses Farbstoffs hergestellt, um zu beobachten welches Lösungsmittel ein einheitliches Auftragen verhindert. Der Farbstoff wurde jeweils mit LM (DCM/MeOH/Wasser 50:40:10), reinem DCM und reinem MeOH gemischt.

Da er sich mit Wasser nicht mischen ließ, wurde etwas *Urticae folium* in kaltes Wasser gegeben, kurze Zeit mazeriert und anschließend der Überstand dieser wässrigen Lösung verwendet. Auf weiteren 3 Bahnen wurde eine Stichprobe der oben beschriebenen Extrakte (*Urticae folium* 1:10 in LM) aufgetragen. Die Versuche wurden zweimal mit der Applikationsdauer für wässrige, und je einmal für methanolische und in Aceton gelöste Proben durchgeführt. Die Applikationsdauer ist am längsten bei wässrigen Extrakten, und verkürzt sich fortlaufend bei methanolischen Extrakten, bis hin zur kürzesten Applikationsdauer für Aceton.

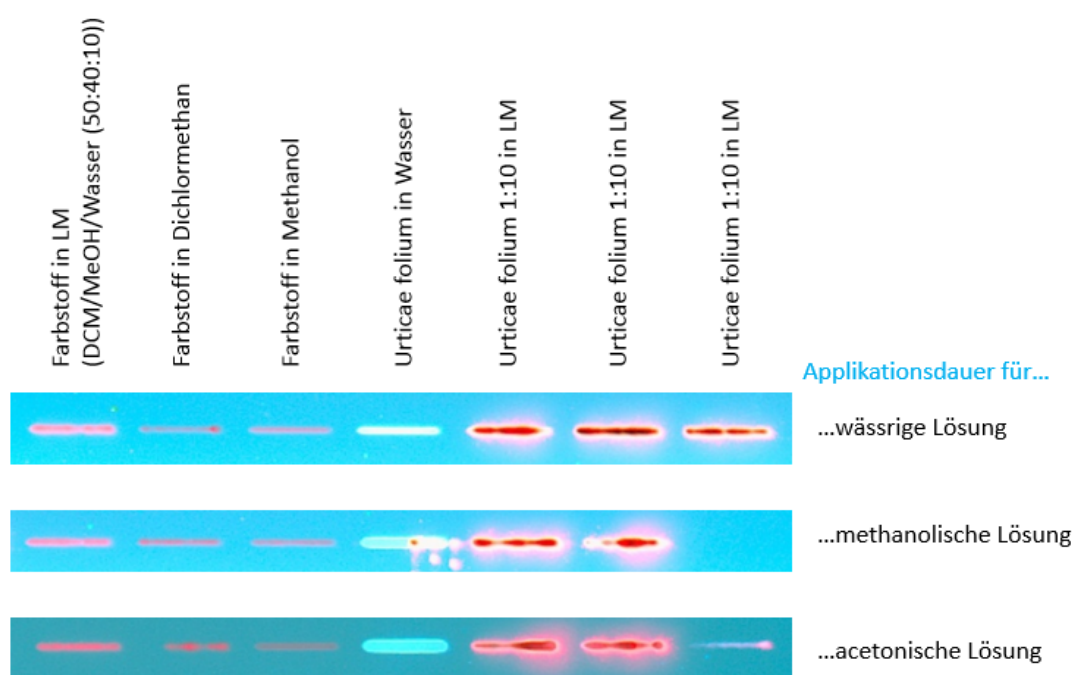


Abbildung 27: Vergleich von Farbstoff und *Urticae folium* in verschiedenen Lösungsmitteln bei unterschiedlicher Applikationsdauer, UV366nm

Dieser Versuch (Abbildung 27) zeigt eindeutig, dass das Gerät Dichlormethan haltige Lösungen nicht gleichmäßig, wässrige und methanolische Lösungen hingegen problemlos aufträgt. Dieses Problem ist bei den vorherigen Versuchen an unserem Department, bei welchen dieses Lösungsmittelgemisch entwickelt wurde, nicht aufgetreten. Eine mögliche Ursache könnte die Flüchtigkeit des DCM sein, deren Anstieg mit einer Temperaturerhöhung korreliert. Die Entwicklung dieses Lösungsmittelgemisches fand bei Temperaturen zwischen 20-24°C statt, wohingegen meine Versuche bei einer Raumtemperatur zwischen 24-30°C durchgeführt wurden.

Dieses Problem wurde für weitere Versuche dahingehend behoben, dass alle Extrakte mit reinem Methanol statt mit dem LM hergestellt wurden, trotz leichten Einbußen bezüglich des Inhaltsstoffspektrums der Extrakte.

4.2.2. Ergebnisse für *Urtica dioica* L.

Das Untersuchungsmaterial wurde laut Arbeitsprotokoll (siehe *Anhang 11.5.*) extrahiert und mittels HPTLC entwickelt. Da die Entwicklung der *Urtica dioica* L. Proben zeitlich vor der Durchführung der in *Kapitel 4.2.1.* beschriebenen Versuche und der Erkenntnis, dass Methanol dem LM vorgezogen werden sollte lag, wurden für diese Versuche noch alle Extrakte mit dem LM hergestellt.

Sowohl das ungleichmäßige Auftragen des Autosamplers, als auch die hohe Konzentration der Extrakte des Untersuchungsmaterials erschwerten die Auswertung.

Auf letzteres möchte ich am Beispiel der in *Kapitel 4.2.1.* bereits erwähnten Platte 15 genauer eingehen (*Abbildung 28*).

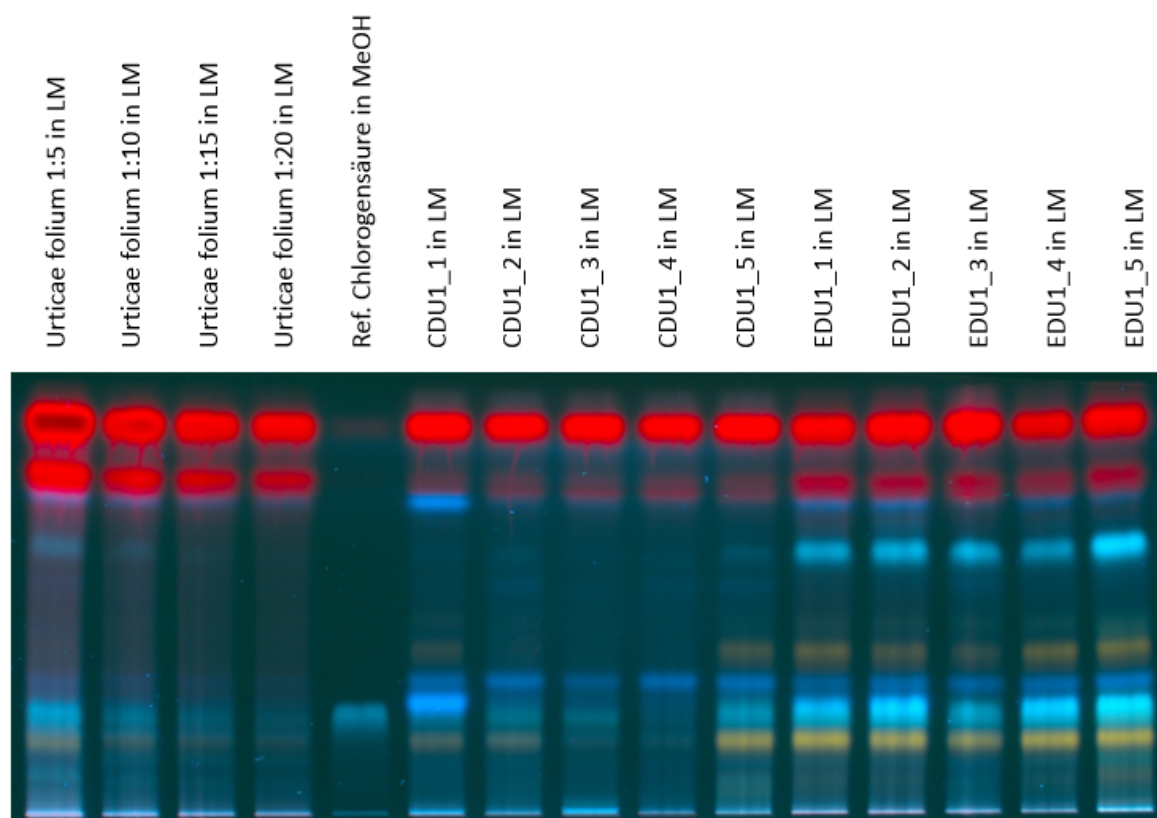


Abbildung 28: Platte 15, Postderivatized UV366nm

Bereits mit freiem Auge lässt sich erkennen, dass das Untersuchungsmaterial welches 1:10 verdünnt ist eine viel höhere Intensität der Banden, d.h. einen viel höheren Gehalt an sekundären Inhaltsstoffen aufweist, als die Verdünnungsreihe des Vergleichsmaterials *Urticae folium*. Wie bereits in *Kapitel 4.2.1., Punkt 4*, wurden auch hier die Daten der Peaks mit den Peakspitzen bei dem roten Spektrum bei ca. 1,29cm, beim grünen und blauen Spektrum bei ca. 5,9cm der Laufstrecke herangezogen.

Für diese Auswertung wurden die Trendlinien der oben erwähnten Eichgeraden der Rohdaten (siehe *Abbildung 26*) durch eine Formel ausgedrückt, und mithilfe dieser umgeformten Formel die der gemessenen Intensität entsprechende Konzentration ermittelt (*Abbildung 29*).

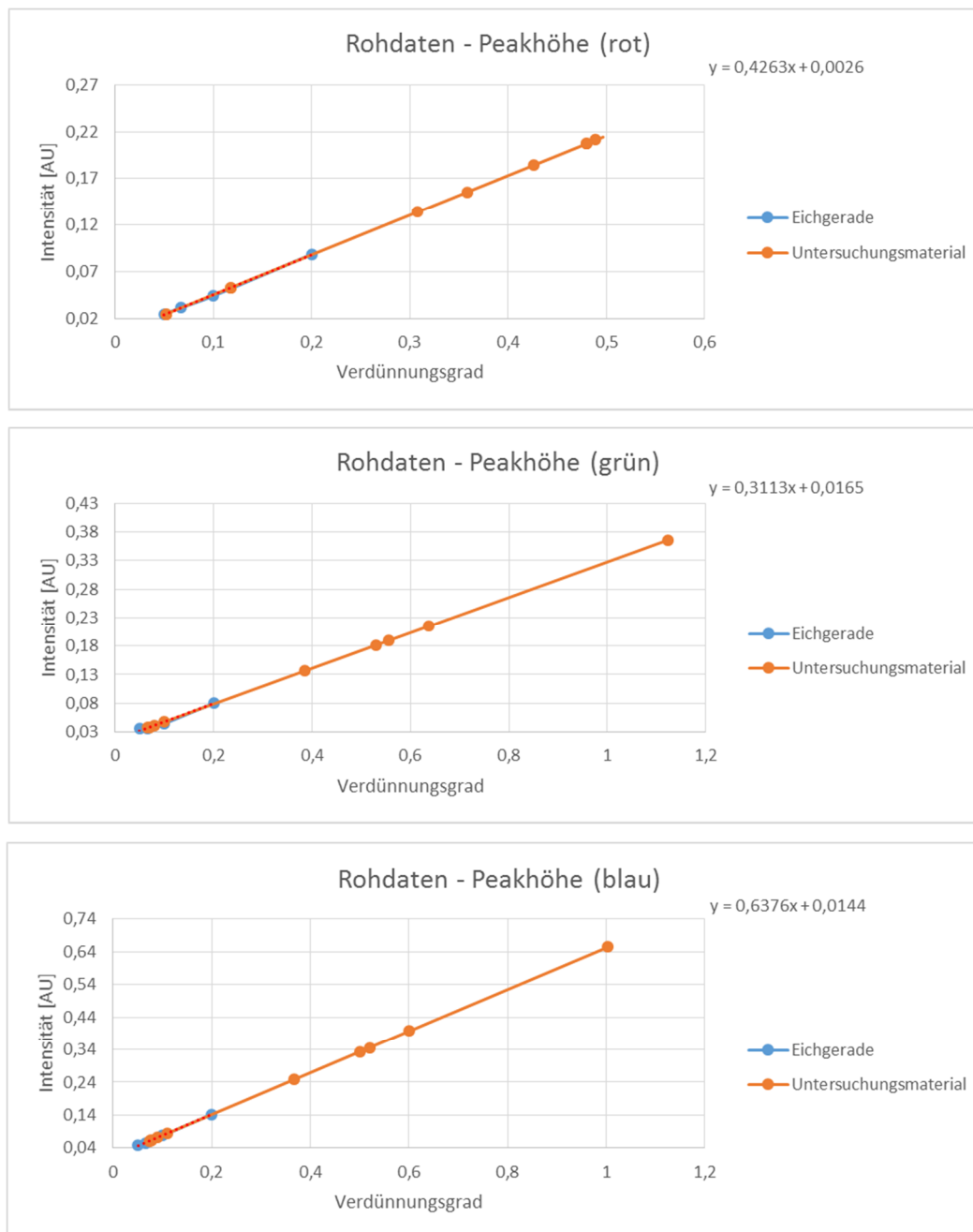


Abbildung 29: Platte 15 – Konzentration von Eichgerade und Untersuchungsmaterial im Vergleich

Die Diagramme in *Abbildung 29* bestätigen die Annahme, dass der Großteil des Untersuchungsmaterials außerhalb des Konzentrationsbereichs der Eichgeraden liegt. Somit ist eine Quantifizierung für diese Chargen nicht mehr möglich, da Werte außerhalb der Eichgeraden

zwar mathematisch prognostiziert werden können, aber dennoch nur der Konzentrationsbereich innerhalb der Eichgerade mit fixen Datenpunkten belegt ist. Somit wäre eine Extrapolation außerhalb der Eichgerade zwar theoretisch möglich, aber die Richtigkeit dieser Daten wäre anzuzweifeln, da es nicht 100%ig sicher ist, dass die Verdünnungsreihe der Eichgeraden – würde man sie weiterführen – weiterhin linear verlaufen würde.

Daher wurde die Quantifizierung für *Urtica dioica* L. nicht weitergeführt, und die Methode für weitere Messungen dahingehend verbessert, dass die Extrakte des Untersuchungsmaterials auf die Konzentration 1:25 verdünnt wurden, um im Konzentrationsbereich der Eichgerade zu bleiben.

4.2.3. Ergebnisse für *Rubus idaeus* L.

Das Untersuchungsmaterial wurde laut Arbeitsprotokoll (siehe *Anhang 11.6.*) extrahiert und mittels HPTLC entwickelt. Der Unterschied zu bisherigen Messungen lag darin, dass einerseits mit Methanol statt mit dem LM extrahiert, andererseits der Extrakt nicht mehr über Watte filtriert, sondern lediglich das Drogenmaterial in den Falcon Tubes mechanisch „gestopft“ und der klare Überstand umpipettiert wurde. Des Weiteren wurden die Extrakte in einem Verhältnis 1:25 verdünnt, um innerhalb des Konzentrationsbereiches der Eichgerade zu bleiben.

4.2.3.1. Definition einzelner Substanzpeaks

Für die Erstellung von Eichgeraden bestimmter Peaks, wurden Banden auf der HPTLC-Platte ausgesucht von denen entweder bekannt war welche Substanzen sie hervorbringen, oder markante Banden unbekannten Ursprungs darstellten, anhand welcher man Differenzen im sekundären Inhaltsstoffspektrum der unterschiedlichen Chargen des Untersuchungsmaterials optimal erkennen kann. Eine relativ genaue Beschreibung einer zu erwartenden DC von *Rubus idaeus* folium wird im Deutschen Arzneimittelcodex (2004) für ein ähnliches Fließmittelsystem und ähnliche Detektionsmethode beschrieben, welche somit auf die hier angewendete Methode übernommen werden kann:

„Im Chromatogramm der Referenzlösung treten im unteren Drittel die orangefarbene Zone des Rutosid, im mittleren Drittel die orangefarbene Zone des Hyperosid und im oberen Drittel die hellblaue Zone der Kaffeesäure auf. Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigt knapp unterhalb der Referenzsubstanz Rutosid zwei nicht immer vollständig getrennte orangefarbene Zonen, zwischen den Referenzsubstanzen Rutosid und Hyperosid eine starke orangefarbene Zone, knapp oberhalb des Hyperosid eine oder zwei orangefarbene Zonen darüber eine weitere schwache orangefarbene bis grünliche Zone. Unterhalb der Referenzsubstanz Kaffeesäure treten eine grünliche und eine blaue Zone auf, in Höhe der Kaffeesäure kann eine hellblaue Zone sichtbar sein. Weitere schwach blaue, grünliche oder orangefarbene Zonen können vorhanden sein.“ (DAC 2004, Monographie für Himbeerblätter, S.3)

Für die Auswertung des Spektrums der roten Farbintensitäten wurden die Hyperosid-Bande, und eine orange Bande unbekannten Ursprungs („Rot“), welche sich auf der Laufstrecke knapp unterhalb des Hyperosids befindet, ausgewählt (*Abbildung 30 + 31*).

Zwar lässt sich das Rutosid im Spektrum auch identifizieren, gibt aber nur bei wenigen Chargen einen deutlichen Peak, und wurde daher nicht bei der Auswertung mit einbezogen.

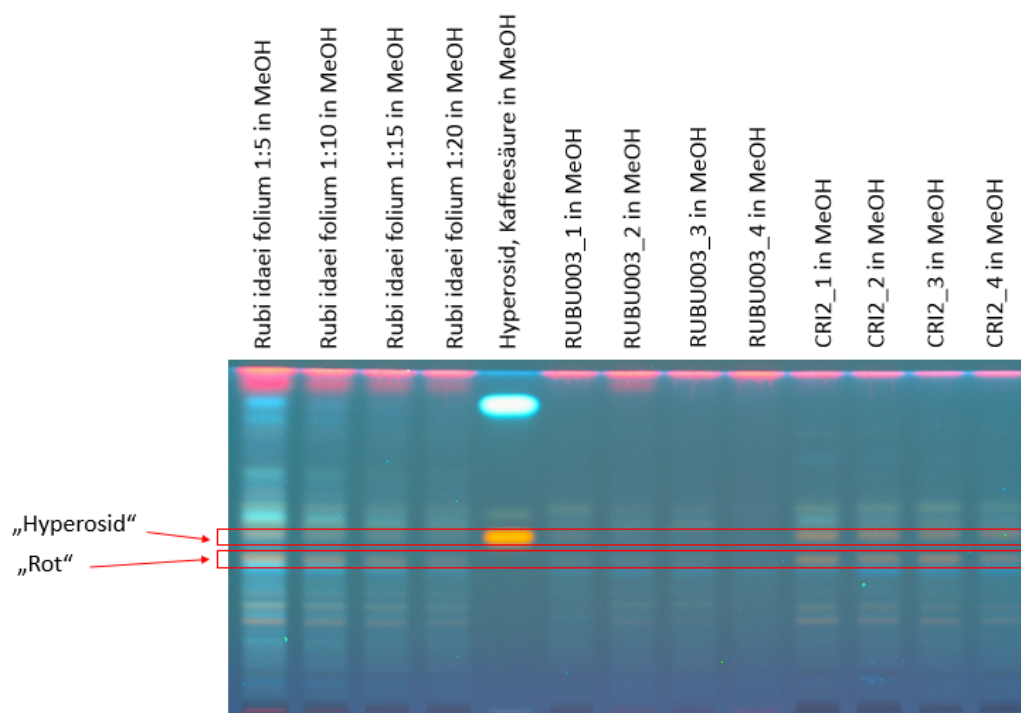


Abbildung 30: Platte 32 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der roten Farbintensität, Postderivatized UV366nm

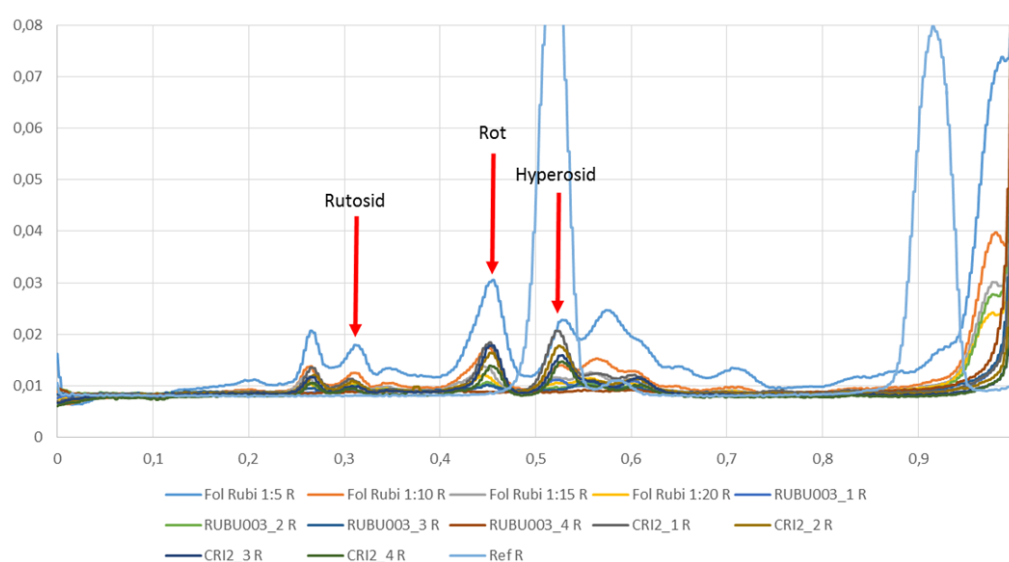


Abbildung 31: Platte 32 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der roten Farbintensität; Spektrum der roten Farbintensität

Für die Auswertung des Spektrums der grünen Farbintensitäten wurde die erste, auf der Laufstrecke knapp über dem Hyperosid befindliche grüne Bande ausgewählt (Abbildung 32 + 33). Zwar lässt sich die Kaffeesäure im Spektrum auch identifizieren, gibt aber bei nur wenigen Chargen einen deutlichen Peak, und wurde daher nicht bei der Auswertung mit einbezogen.

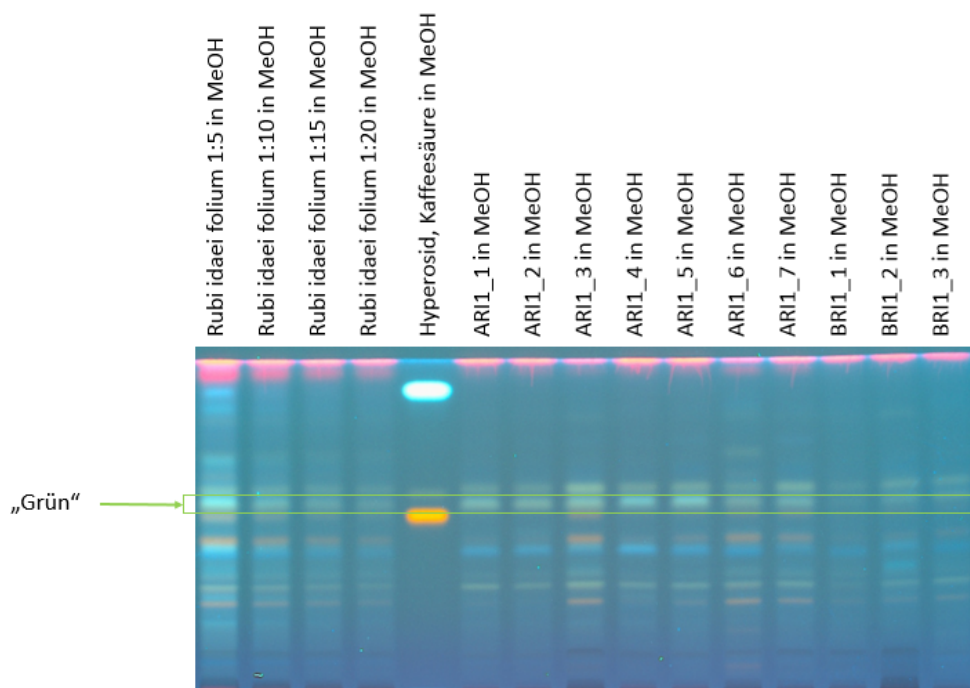


Abbildung 32: Platte 31 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der grünen Farbintensität, Postderivatized UV366nm

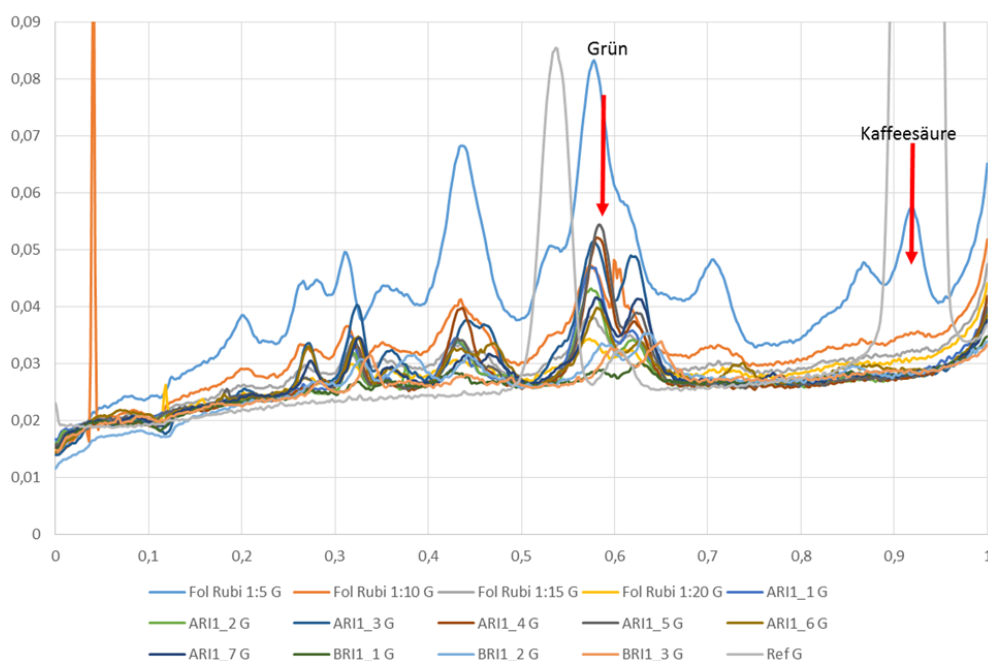


Abbildung 33: Platte 31 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der grünen Farbintensität, Spektrum der grünen Farbintensität

Für die Auswertung des Spektrums der blauen Farbintensitäten wurde die Kaffeesäure-Bande und die auf der Laufstrecke unter dem Hyperosid befindliche, deutlich sichtbare blaue Bande ausgewählt (Abbildung 34 + 35).

Da die Kaffeesäure leider nicht auf allen Platte deutliche Peaks hervorbrachte, konnte diese Bande nur auf ausgewählten Platten ausgewertet werden.

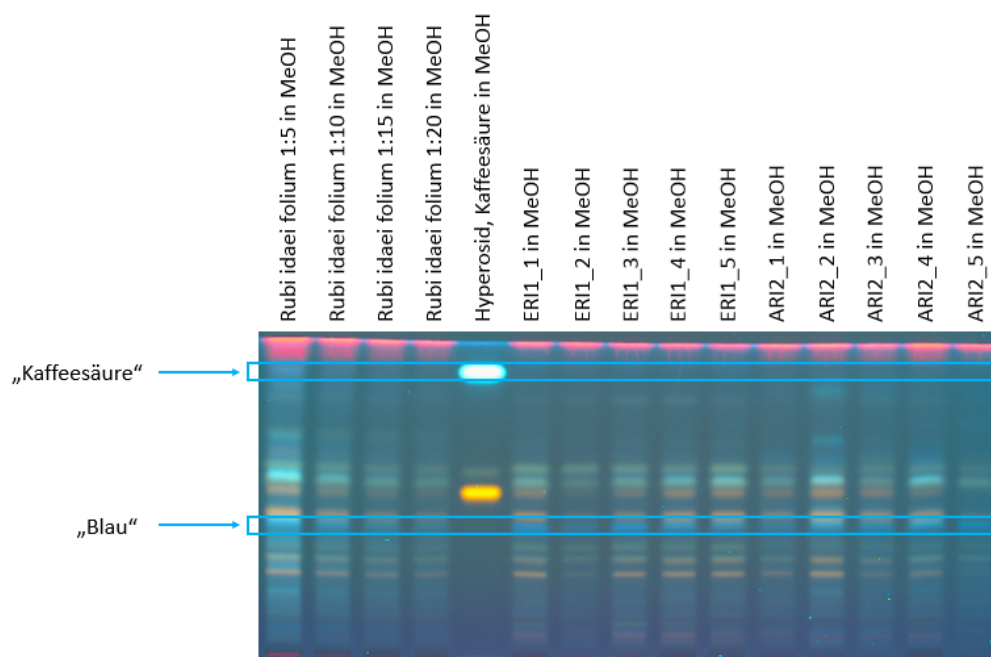


Abbildung 34: Platte 30 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der blauen Farbintensität, Postderivatized UV366nm

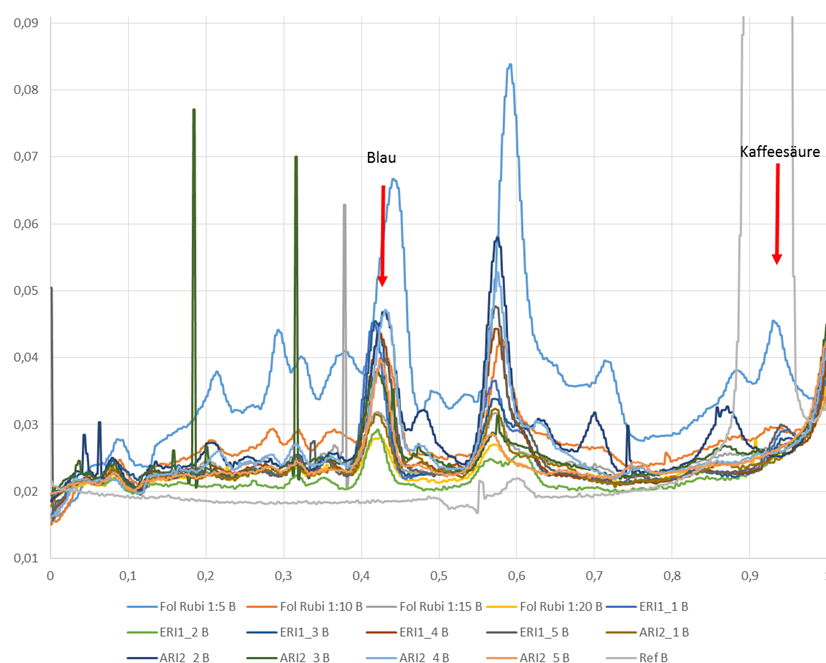


Abbildung 35: Platte 30 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der blauen Farbintensität, Spektrum der blauen Farbintensität

4.2.3.2. Auswertung und Quantifizierung

Erklärung der Vorgehensweise anhand des Beispiels des Hyperosid-Peaks (R) der Platte 30:

Es wurde von jedem der oben genannten, ausgewählten Peaks für jede Komponente (d.h. 4 Interne Standards und die Chargen ERI1_1-5 und ARI2_1-5) die maximale Intensität (d.h. die Intensität an der Peakspitze) als Ausgangswert genommen. Dies ergab 5 Tabellen für die 5 ausgewählten Substanzen: Hyperosid (R), Rot-Peak (R), Grün-Peak (G), Kaffeesäure (B), und Blau-Peak (B). Die bekannte Konzentration der Internen Standards wurde ebenfalls eingetragen. Aus den Daten der Internen Standards (Fol. Rubi 1:5, 1:10, 1:15 und 1:20) wurde eine Eichgerade erstellt, und anschließend die Formel einer linearen Trendlinie berechnet (*Abbildung 36*).

Fol Rubi 1:5	Fol Rubi 1:10	Fol Rubi 1:15	Fol Rubi 1:20	ERI1_1 R	ERI1_2 R	ERI1_3 R	ERI1_4 R	ERI1_5 R	ARI2_1 R	ARI2_2 R	ARI2_3 R	ARI2_4 R	ARI2_5 R
0,034134432	0,018814374	0,014724956	0,012939651	0,02336156	0,01268025	0,01788357	0,0240177	0,02462806	0,0180972	0,03089952	0,02061494	0,01542687	0,01050965
0,20	0,10	0,07	0,05										

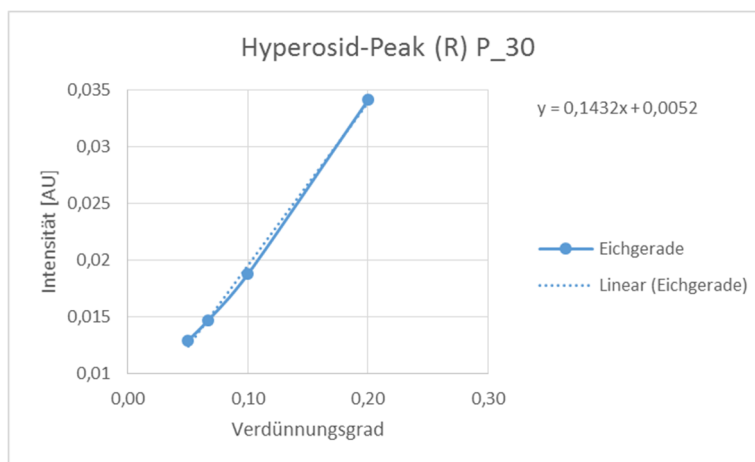


Abbildung 36: Platte 30 – Hyperosid-Peak (R); 1. Schritt der Auswertung

Da die Eichgerade nahezu linear ist, wurde diese Formel für die Berechnung des Verdünnungsgrades des Probenmaterials umgeformt, welche der Konzentration des vorhandenen Inhaltsstoffes, in diesem Fall des Hyperosids, entsprechen müsste.

$$y = 0,1432x + 0,0052$$

$$x = \frac{y - 0,0052}{0,1432}$$

Die mithilfe der Formel berechneten x-Werte wurden ebenfalls in das Diagramm mit der Eichgerade eingefügt (*Abbildung 37*).

Fol Rubi 1:5	Fol Rubi 1:10	Fol Rubi 1:15	Fol Rubi 1:20	ERI1_1 R	ERI1_2 R	ERI1_3 R	ERI1_4 R	ERI1_5 R	ARI2_1 R	ARI2_2 R	ARI2_3 R	ARI2_4 R	ARI2_5 R
0,03413443	0,01881437	0,01472496	0,01293965	0,02336156	0,01268025	0,01788357	0,0240177	0,02462806	0,0180972	0,03089952	0,02061494	0,01542687	0,01050965
0,2	0,1	0,07	0,05										
				0,12682655	0,05223636	0,08857244	0,13140852	0,13567082	0,09006425	0,17946592	0,10764622	0,0714167	0,03707857

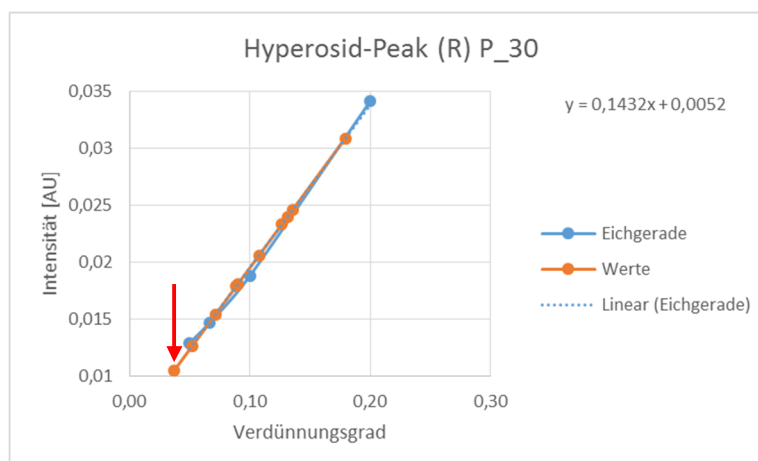


Abbildung 37: Platte 30 – Hyperosid-Peak (R); 2. Schritt der Auswertung

Somit lässt sich auf einen Blick erkennen, dass die Konzentration des Probenmaterials mit der Chargennummer ARI2_5 außerhalb der Eichgerade liegt, da der Konzentrationsbereich des Internen Standards von 0,05 – 0,2 reicht, und der errechnete Wert dieser Charge 0,037 beträgt.

Wie bereits erwähnt, wurden für weitere Analysen Werte außerhalb der Eichgerade nicht mit einbezogen, weil diese nur ungenaue Schätzwerte sind, da man keinen internen Standard mit der entsprechenden Konzentration eingesetzt hat, um diese genauer berechnen zu können.

Anhand dieser Berechnungen konnte für die 5 Peaks aller Chargen folgende Tabelle aller innerhalb der Eichgerade befindlicher Werte erstellt werden (*Tabelle 7*):

**Tabelle 7: Errechnete Konzentrationen bestimmter Peaks vom Probenmaterial von
Rubus idaeus L.**

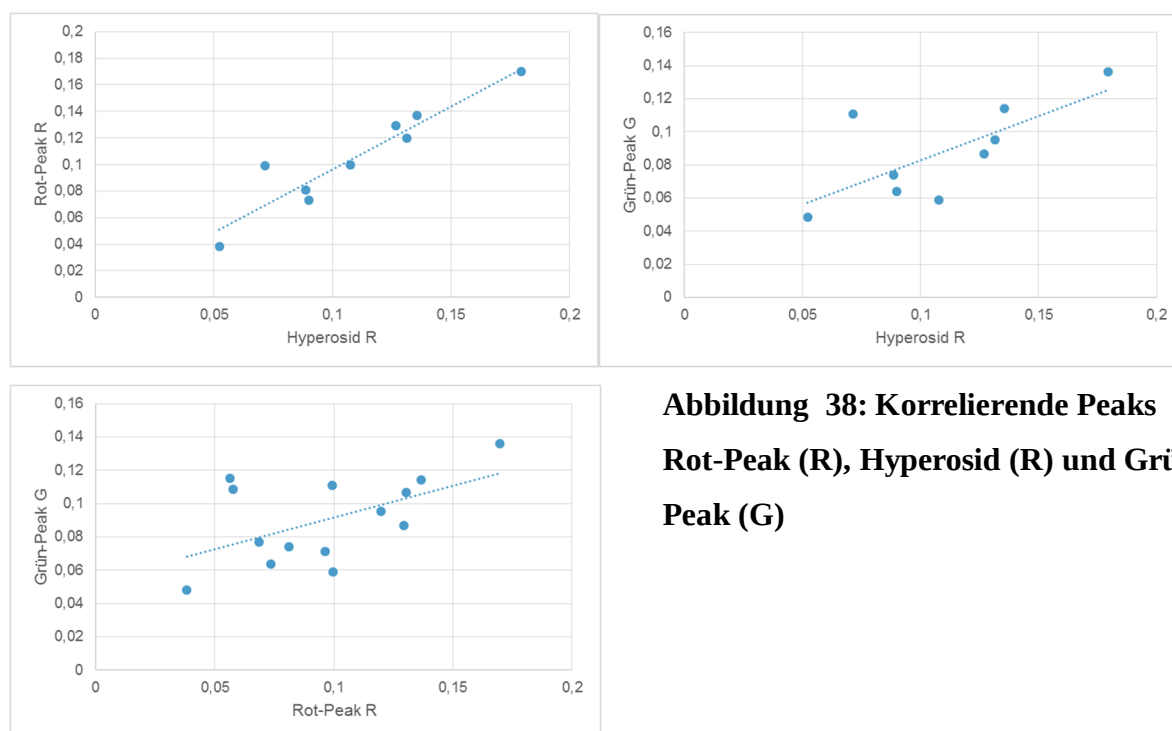
Charge	Hyperosid (R)	Rot-Peak (R)	Grün-Peak (G)	Kaffeesäure(B)	Blau-Peak (B)
ERI1_1	0,126826554	0,129442378	0,086745145	0,081857831	0,118103711
ERI1_2	0,052236363	0,038267352	0,048157035	0,065800605	0,056467153
ERI1_3	0,088572442	0,080979977	0,074093305	0,07241409	0,119045626
ERI1_4	0,131408523	0,119838355	0,095330321	0,066345161	0,111569176
ERI1_5	0,135670819	0,136708578	0,113991784	0,088012743	0,096734016
ARI2_1	0,090064246	0,07333467	0,063791093	0,055568692	0,065297605
ARI2_2	0,179465917	0,169753996	0,136132503	0,055368066	0,124402767
ARI2_3	0,107646219	0,099556177	0,058865913	0,061881238	0,089669654
ARI2_4	0,071416698	0,099240256	0,11096438	0,061028578	0,125521291
ARI1_1			0,092668464		0,083516752
ARI1_2			0,081423519		0,077804536
ARI1_3		0,130306855	0,106494216		0,076164919
ARI1_4		0,057620298	0,108383736		0,113981905
ARI1_5		0,05614742	0,115250526		0,088911623
ARI1_6		0,096430648	0,071238548		0,081718462
ARI1_7		0,068372312	0,076676677		0,059081161
BRI1_1					0,05606638
BRI1_2			0,052251182		0,063523996
BRI1_3					0,05606638
RUBU003_1	0,15				
RUBU003_1	0,053466474				
CRI2_1	0,175813586		0,063248247		
CRI2_2	0,138697046				0,088250669
CRI2_3	0,114738222				0,069982826
CRI2_4	0,099223901				0,07585168
ARI3_1			0,065833894		0,061268686
ARI3_2	0,097147787	0,086157587	0,110085596		0,119428073
ARI3_3					0,100276124
ARI3_4	0,056088775		0,0644325		0,101370521
CRI1_1	0,059224191	0,060809049			0,058689036
CRI1_2	0,053102665		0,069445178		0,068147753
CRI1_3			0,050310763		0,057516468
CRI1_4	0,058179052				0,054858646

4.2.3.3. Korrelation der erhaltenen Daten

Zwar ist der erhaltene Datensatz relativ klein und lückenhaft, dennoch wollte ich auf die Frage ob eine Variabilität der sekundären Inhaltsstoffe bei unseren gesammelten Individuen vorliegt und inwiefern diese Variabilität auf ökogeographische Einflussfaktoren zurückzuführen ist genauer eingehen und damit auf die ursprüngliche Thematik Bezug nehmen.

Daher wurden erstens einzelne Peaks miteinander, zweitens mit der Seehöhe und drittens mit der Jahresdurchschnittstemperatur und der jährlichen durchschnittlichen Niederschlagsmenge in Korrelation gesetzt.

Der Vergleich einzelner Peaks miteinander, ergab eine Korrelation zwischen dem Rot-Peak (R), Hyperosid-Peak (R) und Grün-Peak (G) (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Korrelierende Peaks
Rot-Peak (R), Hyperosid (R) und Grün-
Peak (G)**

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Substanzen welche im Chromatogramm den Rot-Peak (R) und den Grün-Peak (G) erzeugen, sowie das Hyperosid (R), scheinbar eine Korrelation bezüglich der Konzentration aufweisen. Somit kommt man zu der Annahme, dass die Konzentration dieser Peaks in einem linearen Zusammenhang zueinander steht, d.h. wenn die Pflanzen mehr Hyperosid erzeugen, produzieren sie gleichzeitig auch mehr von den beiden anderen Inhaltsstoffen welche den Rot-Peak (R) und den Grün-Peak (G) hervorbringen.

Der Vergleich einzelner Peaks mit der Seehöhe des Standortes ergab leider keine eindeutig ersichtliche Korrelation (*Abbildung 39*). Bei dem Anlegen einer linearen Trendlinie an die einzelnen Punkte lässt sich zwar ein minimaler Trend erkennen, jedoch wird bereits durch einen Blick auf die Grafik ersichtlich, dass die Daten nicht in Korrelation gesetzt werden können. Es liegt eine zu große Streuung der Daten vor, sowohl in tieferen, als auch höheren Höhenlagen sind vollkommen unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Inhaltsstoffe vorzufinden, somit lässt sich keine Korrelation zwischen der Konzentration und der Höhenlage an diesen Proben erkennen.

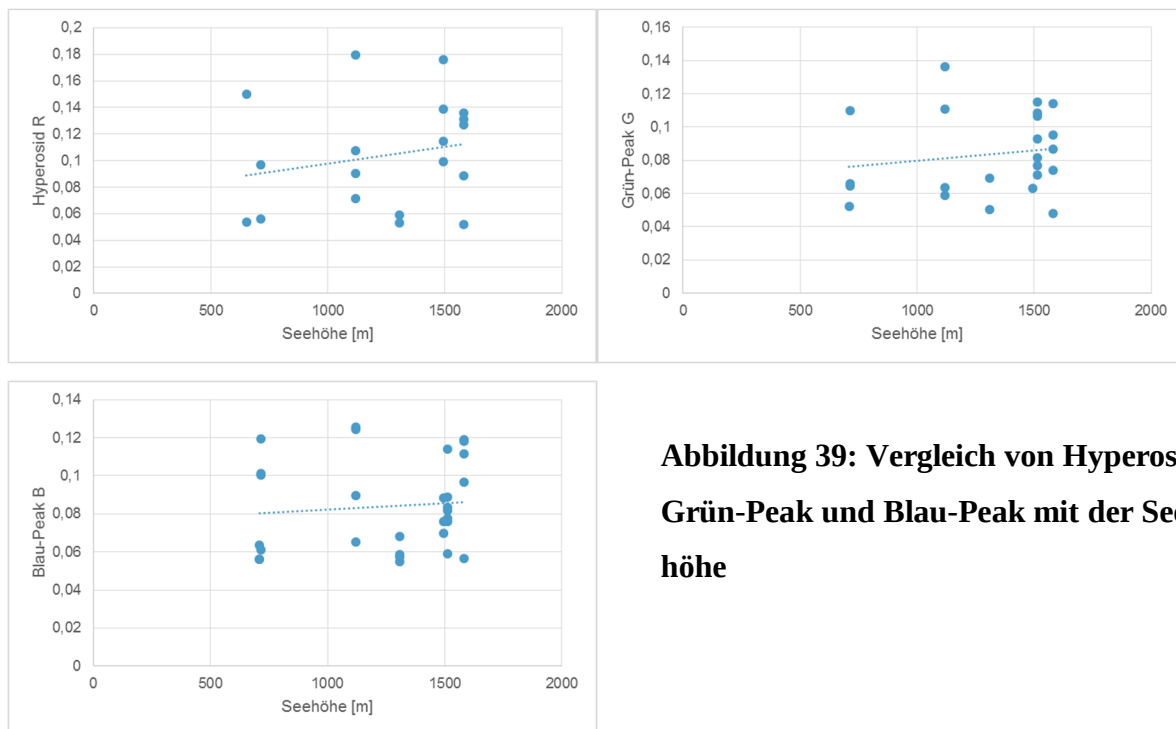


Abbildung 39: Vergleich von Hyperosid, Grün-Peak und Blau-Peak mit der Seehöhe

Der Vergleich einzelner Peaks mit der Jahresdurchschnittstemperatur und der jährlichen durchschnittlichen Niederschlagsmenge erfolgte basierend auf den Klimadiagrammen des IPCC (Intergovernmental panel on climate change) für den Zeitraum 1960-1990. Die Daten beziehen sich auf die Gegend in der die Pflanze gesammelt wurde und stimmen nicht mit den genauen GPS-Koordinaten des Sammelortes überein.

Bei dem Vergleich dieser Daten lässt sich jedoch auch keine Korrelation erkennen, da trotz relativ gleicher Witterungsbedingungen die Konzentration der einzelnen Inhaltsstoffe stark schwankt und aus den Datenpunkten kein Trend ersichtlich wird (*Abbildung 40*).

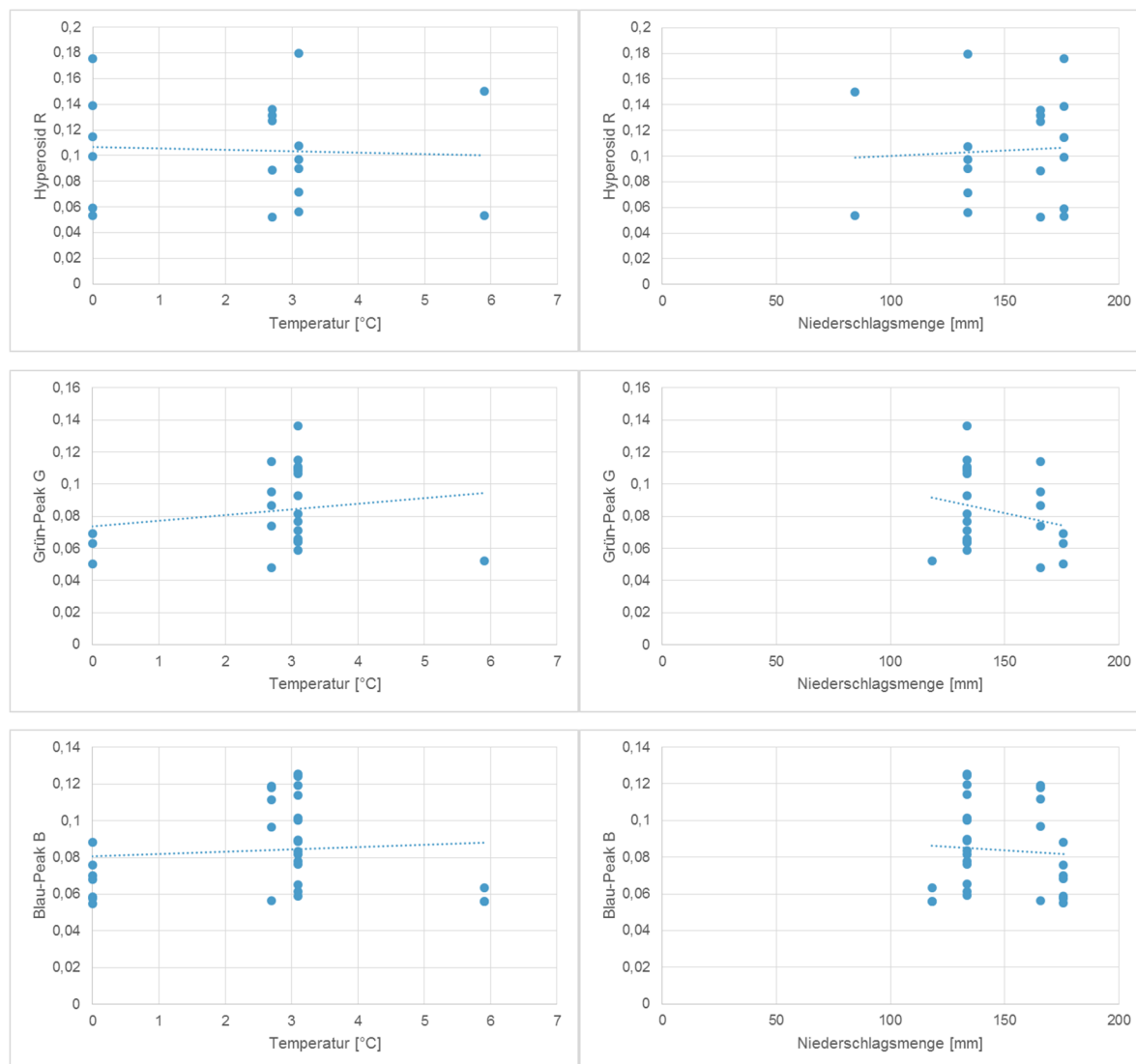


Abbildung 40: Vergleich von Hyperosid, Grün-Peak und Blau-Peak mit der Jahresdurchschnittstemperatur und der jährlichen durchschnittlichen Niederschlagsmenge⁴

5. Diskussion

5.1. Anwendbarkeit der Infrarotspektroskopie bei ökogeographischen Studien

Wie bereits von Roggo et al. (2007) gezeigt wurde, kann als mögliche qualitative Analyse-methode für erhaltene IR-Spektren, u.a. entweder eine „nichtüberwachte Klassifizierungsmethode“ wie z.B. die Hauptkomponentenanalyse, oder eine „überwachte Klassifizierungsmethode“ wie z.B. die Diskriminanzanalyse durchgeführt werden.

Die Hauptkomponentenanalyse ermöglicht die Reduktion der Dimensionen des Datensatzes, und gleichzeitig eine neue, vereinfachte Darstellung der nun unkorrelierten Daten. Diese Methode hat den Vorteil, dass sich neue Zusammenhänge in den Daten mithilfe von neuen Gesichtspunkten, welche jedoch die „Richtung“ der ursprünglichen Daten beibehalten haben, erkennen lassen. Somit ist sie dafür geeignet komplexe Datensätze, z.B. viele Wellenzahlen des IR-Spektrums eines Probenmaterials zu strukturieren und zu veranschaulichen.

Die Diskriminanzanalyse ermöglicht eine Differenzierung der Daten. Voraussetzung hierfür ist, dass bereits ein Datensatz als Referenz vorliegt, welche gewisse „Eckpunkte“ für diese Differenzierung vorgibt. Diese Methode ist z.B. dafür geeignet, unbekanntes Pflanzenmaterial zu identifizieren, unter der Voraussetzung, dass zuvor Daten von bekanntem Material erhoben wurden, welche gewisse „Eckpunkte“ für die Analyse vorzugeben haben (Roggo et. al. 2007).

Basierend auf diesen Erkenntnissen, kann auch meine Arbeit an der Annahme anknüpfen, dass sich beide Verfahren hervorragend koppeln lassen, wie man anhand der Ergebnisse der Versuche an *Fragaria vesca* L., *Fragaria moschata* L., und *Fragaria viridis* L. (Kapitel 4.1.1.) erkennen kann.

5.2. Anwendbarkeit der HPTLC bei Ökogeographischen Studien

Die Arbeit von Ambühl R. (2011), bei welcher die Flavonoid-Komponenten von 6 Pflanzenarten anhand von 246 Proben mittels HPTLC untersucht wurden, hat bereits gezeigt, dass die visuelle Interpretation der HPTLC-Chromatogramme, sowie die Identifikation über Peakfläche und Peakhöhe allein für eine Unterscheidung einzelner Individuen nicht ausreichend war. Die Autorin nannte eine natürliche Schwankung der sekundären Inhaltsstoffe als mögliche Ursache. In dieser Studie wurden jedoch weitere Methoden für die Ergebnisse der HPTLC angewandt, eine Hauptkomponentenanalyse in Verbindung mit einer multivariaten Varianzanalyse. Mit diesen Methoden wurde ein möglicher Ansatz für die Unterscheidung einzelner Individuen aufgrund ihrer HPTLC-Fingerprints erschaffen, jedoch bei weitem nicht mit ausreichender Spezifität um unbekanntes Material anhand von HPTLC eindeutig identifizieren zu können. (Ambühl R. 2011)

Dies bestätigt die Annahme, dass selbst wenn die Methoden bestmöglich optimiert wurden, der Gehalt an sekundären Inhaltsstoffen natürlichen Schwankungen unterliegt. Dies untermauert diverse Probleme die sich auch bei meiner Arbeit bei der Auswertung der HPTLC-Messungen ergeben haben, z.B. dass keine Korrelation zwischen den Peaks und äußeren Einflussfaktoren gefunden werden konnte.

Somit steht noch offen, ob für ökogeografische Studien weitere Faktoren, welche bei meinen Versuchen nicht mit einbezogen wurden, eventuell beachtet werden müssten. Somit ließen sich ebenfalls Tabellen mit anderen Einflussfaktoren erstellen und analysieren, basierend auf der Quantifizierung mittels mithilfe interner Standards erstellten Eichgeraden.

Eine mögliche Fragestellung für zukünftige Arbeiten welche sich mit der Methodenfindung für ökogeographische Studien befassen, wäre die Ergebnisse einer Analyse desselben Datensatzes mittels IR und HPTLC zu vergleichen und eventuell vorhandene Parallelen aufzuweisen. Ließen sich die Daten beider Analyseverfahren auf derselben Skala erfassen, würde das eine Vielzahl neu erworbener Informationen liefern. Dies würde für die Zukunft völlig neue Möglichkeiten für die Identifikation bzw. Analyse pflanzlichen Materials bieten.

6. Zusammenfassung

Sowohl die Infrarotspektroskopie, als auch die HPTLC bieten vielversprechende Verfahren für die Erstellung ökogeographischer Studien.

Die Infrarotspektroskopie bietet eine gute Möglichkeit, Pflanzensysteme mithilfe von computergestützten mathematischen Auswertungsverfahren (Hauptkomponentenanalyse, Diskriminanzanalyse), zu differenzieren und im Idealfall bestimmten Arten zuzuordnen.

Beide Verfahren lassen sich für solche Analysen hervorragend koppeln, um in diesem Fall makroskopisch identifiziertes Pflanzenmaterial, mittels Hauptkomponentenanalyse zu gruppieren und anschließend makro- bzw. mikroskopisch nicht identifizierbares Pflanzenmaterial z.B. derselben Gattung mithilfe der Diskriminanzanalyse – basierend auf den „Eckpunkten“ des Ergebnisses der Hauptkomponentenanalyse – mit großer Wahrscheinlichkeit zu identifizieren.

Mittels HPTLC ergibt sich eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber diversen anderen Verfahren, u.a. die Möglichkeit größten Teils automatisiert, wiederholbar gleichmäßig aussehende DCs herzustellen, welche mithilfe der computergestützten Auswertungsverfahren mit einer Vielzahl von Analysemöglichkeiten ausgewertet werden können.

Meine Arbeit hat gezeigt, welche Extraktionsmethoden eine optimale Darstellung der Pflanzensysteme *Urtica dioica* L. und *Rubus idaeus* L. bei einer HPTLC ermöglichen. Für das breiteste Inhaltsstoffspektrum empfiehlt sich die Extraktion mittels eines Lösungsmittelgemisches aus DCM: Methanol: Wasser (50:40:10). Bei Raumtemperaturen über ca. 24°C ist eine Extraktion mit reinem Methanol empfehlenswert, da dies das weniger flüchtige Extraktionsmittel darstellt. Hierbei muss man gegenüber der Extraktion mit dem Lösungsmittelgemisch ein geringeres Wirkstoffspektrum in Kauf nehmen.

Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass eine Entwicklung mit einer Verdünnungsreihe eines internen Standards eine Quantifizierung ermöglicht und die Konzentrationen einzelner Substanzen mit diversen Einflussfaktoren wie z.B. Seehöhe, Jahresdurchschnittstemperatur, bzw. mit anderen Substanzpeaks von anderen auf gleiche Weise entwickelten HPTLC-Platten untereinander vergleichbar macht. Damit ergibt sich eine optimale Möglichkeit, mehrere Platten untereinander vergleichen zu können.

7. Summary

Both Infrared spectroscopy and HPTLC offer an excellent option for the creation of ecogeographical studies.

IR makes it possible to distinguish different plant species, based on computerised mathematical interpretation methods (such as Principal Component Analysis and Discriminant Function Analysis), and under ideal conditions, attach them to known plant species.

Both methods can be combined well for such analyses, as on the one hand, grouping macroscopically identified plants by PCA, and on the other hand identify macroscopically and microscopically unidentifiable material of the same herbal genus by DFA, based on the vertices yielded by the outcomes of prior PCA.

Via HPTLC many advantages occur over diverse other methods, such as the possibility to produce automated, repeatable constant looking TLCs, which can be analysed based on many computer assisted interpretational methods.

In the first place the results of my work are optimizing the extraction methods for the plant species *Urtica dioica* L. and *Rubus idaeus* L. for HPTLC. The greatest diversity of secondary metabolites results of an extraction with a solvent mixture of Dichloromethane, Methanol and Water (50:40:10). At room temperatures above 24°C the extraction with Methanol becomes recommendable, because it is less volatile than the solvent mixture. One only has to put up with the disadvantage of getting a minor diversity of secondary metabolites.

It could also be proven, that the evaluation with a serial dilution of an internal standard enables a quantification, and makes it possible to compare the concentration of the analysed substances with many parameters, such as sea level, average temperature, or other substance peaks from other equally developed HPTLC plates. Therefore this is an ideal method for comparing a broad range of HPTLC plates.

8. Literaturverzeichnis

Bücher und Publikationen

Dr. Bohm B.A. (2009), The Geography of Phytochemical Races, Springer Science + Business Media B.V.

Europäisches Arzneibuch 2011, 7. Ausgabe, Grundwerk 2011, Verlag Österreich GmbH

Deutscher Arzneimittel Codex /Neues Rezeptur-Formularium 2007, Govi Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart

Deutscher Arzneimittel Codex/Neues Rezeptur-Formularium 2013, Govi Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart

Österreichisches Arzneibuch 2014, Amtliche Ausgabe 2014, Verlag Österreich GmbH, Wien

Schönfelder I., Schönfelder P., (2010), Der Kosmos Heilpflanzenführer, Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart

Wichtl M., Bauer R., Blaschek W., Buff W., Hiller K., Lichius J.J., Löw D., Stahl-Biskup E., Teuscher E., (2009), Teedrogen und Phytopharmaka, Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftliche Grundlage, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Teuscher E., Melzig M.F., Lindequist U., (2004), Biogene Arzneimittel, Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Eggenberg S., Möhl A., (2009), Flora Vegetativa, Ein Bestimmungsbuch für Pflanzen der Schweiz im blütenlosen Zustand, 2. Auflage, Haupt Verlag, Bern, Stuttgart, Wien

Fischer M. A., Oswald K., Adler W., (2008), Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein, Südtirol, 3. Auflage, Linz: Land Oberösterreich, Biologizentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen

Krajšek S.S., Buh P., Zegac A., Kreft S. (2008), Identification of Herbarium Whole-Leaf Samples of *Epilobium* Species by ATR-IR Spectroscopy, Chemistry and Biodiversity, Vol.5: S. 310-317

Potter D., Luby J.J., Harrison R.E. (2000), Phylogenetic Relationships among Species of *Fragaria* (Rosaceae) Inferred from Non-Coding Nuclear and Chloroplast DNA Sequences, Systematic Botany, Vol. 25, Nr.2, S. 342

Reich E., Schibli A., (2007), High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medical Plants, Thieme Medical Publishers, Inc., New York

Roggo Y., Chalus P., Maurer L., Lema-Martinez C., Edmond A., Jent N. (2007), A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44, S. 683-700

Ambühl R. (2011), Pattern Recognition in HPTLC-Fingerprints of Medicinal Plants, Institute of Pharmaceutical Biology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel, Switzerland

Internet-Quellen

1. [http://www.ioc.uni-karlsruhe.de/downloads/Spektroskopie/IR Spektren Tabellen Okt09.pdf](http://www.ioc.uni-karlsruhe.de/downloads/Spektroskopie/IR_Spektren_Tabellen_Okt09.pdf) (14.07.2014)
2. http://www.google.at/url?sa=t&rct=j&q=&resrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0CDgQFjAG&url=http%3A%2F%2Fwww.ru.nl%2Fpublish%2Fpages%2F609550%2Fbruker-tensor-ftir-instructions.pdf&ei=DdnEU9GyGayB7Qagx4CgAQ&usg=AFQjCNGkjhH-UYhBAAtBcPAtDyLo2_bCQwA&bvm=bv.70810081,d.ZWU (15.07.2014)
3. http://www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/software/new_visioncats.cfm (12.08.2014)
4. <http://www.mappedplanet.com/klima/> (13.10.2014)

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 eine Meldung bei mir.

9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Beispiel für ein Individuum des Probenmaterials
- Abbildung 2: Blatt von *Fragaria vesca* L., *Fragaria moschata* L., *Fragaria viridis* L. (von links nach rechts), aus dem gepressten Vergleichsmaterial
- Abbildung 3: Das elektromagnetische Spektrum
- Abbildung 4: Vermessung der Proben im IR
- Abbildung 5: HPTLC-Geräte und Software von der Firma Camag (www.camag.com)
- Abbildung 6: DeepWell Platte (links) und Falcon Tubes (rechts)
- Abbildung 7: von links nach rechts: Folium *Fragaria* extrahiert mit DCM, MeOH, LM; Folium *Rubi idaei* extrahiert mit DCM, MeOH, LM; Entwicklung mittels Flavonoid-Methode
- Abbildung 8: Methoden Screening nach Camag und Arzneibuch mit *Urticae folium*, Postderivatized UV366
- Abbildung 9: Methoden Screening nach Camag und Arzneibuch mit *Rubi idaei folium*, Postderivatized UV366
- Abbildung 10: Methoden Screening nach Camag und Arzneibuch mit *Plantaginis lanceolatae folium*, Postderivatized UV366
- Abbildung 11: Methoden Screening nach Camag mit *Fragariae folium*, Postderivatized UV366
- Abbildung 12: Methoden Screening nach Camag mit *Fragaria vesca* L.
- Abbildung 13: Mittelwert der Spektren von 49 Individuen des Untersuchungsmaterials von *Urtica dioica* L.
- Abbildung 14: Mittelwert der Spektren von 47 Individuen des Untersuchungsmaterials von *Rubus idaeus* L.
- Abbildung 15: Stammbaum von *Fragaria* sp. (Potter et al. 2000)
- Abbildung 16: Hauptkomponentenanalyse der Blattoberseite des identifizierten Vergleichsmaterials
- Abbildung 17: Hauptkomponentenanalyse der Blattoberseite des Untersuchungsmaterials von *Fragaria* sp.
- Abbildung 18: Diskriminanzanalyse der Blattoberseite des Untersuchungsmaterials von *Fragaria* sp.

Abbildung 19: Beispiele für ungleichmäßige Banden; Interner Standard *Urticae folium* 1:5; Interner Standard *Urticae folium* 1:10, ADU3_4, CDU2_4 (von links nach rechts), Postderivatized UV366

Abbildung 20: Platte 21 – 15 idente Extrakte aus *Urticae folium*, Postderivatized UV366

Abbildung 21: Platte 21 – Chromatogramm der Rohdaten der grünen Farbintensitäten aller 15 Bahnen

Abbildung 22: Platte 21 - Chromatogramm der ppm-normierten Daten der grünen Farbintensitäten aller 15 Bahnen

Abbildung 23: Platte 21 – Chromatogramm der vektornormierten Daten der grünen Intensitäten aller 15 Bahnen (Werte der Intensität = tatsächlicher Wert + 1)

Abbildung 24: Schematische Darstellung einer HPTLC-Platte mit Vergleichs- und Untersuchungsmaterial

Abbildung 25: Platte 15 - Vergleich von Rohdaten, ppm-Normierung und Vektornormierung, berechnet über Peakhöhe vs. Peakfläche, vom Peak des grünen Intensitätsspektrums

Abbildung 26: Platte 15 - Vergleich von Rohdaten, ppm-Normierung und Vektornormierung, berechnet über die Peakhöhe der Farbintensitäten von rot, grün und blau

Abbildung 27: Vergleich von Farbstoff und *Urticae folium* in verschiedenen Lösungsmitteln bei unterschiedlicher Applikationsdauer, UV366nm

Abbildung 28: Platte 15, Postderivatized UV366nm

Abbildung 29: Platte 15 – Konzentration von Eichgerade und Untersuchungsmaterial im Vergleich

Abbildung 30: Platte 32 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der roten Farbintensität, Postderivatized UV366nm

Abbildung 31: Platte 32 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der roten Farbintensität, Spektrum der roten Farbintensität

Abbildung 32: Platte 31 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der grünen Farbintensität, Postderivatized UV366nm

Abbildung 33: Platte 31 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der grünen Farbintensität, Spektrum der grünen Farbintensität

Abbildung 34: Platte 30 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der blauen Farbintensität, Postderivatized UV366nm

Abbildung 35: Platte 30 – Ausgewählte Banden zur Auswertung der blauen Farbintensität, Spektrum der blauen Farbintensität

Abbildung 36: Platte 30 – Hyperosid-Peak (R); 1. Schritt der Auswertung

Abbildung 37: Platte 30 – Hyperosid-Peak (R); 2. Schritt der Auswertung

Abbildung 38: Korrelierende Peaks Rot-Peak (R), Hyperosid (R) und Grün-Peak (G)

Abbildung 39: Vergleich von Hyperosid, Grün-Peak und Blau-Peak mit der Seehöhe

Abbildung 40: Vergleich von Hyperosid, Grün-Peak und Blau-Peak mit der
Jahresdurchschnittstemperatur und der jährlichen durchschnittlichen
Niederschlagsmenge⁴

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Makroskopische Unterschiede bei der Gattung *Fragaria*

Tabelle 2: Elutrope Reihe der reinen Lösungsmittel auf Kieselgel

Tabelle 3: Methodenscreening

Tabelle 4: Methodenscreening

Tabelle 5: Vergleich der Daten im Neuzustand vs. im aktuellen Zustand des Gerätes, am Beispiel eines Peaks des grünen Farbspektrums

Tabelle 6: Variationskoeffizienten von Rohdaten, ppm-normierten Daten und vektornormierten Daten

Tabelle 7: Errechnete Konzentrationen bestimmter Peaks vom Probenmaterial von *Rubus idaeus* L.

Anhänge

11.1. Untersuchungsmaterial: Herkunft und Daten

Tabelle 1. Untersuchungsmaterial									
Standort	Datum	Art	Chargennummer	Koordinaten	Seehöhe	Uhrzeit	Boden	Ökologie	Individuen
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Urtica dioica	ADu1	47°16.145'/10°23.257'	1470	11:37		Ortschaft / Wiese / Straßenrand	6
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Urtica dioica	ADu2	47°44.079'/14°54.491'	1120	14:24		Gebirge / Waldrand / Straßenrand	3
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Urtica dioica	ADu3	47°44.859'/14°54.752'	728	15:01		Waldlichtung	5
Fuschel am See (S)	18.07.2013	Urtica dioica	BDu1	47°48.244'/13°18.001'	716	11:35		Ortschaft / Wiese / Straßenrand	4
Mund (CH)	31.07.2013	Urtica dioica	CDu1	46°19.116'/7°56.465'	1342	17:30		Ortschaft / Wiese / Straßenrand	5
Mund (CH)	31.07.2013	Urtica dioica	CDu2	46°19.041'/7°55.038'	1569	18:55		Ortschaft / Waldrand / Straßenrand	4
Furkapass (CH)	02.08.2013	Urtica dioica	EDu1	46°18.885'/7°56.554'	948	17:59		Ortschaft / Wiese / Straßenrand	5
Furkapass (CH)	02.08.2013	Urtica dioica	EDu2	46°35.406'/8°29.175'	1856	20:00		Gebirge / Wiese / Straßenrand	4
Rax (ST)	26.07.2013	Urtica dioica	URT001	N47 42.731 E15 45.711	1664	13:16	Karbonat	Weiderasen / Ränder der Latchengebüsche	4
Rax (ST)	26.07.2013	Urtica dioica	URT002	N47 42.461 E15 46.427	1026	14:47	Karbonat	Waldschlag	5
Rax (ST)	26.07.2013	Urtica dioica	URT003	N47 41.967 E15 48.853	567	15:59	Karbonat	Mähwiese	4
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Rubus idaeus	ARI1	47°43.242'/14°55.302'	1513	13:07	Karbonat	Forststrassenränder	7
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Rubus idaeus	ARI2	47°44.082'/14°54.489'	1120	14:23		Gebirge / Waldrand / Straßenrand	5
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Rubus idaeus	ARI3	47°44.853'/14°54.761'	714	15:33		Gebirge / Waldrand	5
Fuschel am See (S)	18.07.2013	Rubus idaeus	BRI1	47°47.976'/13°18.296'	709	10:13		neben Ortschaft / Wiese / Waldrand	3
Mund (CH)	31.07.2013	Rubus idaeus	CRI1	46°18.964'/7°56.246'	1308	17:15		Ortschaft / Wiese / Straßenrand	4
Mund (CH)	31.07.2013	Rubus idaeus	CRI2	46°18.986'/7°55.552'	1495	18:11		Ortschaft / Wiese / Straßenrand	4
Furkapass (CH)	02.08.2013	Rubus idaeus	ERI1	46°31.420'/8°20.203'	1581	19:21		Acker / Straßenrand	5
Rax (ST)	26.07.2013	Rubus idaeus	RUBU001	N47 42.731 E15 45.711	1664	13:16	Karbonat	Weiderasen / Ränder der Latchengebüsche	5
Rax (ST)	26.07.2013	Rubus idaeus	RUBU002	N47 42.461 E15 46.427	1026	14:47	Karbonat	Waldschlag	5
Rax (ST)	26.07.2013	Rubus idaeus	RUBU003	N47 41.972 E15 48.450	653	15:47	Karbonat	Mähwiese	4
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Plantago lanceolata	API1	47°44.885'/14°54.643'	708	15:43		Gebirge / Waldrand	5
Fuschel am See (S)	18.07.2013	Plantago lanceolata	BPI1	47°47.832'/13°17.984'	665	11:53		Ortschaft / Garten	5
Mund (CH)	31.07.2013	Plantago lanceolata	CPI1	46°18.953'/7°56.226'	1305	17:08		Wiese / Straßenrand	5
Mund (CH)	31.07.2013	Plantago lanceolata	CPI2	46°18.983'/7°55.590'	1489	18:08		Wiese / Straßenrand	4
Furkapass (CH)	02.08.2013	Plantago lanceolata	EPI1	46°18.885'/7°56.554'	947	17:53		Ortschaft / Straßenrand	4
Hochstaff (NÖ)	21.07.2013	Plantago lanceolata	PLAN001	N47 58.012 E15 41.179	1139	11:34	Karbonat	Weiderasen	5
Hochstaff (NÖ)	21.07.2013	Plantago lanceolata	PLAN002	N47 59.239 E15 42.307	907	13:06	Karbonat	Mähwiese	7
Hochstaff (NÖ)	21.07.2013	Plantago lanceolata	PLAN003	N47 59.356 E15 44.823	459	13:21	Karbonat	Mähwiese	5
Rax (ST)	26.07.2013	Plantago lanceolata	PLAN004	N47 42.173 E15 47.362	820	15:22	Karbonat	Mähwiese	5
Rax (ST)	26.07.2013	Plantago lanceolata	PLAN005	N47 41.932 E15 48.720	597	15:54	Karbonat	Mähwiese	5
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Fragaria vesca	AFv1	47°43.242'/14°55.302'	1514	13:08	Karbonat	Weiderasen / Forststrassenränder	4
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Fragaria vesca	AFv2	47°44.076'/14°54.488'	1120	14:23		Gebirge / Waldrand / Straßenrand	7
Hochkar (NÖ)	14.07.2013	Fragaria vesca	AFv3	47°44.847'/14°54.750'	728	15:19		Gebirge / Waldrand	5
Fuschel am See (S)	18.07.2013	Fragaria vesca	BFv1	47°47.973'/13°18.335'	679	10:09		neben Ortschaft / Wiese / Waldrand	3
Mund (CH)	31.07.2013	Fragaria vesca	CFv1	46°18.956'/7°56.230'	1305	17:09		Ortschaft / Wiese / Straßenrand	5
Mund (CH)	31.07.2013	Fragaria vesca	CFv2	46°19.042'/7°55.039'	1569	18:55		Ortschaft / Waldrand / Straßenrand	5
Kleiner Goller (NÖ)	07.07.2013	Fragaria vesca	FRAG001	N47 48.778 E15 32.487	702	11:31	Karbonat	Bachufer / Laubmischwald	5
Kleiner Goller (NÖ)	07.07.2013	Fragaria vesca	FRAG002	N47 48.414 E15 32.322	960	12:28	Karbonat	Lärchen-Fichten-Rotföhrenwald mit Sesleria varia	5
Kleiner Goller (NÖ)	07.07.2013	Fragaria vesca	FRAG003	N47 48.134 E15 31.988	1143	13:13	Karbonat	Nadel-Mischwald	5
Kleiner Goller (NÖ)	07.07.2013	Fragaria vesca	FRAG004	N47 47.931 E15 31.153	1445	14:27	Karbonat	Weiderasen	5
Kleiner Goller (NÖ)	07.07.2013	Fragaria vesca	FRAG005	N47 47.652 E15 30.435	1577	15:44	Karbonat	Latschengebüsch	5
Rax (ST)	26.07.2013	Fragaria vesca	FRAG006	N47 42.731 E15 45.711	1664	13:16	Karbonat	Weiderasen / Ränder der Latchengebüsche	2
Rax (ST)	26.07.2013	Fragaria vesca	FRAG007	N47 42.461 E15 46.427	1026	14:47	Karbonat	Waldschlag	1
Payerbach (NÖ)	26.07.2013	Fragaria vesca	FRAG008	N47 41.488 E15 51.409	479	17:25		Wald- / Wegränder	5

11.2. Vergleichsmaterial: Herkunft und Daten

Tabelle 2.1. Vergleichsmaterial						
Standort	Datum	Art	Chargennummer	genauer Sammelort		
Laab im Wald	08.05.2014	<i>Fragaria vesca</i>	LWVE	Westrand		
Hermannskogel	09.05.2014	<i>Fragaria vesca</i>	HEVE	Südseite		
Maria Dreieichen	18.05.2014	<i>Fragaria vesca</i>	MDVE			
Steinegg	18.05.2014	<i>Fragaria vesca</i>	STVE			
Laab im Wald (NÖ)	07.05.2014	<i>Fragaria moschata</i>	LWMO	Forststraße, in Fortsetzung der Mauerwaldgasse		
Maria Dreieichen	18.05.2014	<i>Fragaria moschata</i>	MDMO			
Steinegg	18.05.2014	<i>Fragaria moschata</i>	STMO			
Laab im Wald	08.05.2014	<i>Fragaria viridis</i>	LWVI	Westrand		
Salmansdorf (W)	09.05.2014	<i>Fragaria viridis</i>	SAVI	Häuserl am Roan		
Maria Dreieichen	18.05.2014	<i>Fragaria viridis</i>	MDVI			
Steinegg	18.05.2014	<i>Fragaria viridis</i>	STVI			
Altenburg	18.05.2014	<i>Fragaria viridis</i>	ABVI	Burgenwiese		
Steinegg	18.05.2014	<i>Potentilla rupestris</i>	STPR			
Steinegg	18.05.2014	<i>Plantago lanceolata</i>	STPL			
Steinegg	18.05.2014	<i>Plantago altissima</i>	STPA			

Tabelle 2.2. Vergleichsmaterial						
Bezeichnung	Deutsche Bezeichnung	Art	Firma	Chargennummer	Ablaufdatum	
FOLIUM URTICAE CS	Brennnesselblatt, geschnitten, nach PhE	<i>Urtica dioica</i> L., <i>Urtica urens</i> L.	Kottas Pharma	P13301691	31.10.2015	
FOLIUM RUBI IDAEI CS	Himbeerblatt, geschnitten, nach DAC	<i>Rubus idaeus</i> L.	Kottas Pharma	W13203216	30.04.2015	
FOLIUM PLANTAGINIS LANCEOLAT.	Spitzweigerichblatt, geschnitten, nach PhE	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Kottas Pharma	W13204076	28.02.2016	
FOLIUM FRAGARIAE CS	Erdbeerblatt, geschnitten, nach DAC	<i>Fragaria vesca</i> L., <i>Fragaria moschata</i> WESTON, <i>Fragaria viridis</i> WESTON, <i>Fragaria x ananassa</i> (WESTON) DUSCHESNE EX ROZIER und sowie Hybriden mit anderen <i>Fragaria</i> -Arten	Kottas Pharma	W13204318	31.10.2016	

11.3. HPTLC - Detektionsreagentien und –Verfahren laut Camag

Detektionsreagens	Zusammensetzung	Dektionsverfahren
Anisaldehyd-Reagens	10ml konzentrierte Schwefelsäure 170ml Methanol 20ml konzentrierte Essigsäure 1ml Anisaldehyd	Platte für 1 sec in das Reagens tauchen, anschließend 2-5 min auf 100°C erhitzen; Detektion bei Tageslicht und UV 366nm
Naturstoff-Reagens A	1g Diphenylborsäure-aminoethylester 200ml Ethylacetat	Platte für 3 min auf 100°C aufheizen, anschließend in das Reagens tauchen; Detektion bei UV 366nm
Ninhydrin-Reagens	0,6g Ninhydrin 190ml Isopropanol 10ml konzentrierte Essigsäure	Platte in das Reagens tauchen, anschließend 3 min auf 105°C erhitzen; Detektion bei Tageslicht

11.4. HPTLC - Fließmittel und Detektionsverfahren laut (abgewandelter) Arneibuchmethode

Untersuchungsmaterial	Fließmittel	Detektionsverfahren
Urticae folium (EuAB)	wasserfreie Ameisensäure R, Methanol R, Wasser R, Ethylacetat R (2,5:4:4:50 V/V/V/V)	Naturstoff-Reagens A in Ethylacetat; Platte für 3 min auf 100°C aufheizen, anschließend in das Reagens tauchen; Detektion bei UV 366nm
Rubi idaei folium (DAC)	Ethylacetat R, Wasser R, wasserfreie Ameisensäure R, Essigsäure 99% R (72:14:7:7 V/V/V/V)	Naturstoff-Reagens A in Ethylacetat; Platte für 3 min auf 100°C aufheizen, anschließend in das Reagens tauchen; Detektion bei UV 366nm
Plantaginis lanceolatae folium (EuAB)	Essigsäure 99% R, wasserfreie Ameisensäure R, Wasser R, Ethylacetat R (11:11:27:100 V/V/V/V)	Die Platte wird ohne Reagens unmittelbar nach der Entwicklung 5 bis 10min lang bei etwa 120°C erhitzt

HPTLC - Arbeitsprotokoll für *Urtica dioica* L.

10 Proben/Platte:

<u>Platte 1:</u>	<u>Platte 2:</u>	<u>Platte 3:</u>	<u>Platte 4:</u>	<u>Platte 5:</u>
CDU1_1 – 5	URTI2_1 – 5	EDU2_1 – 4	URTI3_1 – 4	BDU1_3 – 4
EDU1_1 – 5	ADU3_1 – 5	ADU1_1 – 6	CDU2_1 – 4	URTI1_1 – 4
			BDU1_1 – 2	ADU2_1 – 3

Bei jeder Platte:
 „Interner Standard“: Fol. Urticae

- 1 : 5
- 1 : 10
- 1 : 15
- 1 : 20

Referenz: 2mg Chlorogensäure in 10ml MeOH

Ablauf:

1. Je 200mg/Charge grob einwiegen
2. Chargen des Tages + 1g Folium Urticae pulverisieren
3. Genau 150mg/ Charge abwiegen und in Falcon tubes einfüllen
4. Zu jeder Charge 1,5ml LM (MeOH/DCM/H₂O, 40:50:10) dazugeben, durchmischen
5. Zu 1g Droge 5ml LM (MeOH/DCM/H₂O, 40:50:10) dazugeben
6. Am Ultraschallbad 10 Min. extrahieren
7. Durchmischen, erneut am Ultraschallbad 10 Min. extrahieren
8. **Verdünnungsreihe** erstellen!

Verdünnungsreihe – Interner Standard:

1 : 5 1g Droge + 5ml LM (wurden Extrahiert)	1 : 10 1ml 1:5-Verd. + 1ml LM	1 : 15 1ml 1:%-Verd. + 2ml LM	1 : 20 1ml 1:5-Verd + 3ml LM
--	--	--	---

9. Extrakt abpipettieren und über Watte filtrieren
10. In HPTLC-Vials füllen

HPTLC-Messung: auf 10cm x 20cm zugeschnittenen Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Fertigplatten der Firma Merck

- FM: Ameisensäure, MeOH, H₂O, Ethylacetat (2,5 : 4 : 4 : 50)
- Detektion: 3 Min. 100°C erhitzen, dann in Naturstoffreagens tauchen → UV 366nm

Probe_Charge 10
Probe_Charge 9
Probe_Charge 8
Probe_Charge 7
Probe_Charge 6
Probe_Charge 5
Probe_Charge 4
Probe_Charge 3
Probe_Charge 2
Probe_Charge 1
Ref.: Chlorogensäure
Int. Standard 1:20
Int. Standard 1:15
Int. Standard 1:10
Int. Standard 1:5

11.7. Formel zur Berechnung der ppm-normierten Werte

(die sogenannte „100%-Methode“)

$$ai_{ppm-norm.} = \frac{ai}{\sum ai} \times 100$$

ai ... Wert der Intensität

$\sum ai$... Summe aller Intensitäten

11.8. Formel zur Berechnung der vektornormierten Werte

$$ai_{vektornorm.} = \frac{ai - \frac{\sum ai}{n}}{\sqrt{\sum ai^2}}$$

ai ... Wert der Intensität

$\sum ai$... Summe aller Intensitäten

n ... Zahl der vermessenen Intensitäten
(10001)

11.9. Formel zur Berechnung des Variationskoeffizienten

$$\text{Variationskoeffizient}_{a_{ix}} = \frac{\text{Standardabweichung}_{a_{ix}}}{\text{Mittelwert}_{a_{ix}}}$$

$\text{Standardabweichung}_{a_{ix}}$... Standardabweichung der Werte bei Intensität x

$\text{Mittelwert}_{a_{ix}}$... Mittelwert der Werte bei Intensität

x

12. Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name: Réka Tenkei
Geburtsdatum: 12.06.1989
Geburtsort: Budapest, Ungarn

Ausbildung

seit 2007- dato	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
1999 – 2007	Akademisches Gymnasium, 1010 Wien, Matura mit Auszeichnung bestanden
1995 – 1999	Volksschule Scheibenbergstraße, 1180 Wien

Berufserfahrung

seit 09.2008 - dato	Apotheke zum Schwarzen Adler, 1110 Wien, geringfügig beschäftigt
Sommer 2008, 2010, 2012	Apotheke zum Schwarzen Adler, 1110 Wien , jeweils 1 Monat Ferialpraktikum
Sommer 2005	Gasometer Apotheke, 1110 Wien, 2 Wochen Ferialpraktikum

Sprachkenntnisse

Deutsch, Englisch, Ungarisch