



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

ISOLIERUNG VON ANTIINFLAMMATORISCH WIRKENDEN

INHALTSSTOFFEN AUS

DRYOPTERIS FILIX-MAS L.

verfasst von

Magdalena Löwenstein

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, im November 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek

Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek für die interessante Themenstellung und für seine fachliche Unterstützung bei der Umsetzung meiner Arbeit danken.

Herzlichen Dank auch an Dr. Paolo Picker, der mir mit seiner wissenschaftlichen Kompetenz, seiner Geduld und Hilfsbereitschaft oftmals bei anfallenden Problemen geholfen hat.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Dr. Atanas Atanasov und seiner Arbeitsgruppe für die Durchführung der pharmakologischen Tests.

Besonders danken möchte ich auch meinen Eltern und meiner Schwester für jegliche Unterstützung während meines Studiums.

Vielen Dank auch an Elisabeth Hawlena und Alexandra Regner, die durch anregende Gespräche aber auch kritische Beiträge mich in meinem Denken und Reflektieren immer wieder weitergebracht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Stefan, für seine liebenswerte Unterstützung in allen Lebenslagen.

Spezieller Dank gilt dem Team der Grossfeld-Apotheke, allen voran meinem Chef, Mag. pharm. Walter Janku, für sein Entgegenkommen in Bezug auf meine Arbeitszeiten, sein Vertrauen in mich und für seine Geduld und seine aufbauenden Worte.

Ohne seine Unterstützung wäre mir ein positiver Abschluss nicht gelungen.

Ich kann mir kein besseres Arbeitsklima vorstellen und schätze mich glücklich, Teil dieses Apotheken-Teams sein zu dürfen.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	5
1.1 Bedeutung von <i>Dryopteris filix-mas</i> in der Volksmedizin	5
1.2 Erkenntnisse aus vorangegangenen Arbeiten	7
1.3 Problemstellung	8
2. Material	9
2.1 <i>Dryopteris filix-mas</i> – Steckbrief	10
2.2 Inhaltsstoffe aus <i>Dryopteris filix-mas</i>	11
3. Methoden	12
3.1 Festphasenextraktion (SPE)	12
3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	13
3.2.1 Funktionsweise und Aufbau einer HPLC-Anlage	13
3.2.2 Parameter bei der Methodenoptimierung	16
3.3 Semipräparative HPLC	19
3.4 Pharmakologische Untersuchungen	20
3.4.1 NF- κ B-Test	20
4. Experimenteller Teil	23
4.1 Herstellung des Dichlormethanextraktes	23
4.2 Abtrennung des Chlorophylls	24
4.3 Fraktionierung des vorgereinigten Extrakts mittels SPE	25
4.4 Charakterisierung der Fraktionen	28
4.4.1 Methodenoptimierung	29
4.4.1.1 Untersuchung der 70%-Fraktion	29
4.4.2 Auftrennung der 70%-Fraktion mittels semipräparativer HPLC	34
4.5 Fraktionierung der 70%-Methanol-Fraktion	34
4.5.1 Überprüfung der Subfraktionen mittels HPLC	38
5. Pharmakologische Untersuchungen	44
5.1 NF- κ B-Test	46
6. Ergebnisse und Diskussion	49
7. Zusammenfassung	52

8. Abstract	53
9. Literaturverzeichnis	54
10. Abbildungsverzeichnis.....	57
11. Tabellenverzeichnis	59
12. Abkürzungsverzeichnis.....	60
13. Curriculum Vitae	62

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Bedeutung von *Dryopteris filix-mas* in der Volksmedizin

Am Department für Pharmakognosie wurden in den Jahren 1983 bis 1995 Diplomarbeiten vergeben, mit dem Ziel, volksmedizinisch verwendete Arzneimittel in einer Datenbank zu sammeln und so das traditionelle Wissen zu bewahren.

Daraus wurde im Laufe der Jahre die **VOLKSMED-Datenbank** entwickelt.

Diese Datenbank kann nun als Grundlage zur tiefergehenden Erforschung heimischer Arzneipflanzen dienen.

Pflanzen spielen bei der Entdeckung neuer Wirkstoffe seit jeher eine wichtige Rolle. Hier sind etwa Artemisinin aus *Artemisia annua*, Paclitaxel aus *Taxus brevifolia* oder die Shikimisäure aus *Illicium verum* zu nennen.

In der VOLKSMED-Datenbank wird der Wurmfarfarn als wichtigste Pflanze gegen Entzündungen genannt [1].

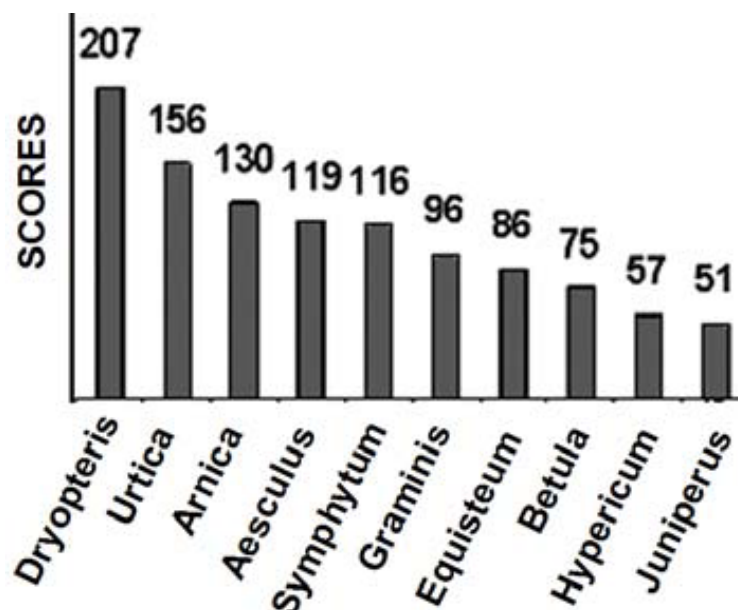


Abb. 1: Nennungen in der VOLKSMED Datenbank in Bezug auf die antientzündliche Wirkung [1]

Als wichtigste Indikationen für *Dryopteris filix-mas* werden Rheuma, Gicht und Schmerzen des Bewegungsapparats genannt.



Abb. 2: Indikationen von *Dryopteris filix-mas* [1]

Es wird beschrieben, dass die frischen oder getrockneten Farnwedel in Kopfpölster oder Bettdecken gefüllt oder einfach ins Bett gelegt worden sind und so zu einer Linderung bei Schmerzen oben genannter Krankheiten geführt haben.

Wobei beobachtet wurde, dass diese Anwendung vor allem in Österreich, insbesondere in der Region Oberes Mühlviertel, Verwendung findet [1].

In der Literatur [2] ist bei der Anwendung von *Dryopteris* vor allem von einer anthelmintischen Wirkung gegen Bandwürmer die Rede, welche auch in vivo, in vitro und am Menschen bestätigt ist. Daher rührt auch der Name des „Wurm“farns.

Die Anwendung gegen diese Art von Beschwerden, wie im Allgemeinen die innere Anwendung, ist, aufgrund der geringen therapeutischen Breite und der daraus resultierenden Gefahr von Intoxikationen, heutzutage obsolet.

Man nimmt an, dass die Verwendung des Farns gegen Rheuma als Nebenwirkung bei der Bekämpfung von Endoparasiten im Bett beobachtet wurde und seither vor allem von der ländlichen Bevölkerung verstärkt zur Schmerzlinderung eingesetzt worden ist [1].

Aufgrund dieser bemerkenswerten Wirkung des Wurmfarms und der Tatsache, dass in phytochemischer Hinsicht kaum Untersuchungen durchgeführt wurden, beschloss man, diesen Beobachtungen näher auf den Grund zu gehen.

Bereits in vorangegangenen Diplomarbeiten versuchte man, mehr über die wirksamen antiphlogistischen Inhaltsstoffe des Wurmfarms zu erfahren.

1.2. Erkenntnisse aus vorangegangenen Arbeiten

In vorherigen Arbeiten [3, 4, 5, 8, 12, 14] wurden zuerst Extrakte mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität hergestellt und auf ihre antiphlogistische Wirkung geprüft.

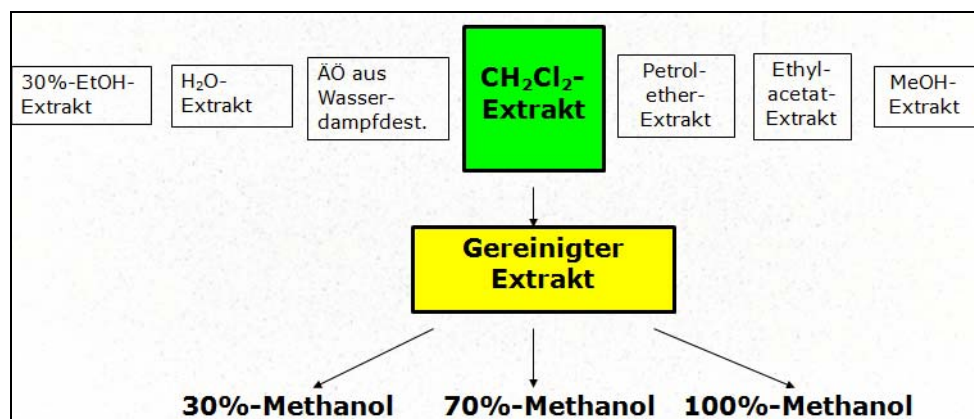


Abb. 3: Hinsichtlich antiphlogistischer Aktivität untersuchte Extrakte aus *Dryopteris*

Es wurde hierbei so vorgegangen, dass die Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln vorgenommen wurde. Als Extraktionsmittel wurden 30%-Ethanol, Wasser, Petrolether, Ethylacetat, Methanol sowie Dichlormethan verwendet. Außerdem wurde durch Wasserdampfdestillation das ätherische Öl gewonnen.

Diese so gewonnenen Extrakte und das ätherische Öl wurden hinsichtlich ihrer antiinflammatorischen Wirkung getestet.

Die Aktivität wurde in den ersten Arbeiten mittels Crotonöl-Mäuseohr-Test überprüft. Es handelt sich hierbei um ein Prüfverfahren, bei dem am Mäuseohr durch ein bestimmtes ätherisches Öl, das Crotonöl, ein Ödem hervorgerufen

wird. Die zu prüfenden Extrakte und Fraktionen werden am Ohr aufgebracht, wobei das 2. Ohr unbehandelt bleibt. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Ödemreduktion im Vergleich zum unbehandelten Ohr. Als Positivkontrolle wird Indomethacin verwendet [4].

Hierbei zeigte der Dichlormethan-Extrakt im Vergleich zu Indomethacin (Positiv-Kontrolle) die höchste Aktivität.

Aus dem Dichlormethanextrakt wurde mittels Festphasenextraktion eine 30%-Methanol-, eine 70%-Methanol- und eine 100%-Methanol-Fraktion erhalten, welche wiederum auf ihre Aktivitäten getestet wurden. Sowohl die 70%ige- als auch die 100%ige-Fraktion wiesen hierbei die höchsten Aktivitäten in Bezug auf die antiphlogistische Wirkung auf [5].

Da Tierversuche jedoch ethische Fragen aufwerfen wurde nachfolgend der **NF- κ B-Test** (in-vitro assay) zur Aktivitätsüberprüfung eingesetzt [12].

Die genaue Durchführung ist dem *Kapitel 3.4.1* zu entnehmen.

1.3. Problemstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es dementsprechend, ausgehend von den getrockneten Wedel von *Dryopteris filix-mas*, mittels Dichlormethan-Extraktion, Chlorophyll-Separation und anschließender Festphasenextraktion mengenmäßig ausreichend von der 70%- und 100%-igen Fraktion zu gewinnen, mittels HPLC weiter aufzutrennen und anschließend mittels semipräparativer HPLC Reinsubstanzen in ausreichender Menge zu isolieren, um sie nachfolgend auf ihre antiphlogistische Wirkung testen zu können.

Von jenen Stoffe, die eine ausreichende entzündungshemmende Aktivität zeigen, sollte die Struktur, unter zu Hilfenahme der bereits aus vorigen Diplomarbeiten erarbeiteten Strukturvorschläge, mittels MS und NMR aufgeklärt werden.

2. Material

Für die vorliegende Diplomarbeit wurde Drogenmaterial verwendet, welches 2009 auf der Ebenwaldhöhe in Niederösterreich, Bezirk Lilienfeld, gesammelt worden ist.

Die Ebenwaldhöhe ist Teil der niederösterreichischen Kalkalpen.



Abb. 4: Sammelort des verwendeten Materials [6]

Nach eingehenden botanischen und morphologisch-anatomischen Untersuchungen wurde die Droge eindeutig als *Dryopteris filix-mas* identifiziert. Belegexemplare liegen im Herbarium des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien auf.

In der VOLKSMED-Datenbank sind verschiedene Farne genannt, wobei keine eindeutige Unterscheidung getroffen wurde, da die Identifizierung der einzelnen Farnarten mitunter ein schwieriges Unterfangen ist, wenn man bedenkt, dass es in Österreich ca. 50 verschiedene Arten gibt [1].

Dieser Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchungen des weit verbreiteten **Wurmfarns** (*Dryopteris filix-mas*).

2.1. *Dryopteris filix-mas* – Steckbrief



Abb 5: *Dryopteris filix-mas* L. [7]

Familie: Der Echte Wurmfarne gehört zur Familie der *Dryopteridaceae*. Er gilt als häufigster mitteleuropäischer Vertreter der Gattung der Wurmfarne (*Dryopteris*) [2].

Verbreitung: Man findet ihn in Europa, in West- bis Zentralasien sowie in Nordamerika [2].

Dryopteris filix-mas ist weiter unter den Namen „Gewöhnlicher bzw. Gemeiner Wurmfarne“ oder „Männerfarne“ bekannt. Letzterer geht auf eine ähnliche Art, dem „Gewöhnlichen Frauenfarne“ (*Athyrium filix-femina*) zurück. Im Unterschied zum Männerfarne hat der Frauenfarne hellgrüne Wedel und die Fiedelchen sind feiner gesägt [7].

Botanische Beschreibung: Bei *Dryopteris filix-mas* handelt es sich um eine 30 bis 140 cm hohe, ausdauernde Pflanze mit kurzem, dickem, aufsteigendem Rhizom, das dicht mit Blattresten besetzt ist [2].

Der Blattstiel ist 6 bis 30 cm lang und bis zu 5 mm dick. Er ist nur am Grunde dicht, sonst wie die Blattspindel spärlich mit braunen Spreuschuppen besetzt. Die Blätter sind einfach gefiedert, an der Oberseite dunkelgrün, an der Unterseite blasser.

An den Fiederchen des mittleren und oberen Teils der Blätter sind mindestens 3, meist 5 bis 6 Sori vorhanden. Diese sind klein, rundlich und von nierenförmigem Schleier (Industrium) bedeckt.

Die Sporen sind dunkelbraun mit unregelmäßigen, gewundenen Leisten [2].

2.2. Inhaltsstoffe aus *Dryopteris filix-mas*

- **Etherlösliche *Acylphloroglucinole*:** *Filixsäuren*, *Flavaspidsäure* – vor allem im Rhizom zu finden.
- ***Polyensäuren*** (u. a. *Hexadecatriensäure*, *Octadecatriensäure*, *Eicosatetraensäure*, *Eicosapentaensäure*)
- ***Flavonoide*** (*Kämpferol-3-glucosid*, *Quercetin-3-O-glucosid*, *Dryopterin*)
- ***Terpenoide***
- Geringe Mengen ***ätherisches Öl*** (z.B. *Nerolidol*),
- *Palmitinsäure* [8]

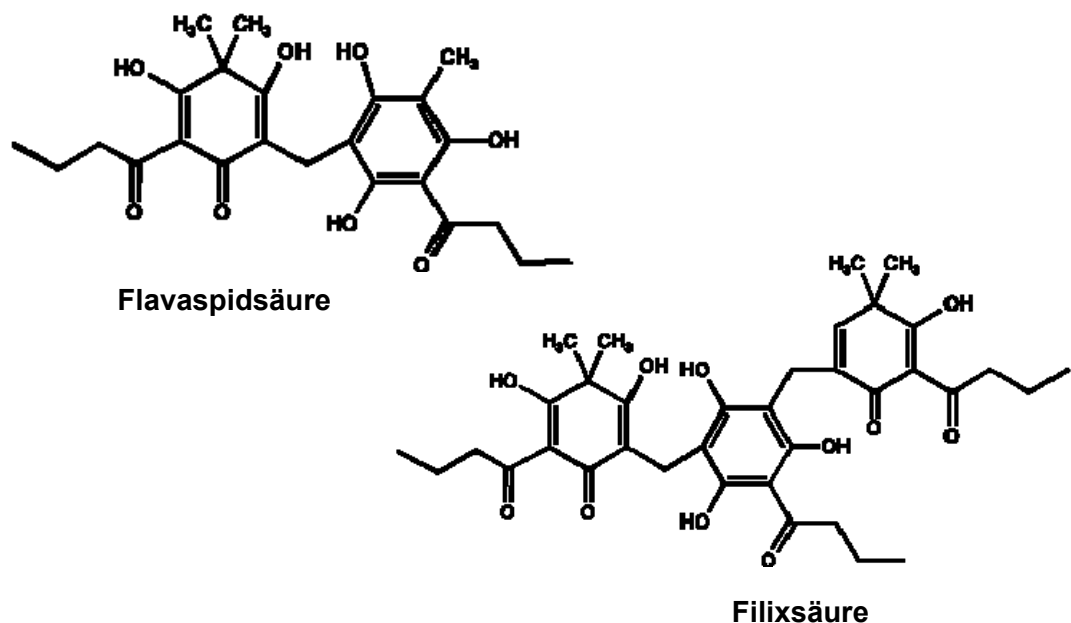


Abb. 6: Chemische Strukturen der *Acylphloroglucinole* [9]

3. Methoden

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit werden sämtliche verwendete chromatographische, spektroskopische und pharmakologische Methoden beschrieben und hinsichtlich ihrer Parameter charakterisiert.

3.1 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) stellt eine Sonderform der Säulenchromatographie nach dem Absorptionsprinzip dar.

Hierbei erfolgt der Extraktionsprozess zwischen einer flüssigen und einer festen Phase, dem Sorbens. Das Sorbens liegt gepackt in einer kurzen Säule vor. Während des Extraktionsvorgangs kommt es nun zwischen der festen Phase und bestimmten Substanzen im Probengemisch zu Wechselwirkungen [10].

Die Festphasenextraktion wird verwendet, um Verunreinigungen abzutrennen. Diese Verunreinigungen durchlaufen entweder die Sorbenspackung, wobei die zu isolierenden Substanzen an der Sorbensoberfläche zurückgehalten werden oder die Verunreinigung der Ausgangsprobe verbleiben auf der Säule und die zu isolierenden Substanzen durchlaufen die Packung [10].

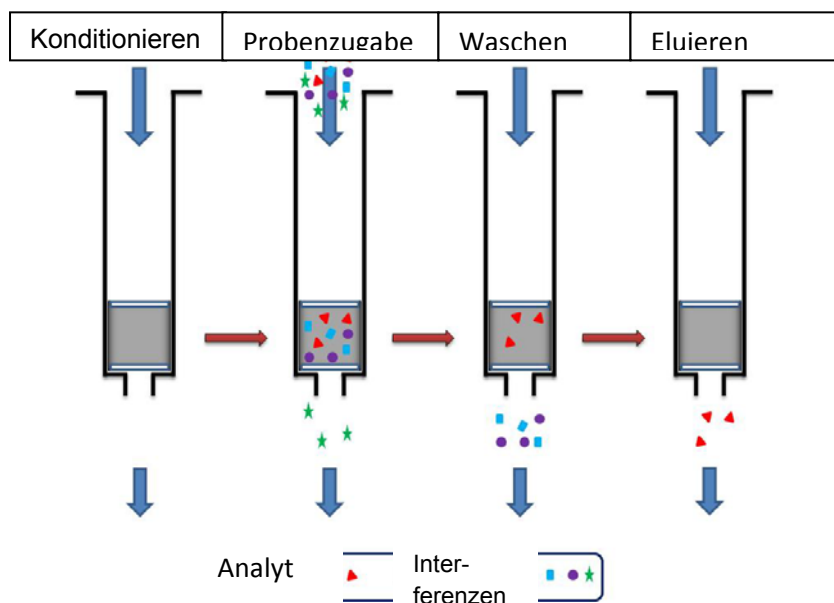


Abb 7.: Schematische Darstellung des Ablaufes der Festphasenextraktion [17]

In der gegenständlichen Arbeit wurde die Festphasenextraktion dazu verwendet, den vom Chlorophyll gereinigten Extrakt in weitere Fraktionen unterschiedlicher Polarität aufzutrennen.

Die verwendeten Parameter sind der **Tab. 1** zu entnehmen:

Stationäre Phase:	<i>Varian Bond Elut C18, 10 g, 60 ml</i>
Mobile Phase:	<i>30%-, 70%- und 100%- Methanol</i>
Auftragemenge:	<i>200 mg gereinigten Extrakt in 2 ml Dichlormethan gelöst</i>
Elutionsmenge:	<i>Je 5 Reservoirvolumina (à 60 ml)</i>

Tab. 1: *Parameter für die Festphasenextraktion*

3.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Da in der vorliegenden Arbeit der Hauptaugenmerk auf die Charakterisierung der 70%- und 100%-Fraktion mittels HPLC gerichtet war, sowie nachfolgend das Sammeln der Reinstoffe mittels HPLC eine wesentliche Rolle spielte, wird in diesem Kapitel ausführlicher auf die apparativen und experimentellen Details dieser Methode eingegangen.

3.2.1. Funktionsweise und Aufbau einer HPLC-Anlage

Die HPLC ist ein schonendes Verfahren zur Analyse von schwerflüchtigen, nicht-flüchtigen und thermolabilen Substanzen.

Die Löslichkeit des Analyten in der mobilen Phase muss gegeben sein, um zu einem aussagekräftigen Ergebnis zu kommen [10].

Die Vorteile der HPLC gegenüber herkömmlicher Säulen-Chromatographie sind:

- eine wesentlich höhere Auflösung bei der Trennung (Trennung von bis zu 100 Komponenten und mehr)
- Verkürzung der Analysenzeiten sowie
- eine erhebliche Verbesserung der Empfindlichkeit [18]

Aufbau einer HPLC-Anlage (Abb. 8):

Die HPLC besteht aus folgenden Modulen:

1. Einer oder mehrere **Pumpen** zur Förderung des Eluenten durch die Anlage,
2. **Injektor** (meist Autosampler) mit Hilfe dessen die Probe in die Anlage gelangt,
3. **Säule** mit stationärer Phase an der die Trennung stattfindet,
4. **Mobile Phase** (meist mehrere Lösungsmittel),
5. **Detektor** zur Registrierung der Probenkomponenten (meist UV-Detektor) sowie
6. **Rechner** zum Steuern der Anlage und als Auswerteeinheit [20]

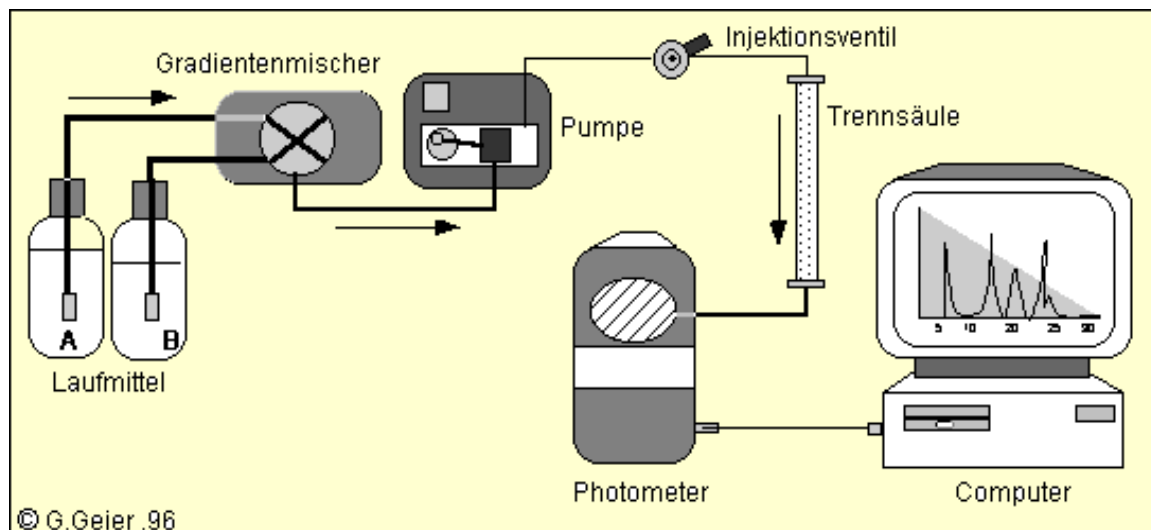


Abb 8.: Komponenten der HPLC [19]

Die jeweiligen Komponenten werden durch Injektion eines bestimmten Probenvolumens auf die Säule aufgebracht. Sie passieren die Säule mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, jeweils abhängig von der Wechselwirkung zwischen der mobilen Phase und der stationären Phase [22].

Die Thermostatisierung über einen Säulenofen verhindert Temperaturschwankungen, die einen beachtlichen Einfluss auf die Retentionszeit haben [10].

Die Auswertung der Signale erfolgt mittels IT-Unterstützung und mit der entsprechenden chromatographischen Software, die eine Nachbearbeitung der Daten jederzeit zulässt [10].

Zur **Detektion** wurde ein **Diode Array Detector** (DAD) verwendet. Der DAD ist ein UV/VIS-Messgerät mit mehreren hundert Dioden. So lässt sich das gesamte Absorptionsspektrum der eluierenden Substanzen messtechnisch erfassen. Man erhält damit ein Chromatogramm, welches die Elutionszeit, Wellenlänge und Absorption wiedergibt [3].

Außerdem wurde ein **Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor** (ELSD, Evaporative Light Scattering Detector) verwendet. Dieser spezielle Detektor wird für die Analyse von Substanzen ohne Chromophor eingesetzt.

Das Eluat wird mit einem warmen, partikelfreien Luftstrom in ein Interface eingesprüht. Dabei verdampft das Lösungsmittel und es entsteht ein Nebel, der aus kleinen Partikeln besteht, die von einer Lichtquelle bestrahlt werden. Das daraus resultierende Streulicht wird von einem Photomultiplier gemessen. Das erhaltene Signal ist proportional zur Konzentration des Analyten im Eluat. Signale des Lösungsmittels werden ausgeschaltet [3].

In dieser Diplomarbeit sollten die durch die SPE erhaltenen Fraktionen mittels HPLC weiter aufgetrennt und anschließend die einzelnen Substanzen mittels semipräparativer HPLC gesammelt werden.

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden zahlreiche Parameter sukzessive verändert, um eine optimale Trennleistung zu erhalten.

3.2.2. Parameter bei der Methodenoptimierung

1. Stationäre Phase

RP-HPLC: Es wurden verschiedene Umkehrphasen getestet. Bei der RP-HPLC wird durch Anlagerung einer apolaren Verbindung an die Säulenmatrix die Polarität der stationären Phase umgekehrt. Unpolare Seitenketten sind an ein Kieselgelgerüst oder an ein Polymer gebunden. Dadurch verhalten sie sich hydrophob (vgl. Abb. 9).

Mit zunehmender Kettenlänge werden die Phasen unpolarer. Der Trennmechanismus basiert auf Van-der-Waals-Kräften. Je ähnlicher der Analyt der Kohlenwasserstoffkette der Phase ist, umso größer sind seine Wechselwirkungen mit der Säule [22].

Die RP-Systeme zeichnen sich allgemein durch eine hohe Stabilität aus und sind innerhalb weniger Minuten äquilibriert, so dass der Lösungsmittelwechsel und die Gradientenelution problemlos möglich sind [22].

Voraussetzung für eine ausreichende Stabilität des Trennmaterials ist eine optimale Belegung der Silanolgruppen des Kieselgels. Dies wird mittels End-Capping erreicht.

Bei RP18-Material erfolgt nach einer ersten Belegung mit Octadecylsilan eine Nachbehandlung mit Trimethylchlorsilan. Letztere verringert die Anzahl der aus sterischen Gründen nicht umgesetzten Silanolgruppen [22].

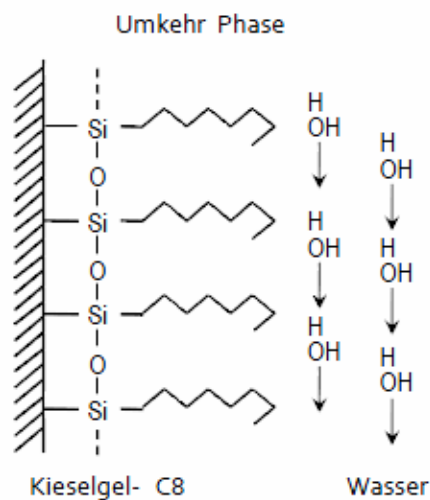


Abb. 9: Schematische Darstellung von Kieselgel RP-8 [22]

Allgemein ist zu sagen, dass hydrophobe Zentren wie Methylgruppen im Analyten die Retentionszeit erhöhen, phenolische Hydroxylgruppen oder Glykoside reduzieren sie [10].

Folgende stationäre Phasen wurden getestet:

Stationäre Phase	<i>LiCrospher® 100 RP-18; 4 x 250 mm, Korngröße 5 µm</i>
	<i>Aquasil C18; 4,6 x 250 mm, Korngröße 5 µm</i>
	<i>Luna® C18; 4,6 x 250 mm, Korngröße 5 µm</i>
	<i>LiCrospher® 100 RP-18e, 4,0 x 250 mm, Korngröße 5 µm</i>
	<i>Luna® (Phenylhexyl) + Vorsäule/ Phenomex; 250 x 2 mm, Korngröße 5 µm</i>

Tab. 2: Getestete stationäre Phasen

2. Mobile Phase

Die Wahl des Eluenten muss auf die stationäre Phase abgestimmt werden.

Für die Eluenten der Umkehrphasen-Chromatographie gilt grundsätzlich:

- Stationäre Phase ist unpolar
- Eluenten sind polar
- Verteilung ist der Trennmechanismus
- Lösungsmittel werden in Mischungen verwendet (meist Methanol/ Wasser oder Acetonitril/ Wasser)
- je mehr organisches Lösungsmittel im Verhältnis zu Wasser, desto höhere Elutionskraft [21]

Oft ist es nötig, der mobilen Phase einen Säureanteil beizugeben. Damit wird die Dissozierung von Pflanzensäuren verhindert und das Tailing von phenolischen Substanzen, die mit nicht abgedeckten Silanolgruppen interagieren, reduziert [10].

In dieser Diplomarbeit wurden Methanol/ Wasser (angesäuert mit Ameisensäure auf pH 2,8) in verschiedenen Mischungsverhältnissen und Gradienten eingesetzt.

3. Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase durch die Säule

Je größer die Flussgeschwindigkeit ist, desto weniger oft kann sich das Gleichgewicht einstellen, woraus wiederum eine schlechtere Trennung resultiert.

Bei zu langsamem Fluss kommen jedoch z.B. Diffusionsvorgänge ins Spiel, was die Qualität der Trennung ebenfalls vermindert [18].

Dementsprechend ist experimentell an eine geeignete Geschwindigkeit zu gelangen, während dieser eine Einstellung des Gleichgewichts ausreichend oft möglich ist und störende Phänomene ausgeschaltet werden.

4. Temperatur der Säule

Je höher die Temperatur gewählt wird, desto kürzer sind die Analysenzeit. Auch eine Verbesserung hinsichtlich Peaksymmetrie wird in der Literatur beschrieben. Die Temperatur wird limitiert durch den Siedepunkt des Lösungsmittels [10].

3.3. Semipräparative HPLC

Die semipräparative HPLC wird normalerweise zur Reinigung und Isolierung von Substanzen verwendet. Eingesetzt werden in der Labor-Praxis Säulen von 8 bis 25 mm Innendurchmesser. Diese werden mit Partikeln großer Oberfläche und entsprechend hoher Kapazität sowie Selektivität gefüllt. Damit ist es möglich, Verfahren mit hoher Selektivität auf ein präparatives Verfahren ohne weitere Optimierung zu übertragen [10].

Die verwendeten Parameter sind in **Tab. 3** beschrieben:

Stationäre Phase	<i>RP18e semipräparativ, 10 x 250 mm, 5 µm Korngröße</i>
Mobile Phase	<i>Methanol/ Wasser, angesäuert mit Ameisensäure auf pH 2,8</i>
Autosampler	<i>Shimadzu SIL-10 AD</i>
Einspritzvolumen:	<i>40 µl</i>
Detektion	<i>DAD, Shimadzu SPD-M20A</i>
Software	<i>Shimadzu LCsolution Version 1.21 SP1</i>

Tab. 3: Parameter für die semipräparative HPLC

3.4. Pharmakologische Untersuchungen

Um die pharmakologische Aktivität der einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihrer antiinflammatorischen Wirkung zu testen, wurde die Rezeptorinhibierung von Nuclear Factor κ B mittels **Luciferase-Zelltest** überprüft.

3.4.1. NF- κ B-Test

NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor, der ubiquitär exprimiert wird und durch eine Vielzahl von Stimuli induziert wird.

NF- κ B spielt eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen. Zahlreiche zelluläre Prozesse werden durch den Transkriptionsfaktor gesteuert, wie die Aktivierung von Immunzellen, die Entwicklung und Proliferation der B- und T-Zellen bis hin zum Zelltod [11].

Struktur

Bei NF- κ B handelt es sich nicht um ein einzelnes Protein, sondern um fünf bzw. sieben verschiedene Proteine, deren gemeinsames Kennzeichen eine Domäne von etwa 300 Aminosäuren ist, die sogenannte Rel-Homologie-Domäne.

Je zwei Untereinheiten können in unterschiedlichen Kombinationen aneinander binden und auf diese Weise Dimere bilden.

Heterodimere (bestehend aus einem Nicht-Rel-Protein und einem Rel-Protein) wirken aufgrund der Transaktivierungsdomäne der Rel-Proteine aktivierend, während für Dimere ohne Beteiligung von Rel-Proteinen eine hemmende Funktion beschrieben ist [11].

Funktionsweise

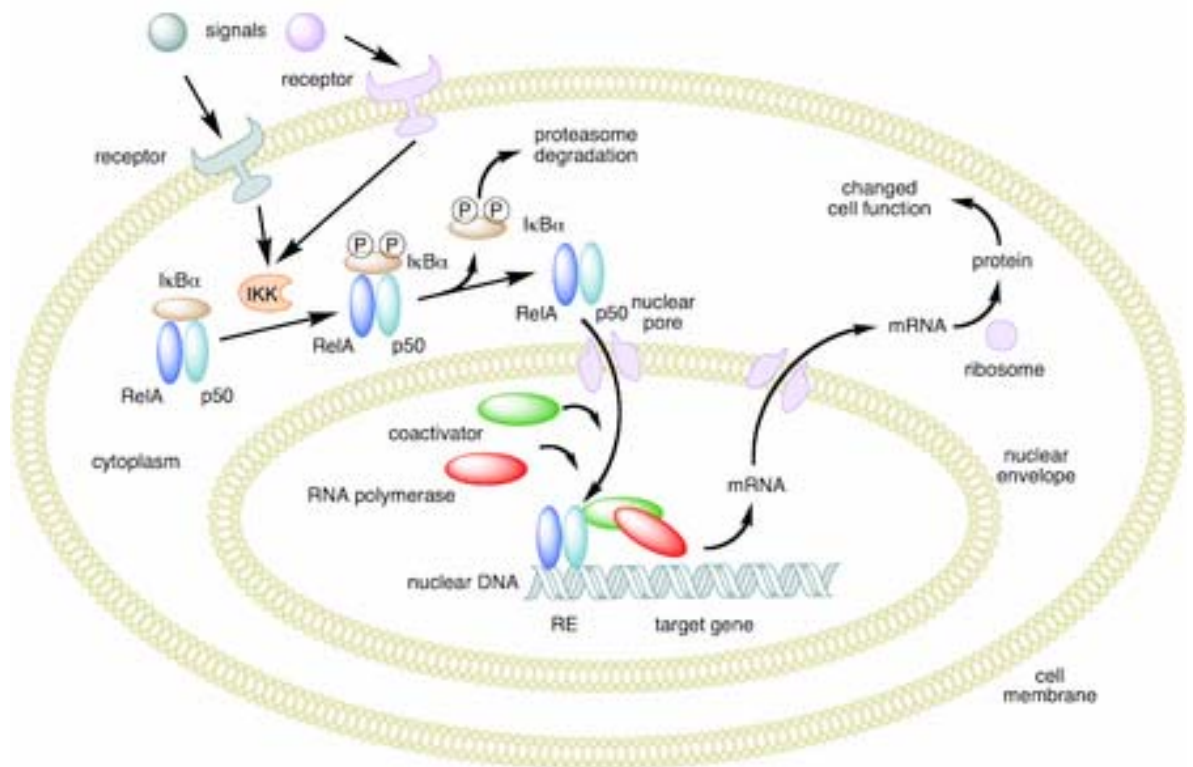


Abb. 10: Mechanismus der NF-κB-Regulation [11]

NF-κB kann an ein spezifisches DNA-Motiv bestehend aus etwa zehn Basenpaaren, das sogenannte κB-Motiv, binden. Das κB-Motiv wurde an zahlreichen regulatorischen Bereichen in der DNA nachgewiesen und unterliegt einer gewissen Variabilität, die eine Feinregulation hinsichtlich der unterschiedlichen NF-κB-Dimere erlaubt. Die Bindung von NF-κB an das DNA-Motiv führt zu einer verstärkten Transkription der davon abhängigen Gene [11].

Unter die von NF-κB regulierten Gene fallen viele Zytokine und Adhäsionsmoleküle, die eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Immunsystems spielen.

Testung der antiinflammatorischen Wirkung durch Inhibierung von NF- κ B

Der NF- κ B-Test ist ein Zelltest, der auf einer Rezeptoraktivierung mit darauf folgender Rezeptorinhibierung basiert.

Hierbei wird eine Fremd-DNA, in diesem Fall pNF κ B-Luc, in Human embryonic kidney Zellen (HEK) eingeschleust. Das pNF κ B-Luc ist ein in DNA inkludiertes NF κ B-Luciferase-Reporter-Konstrukt [12].

Bei Stimulation wandert NF- κ B in den Zellkern und aktiviert die Genexpression, auch die Luciferase wird hierbei exprimiert. Die Luciferase fördert die Umwandlung von Luciferin, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht [13].

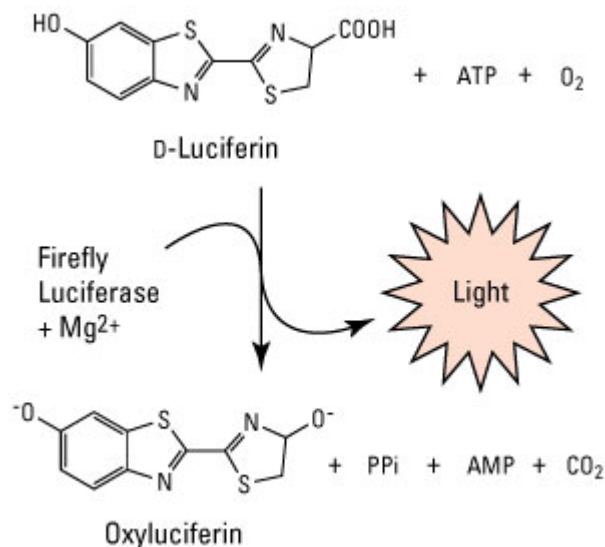


Abb. 11 : Oxidation von Luciferin mit Hilfe von Luciferase und ATP [15]

Bei Inhibierung von NF- κ B oder bei verminderter Expression von Luciferase kommt es zu einer eingeschränkten Lichtemission [13].

Dementsprechend kann man sagen, dass die Lichtemission umgekehrt proportional zur Inhibierung von NF- κ B und in weiterer Folge zur entzündungshemmenden Wirkung ist.

Von einer Inhibierung kann gesprochen werden, wenn das Signal mehr als 50%, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, gehemmt wird [14].

4. Experimenteller Teil

4.1. Herstellung des Dichlormethan-Extrakts

Zunächst erfolgte die Pulverisierung der zuvor geschnittenen Droge mittels elektrischer Drogenmühle der Fa. *Retsch* (Siebgröße 0,75).



Abb. 12: Elektrische Drogenmühle Retsch

Insgesamt wurden **1528,61 g** Droge zu Pulver verarbeitet.

Danach wurden jeweils **100 g** der pulverisierten Droge mit **1000 ml** Dichlormethan versetzt und anschließend bei Raumtemperatur 30 Minuten am Ultraschallbad extrahiert.

Nach dem Filtrieren erhielt man ein dunkelgrünes Filtrat. Der Filterrückstand wurde nochmals wie oben angegeben extrahiert.

Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt, um eine erschöpfende Extraktion zu gewährleisten.

Nach Vereinigung der Filtrate wurden diese am Rotationsverdampfer bei 45 °C und einem Druck von 750 mbar zur Trockene eingedampft.

Der auf diese Weise erhaltene Rohextrakt wurde über Nacht im Exsiccator gelagert und danach gewogen.

Insgesamt wurden **50,68 g** Rohextrakt aus 1500,76 g pulverisierter Droge erhalten.

4.2. Abtrennung des Chlorophylls

In vorangegangenen Arbeiten [3, 4, 5, 8, 12, 14] wurde mittels Dünnschichtchromatographie festgestellt, dass Chlorophyll einen großen Anteil des Rohextrakts ausmacht und sich deshalb störend auf weitere phytochemische und pharmakologische Untersuchungen auswirkt [4].

Daher erfolgte als nächster Schritt die Abtrennung des Chlorophylls mittels Flüssig-Flüssig Verteilung mit Dichlormethan und einer Methanol/ Wasser-Mischung.

Dazu wurden *100 mg Rohextrakt in 15 ml Dichlormethan und 15 ml Methanol/ Wasser-Mischung* gelöst wurden. Dadurch bildeten sich 2 Phasen, welche am Rotationsverdampfer bei *750 mbar* und *45 °C* eingeengt wurden. Das Dichlormethan verdampfte hierbei, Ballaststoffe sowie unlösliche Begleitsubstanzen fielen aus und konnten abfiltriert werden.



Abb. 13 + 14: Unlösliche Ballaststoffe (u. a. Chlorophyll)

Das gelblich-grüne Filtrat wurde wiederum am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht.

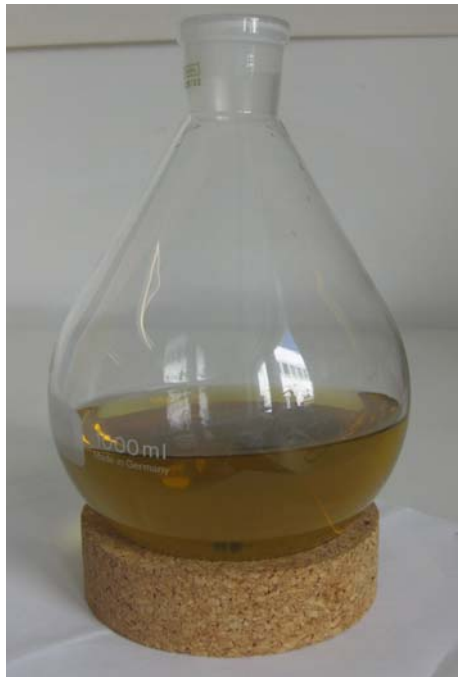


Abb. 15: Gelb-grünes Filtrat, größtenteils frei von unlöslichen Bestandteilen (v. a. Chlorophyll)

Man erhielt so **5,54 g** Chlorophyll-armen Reinextrakt (11% vom Rohextrakt).

4.3. Fraktionierung des vorgereinigten Extrakts mittels Festphasenextraktion (SPE)

Nachdem der Extrakt nun ohne störende Begleitsubstanzen vorlag, konnte nun eine Auftrennung dieses Extraktes mittels SPE vorgenommen werden.

Als Lösungsmittel wurden Methanol/ Wasser Mischungen in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Aus vorhergehenden Diplomarbeiten [3, 4, 5, 8, 12, 14] war bekannt, dass vor allem die 70%- und 100%-Methanol-Fraktion eine starke antiphlogistische Wirkung zeigen [5].

In weiterer Folge des Versuchsaufbaus wurde die Kartusche, die sich auf einer Vakuumbbox befand, zu allererst mit je 2 Reservoirvolumina destilliertem Wasser sowie 3 Reservoirvolumina Methanol gewaschen.



Abb. 16: SPE zur Auftrennung des Rohextraktes

Anschließend erfolgte das Equilibrieren, das heißt, das Waschen mit 2 Reservoirvolumina der Anfangskonzentration (30% Methanol).

Danach wurde die Kartusche für 30 Minuten bei 15 mmHg Vakuum getrocknet. Im nachfolgenden Schritt konnte nun auf die Kartusche die Probe aufgetragen werden. Hierfür wurden 200 mg des Reinextrakts in 2 ml Dichlormethan gelöst und anschließend vorsichtig mittels Pasteurpipette gleichmäßig auf der Auftragfläche der Kartusche verteilt.

Nach dem Auftragen des Substanzgemisches wurde wiederum ein Trocknungsvorgang durchgeführt.

Darauf erfolgte das Eluieren in einer Geschwindigkeit von ungefähr 2 Tropfen pro Sekunde mit jeweils 5 Reservoirvolumina 30%-Methanol, 5 Reservoirvolumina 70%-Methanol sowie 5 Reservoirvolumina 100%-Methanol.



Abb. 17: SPE-Kartusche zur Auftrennung des Dichlormethan-Extraktes

Die weiteren Parameter sind in **Tab. 1** angeführt.

Die so erhaltenen Fraktionen sind bereits anhand der Farbe gut zu unterscheiden.



Abb 18: Fraktionen mit unterschiedlichen Methanol-Konzentrationen

Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei 45 °C zur Trockene gebracht.

So erhielt man nach zehn Festphasen-Extraktionsvorgängen, in denen insgesamt **3801,37 mg** (= 100 %) Reinextrakt aufgetragen wurde:

- von der **30%-Methanol-Fraktion** insgesamt **726,89 mg** (entspricht 19,12 %)
- von der **70%-Methanol-Fraktion** insgesamt **2198,14 mg** (57,82 %)
- von der **100%-Methanol-Fraktion** insgesamt **921,12 mg** (24,23 %)

4.4. Charakterisierung der einzelnen Fraktionen

Da aus vorherigen Diplomarbeiten [3, 4, 5, 8, 12, 14] bekannt war, dass die 70%- und 100%- Methanol-Fraktion die stärkste antiinflammatorische Wirkung zeigten, wurde vor allem die 70%-Methanol-Fraktion in dieser Arbeit näher untersucht.

Um Reinsubstanzen isolieren zu können, die in weiterer Folge auf ihre antientzündliche Aktivität überprüft werden sollten, musste zuerst einen Überblick über das Inhaltsstoffspektrum geschaffen werden.

Im Laufe der Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Methodenoptimierung der analytischen HPLC gelegt, um das isolierte Substanzgemisch aus *Dryopteris filix-mas* möglichst gut in seine Einzelkomponenten auftrennen zu können.

Dann wurde jeweils ein Parameter (z. B. stationäre Phase oder die Zusammensetzung der mobilen Phase) geändert, um letztendlich ein optimales Ergebnis hinsichtlich der Trennleistung zu erreichen.

In den nachfolgenden Kapiteln ist der Verlauf der Methodenoptimierung beschrieben, welche Parameter verändert wurden und welche Methode letztendlich gewählt wurde, um die Reinsubstanzen zu sammeln und diese nachfolgend in pharmakologischen Tests auf ihre antiinflammatorische Wirkung zu untersuchen.

4.4.1 Methodenoptimierung

4.4.1.1 Untersuchung der 70%-Fraktion

Zuerst wurde die 70% Fraktion mittels analytischer HPLC untersucht, um so einen ersten Überblick über die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe zu bekommen.

Methode 1a:

Stationäre Phase: Lichrospher® 100 RP-18, 4 x 250 mm, Korngröße 5 µm
Probenkonzentration: 2 mg gelöst in 1 ml MeOH
Fluss: 1 ml/min
Mobile Phase: MeOH und H₂O pH 2,8 (angesäuert mit Ameisensäure)
Gradient: 50-100% MeOH in 50 Min
Temperatur: 25 °C
Einspritzvolumen: 10 µl
Mobile Phase: Methanol/Wasser-Mischung (pH 2,8), angesäuert mit Ameisensäure
Flussrate: 1 ml/min

Fazit: Die Trennleistung ist nicht optimal. An den größeren Peaks sind noch „Schultern“ erkennbar. Dies kommt zustande, wenn zwei Substanzen teilweise coeluieren.

Methode 1b

Veränderter Parameter: Gradient: 60% - 95% -Methanol in 70 Minuten

Weitere Parameter: siehe Methode 1

Fazit: Es wurde eine bessere Trennung erreicht, jedoch sind noch teilweise Überlagerungen sichtbar. Eine Verbesserung der Methode durch eine weitere Parameteränderung sollte vorgenommen werden.

Methode 2:

Stationäre Phase:	LUNA® (Phenylhexyl) Phenomenex, 250 x 2 mm, Korngröße 5 µm
Probenkonzentration:	2 mg gelöst in 1 ml MeOH
Fluss:	1 ml/min
Mobile Phase:	MeOH und H ₂ O, pH 2,8 (angesäuert mit Ameisensäure)
Gradient:	60-95% MeOH in 70 Min
Temperatur:	25 °C
Einspritzvolumen:	10 µl

Fazit: Auch mit dieser Methode wurde nicht die gewünschte Trennleistung erhalten. Im Gegenteil, es kam zu einer Verschlechterung der Auftrennung des Extrakts. Die Trennung mit dieser Säule, die als stationäre Phase an Kieselgel gebundene Phenylhexylgruppen aufweist, scheint für dieses Substanzgemisch nicht geeignet zu sein.

Methode 3

Stationäre Phase:	RP 18e LiCrospher®100, Korngröße 5 µm
Probenkonzentration:	2 mg gelöst in 1 ml MeOH
Fluss:	1 ml/min
Mobile Phase:	MeOH und H ₂ O, pH 2,8 (angesäuert mit Ameisen- säure)
Gradient:	60-95% MeOH in 70 Min
Temperatur:	25 °C
Einspritzvolumen:	10 µl

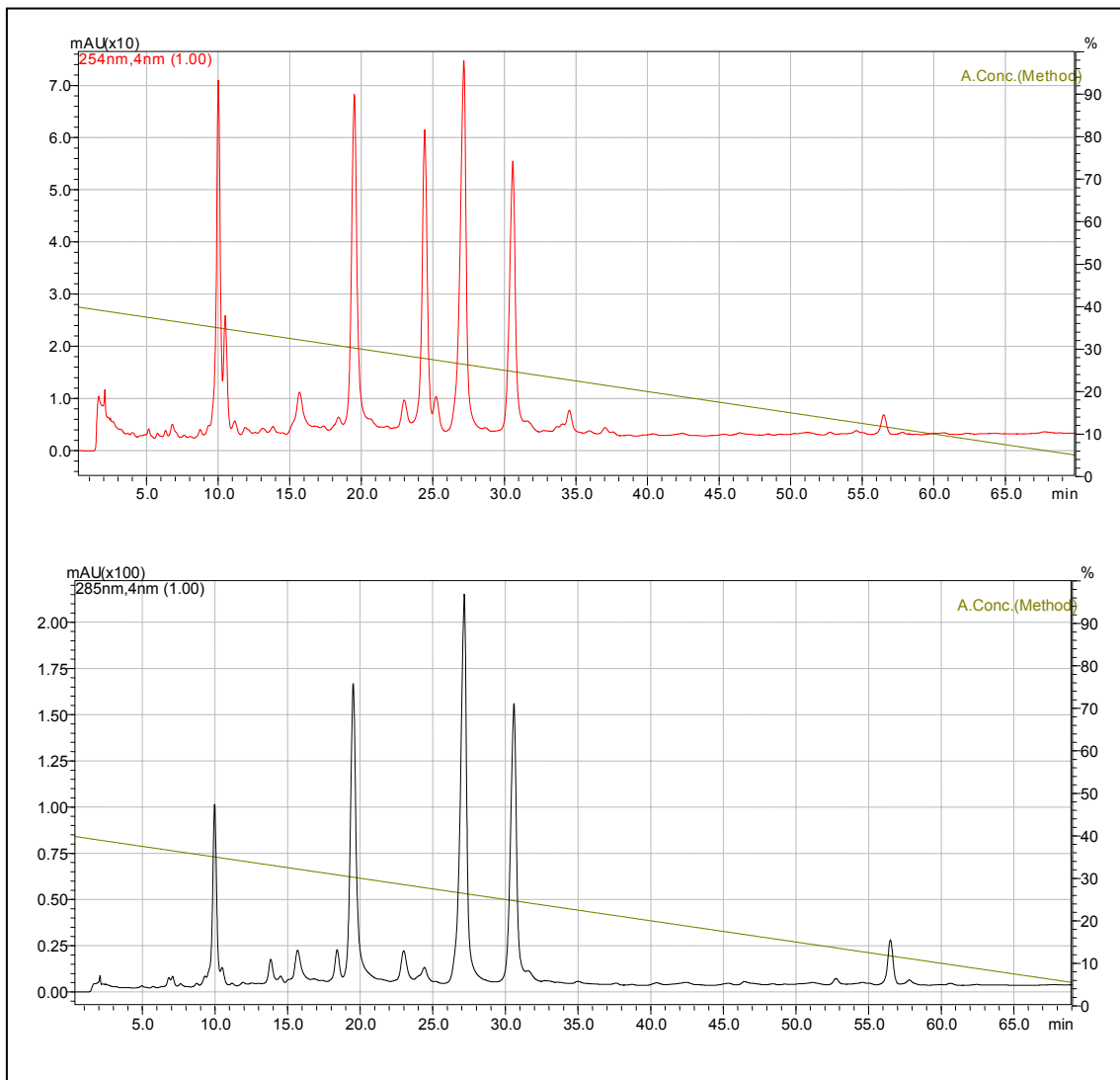


Abb. 19: HPLC-Analyse der 70%-Fraktion bei 254 nm (oben) und 285 nm (unten), Methode 3

Fazit: Durch Verwendung einer RP18e-Säule konnte eine wesentliche Verbesserung der Trennleistung erzielt werden.

Die Hauptpeaks 1-5 haben eine Retentionszeit von:

Peak 1: 10.0 min

Peak 2: 19.0 min

Peak 3: 24.0 min

Peak 4: 26.0 min

Peak 5: 30.0 min

Da bei Peak 1 und Peak 5 leichte „Schultern“ erkennbar waren, wurde nachfolgend versucht, die Trennleistung weiter zu optimieren (siehe Methode 4).

Die Fraktionierung der 70%-Methanol-Fraktion wurde im Anschluss mittels Methode 3 und Methode 4 durchgeführt. (siehe Kap. 4.5)

Methode 4:

In weiteren Versuchen wurde zuerst die stationären Phase (siehe nachfolgend) geändert. Es wurde eine bessere Trennleistung erzielt. Um die Methode weiter zu optimieren, wurde im nachfolgenden Schritt zuerst der Gradient (isokratisch) und in weiterer Folge der Fluss und die Temperatur sukzessive geändert.

Dementsprechend konnte mit folgenden Einstellungen gute Resultate erzielt werden:

Stationäre Phase: *Phenomenex LUNA® C18*, 4,6 x 250 mm, Korngröße 5 µm

Probenkonzentration: 5 mg gelöst in 1 ml MeOH

Fluss: 0,7 ml/min

Mobile Phase: MeOH und H₂O pH 2,8 (angesäuert mit Ameisensäure)

Gradient: isokratisch: 0-38 min 58% MeOH

38-82 min 58-80% MeOH

82-83 min 80-95% MeOH

83-88 min 95% MeOH

89-99min 100% MeOH

Temperatur: 15 °C

Einspritzvolumen: 10 µl

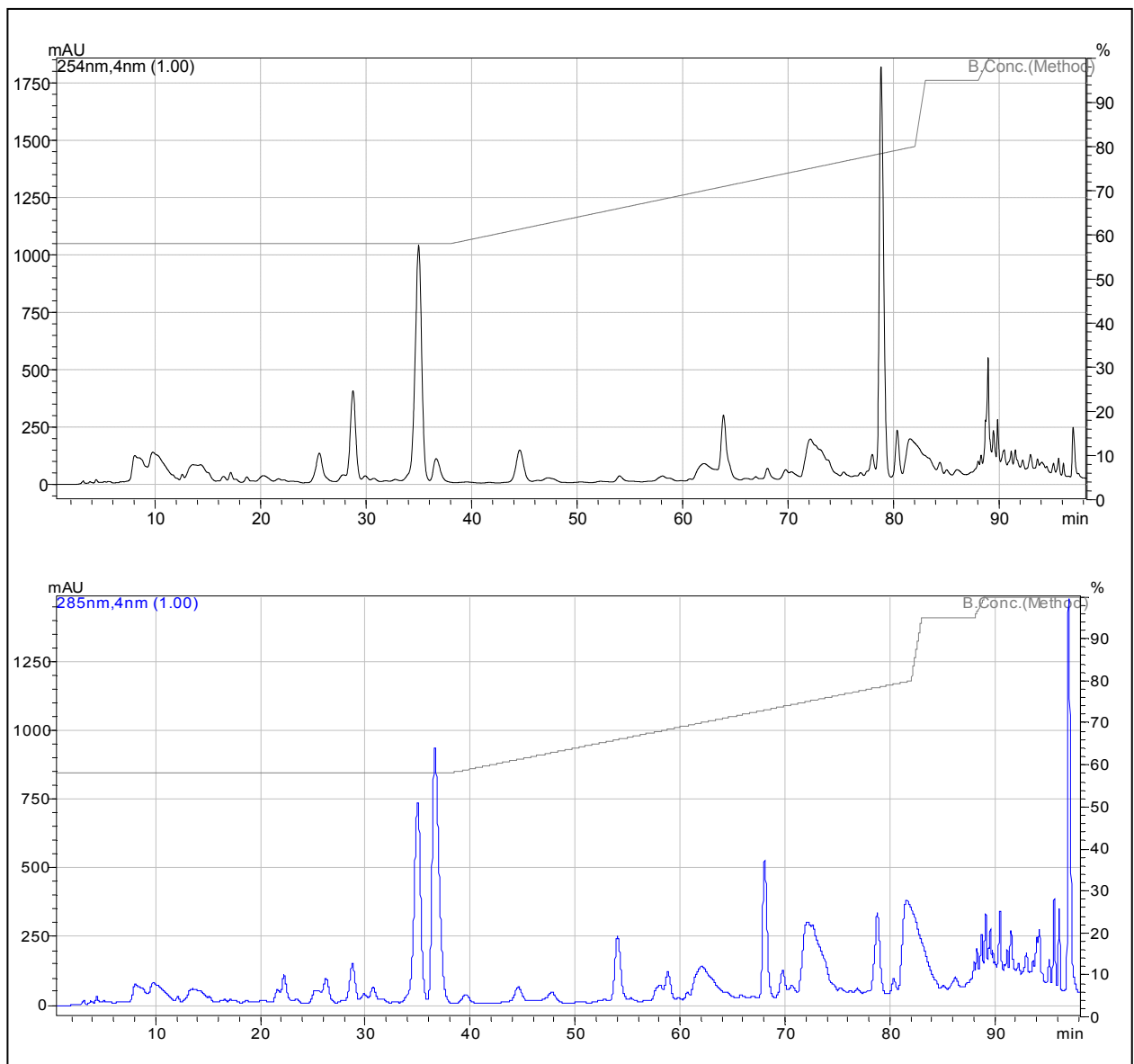


Abb. 20: HPLC-Analyse der 70%-Fraktion bei 254 nm (oben) und 285 nm (unten),
Methode 4

Fazit: Mit dieser Methode konnte eine gute Trennung mit symmetrischen Peaks erreicht werden. Daher wurde beschlossen, das Sammeln der einzelnen Fraktionen, zusätzlich zu Methode 3, mit diesen Einstellungen durchzuführen. (siehe Kap. 4.5)

4.4.2 Auftrennung der 70%-Fraktion mittels semipräparativer HPLC

Der Vorteil der semipräparativen HPLC liegt in der höheren Beladbarkeit, man muss jedoch eine geringere Trennleistung in Kauf nehmen.

Da nach der Auftrennung mittels HPLC die einzelnen Subfraktionen für weitergehende Untersuchungen gesammelt werden sollten, würde dies eine mengenmäßig größere Ausbeute pro Durchlauf bedeuten.

Die Parameter sind **Tab. 3** zu entnehmen.

Mittels semipräparativer Säule konnte jedoch keine ausreichend gute Trennung erreicht werden. Peaks, die mittels analytischer Säule getrennt vorlagen, überlagerten sich im Chromatogramm der semipräparativen HPLC.

Daher wurde die Fraktionierung des Eluats mittels analytischer Säule durchgeführt. (Parameter hierfür sind **Kap. 4.4.1.1** zu entnehmen)

4.5 Fraktionierung der 70 %-Methanol-Fraktion

Als geeignete Methoden, um Subfraktionen der 70 %-Fraktion zu sammeln, wurden die **Methoden 3 und 4** (siehe **Kap. 4.4.1.1**) herangezogen.

Autosampler	<i>Shimadzu SIL-10 AD</i>
Pumpe:	<i>Shimadzu LC – 20 AD</i>
Detektion:	<i>DAD, Shimadzu SPD-M20A</i>
Software	<i>Shimadzu LCsolution Version 1.21 SP1</i>

Tab. 5 :Gerätekonfiguration der HPLC

Methode 3:

Die genauen Parameter dieser Methode sind **Kap. 4.4.1.1** zu entnehmen.

Das folgende Chromatogramm zeigt die gesammelten Subfraktionen:

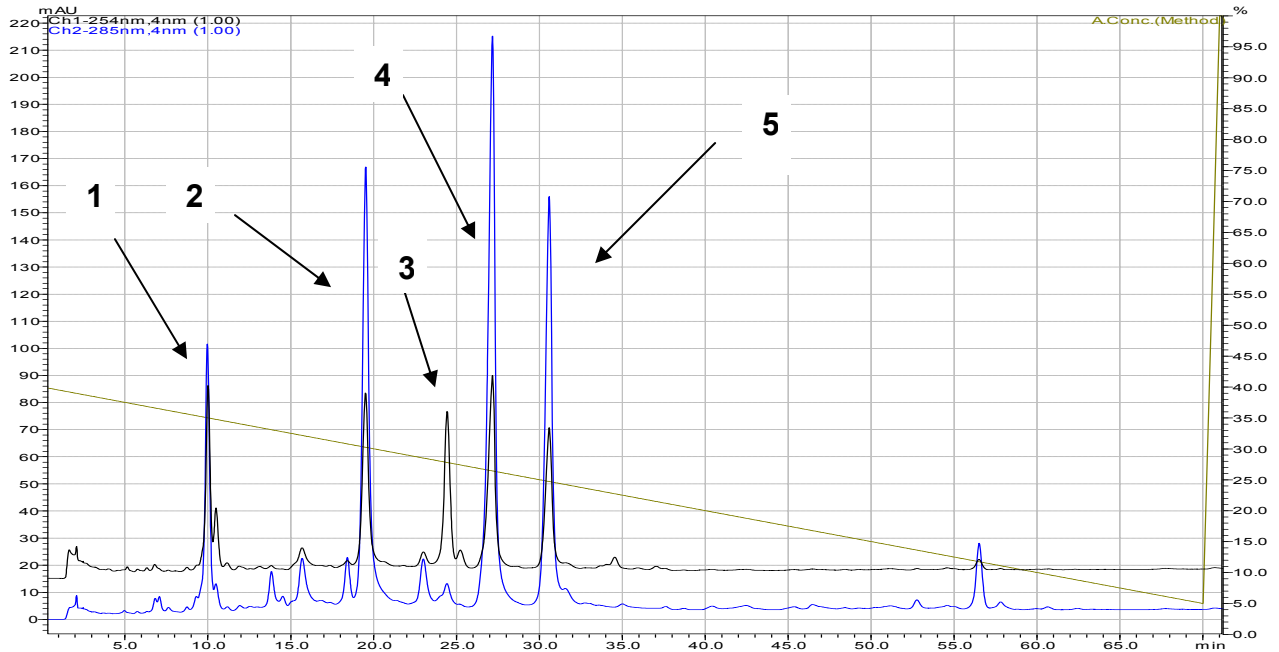


Abb. 21: HPLC-Chromatogramm der 70%-Fraktion, gesammelte Subfraktionen bei 254 nm (oben) und 285 nm (unten), Methode 3

Subfraktion	Retentionszeit (min)	Ausbeute (mg)
1	10-10,5	0,61
2	19-20,3	0,71
3	24-25	0,58
4	26-28	1,08
5	30-31	1,02

Tab. 6: Retentionszeit (min) und Ausbeute (mg) der gesammelte Subfraktionen nach HPLC-Fraktionierung der 70%-Fraktion, Methode 3

Mittels Methode 3 wurden 5 Hauptpeaks gesammelt.

Die genauen Retentionszeiten (min) und Ausbeute (mg) sind **Tab. 6** zu entnehmen.

Methode 4:

Die Parameter für diese Methode sind **Kap. 4.4.1.1.** zu entnehmen.

Das folgende Chromatogramm zeigt die gesammelten Subfraktionen:

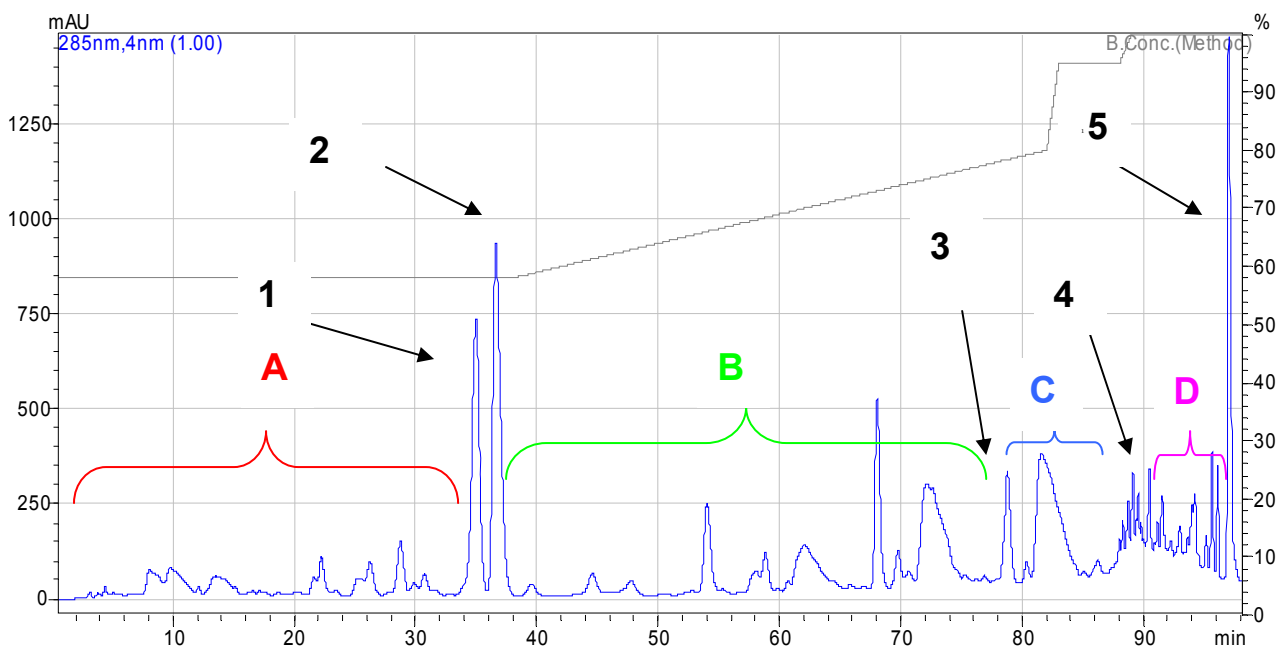


Abb. 22: HPLC-Chromatogramm der 70%-Fraktion, gesammelte Subfraktionen bei 285 nm, Methode 4

Subfraktion	Retentionszeit (min)	Ausbeute (mg)
1	34-36,3	1,34
2	36,3-38,3	0,67
3	78-80	1,37
4	87,5-90,5	1,00
5	96-97	0,46
A	0-34	1,33
B	38,3-78	1,00
C	80-87,5	0,61
D	90,5-96	0,51

Tab. 7: Retentionszeit (min) und Ausbeute (mg) der gesammelten Subfraktionen nach HPLC-Fraktionierung der 70%-Fraktion, Methode 4

Zuerst wurden die Peaks **1-5** in zahlreichen Durchläufen gesammelt.

Die Retentionszeiten und Ausbeute der gesammelten Komponenten sind **Tab. 7** zu entnehmen.

Um die gesamte 70%-Fraktion in Einzelkomponente aufzutrennen und auf ihre antiinflammatorische Wirkung testen zu können, wurden auch die Komponentengemische zwischen den Peaks 1-5 gesammelt. Diese wurde mit den Buchstaben **A-D** beschriftet.

Die 5 Peaks (Subfraktion 1-5) wurden nachfolgend (siehe Kap. 4.5.1) auf Reinheit überprüft, um sie in pharmakologischen Tests, wie die mit Methode 3 erhaltenen Subfraktionen, auf ihre antiinflammatorische Aktivität zu testen.

4.5.1. Überprüfung der Subfraktionen mittels HPLC

Anschließend wurden die **Subfraktionen 1-5** einzeln auf Reinheit geprüft.

Dazu wurde die HPLC-Methode 3 (siehe Kap. 4.4.1.1 – Methode 3) verwendet.

Subfraktion 1:

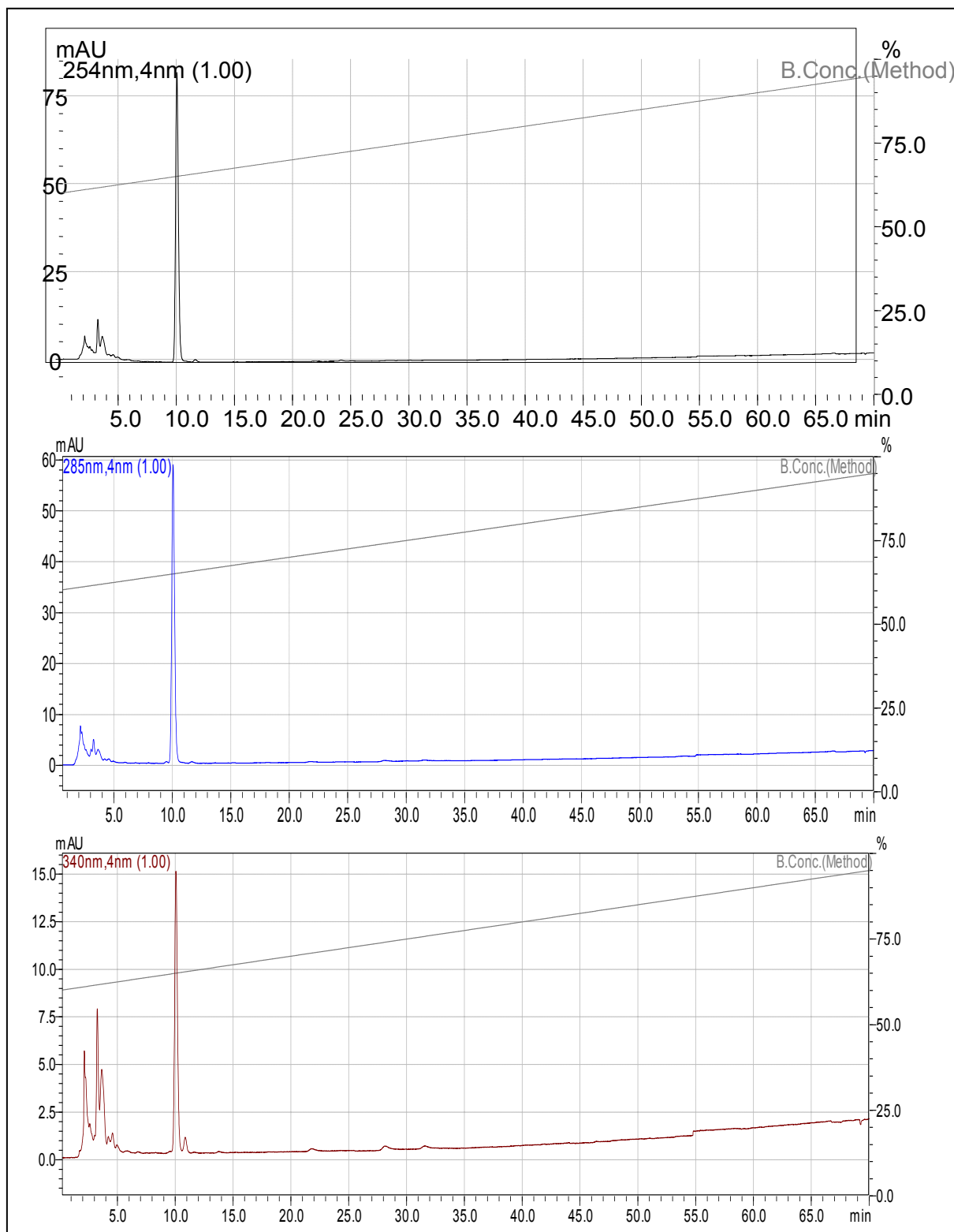


Abb. 23: HPLC-Analyse der **Subfraktion 1** bei $\lambda=254\text{ nm}$, 285 nm und 340 nm

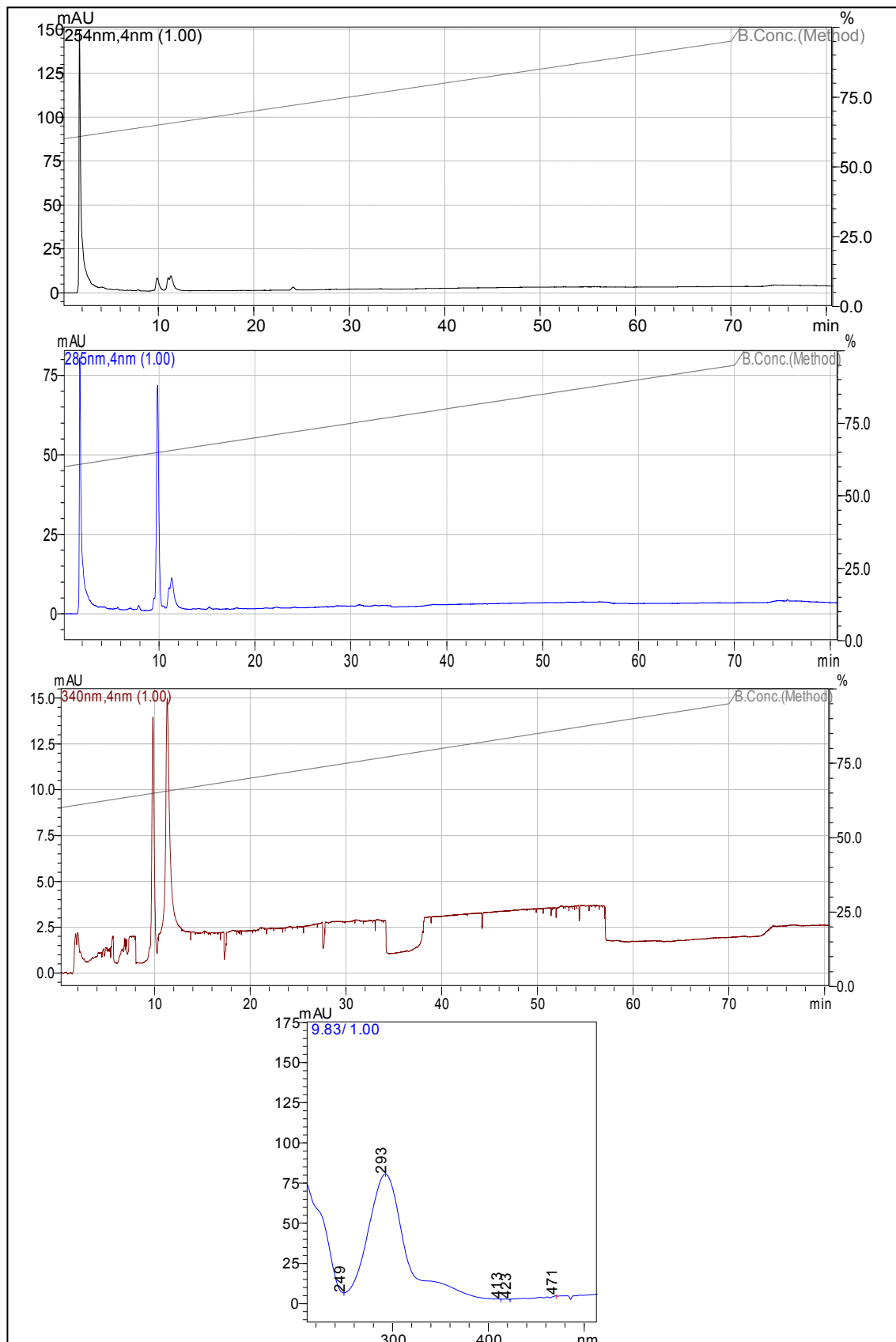
Subfraktion 2:

Abb. 24: HPLC-Analyse der Subfraktion 2 bei $\lambda=254$ nm, 285 nm und 340 nm, sowie UV-Spektrum des Hauptpeaks bei 9,83 min

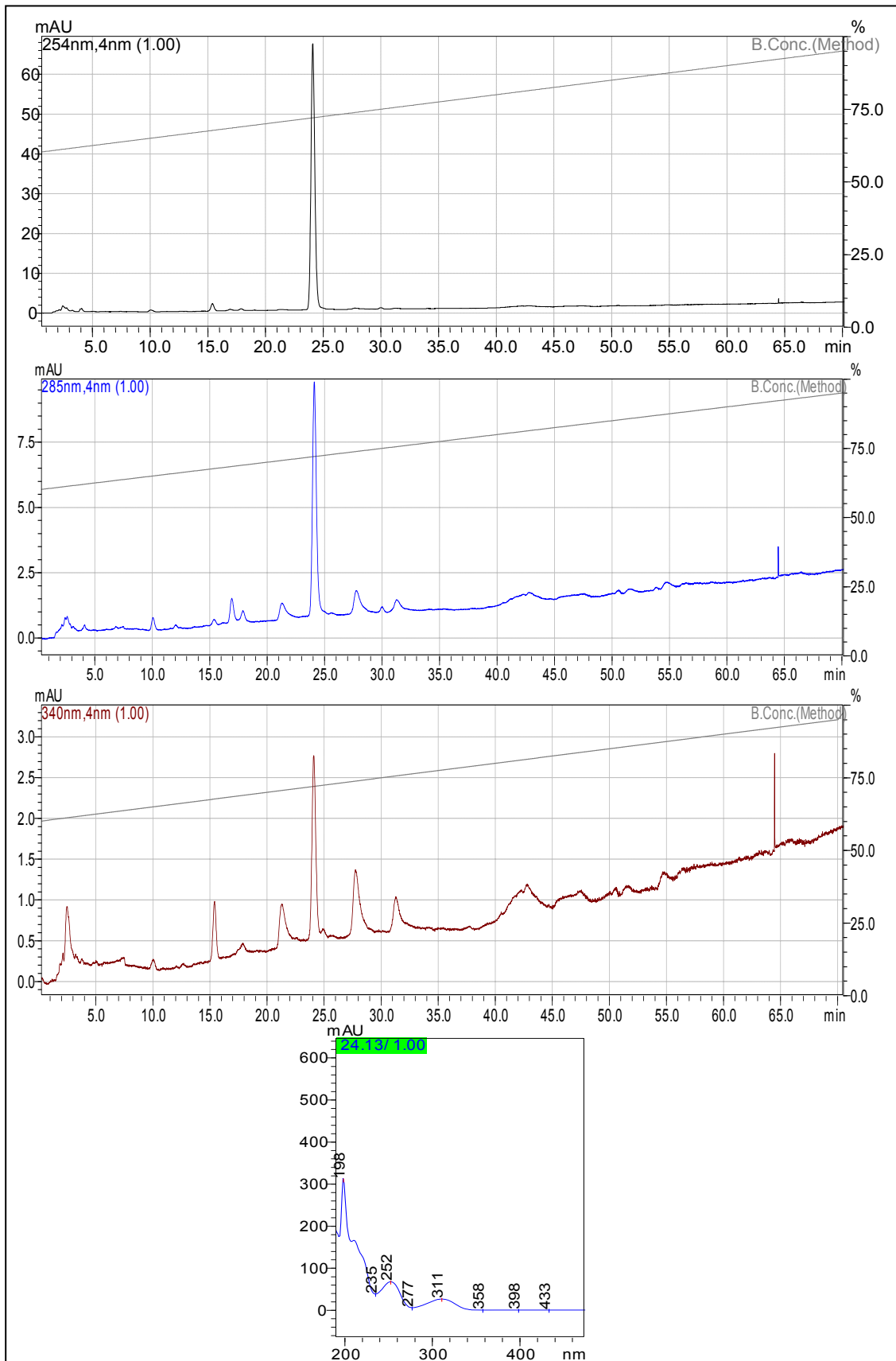
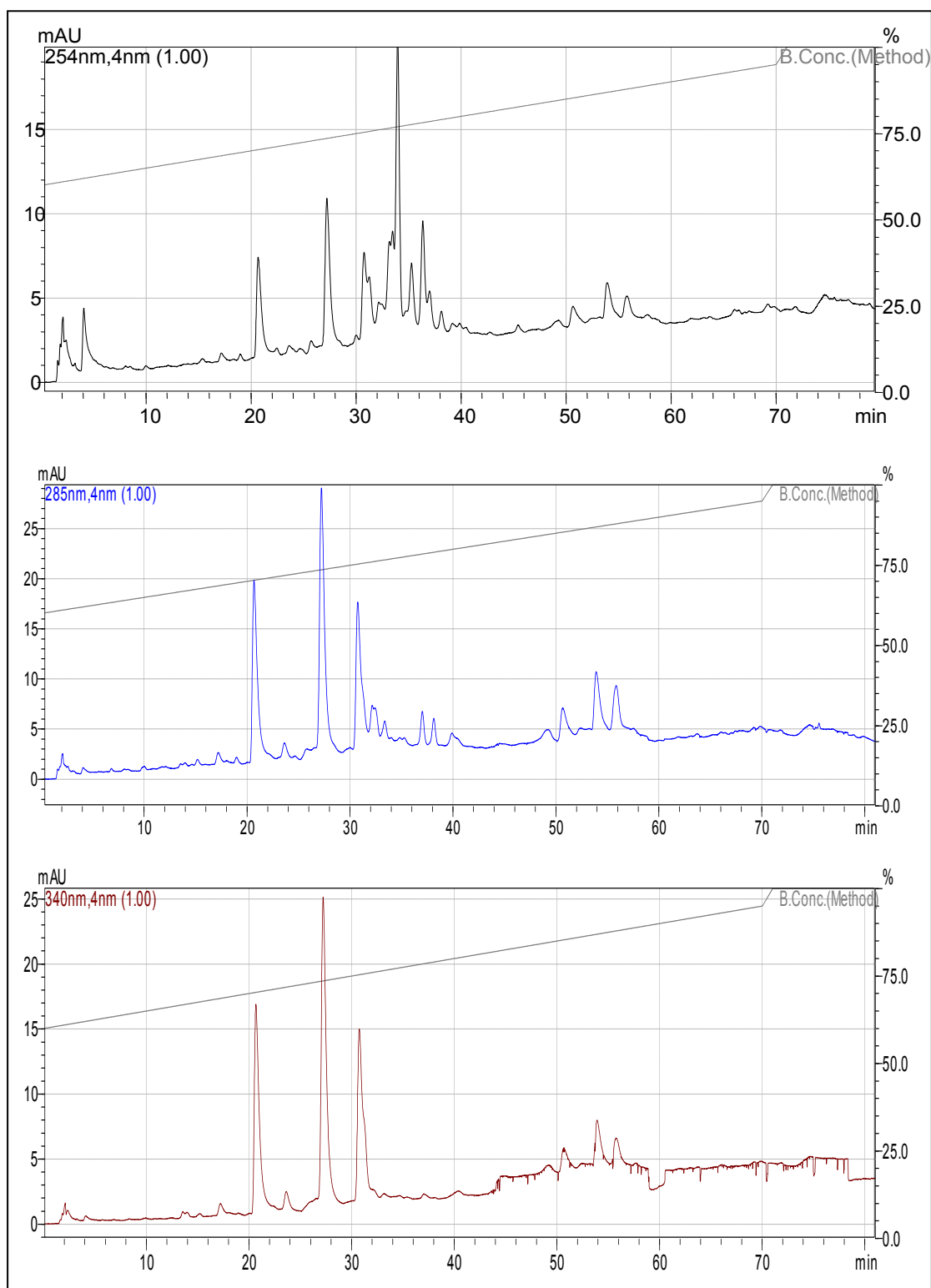
Subfraktion 3:

Abb. 25: HPLC-Analyse der Subfraktion 3 bei $\lambda = 254$ nm, 285 nm und 340 nm, sowie UV-Spektrum des Hauptpeaks bei 24,1 min

Subfraktion 4:**Abb. 26:** HPLC-Analyse der Subfraktion 4 bei $\lambda = 254 \text{ nm}$, 285 nm und 340 nm

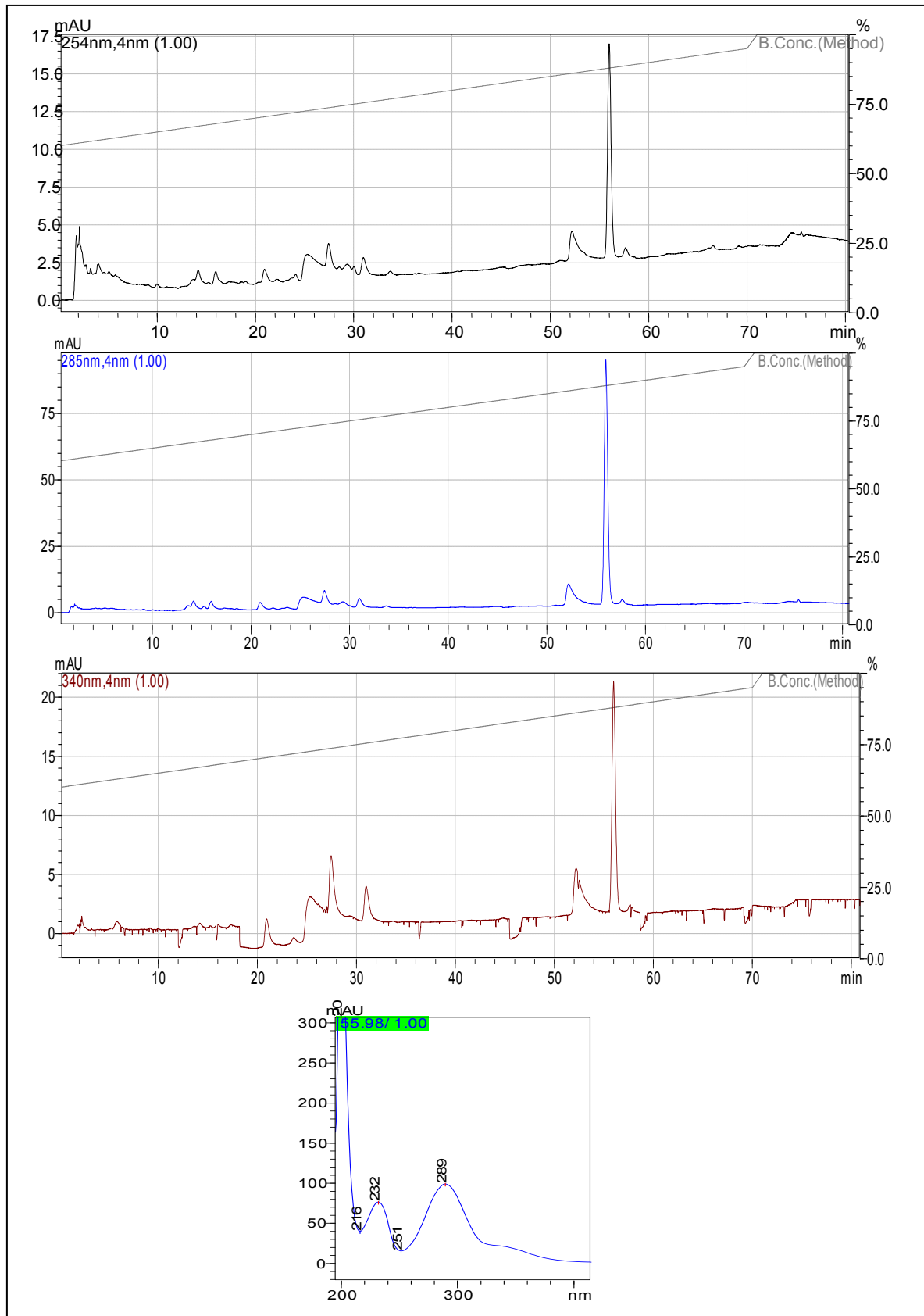
Subfraktion 5:

Abb. 27: HPLC-Analyse der Subfraktion 5 bei $\lambda = 254 \text{ nm}$, 285 nm und 340 nm , sowie UV-Spektrum des Hauptpeaks bei $55,9 \text{ min}$

Anhand der Chromatogramme der Subfraktionen 1-5 (**Abb. 23-27**) konnte gezeigt werden, dass diese in ausreichender Reinheit vorlagen, um sie in pharmakologischen Tests auf ihre antiphlogistische Wirkung zu testen.

5. Pharmakologische Untersuchungen

Für die pharmakologischen Untersuchungen wurden sämtliche Extrakte und Fraktionen zur Trockene gebracht und gewogen (siehe Tab. 7 und 8).

Bezeichn.	Pflanze	Pflanzl. Organ	Sammelort	Gewinnung	Gewicht [mg]
DFM_1	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	DCM-Extrakt	14,07
DFM_2	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	DCM-Extrakt, von Chlorophyll gereinigt	10,96
DFM_3	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	Unlöslicher Rückstand der Chlorophyll Abtrennung	12,66
DFM_4	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	SPE 30% MeOH Fraktion	11,26
DFM_5	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	SPE 70% MeOH Fraktion	12,19
DFM_6	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	SPE 100% MeOH Fraktion	10,26

Tab. 8: In pharmakologischen Untersuchungen verwendete Extrakte von *Dryopteris filix-mas*

Bezeichn.	Pflanze	Pflanzl. Organ	Sammelort	Gewinnung	Gewicht [mg]
DFM_7	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 1/ Methode 4	1,34
DFM_8	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 2/ Methode 4	0,67
DFM_9	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 3/ Methode 4	1,37
DFM_10	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 4/ Methode 4	1,00
DFM_11	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 5/ Methode 4	0,46
DFM_12	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. A/ Methode 4	1,20
DFM_13	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. B/ Methode 4	1,00
DFM_14	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC-Subfrak. C/ Methode 4	0,63
DFM_15	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. D/ Methode 4	0,51
DFM_16	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 1/ Methode 3	0,61
DFM_17	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 2/ Methode 3	0,71
DFM_18	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 3/ Methode 3	0,58
DFM_19	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 4/ Methode 3	1,08
DFM_20	<i>Dryopteris filix mas</i>	Kraut	Ebenwaldhöhe NÖ	HPLC Subfrak. 5/ Methode 3	1,02

Tab. 9: Durch HPLC-Fraktionierung gewonnene Extrakte für pharmakologische Untersuchungen

5.1. NF- κ B-Test

Mittels **NF- κ B-Test** (siehe **Kap. 3.4.1**) wurde auf die antiinflammatorische Wirkung der Subfraktionen getestet.

Alle Proben wurden in zwei unabhängigen Experimenten geprüft, einige wurden dreimal getestet.

Die Durchführung dieses Tests ist **Kap. 3.4.1** zu entnehmen.

Getestete Konzentration: 10 ug/ml (Reinsubstanz)

100 ug/ml (Extrakt)

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 10* zusammengestellt.

<u>Bezeichn.</u>	<u>Inhibierung von NF-κB</u>			<u>Aktivität</u>	<u>Extrakt</u>
	% Restaktivität gegenüber der Kontrolle (100%)				
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3		
DFM_1	27%	NEIN	NEIN	SCHWACH AKTIV	DCM Extrakt, 100 ug/ml
DFM_2	22%	72%	NEIN	SCHWACH AKTIV	DCM Extrakt, frei von Chlorophyll , 100 ug/ml
DFM_3	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	Unlösliche Bestandteile(u.a. Chlorophyll), 100 ug/ml
DFM_4	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	SPE 30% MeOH Fraktion, 100 ug/ml
DFM_5	0%	22%		AKTIV	SPE 70% MeOH Fraktion, 100 ug/ml
DFM_6	41%	70%	NEIN	SCHWACH AKTIV	SPE 100% MeOH Fraktion, 100 ug/ml
DFM_7	NEIN	81%		SCHWACH AKTIV	HPLC Subfrak. 1 (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_8	NEIN	81%		SCHWACH AKTIV	HPLC Subfrak. 2 (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_9	NEIN	86%		SCHWACH AKTIV	HPLC Subfrak. 3 (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_10	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. 4 (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_11	NEIN			NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. 5 (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_12	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. A (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_13	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. B (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_14	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. C (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_15	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. D (Methode 4), 10 ug/ml
DFM_16	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. 1 (Methode 3), 10 ug/ml
DFM_17	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. 2 (Methode 3), 10 ug/ml
DFM_18	NEIN	NEIN		NICHT AKTIV	HPLC Subfrak. 3 (Methode 3), 10 ug/ml
DFM_19	73%	43%	84%	SCHWACH AKTIV	HPLC Subfrak. 4, (Methode 3), 10 ug/ml
DFM_20	86%	87%		SCHWACH AKTIV	HPLC Subfrak. 5, (Methode 3), 10 ug/ml

Tab. 10: Auswertung des NF-κB-Tests

Wie schon aus vorangegangenen Arbeiten [3, 4, 5, 8, 12, 14] bekannt, zeigte vor allem die 70%-Methanol Fraktion einen starken NF- κ B-inhibierenden Effekt.

Die 30%-Fraktion zeigte keinerlei Aktivität.

Die 100%-Methanol-Fraktion wies eine schwache NF- κ B-inhibierende Wirkung auf. Da diese Fraktion jedoch Komponenten der 70%-Fraktion enthält, könnte dies ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein der wirksamen Inhaltsstoffe vor allem in der 70%-Fraktion sein.

Die untersuchten Subfraktionen waren schwach bzw. gar nicht aktiv, jedoch konnte keine der Subfraktionen solch einen signifikanten NF- κ B-inhibierenden Effekt aufweisen, wie es bei der 70%-Methanol-Fraktion der Fall war.

6. Ergebnisse und Diskussion

Anhand der pharmakologischen Tests konnte bestätigt werden, dass sich die wirksamen antiinflammatorischen Substanzen in der 70%-Methanol-Fraktion befinden.

Da die gesammelten Einzelkomponenten keine derartige signifikante Aktivität aufwiesen, wäre es möglich, dass die Wirkung der Hauptfraktion auf synergistischen Effekten der einzelnen Komponenten beruht.

Eine weitere Erklärung für die fehlende Aktivität der Reinsubstanzen wäre, dass die Konzentration, die für die Testung der Substanzen in den pharmakologischen Versuchen verwendet wurde, zu gering war.

Um die erhaltenen chromatographischen Daten sowie die Daten aus den pharmakologischen Tests in Einklang zu bringen, wurde versucht, chromatographische Peaks bzw. Retentionszeitabschnitte in den Chromatogrammen zu finden, die für die antiphlogistische Wirkung verantwortlich sein könnten.

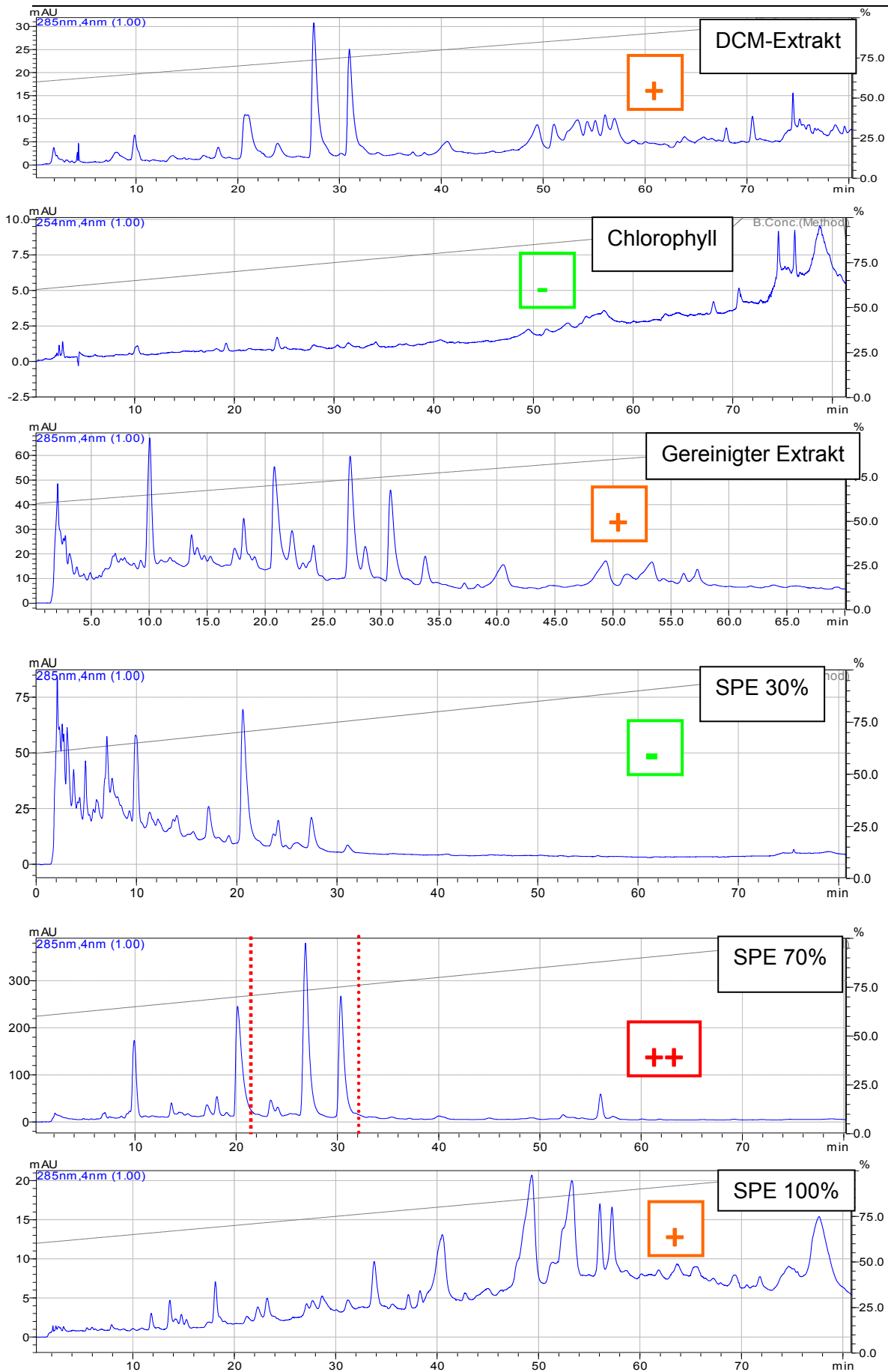


Abb. 28 : Chromatographische Daten und pharmakologische Ergebnisse im Vgl.

- = Keine Aktivität + = Schwache Aktivität ++ = Starke Aktivität

Wie aus **Abb. 28** ersichtlich, zeigt die 70%-Methanol-Fraktion die stärkste Aktivität hinsichtlich NF- κ B-Inhibierung.

Sowohl der Dichlormethan-Extrakt, der gereinigte Extrakt als auch die 100%-Fraktion zeigten eine schwache Inhibierung. Eine Erklärung hierfür wäre, dass alle diese Extrakte, die wesentlichen Peaks der 70%-Methanol-Fraktion in einer geringen Konzentration enthalten.

Die 30%-Fraktion wies keinerlei Aktivität auf.

Die für die inflammatorische Wirkung verantwortlichen Substanzen sind dementsprechend bei einer Retentionszeit von ca. 22 bis 32 Minuten (vgl. **Abb. 28**) zu finden.

Da die Subfraktionen der 70%-Fraktion nicht den gewünschten Effekt hinsichtlich der antiphlogistischen Aktivität aufwiesen, wurde auf eine Strukturaufklärung dieser Substanzen mittels NMR verzichtet.

Eine neuerliche Auftrennung des 70%-MeOH-Extrakts in seine Einzelkomponenten ist zu empfehlen, würde jedoch den Rahmen dieser Diplomarbeit sprengen und muss dementsprechend nachfolgenden Arbeiten vorbehalten bleiben.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in Fortsetzung vorangegangener Arbeiten mit der Isolierung antiinflammatorisch wirkenden Inhaltsstoffen aus *Dryopteris filix-mas*.

In der Volksmedizin wurde der Wurmfarfarn seit jeher als Mittel gegen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises angewendet.

Um die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen ausfindig zu machen, wurde jene Vorgehensweise gewählt, welche sich schon in vorhergehenden Arbeiten [3, 4, 5, 8, 12, 14] bewährt hat. Die getrockneten Farfarnwedel wurden zerkleinert und mittels Dichlormethan extrahiert und von Chlorophyll und sonstigen unlöslichen Bestandteilen befreit.

Aus dem gereinigten Extrakt wurde mittels Festphasenextraktion (SPE) eine 30%-, eine 70%- sowie eine 100%-Fraktion hergestellt.

Aus vorhergehenden Arbeiten war bekannt, dass vor allem die 70%-Fraktion hinsichtlich antiphlogistischer Wirkung die höchste Aktivität aufweist.

Dementsprechend wurde mittels HPLC-Analyse die 70%-Fraktion in ihre Einzelkomponenten zerlegt und diese Fraktionen gesammelt.

Im nächsten Schritt wurden sämtliche Extrakte (Dichlormethan-Extrakt, Gereinigter-Extrakt, Chlorophyll) und SPE-Fractionen (30%-, 70%- und 100%-Methanol-Fraktion) sowie die gesammelten Subfraktionen der 70%-Methanol-Fraktion mittels NF- κ B-Test auf ihre antiinflammatorische Wirkung untersucht.

Vor allem die 70%-Fraktion wies eine hohe Aktivität hinsichtlich der NF- κ B-Inhibierung auf. Die Subfraktionen zeigten hingegen keine signifikante Wirkung.

Dementsprechend wäre eine neuerliche Auftrennung der 70%-Fraktion im größeren Maßstab zu empfehlen, das muss jedoch folgenden Diplomarbeiten vorbehalten sein.

8. Abstract

The present thesis deals with the isolation of anti inflammatory fractions of *Dryopteris filix-mas*.

According to tradition in folk medicine male fern was used against rheumatic diseases. It is not known which compounds are responsible for this effect.

The Department of Pharmacognosy, University of Vienna, started to contract out diploma theses concerning this theme to identify the active substances.

As stated by other theses especially the dichlormethane-extract showed the highest rate regarding to the antiinflammatory activity.

Using solid phase extraction, a 30%-, a 70%- and a 100%-methanol subfraction was prepared.

The 70%-SPE-methanol fraction was further separated using analytical HPLC. A method for the separation and detection of the substances from the 70% fraction was developed and small amounts of these subfractions were isolated.

All obtained compounds and subfraction were tested using NF- κ B-test for their anti-inflammatory activity.

As documented also by other theses, especially the 70%-fraction was the one with the highest activity for NF- κ B inhibition.

However, none of the subfractions showed a significant effect, but again it could be confirmed that the active substances should be located in the 70%-SPE-fraction

9. Literaturverzeichnis

- [1] Gerlach S., Wissenschaftliche Reflexionen über traditionelle Arzneimittel in Österreich, Dissertation, Universität Wien; 2007
- [2] Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band 6 , 5. Auflage, Springer-Verlag, 1993
- [3] Tremesberger M., Screening von Extrakten des Wurmfarns (*Dryopteris filix-mas*) auf antiphlogistische Aktivität: Überprüfung einer volksmedizinischen Anwendung, Diplomarbeit, Universität Wien; 2007
- [4] Ismail S., Aktivitätsgeleitete Fraktionierung von *Dryopteris filix-mas*, Diplomarbeit, Universität Wien; 2009
- [5] Sommergruber M., *Dryopteris filix-mas* : phytochemische und pharmakologische Untersuchungen, Diplomarbeit, Universität Wien, 2007
- [6] adaptiert von: Österreich & Weltatlas, Freytag-Berndt, Wien; 1995
- [7] adaptiert von:
http://de.wikipedia.org/wiki/Echter_Wurmfarn
(Zugriff: 12.06.2014))
- [8] Dvorak K., Analytik und Testung von Fraktionen aus *Dryopteris filix mas*, Diplomarbeit, Universität Wien; 2010
- [9] adaptiert von :
http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/6_droge/filici-r.htm
(Zugriff: 07.07.2014))
- [10] Adam K. P., Becker H. (Hrsg.), Analytik biogener Arzneistoffe, Reihe „Pharmazeutische Biologie“, Band 4, 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2000
- [11] adaptiert von:
<http://de.wikipedia.org/wiki/NF-%CE%BAB>
(Zugriff: 12.09.2014)

- [12] Bruckner C., Bioassay-geleitete Fraktionierung von *Dryopteris filix-mas* zur Auffindung potentiell antiphlogistisch wirksamer Inhaltsstoffe, Diplomarbeit, Universität Wien, 2010
- [13] Schrammel O., Natural compounds with a putative anti-inflammatory activity and their effect on NF- κ B mediated gene transactivation, Diplomarbeit, Universität Wien, 2010
- [14] Huber K., Screening verschiedener Farnextrakte auf Rezeptoraktivierung von PPAR α , PPAR γ und auf Rezeptor-Inhibierung von NF κ B, Diplomarbeit, Universität Wien, 2009
- [15] adaptiert von:
<http://www.piercenet.com/product/pierce-firefly-luciferase-glow-assay-kit>
(Zugriff: 03.09.2014))
- [16] adaptiert von:
<http://www.basf.com/group/corporate/de/content/news-and-media-relations/podcasts/chemical-reporter/fireflies>
(Zugriff: 05.09.2014)
- [17] Lucci P., Pacetti D.; Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis, InTech, 2012
Online unter <http://www.e-booksdirectory.com/details.php?ebook=8154>
(Zugriff: 12.09.2014)
- [18] adaptiert von:
http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/OCP/ch/chb/ocp3/HPLC_skript_bw.pdf
(Zugriff 20.09.2014)
- [19] adaptiert von:
<http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt1/polyzen/physiol/hplc.htm>
(Zugriff: 09.11.2014)

- [20] adaptiert von:
<http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/HPLCfuerNeueinsteiger.pdf>
(Zugriff: 23.09.2014)
- [21] adaptiert von:
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_de_tail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/mob_phase/mobphasem63ht0400.vscml.html
(Zugriff: 26.09.2014)
- [22] adaptiert von:
http://www.univie.ac.at/nutrigenomics/teaching/vo_methoden/HPLC_MS.pdf
(Zugriff: 26.09.2014)

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Nennungen in der VOLKSMED Datenbank in Bezug auf die antientzündliche Wirkung [1]
- Abb. 2:** Indikationen von *Dryopteris filix-mas* [1]
- Abb. 3:** Hinsichtlich antiphlogistischer Aktivität untersuchte Extrakte aus *Dryopteris*
- Abb. 4:** Sammelort des verwendeten Materials [6]
- Abb. 5:** *Dryopteris filix-mas* L. [7]
- Abb. 6:** Chemische Strukturen der Acylphloroglucinole [9]
- Abb. 7:** Schematische Darstellung des Ablaufes der Festphasenextraktion [17]
- Abb. 8:** Komponenten der HPLC [19]
- Abb. 9:** Schematische Darstellung von Kieselgel RP-8 [22]
- Abb. 10:** Mechanismus der NFκB-Regulation [11]
- Abb. 11:** Oxidation von Luciferin mit Hilfe von Luciferase und ATP [15]
- Abb. 12:** Elektrische Drogenmühle Retsch
- Abb. 13 + 14:** Unlösliche Ballaststoffe (u.a. Chlorophyll)
- Abb. 15:** Gelb-grünes Filtrat, größtenteils frei von unlöslichen Bestandteilen
- Abb. 16:** Aufbau der SPE
- Abb. 17:** SPE-Kartusche
- Abb. 18:** Fraktionen mit unterschiedlichen Methanol-Konzentrationen
- Abb. 19:** HPLC-Analyse der 70%-Fraktion bei 254 nm (oben) und 285 nm (unten), Methode 3
- Abb. 20:** HPLC-Analyse der 70%-Fraktion bei 254 nm (oben) und 285 nm (unten), Methode 4
- Abb. 21:** HPLC-Chromatogramm der 70%-Fraktion, gesammelte Subfraktionen bei 254 nm (oben) und 285 nm (unten), Methode 3
- Abb. 22:** HPLC-Chromatogramm der 70%-Fraktion, gesammelte Subfraktionen bei 285 nm, Methode 4

Abb. 23: HPLC-Analyse der Subfraktion 1 bei $\lambda=254$ nm, 285 nm und 340 nm

Abb. 24: HPLC-Analyse der Subfraktion 2 bei $\lambda=254$ nm, 285 nm und 340 nm,
sowie UV-Spektrum des Hauptpeaks bei 9,83 min

Abb. 25: HPLC-Analyse der Subfraktion 3 bei $\lambda= 254$ nm, 285 nm und 340 nm,
sowie UV-Spektrum des Hauptpeaks bei 24,1 min

Abb. 26: HPLC-Analyse der Subfraktion 4 bei $\lambda= 254$ nm, 285 nm und 340 nm

Abb. 27: HPLC-Analyse der Subfraktion 5 bei $\lambda= 254$ nm, 285 nm und 340 nm,
sowie UV-Spektrum des Hauptpeaks bei 55,9 min

Abb. 28: Chromatographische Daten und pharmakologische Ergebnisse im Vgl.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Parameter für die Festphasenextraktion
Tab. 2:	Getestete stationäre Phasen
Tab. 3:	Parameter für die semipräparative HPLC
Tab. 4:	Gesammelte Subfraktionen
Tab. 5:	Gerätekonfiguration der HPLC
Tab. 6:	Retentionszeit (min) und Ausbeute (mg) der gesammelten Subfraktionen nach HPLC-Fraktionierung der 70%-Fraktion, Methode 3
Tab. 7:	Retentionszeit (min) und Ausbeute (mg) der gesammelten Subfraktionen nach HPLC-Fraktionierung der 70%-Fraktion, Methode 4
Tab. 8:	In pharmakologischen Untersuchungen verwendete Extrakte von <i>Dryopteris filix-mas</i>
Tab. 9:	Durch HPLC-Fraktionierung gewonnene Extrakte für pharmakologische Untersuchungen
Tab. 10:	Auswertung des NF- κ B-Tests

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AMP	Adenosinmonophosphat
ÄÖ	Ätherisches Öl
ATP	Adenosintriphosphat
DAD	Diode Array Detector
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
HEK	Human embryonic kidney
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
LC-MS	Liquid Chromotography-Mass Spektrometry
Luc	Luciferase
MeOH	Methanol
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz (Kernspinresonanz)
NP	Normalphase
RP	Reversed Phase
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)

Curriculum Vitae

Magdalena Löwenstein

- **Ausbildung**

10/2004 – dato	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
09/2000 - 06/2002	Kolleg für Internationale Wirtschaft an der HBLA Hollabrunn
09/1992 – 06/2000	Bundesrealgymnasium Ödenburgerstraße, 1210 Wien
09/1988 – 09/1992	Volksschule Dr. Skala-Straße, 1210 Wien

- **Berufliche Erfahrung**

05/2005 – dato	Großfeld-Apotheke, 1210 Wien
05/2004 – 09/2004	Thomas Cook Austria AG, 1020 Wien
12/2002 – 03/2004	Starlight Suiten Hotel Am Heumarkt, 1030 Wien
06/2002 – 11/2002	Landhaus zu Appesbach, 5360 St. Wolfgang