



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Phytochemische Untersuchungen von

Leonurus sibiricus L. (Lamiaceae)

verfasst von

Gudrun Schallauer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreut von: Ao. Univ. Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

„Kein Happy End gibt's umsonst.“

G. Kummer

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Ao. Univ. Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die großartige Betreuung während meiner Diplomarbeit. Ich bin immer gern ins Labor gekommen und konnte sehr viel lernen. Danke, Sabine!

Dr. Martin Zehl danke ich für die Durchführung der MS – Analysen und für so manchen netten Plausch zwischendurch, ob mit oder ohne Kaffee. Danke, Martin! Mein Dank gilt natürlich auch der restlichen Arbeitsgruppe, für die nette Aufnahme während meines Diplomarbeitssemesters. Ich hab mich bei euch allen sehr wohl gefühlt!

Mein besonderer Dank gilt natürlich auch meiner Familie, allen voran meiner Mama. Danke für die finanzielle Unterstützung, das wiederholte Aufbauen und Mut machen, das meist genau im richtigen Moment erfolgt. Danke, Mama!

Ich möchte auch meinen Geschwistern Kathrin und Jürgen danken, für die vielen lustigen Stunden und das viele Daumen halten. Danke, euch zwei!

Meinem Freund Michael gilt ebenfalls besonderer Dank. Ohne deine Unterstützung, dein gutes Zureden, den vielen Spaß, den wir immer zusammen haben und das Beruhigen vor den Prüfungen wäre das Studium wohl viel schwieriger zu bewältigen. Danke, Michi!

Ein sehr großer Dank geht auch an alle meine Freunde, die mich durchs Studium begleitet haben und mich hoffentlich auch weiterhin begleiten werden. Anstatt alle namentlich zu nennen, gibt's für euch ein einfaches, aber von Herzen kommendes Dankeschön!

INHALTSVERZEICHNIS

I) EINLEITUNG

1.)	Mongolische Medizin	3
2.)	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	5
3.)	Zielsetzung der Arbeit	7

II) MATERIALIEN UND METHODEN

1.)	Verwendete Materialien	8
	1.1. Verwendete Pflanze und deren Herkunft.....	8
	1.2. Herstellung des Original Wasserextraktes (OWE)	9
2.)	Methoden.....	10
	2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	10
	2.2. Festphasenextraktion (SPE).....	12
	2.3. Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH 20	13
	2.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	15
	2.5. Flüssigchromatographie – Massenspektrometrie (LC – MS).....	17

III) EXPERIMENTELLER TEIL

1.)	Aufreinigung des OWE mittels SPE	19
	1.1. Cyanophase.....	20
	1.2. C8 – Phase.....	20
	1.2.1. Analyse der SPE C8-Fractionen mittels HPLC.....	24
	1.3. C2 – Phase.....	27
	1.3.1. Analyse der SPE C2 – Fractionen mittels HPLC.....	31
	1.3.2. Analyse der Fraktion SPE_C2_MeOH20_1 mittels LC – MS.....	32

2.)	Aufreinigung des OWE an Sephadex LH 20.....	38
3.)	Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen mittels LC – MS.....	43
4.)	Lokalisierung der Chlorogensäuren auf Kieselgel (RP8-Material) und im Chromatogramm der HPLC – Analyse.....	56

IV) ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1.)	Substanzen der Sephadex – Fraktionen.....	61
2.)	Identifizierung von Substanzen in den Chromatogrammen der HPLC – Analyse der SPE C8 – Fraktionen	62
	2.1. Zuordnung der Peaks im Chromatogramm der SPE C8 – H ₂ O – Fraktion.....	62
	2.2. Zuordnung der Peaks im Chromatogramm der SPE C8 – MeOH – Fraktion	64
3.)	Identifizierung von Substanzen im Chromatogramm der HPLC – Analyse des OWE	67
4.)	Zusammenfassung aller gefundenen Substanzen und deren Strukturen	68

V) ZUSAMMENFASSUNG	72
---------------------------------	-----------

VI) ABSTRACT	73
---------------------------	-----------

VII) LITERATURVERZEICHNIS	74
--	-----------

VIII) ANHANG	76
---------------------------	-----------

IX) LEBENS LAUF.....	78
-----------------------------	-----------

I) EINLEITUNG

Diabetes mellitus bezeichnet ein Syndrom, das durch Insulinmangel im Körper hervorgerufen wird und zu chronischer Hyperglykämie führt (1). Ohne adäquate Behandlung führt diese dauerhafte Erhöhung des Blutzuckerspiegels zu ernsten körperlichen Schäden, wobei hier hauptsächlich das Nervensystem und die Blutgefäße betroffen sind (2). Mit der Entdeckung von Zucker im Urin und dessen Nachweis im Labor, manifestierte sich im 18. Jahrhundert das Wissen über diese Krankheit. Heutzutage gilt Diabetes mellitus als die am häufigsten vorkommende metabolische Erkrankung (3). Allein im europäischen Raum sind laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bereits 60 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt, wobei die Zahl der Betroffenen aufgrund ungesunder Ernährung und fehlender körperlicher Betätigung stetig zunimmt. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation gehen weiters davon aus, dass sich die Zahl der mit Diabetes assoziierten Todesfälle bis 2030 verdoppeln wird (4). Aufgrund der stetig steigenden Zahl der Betroffenen ist eine unermüdliche Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Suche werden auch alte Heilmittel traditioneller Medizin wiederentdeckt und neu bewertet, wobei keinerlei Absicht besteht, die konventionelle Pharmakotherapie zu ersetzen (5).

In vielen Kulturen wurden für lange Zeit Heilpflanzen traditioneller Medizin zur Behandlung von Diabetes angewendet (6). Da sich die Bewohner vieler nicht-industrialisierter Länder teure Arzneimittel oft nicht leisten können oder schlicht keinen Zugang dazu haben, spielt die Anwendung traditioneller Heilpflanzen auch heutzutage noch eine große Rolle (5).

1.) Traditionelle Mongolische Medizin

Die einst als Nomadenvolk lebenden Mongolen konnten sich im Laufe der Zeit detailreiches Wissen und einen reichen Erfahrungsschatz über die Wildpflanzen ihres Landes und deren Gebrauch aneignen (7). Basierend auf mongolischer Volksmedizin, entwickelte sich schließlich die Traditionelle Mongolische Medizin, wobei schamanische Praktiken durch medizinische Theorien, Techniken und Medikationen der Traditionellen Tibetischen Medizin ersetzt wurden. Nachdem der Lamaismus im 16. Jahrhundert die wichtigste Religion im Land geworden war, begann der tibetische Buddhismus auch die medizinische Ausbildung zu

beeinflussen. Auch zur Zeit des Verbotes von Lamaismus und Traditioneller Mongolischer Medizin durch die Sowjetunion, fand diese im Geheimen rege Anwendung (8).

Nach den politischen Veränderungen in der Sowjetunion, wurde das Verbot aufgehoben. Heutzutage genießt die Traditionelle Mongolische Medizin eine breite Akzeptanz in der Bevölkerung und in vielen Kliniken werden sowohl westliche Medizin als auch Traditionelle Mongolische Medizin angeboten (9). In einer Studie der Universität Stanford (USA), gaben 8 % der befragten Mongolen an, im vergangenen Jahr ausschließlich Traditionelle Mongolische Medizin angewendet zu haben während 38 % der Befragten sowohl westliche als auch traditionelle Medizin angewendet hatten. Die Anwender traditioneller Medizin unterschieden sich nicht bezüglich Alter, Geschlecht oder ländlichem/städtischem Wohnsitz, jedoch schien die Art der Krankheit Einfluss auf die Wahl der medizinischen Betreuung zu haben (10).

Grundsätzlich folgt die Traditionelle Mongolische Medizin den Regeln der Tibetischen Medizin und des Tibetischen Buddhismus. Demnach beruht die Gesundheit des menschlichen Körpers auf einem Gleichgewicht der drei lebenserhaltenden Prinzipien „hii“, „sar“ und „badgan“. Eine Störung dieses Gleichgewichtes führt zu einer Erkrankung. Die Hauptaufgabe eines traditionellen Mediziners ist es, dieses Gleichgewicht im Körper wieder herzustellen. Die Therapie einer Krankheit besteht hauptsächlich aus Ernährungsumstellung, und Änderung der Lebensgewohnheiten. Neben anderen Methoden wie Massagen oder Akkupunktur, werden auch medizinische Zubereitungen zur Heilung verwendet, welche hauptsächlich aus Pflanzen bestehen (9).

2.) *Leonurus sibiricus* L.

Die vorliegende Arbeit galt der Untersuchung des Original-Wasserextraktes (OWE) der mongolischen Arzneipflanze *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae).



Abb. 1: *Leonurus sibiricus* L.

(http://www.elixier.de/product_info.php?products_id=882&osCsid= 21.1.2013)

Leonurus sibiricus L. wird in der Traditionellen Mongolischen Medizin sowohl gegen Bluthochdruck oder Vergiftungen als auch beim Krankheitsbild Diabetes mellitus angewendet, wobei auch viele andere Pflanzen wie etwa *Achillea asiatica* oder *Asparagus officinalis* bei der Behandlung von Diabetes mellitus Anwendung finden (11). In früheren Arbeiten wurde die Wirkung von *Leonurus sibiricus* L. bezüglich der Glucoseaufnahme im Glucose-uptake-assay bzw. der Insulinfreisetzung an INS-1E-Zellen überprüft. Während die Butanolfraction eines Methanolextraktes von *Leonurus sibiricus* L. zu einer erhöhten Glucoseaufnahme führte, erwies sich der OWE im Glucose-uptake-assay als unwirksam. Jedoch zeigte sich in Anwesenheit des OWE eine gesteigerte Insulinfreisetzung an INS-1E-Zellen (12).

Phytochemisch betrachtet vereint ein OWE von *Leonurus sibiricus* L. eine große Zahl an Stoffgruppen in sich. So sind beispielsweise Flavonoide wie Lavandulifoliosid oder Verbascosid (12), verschiedene Caffeoylchinasäuren und Betaine (13) vertreten.

3.) Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit kann in zwei Aufgabenstellungen unterteilt werden.

Die erste Aufgabe bestand darin, Zucker, sowie die Stoffgruppe der Betaine möglichst effizient und einfach vom Original-Wasserextrakt (OWE) von *Leonurus sibiricus* L. abzutrennen. Da der OWE in weiterer Folge an INS 1E-Zellen auf die Förderung der Insulinfreisetzung getestet werden sollte, war die Abtrennung der Zucker gefragt, um eine Zucker-bedingte Insulinfreisetzung ausschließen zu können. Die Stoffgruppe der Betaine hatte sich in Tests bereits als unwirksam bezüglich der Insulinfreisetzung herausgestellt. Da diese Verbindungen jedoch aufgrund ihres zwitterionischen Charakters schwierig zu handhaben waren und sich immer wieder als störend erwiesen, sollte auch für sie eine Möglichkeit der Abtrennung vom OWE gefunden werden.

Der zweite Teil der Aufgabenstellung bestand darin, den sehr komplexen Original-Wasserextrakt in Fraktionen analysierbaren Umfangs aufzutrennen, um auf diese Weise möglichst viele Inhaltsstoffe identifizieren zu können.

II) MATERIALIEN UND METHODEN

Das folgende Kapitel bietet einen Überblick über das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial sowie die zur Analytik eingesetzten Methoden.

1.) Verwendete Pflanze und deren Herkunft

Die Sammlung des verwendeten Pflanzenmaterials erfolgte im August 2009 in der Mongolei, Provinz Archangai (s. Abb. 2).



Abb. 2: Landkarte der Mongolei; roter Bereich = Ort der Sammlung (Quelle: Google Maps)

Das gesammelte Pflanzenmaterial wurde an der State University of Mongolia, Ulaanbaatar, identifiziert. Der entsprechende Herbarbeleg Nr. 10080805 ist im Herbarium der School of Pharmacy, University of Mongolia, aufbewahrt. Die oberirdischen Pflanzenteile wurden gemahlen und in dieser Form weiterverwendet, die laborinterne Bezeichnung des verwendeten Materials lautete „LS 08/10, gemahlen am 20. 4. 2011“.

1.1. Herstellung des Original Wasserextraktes (OWE)

Traditionell angewendet, wird das Drogenpulver mit viel Wasser geschluckt. Bei der Herstellung des OWE wurde deshalb darauf geachtet, die natürlichen Einnahmebedingungen zu simulieren.

Die verschiedenen im Labor nach Herstellung durch meine Vorgängerin Carina Burgstaller noch vorhandenen OWE-LS wurden, nachdem deren Äquivalenz durch die Anfertigung einer DC nachgewiesen wurde, vereinigt. Um für die geplanten Analysen eine ausreichende Menge an Extrakt zur Verfügung zu haben, wurde außerdem neuer Original-Wasserextrakt hergestellt.

Für die Herstellung wurden 100 g Drogenpulver eingewogen. Diese wurden gleichmäßig auf drei Kolben aufgeteilt und im Verhältnis 1:25 mit Leitungswasser versetzt. Das Leitungswasser wurde zuvor mit Trifluoressigsäure auf pH 2 eingestellt, um die Verhältnisse im Magen zu simulieren. Anschließend wurde 2h bei 40 °C im Rotationsverdampfer unter leichtem Drehen extrahiert. Dies diente sowohl der besseren Durchmischung, als auch der Simulation der Darmperistaltik. Danach wurde filtriert, und der Extrakt im Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck etwas eingengt, um die restliche Säure zu entfernen. Der Extrakt wurde im Kolben tiefgefroren und mittels Lyophilisation zur Trockene gebracht. Insgesamt konnten 14 g OWE gewonnen werden.

2.) Methoden

Im folgenden Teil werden die während der Arbeit verwendeten chromatographischen und spektrometrischen Methoden angeführt, sowie die verwendeten Parameter beschrieben.

2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (DC) kann sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt werden und spielt aufgrund des geringen apparativen Aufwands eine wichtige Rolle bei der Analyse von Substanzen und Substanzgemischen. In dieser Arbeit wurde die DC ausschließlich analytisch verwendet. Sie diente der Charakterisierung von Extrakten und erhaltenen Fraktionen und wurde, nicht zuletzt wegen ihrer raschen Durchführbarkeit, sehr häufig eingesetzt. In Tab. 1 sind die verwendeten DC-Systeme, in Tab. 2 die eingesetzten Sprühreagentien angeführt.

Nachzuweisende Stoffgruppen	Stationäre Phase	Mobile Phase
Zucker	TLC Silica Gel 60 F 254, Aluminium Fertigplatte Merck	Dichlormethan (60 T) – Essigsäure _{conc.} (32 T) – Methanol (12 T) – Wasser (8 T)
Betaine	TLC Silica Gel 60 F 254, Aluminium Fertigplatte Merck	Dichlormethan (5 T) – Methanol (4 T) – NH _{3 conc.} (1 T)
Flavonoide	TLC Silica Gel 60 F 254, Aluminium Fertigplatte Merck	HEES = Ethylacetat (100 T) – Ameisensäure _{conc.} (11 T) – Essigsäure _{conc.} (11 T) – Wasser (26 T)
Kohlenwasserstoffe (allg. Nachweis)	TLC Silica Gel 60 F 254, Aluminium Fertigplatte Merck	HEES

Tabelle 1: Parameter der verwendeten DC-Systeme

Die zur Detektion der einzelnen Stoffgruppen verwendeten Sprühreagentien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Nachzuweisende Stoffgruppen	Sprühreagens	Herstellung
Zucker	Diphenylamin – Anilin – Phosphorsäure	0,5 g Diphenylamin in 0,5 ml Anilin lösen und mit 20 ml Aceton und 4 ml Phosphorsäure (85 %) versetzen
Betaine	Dragendorff „spezial“	50 ml Aqua dest., 3,5 ml H ₂ SO _{4 conc.} , 2 ml Essigsäure conc., 0,17 g Wismut – III – nitrat, 10 ml KI-Lösung 40 %, Aqua dest. ad 100 ml
Flavonoide	Naturstoffreagens A + Polyethylenglycol 400 (NSRA + PEG 400)	NSRA: 5 g NSRA + 495 ml MeOH PEG 400: 25 g PEG 400 + 475 ml Ethanol 96 %
Kohlenwasserstoffe (allg. Nachweis)	Anisaldehyd – Schwefelsäure	77 ml MeOH, 0,45 ml Anisaldehyd und 9 ml Essigsäure conc. in einem Erlenmeyer-Kolben mischen und gut kühlen (Gefrierschrank!). In die eiskalte (!!!) Lösung 4,5 ml Schwefelsäure conc. tropfenweise zufügen, dabei den Kolbeninhalt ständig durchmischen.

Tabelle 2: Sprühreagentien für die Derivatisierung der DC-Platten und deren Herstellung

Die Detektion erfolgte sowohl vor, als auch nach dem Besprühen bei Tageslicht, unter UV 254 nm und UV 366 nm.

2.2. Festphasenextraktion (SPE)

Bei der Festphasenextraktion handelt es sich um einen physikalischen Extraktionsvorgang zwischen einer mobilen Phase (dem Elutionsmittel) und einer stationären Phase (dem Sorbens) (14). Die SPE wird in fertigen oder handgefüllten Kartuschen unter Anlegen von Vakuum durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde die SPE zur Aufreinigung des OWE unter Unterdruck eingesetzt. Deren Ziel war es, sowohl Zucker, vor allem Glucose, Fructose und Saccharose, als auch Betaine möglichst vollständig vom OWE abzutrennen.

Kartusche	Dimensionen
Fertigkartusche: Varian Bond Elut, Bonded Phase = C8 Part. Number: 1210-2053	Raum über der stationären Phase = 6 CC ($r = 0,65 \text{ cm}$, $h = 0,8 \text{ cm}$) 1 RV = 6 ml
Fertigkartusche: Varian Mega Bond Elut, Bonded Phase = CN Part. Number: 1225-6006	Raum über der stationären Phase = 6 CC ($r = 0,65 \text{ cm}$, $h = 0,8 \text{ cm}$) 1 RV = 6 ml
Handbefüllung: LiChroprep RP-2, Korngröße 25 – 40 μm , Merck	$r = 1,35 \text{ cm}$, $h = 3,5 \text{ cm}$ ($r^2\pi * h = 20,04 \text{ cm}^3$) 1 RV = 40 ml

Tabelle 3: Parameter der eingesetzten Kartuschen; RV = Raumvolumen

Die Kartuschen wurden gewaschen, anschließend equilibriert und gründlich getrocknet.

Die Probe wurde eingewogen, in Wasser gelöst und tropfenweise auf die Kartusche aufgetragen, wobei darauf geachtet wurde, die Oberfläche gleichmäßig zu benetzen (Konzentrationen der eingesetzten Lösungen bzw. Einwaage des jeweils eingesetzten Extraktes siehe S. 20, Kapitel III, 1.1. – 1.3.). Nach kurzer Wartezeit, die dem Trocknen der aufgetragenen Probe diente, wurde das Elutionsmittel aufgetragen. Als Elutionsmittel wurden Wasser und Methanol verschiedener Konzentration eingesetzt. Die Probe wurde unter schwachem Vakuum tropfenweise eluiert, wobei die Elutionsfolge je nach eingesetzter stationärer Phase variierte. Die erhaltenen Fraktionen wurden zur Trockene gebracht und mittels DC und HPLC analysiert (siehe S. 20, Kap. III, 1.1. – 1.3.).

2.3. Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20

Unter Säulenchromatographie versteht man die Trennung von Substanzgemischen an in Säulen gepackten stationären Phasen. Man unterscheidet verschiedene Trennprinzipien, wobei in dieser Arbeit eine Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20 durchgeführt wurde.

In der Größenausschlusschromatographie erfolgt die Trennung nach der Größe der zu trennenden Moleküle eines Substanzgemisches. Kleine Moleküle, welche in die Poren der stationären Phase diffundieren können, verweilen länger in der Säule, während größere Moleküle weniger stark mit der stationären Phase interagieren und die Säule somit schneller passieren können.

Als stationäre Phase wurde Sephadex LH20 eingesetzt. Dabei handelt es sich um quervernetzte, hydroxypropylierte Dextranbeads, wobei die Vernetzung durch Umsetzen des Dextrans mit Epichlorhydrin erreicht wird (15).

Säulendimensionen	Säulenmaterial	Elutionsmittel	Fraktionen
Gesamthöhe: 107 cm Durchmesser: 3,5 cm Trennstrecke: 62 cm	Sephadex LH20	MeOH _{dest.} 100 %	MeOH100_1 – 14
		MeOH _{dest.} 70 %	MeOH70_15 – 24

Tabelle 4: Parameter der für die Aufreinigung des OWE verwendeten Säule und der Elution

1 g OWE wurde eingewogen, in 5 ml einer 20 %igen MeOH_{dest.}/Wasser-Mischung gelöst und kurz zentrifugiert.

Nach dem Füllen der Säule wurde das Elutionsmittel auf das Niveau des Säulenmaterials abgelassen und die gelöste Probe wurde mittels einer 2 ml Kolbenpipette gleichmäßig aufgetropft. Nach Absinken der Probe auf das Niveau des Säulenmaterials wurde mittels einer 10 ml Kolbenpipette unter kreisenden Bewegungen das Elutionsmittel aufgebracht, wobei darauf geachtet wurde, das Säulenmaterial nicht aufzuwirbeln.

Als Elutionsmittel diente zunächst MeOH_{dest.} 100 %. Da nach erfolgter Elution nach wie vor ein Rückstand der Probe als brauner Ring auf der Säule sichtbar war, wurde versucht, den verbliebenen Rest mit MeOH_{dest.} 70 % von der Säule zu eluieren. Die Kolben wurden in

regelmäßigen Zeitabständen bzw. unter Berücksichtigung der wandernden Banden ausgetauscht und so konnten 14 (MeOH100_1 – MeOH100_14) bzw. 10 Fraktionen (MeOH70_15 – MeOH70_24) zu jeweils etwa 10 ml gesammelt werden.

Das Elutionsmittel wurde im Rotationsverdampfer entfernt, und die Kolben wurden gewogen. Die erhaltenen Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Tab. 5 angeführt. In weiterer Folge wurden die Fraktionen mittels DC, HPLC, sowie LC-MS analysiert (siehe S. 38, Kap. III, Punkt 2 und 3).

Durch Elution mit MeOH 100 % gewonnene Fraktionen	Ausbeuten
1	0,002 g
2	0,014 g
3	0,024 g
4	0,041 g
5	0,121 g
6	0,053 g
7	0,071 g
8	0,046 g
9	0,028 g
10	0,056 g
11	0,043 g
12	0,035 g
13	0,035 g
14	0,162 g
Durch Elution mit MeOH 70 % gewonnene Fraktionen	Ausbeuten
15	0,001 g
16	0,002 g
17	-
18	-
19	-
20	-
21	0,001 g
22	0,014 g
23	0,002 g
24	-

Tab. 5: Ausbeuten der durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20 gewonnenen Fraktionen des OWE

2.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) wird zur Säulenchromatographie gezählt. Die HPLC kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden, in dieser Arbeit wurde sie jedoch ausschließlich analytisch verwendet.

Durch die kleine Partikelgröße der stationären Phase ergibt sich eine hohe Packungsdichte in der Trennsäule. Um trotzdem eine zufriedenstellende Fließgeschwindigkeit zu erreichen, wird das Fließmittel unter erhöhtem Druck mit Hilfe von Pumpen durch die Trennsäule bewegt. Der resultierende Druck ergibt sich dabei aus der Dichte der Säulenpackung, der Viskosität des verwendeten Fließmittels, sowie aus der Länge der Trennsäule und lag in dieser Arbeit bei etwa 130 bar.

Die in der HPLC verwendeten Elutionsmittel müssen hohen Anforderungen entsprechen und eine hohe Reinheit aufweisen. Weiters muss die zu analysierende Probe im verwendeten Elutionsmittel löslich sein, um ein Verstopfen der Trennsäule zu verhindern. In dieser Arbeit handelte es sich bei der mobilen Phase um ein Acetonitril-Wasser-Gemisch, wobei das Wasser mit $\text{HCOOH}_{\text{conc.}}$ auf pH 2,8 eingestellt wurde (16).

Bei der Auswahl der stationären Phase unterscheidet man zwischen Normalphasen- und Umkehrphasenchromatographie. Bei der Normalphasen-Chromatographie wird Kieselgel als polare stationäre Phase verwendet, während als mobile Phase apolare Lösungsmittel zum Einsatz kommen. Bei der Umkehrphasen-Chromatographie gelten gemäß der Bezeichnung umgekehrte Bedingungen. Durch chemisch modifizierte Kieselgele erhält man hier eine apolare stationäre Phase, während polare Lösungsmittel als mobile Phase dienen (15).

In dieser Arbeit wurde eine Luna Phenyl-Hexyl-Säule verwendet. Bei der stationären Phase handelt es sich also um über C6-Ketten an Kieselgel gebundene Phenylgruppen, was dem Kieselgel eine ausgewogene hydrophobe und aromatische Selektivität verleiht (17).

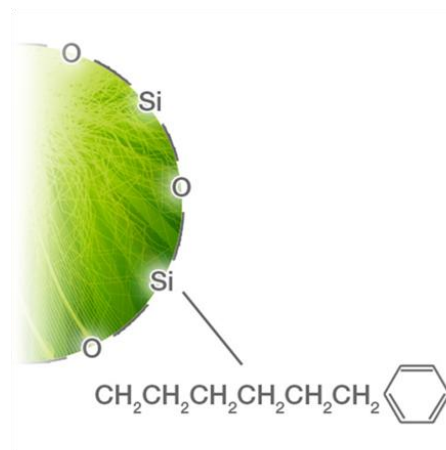


Abb. 3: Schematische Darstellung des verwendeten Säulenmaterials Phenyl-Hexyl

Es wurden verschiedene Methoden getestet, welche sich durch die Steilheit des Gradienten unterschieden. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung des OWE kam schlussendlich für die Analysen der gesamten Arbeit eine Methode mit einem sehr flachen Gradienten von 0,5 % zum Einsatz. Die Parameter der HPLC sowie der verwendeten Methode sind in Tab. 6 angeführt.

Gerät	Shimadzu Degaser DGU-20A5 Shimadzu Autosampler SIL-20AC HT Shimadzu DAD SPD-M20A Shimadzu Säulenofen CTO-20AC Temperatur d. Säulenofens: 25°C		
Software	Shimadzu LAB-Solution-LC-Solution		
Stationäre Phase	Säule: Phenomenex, Luna Phenyl-Hexyl 250 x 2 mm Partikeldurchmesser: 5 µm		
Mobile Phase	A: Wasser, HCOOH conc. , pH 2,8 B: Acetonitril		
Flussrate	0,2 ml/min		
Detektion	Shimadzu UV/VIS Photodiode Array Detector		
Methode	min	B conc.	Steigerungsrate
	0	5 %	0,5 %/min
	70	40 %	
	71 - 80	95 %	

Tabelle 6: Parameter der HPLC

2.5. Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Die Massenspektrometrie (MS) gilt als wichtige Analysenmethode in der pharmazeutischen Forschung und spielt bei der Analytik biogener Stoffe eine bedeutende Rolle. Das Prinzip der MS besteht darin, die Probe zu ionisieren, die Ionen entsprechend ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis zu trennen und schließlich zu detektieren.

Bei der Ionisation werden „harte“ und „sanfte“ Ionisationstechniken unterschieden. Bei „sanften“ Ionisationstechniken wie der chemischen Ionisation, werden nur wenige Fragmentationen gebildet. Hingegen kommt es bei „harten“ Ionisationstechniken wie der Elektronenstoß-Ionisation, neben dem Molekülion auch zur Entstehung zahlreicher Fragmentationen.

In dieser Arbeit kam die Elektrospray-Ionisation zum Einsatz, welche zu den „sanften“ Ionisationstechniken gezählt wird. Die gelöste Probe wird dabei durch eine feine Kapillare in die Ionenquelle eingebracht. Durch die Spannung zwischen Kapillarenspitze und Gegenelektrode entsteht ein elektrisches Feld, welches die Zerstäubung der Probenlösung bewirkt. Es bilden sich positiv bzw. negativ geladene Tröpfchen, welche durch fortschreitende Verdampfung des Lösungsmittels immer kleiner werden. Schließlich kommt es durch elektrostatische Kräfte zwischen gleich geladenen Tröpfchen zur Coulomb-Explosion und zur Entstehung vieler kleinerer Tröpfchen. Schlussendlich resultieren aus diesem Prozess positiv bzw. negativ geladene Ionen, welche in den Analysator eingebracht werden (15).

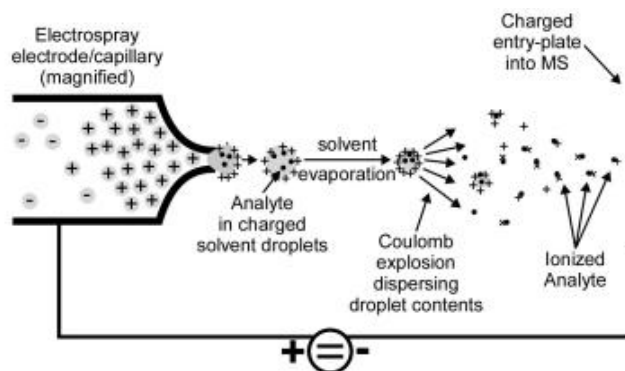


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ionisationsvorganges (18)

Durch Kopplung von HPLC und MS konnten die Proben vor der Analyse mittels MS aufgetrennt werden, wodurch Peaküberlagerungen verhindert werden sollten. Für die Auftrennung mittels HPLC wurde die bereits beschriebene HPLC-Methode verwendet (siehe S. 16, Kapitel II, 2.4., Tab. 6).

MS-Parameter		
	MS Sephadex-Fraktionen	MS SPE-C2-Fraktion
Gerät	Bruker Daltonics ESI-IT-MS	Bruker Daltonics ESI-IT-MS
Ion Polarity	Negative	Positive
Ion Source Type	ESI	ESI
Dry Temperature	340 °C	340 °C
Nebulizer	26,00 psi	26,00 psi
Dry Gas	9 l/min	9 l/min
HV Capillary	3,5 kV	- 3,7 kV
Messbereich MS	m/z 80 - 800	m/z 80 - 750
Messbereich MSⁿ	m/z 40 - 800	m/z 40 - 750
HPLC-Einheit	Dionex UltiMate 3000 RSLC-series System	Dionex UltiMate 3000 RSLC-series System

Tab. 7: Parameter der massenspektrometrischen Messung

III) EXPERIMENTELLER TEIL

1.) Aufreinigung des OWE mittels SPE

Die Aufreinigung des OWE mittels Festphasenextraktion hatte das Ziel, Zucker und Betaine möglichst vollständig vom verwendeten Extrakt abzutrennen.

Bei der Abtrennung der Zucker wurden vor allem Glucose, Fructose und Saccharose berücksichtigt. Da in Folge dieser Arbeit eine Testung des Extraktes auf Förderung der Insulinfreisetzung an INS-1E-Zellen geplant ist, war die Abtrennung der Zucker essentiell. Damit kann ausgeschlossen werden, dass eine etwaige Insulinfreisetzung durch Monosaccharide im Extrakt ausgelöst wird. Die Aufgabe bestand darin, eine Methode zu finden, die eine möglichst rasche, einfache und vollständige Abtrennung der Zucker ermöglicht.

Da in vorangegangenen Arbeiten bereits festgestellt wurde, dass die Stoffgruppe der Betaine keinen Einfluss auf die Insulinfreisetzung hat, sollte auch diese vom Extrakt abgetrennt werden, um die verbleibenden Inhaltsstoffe noch stärker anzureichern. Weiters war die Gruppe der Betaine durch ihren zwitterionischen Charakter schwer zu handhaben und erwies sich dadurch immer wieder als störend.

Da es sich bei der zu untersuchenden Probe um den Wasserextrakt handelte, waren in diesem naturgemäß viele polare Substanzen enthalten, was bei der Auswahl der verwendeten Kartuschen berücksichtigt wurde. So sollte das eingesetzte Material nicht zu apolar sein, um bestimmte Substanzen binden und zurückhalten zu können. Jedoch hätten zu starke polare Eigenschaften eine Auftrennung des Extraktes unmöglich gemacht. Um herauszufinden, welches Material am besten den Anforderungen entsprach, wurden drei verschiedene Kartuschen getestet (Material und Durchführung siehe S. 12, Kapitel II, 2.2.).

1.1. Cyanophase

Bei der Cyanophase handelt es sich um ein Normalphasen-Sorbens mittlerer Polarität, welches angewendet wird, um polare Analyten zu retentieren. Dieses Material ist somit ideal für extrem apolare Substanzen, welche an Sorbentien mit langen Kohlenstoffketten (z.B. C18) eine zu starke Retention erfahren würden (19). Auf diese Weise gewinnt man zunächst die apolaren Analyten, woraufhin die durch das Sorbens retentierten polaren Substanzen eluiert werden. Im Fall des vorliegenden Original-Wasserextraktes konnten somit zuerst die gewollten apolaren Komponenten des Extraktes gewonnen werden, während die polaren Bestandteile durch die stationäre Phase retentiert und somit abgetrennt wurden.

50 mg OWE wurden eingewogen und in 400 µl Wasser gelöst. Anschließend wurden 150 µl der Lösung mittels Spritze auf die Kartusche aufgetragen (Durchführung siehe S. 12, Kap. II, 2.2.). Es wurde mit je drei Raumvolumina Methanol 100 % und Wasser eluiert. Die gewonnen Eluate wurden zur Trockene gebracht, erneut gelöst und mittels DC überprüft.

Da sich in den angefertigten Dünnschichtchromatogrammen jedoch zeigte, dass keine Trennung der Komponenten erreicht werden konnte und sich der Großteil des Extraktes in der Methanolphase wiederfand, wurde die Trennung mittels der Cyanophase nicht weiterverfolgt.

1.2. C8-Phase

Bei der C8-Phase handelt es sich um ein Umkehrphasen-Sorbens, welches angewendet wird, um apolare Analyten zu gewinnen. Im Falle einer zu starken Retention auf C18 –Material, kann die C8 – Phase als Ersatz dienen (19). Da das Ziel der durchgeführten SPE darin lag, die apolaren Komponenten des OWE zu gewinnen, wurde das C8-Material für die Durchführung der SPE gewählt, um eine zu starke Retention dieser Substanzen zu verhindern.

50 mg OWE wurden eingewogen und in 400 µl Wasser gelöst. Anschließend wurden 150 µl dieser Lösung mittels einer Spritze auf die Kartusche aufgetragen. Die Elution erfolgte mit je drei Raumvolumina Wasser und Methanol 100 % (Elutionsfolge siehe S. 22, Tab. 8). Durch den Umkehrphasen-Charakter des Sorbens wurden somit durch die Elution mit Wasser zuerst die polaren Substanzen abgetrennt und durch die folgende Elution mit MeOH 100 % die auf dem Sorbens retentierten apolaren Analyten gewonnen. Die Retention der apolaren Substanzen auf der stationären Phase während der Elution mit Wasser, bzw. die Elution dieser Substanzen durch MeOH 100 % ist in Abb. 5 zu sehen.



Abb. 5: Aufreinigung des OWE mittels SPE C8 – Phase; Links: Elution mit Wasser, Rechts: Elution mit Methanol

Die Eluate wurden zur Trockene gebracht, im jeweiligen Elutionsmittel (Wasser bzw. Methanol 100 %) gelöst und mittels DC analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Abtrennung von Betainen und Zuckern auf diesem Wege prinzipiell möglich, durch Eluieren mit nur drei Raumvolumina Wasser jedoch noch nicht vollständig abgeschlossen war. Die angefertigten Dünnschichtchromatogramme sind in Abbildung 6 dargestellt.

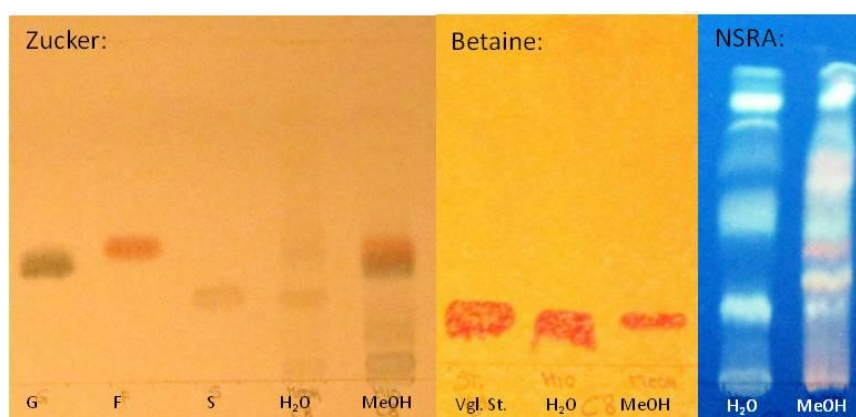


Abb.6: Dünnschichtchromatographische Analyse der gewonnen Fraktionen nach Aufreinigung des OWE mittels SPE C8-Kartusche, 1. Versuch (Parameter siehe S. 10, Kap.II, 2.1., Tab. 1 und 2)

G = Glucose, F = Fructose, S = Saccharose; Vgl. St. = Vergleich Stachydrin; H₂O bzw. MeOH bezeichnen jeweils die durch die Elution mit Wasser bzw. Methanol erhaltenen Fraktionen des ersten Versuchs

Der Versuch wurde daher noch zwei weitere Male wiederholt, wobei diesmal mit fünf- bzw. sechs Raumvolumina Wasser eluiert wurde, um die polaren Komponenten möglichst vollständig zu entfernen (Elutionsfolgen siehe Tab. 8). Bei einer neuerlichen dünn- schicht- chromatographischen Überprüfung zeigte sich, dass durch diese Vorgehensweise sowohl beim zweiten als auch beim dritten Versuch Zucker und Betaine gut abgetrennt werden konnten (s. Abb. 7).

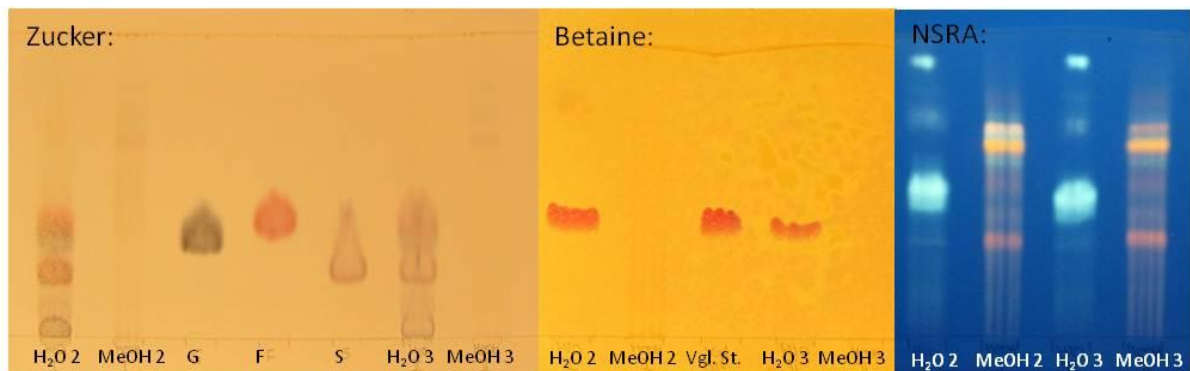


Abb. 7: Dünnschichtchromatographische Analyse der gewonnenen Fraktionen nach Aufreinigung des OWE mittels SPE C8-Kartusche, 2. und 3. Versuch (Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

G = Glucose, F = Fructose, S = Saccharose; Vgl. St. = Vergleich Stachydrin; H₂O 2, H₂O 3 bzw. MeOH 2, MeOH 3 bezeichnen jeweils die durch die Elution mit Wasser bzw. Methanol erhaltenen Fraktionen des zweiten bzw. dritten Versuchs

In Tabelle 8 wurden die Elutionsfolgen der durchgeführten SPE's zur besseren Übersicht nochmal zusammengefasst.

Kartusche	Elutionsmittel	Raumvolumina
1	Wasser	3
	Methanol 100 %	3
2	Wasser	5
	Methanol 100 %	6
3	Wasser	6
	Methanol 100 %	6

Tab. 8: Die den drei Kartuschen entsprechenden Elutionsfolgen bei der Aufreinigung des OWE an RP8-Material mittels SPE mit unterschiedlichen Volumina an MeOH und H₂O

Durch Wiegen der Kolben zeigte sich, dass die Fraktionen mit den Zuckern und Betainen gewichtsmäßig den weitaus größten Teil des Extraktes ausmachten, sodass nach deren Abtrennung von den ursprünglich eingesetzten 19 mg des Extraktes nur noch 1 mg für weitere Analysen zur Verfügung stand.

1.2.1. Analyse der C8-Fractionen „H₂O 2“ und „MeOH 2“ mittels HPLC

Zur weiteren Untersuchung der Fraktionen „H₂O 2“ und „MeOH 2“ wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt, wobei die bereits beschriebene Methode (siehe S. 16, Kap. II, 2.4, Tab. 6) angewendet wurde (siehe Abb. 9 und 10). Zum Vergleich ist in Abbildung 8 ein HPLC-Chromatogramm des Original-Wasserextraktes von *Leonurus sibiricus* L. dargestellt, welches unter Verwendung derselben Methode angefertigt wurde.

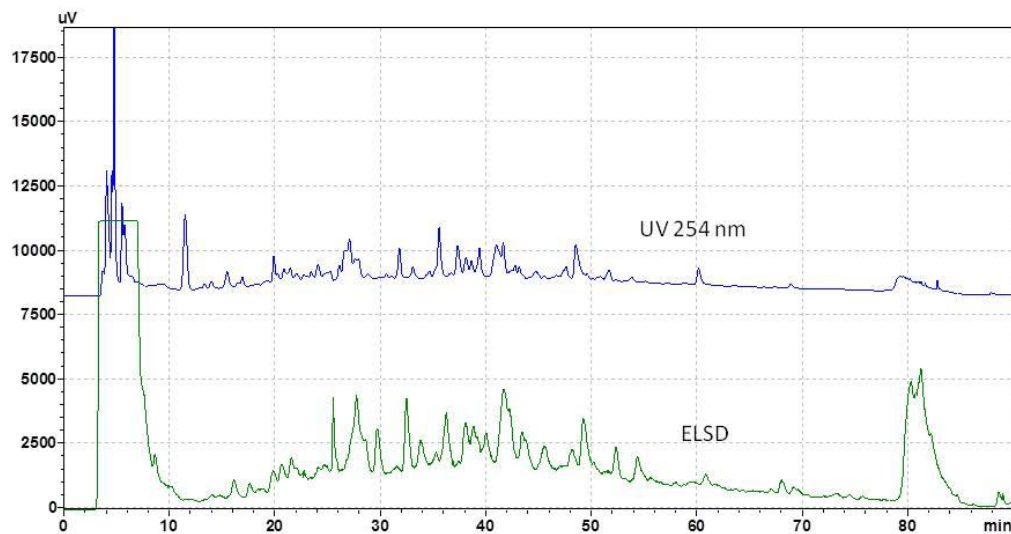


Abb. 8: Analyse des Original-Wasserextraktes von *Leonurus sibiricus* L. mittels HPLC, UV 254 nm (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4, Tab. 6)

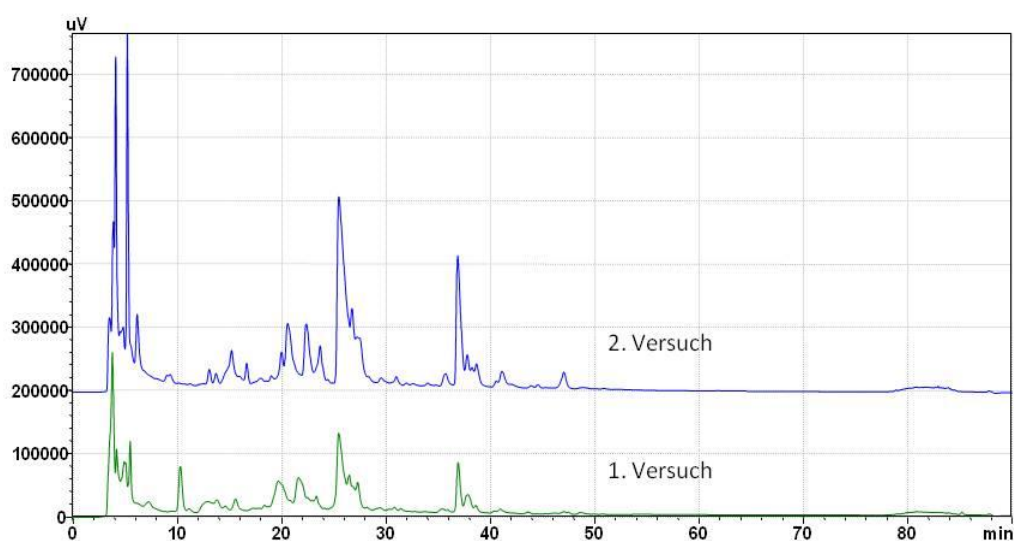


Abb. 9: Analyse der SPE C8-Wasser-Fractionen mittels HPLC, Vergleich des 1. und 2. Versuchs, UV 254 nm (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4, Tab. 6)

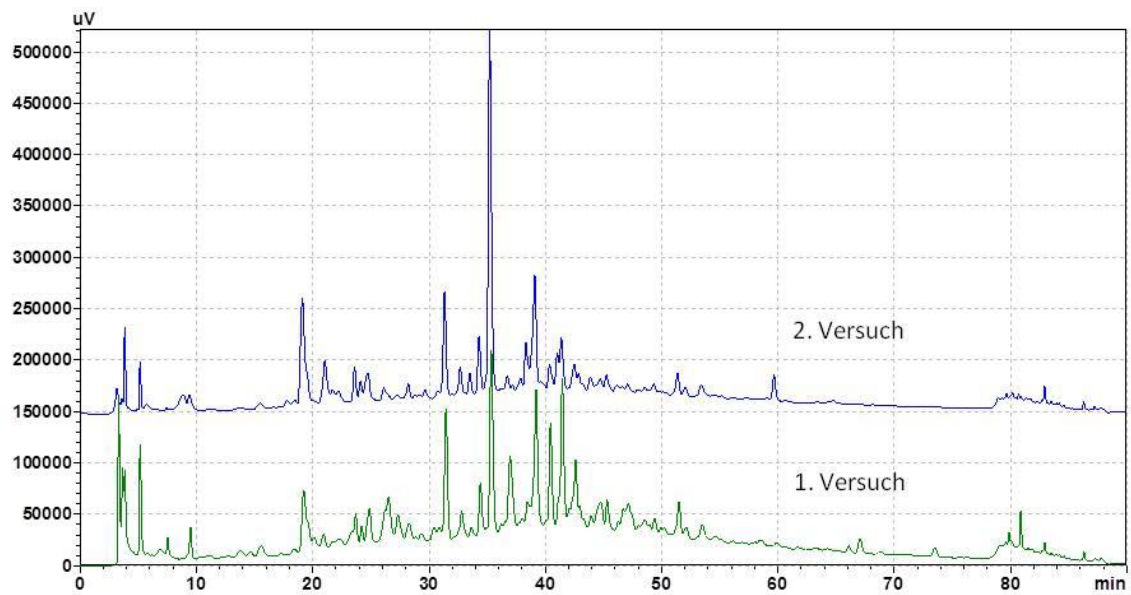


Abb. 10: Analyse der SPE C8-Methanol-Fractionen mittels HPLC,
Vergleich des 1. und 2. Versuchs, UV 254 nm
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4, Tab. 6)

Im Vergleich zum Chromatogramm des Original-Wasserextraktes zeigt sich in den Chromatogrammen der einzelnen MeOH- und H₂O-Fractionen deutlich eine Anreicherung von unterschiedlichen Substanzen.

So zeigen sich in den Wasserfraktionen zwei Hauptgruppen von Peaks bei 26 bzw. 37 min, wobei im 2. Versuch die Peakflächen höher sind, was auf die vollständigere Aufreinigung des Extraktes zurückzuführen ist (siehe Abb. 9).

In den Chromatogrammen der Methanolfractionen zeigt sich eine gute Auftrennung der Peaks. Während im Chromatogramm des ersten Versuchs keine Hauptkomponente erkennbar ist, zeigt sich im Chromatogramm des zweiten Versuchs eine Hauptkomponente bei 35 min (siehe Abb. 10).

Bei Betrachtung der angefertigten Dünnschichtchromatogramme zeigt sich weiters eine mögliche Korrelation zu den Aussagen der HPLC-Analysen.

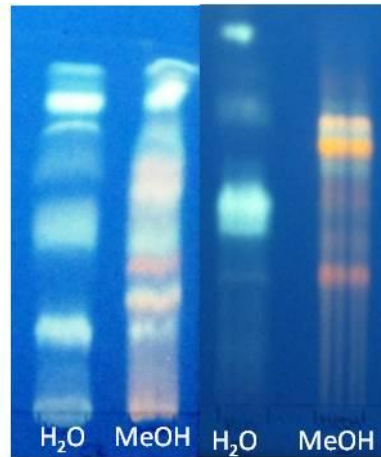


Abb. 11: Dünnschichtchromatographische Analyse der gewonnenen Fraktionen nach Aufreinigung des OWE mittels SPE C8-Kartusche, Detektion mit NSRA; links: 1. Versuch, rechts: 2. Versuch
(Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

Einerseits bietet die besser geglückte Aufreinigung des Extraktes in Versuch zwei der SPE, welche in Abb. 11 deutlich sichtbar ist, eine Erklärung für die höheren Peakflächen im Chromatogramm der „Wasserfraktion zwei“ der HPLC-Analyse (siehe Abb. 9). Weiters sind im Dünnschichtchromatogramm der „Methanolfraktion eins“ wie auch im entsprechenden Chromatogramm der HPLC-Analyse keine Hauptkomponenten erkennbar (siehe Abb. 10). Betrachtet man jedoch das Dünnschichtchromatogramm der „Methanolfraktion zwei“, so sind, wie auch im dazugehörigen Chromatogramm der HPLC-Analyse, deutliche Hauptkomponenten sichtbar (siehe Abb. 10).

Im Chromatogramm der HPLC-Analyse des OWE finden sich zu Beginn, vor allem in der ELSD-Ansicht, sehr große Peaks, welche auf die Stoffgruppe der Betaine zurückzuführen sind (siehe Abb. 8). Die Betaine erfahren also an der verwendeten apolaren stationären Phase Phenyl-Hexyl praktisch keine Retention. In den angefertigten Dünnschichtchromatogrammen mit der stationären Phase Silica Gel 60 F 254, wanderten die Betaine mit der verwendeten mobilen Phase in etwa bis zur Hälfte der Laufstrecke.

Mit dieser polaren stationären Phase zeigte sich also im verwendeten Fließmittelsystem (siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1) eine etwa mittelstarke Interaktion.

Durch Vergleich von während der HPLC-Analysen aufgenommenen UV-Spektren konnten in weiterer Folge verschiedene Substanzen in den Chromatogrammen der SPE-C8-Fractionen identifiziert werden (siehe S. 62, Kap. IV, Punkt 2).

1.3. C2-Phase

Die C2-Phase zählt ebenfalls zu den Umkehrphasen-Sorbentien und wird häufig im Rahmen der Methodenentwicklung angewendet. Es kann weiters eingesetzt werden, falls Analyten durch C8- oder C18-Phasen eine zu starke Retention erfahren (19). Um festzustellen, ob die Retention der zu gewinnenden Substanzen an C2-Material für eine Aufreinigung des Extraktes ausreichend sein würde, wurde eine SPE an diesem Material durchgeführt. Da keine Fertigkartuschen zur Verfügung standen, wurde eine Kartusche per Hand mit losem C2-Material gefüllt. Da bei diesem Versuch eine größere Kartusche verwendet wurde, wurden 63 mg OWE eingewogen und in 500 µl Wasser gelöst. Anschließend wurden 300 µl der gelösten Probe mittels einer Spritze aufgetragen (Durchführung siehe S. 12, Kap. II, 2.2.). Die Elution erfolgte zunächst mit Wasser, wobei hier sehr gründlich mit zehn Raumvolumina eluiert wurde, um eine vollständige Abtrennung der polaren Extraktbestandteile sicherzustellen. Anschließend wurde mit Methanol 20 %, 40 %, 60 %, 80 % und 100 % eluiert (Elutionsfolge siehe Tab. 9). Da nach abgeschlossener Elutionsfolge immer noch Extrakt auf der Säule zu sehen war, wurde MeOH mit Ameisensäure ($\text{HCOOH}_{\text{conc.}}$) leicht angesäuert. Anschließend wurde versucht, den restlichen Extrakt damit zu eluieren, was jedoch nur teilweise erfolgreich war.

Elutionsmittel	Konzentration	Anzahl eluierter RV
Wasser	100 %	10
Methanol Fraktion 1 und 2	20 %	2
Methanol Fraktion 3 und 4	40 %	2
Methanol Fraktion 5 und 6	60 %	2
Methanol Fraktion 7 und 8	80 %	2
Methanol Fraktion 9 und 10	100 %	2
Methanol/HCOOH conc. Fraktion 11 - 13	-	3

Tab. 9: Elutionsfolge bei der Auftrennung des Original-Wasserextraktes mittels SPE C2-Kartusche

Die Eluate wurden zur Trockene gebracht, erneut im entsprechenden Elutionsmittel gelöst und bezüglich Flavonoiden, Zuckern und Betainen dünnschichtchromatographisch analysiert (Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2). Dabei zeigte sich, dass keine zufriedenstellende Abtrennung von Zuckern und Betainen erfolgt war, und sich beide Stoffgruppen neben der Wasserfraktion, sowohl in Fraktion drei als auch in Fraktion fünf wiederfanden (siehe Abb. 12-14).

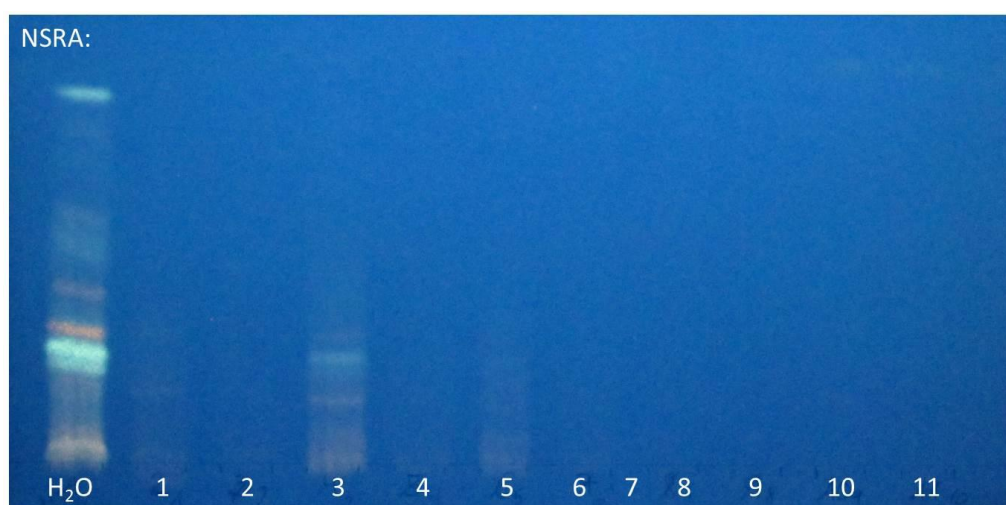


Abb. 12: Dünnschichtchromatographische Analyse der gewonnenen Fraktionen nach Aufreinigung des OWE mittels SPE C2-Kartusche, Detektion mit NSRA
(Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

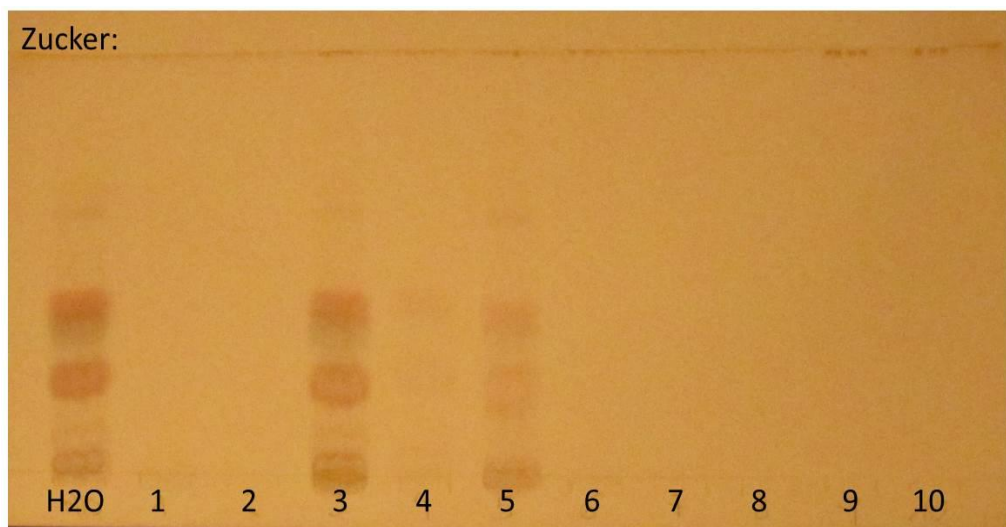


Abb. 13: Dünnschichtchromatographische Analyse der gewonnenen Fraktionen nach Aufreinigung des OWE
mittels SPE C2-Kartusche, Detektion der Zucker
(Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

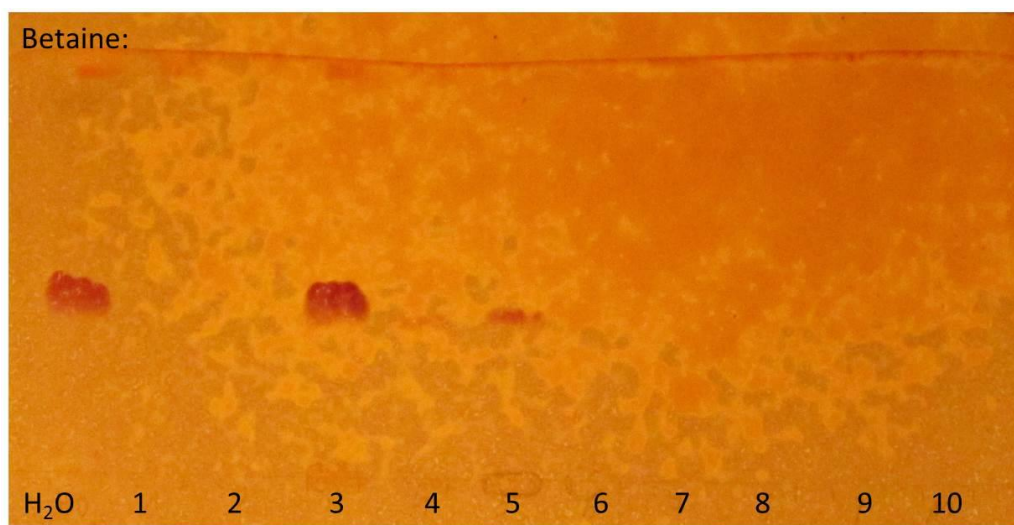


Abb. 14: Dünnschichtchromatographische Analyse der gewonnenen Fraktionen nach Aufreinigung des OWE
mittels SPE C2-Kartusche, Detektion der Betaine
(Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

Da mit der C8-Phase ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden konnte, wurde die Möglichkeit der Abtrennung von Zuckern und Betainen über die C2-Phase nicht weiterverfolgt. Um festzustellen, ob die erhaltenen Fraktionen für die zweite Zielsetzung der Arbeit, nämlich die Identifizierung von Inhaltsstoffen des OWE, herangezogen werden konnten, wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt.

1.3.1. Analyse der SPE C2-Fractionen mittels HPLC

Unter Verwendung der unter Kap. II, 2.4., Tab. 6, beschriebenen Methode wurden mit den erhaltenen Fraktionen HPLC-Analysen durchgeführt (siehe Abb. 15).

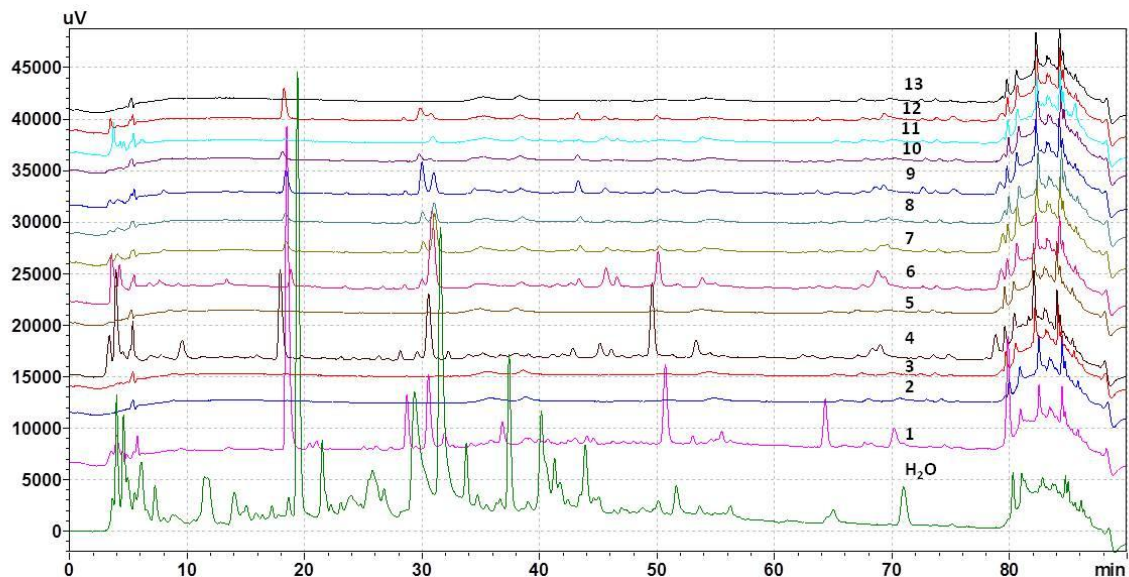


Abb. 15: Chromatogramme der HPLC-Analyse der durch Aufreinigung des OWE mittels SPE C2-Kartusche erhaltenen Fraktionen (siehe S. 28, Kap. III, 1.3., Tab. 9)

Es zeigte sich jedoch, dass kein akzeptables Ergebnis erzielt worden war und sich der Großteil der Substanzen in der Wasserphase, sowie in den Fraktionen eins, vier und sechs wiederfand. Zur Identifizierung von Inhaltsstoffen wurden daher hauptsächlich die SPE C8-Fractionen (siehe S.22, Kap. III, 1.2., Tab. 8) sowie die Fraktionen der Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20 (siehe S. 14, Kap. II, 2.3., Tab. 5) herangezogen (siehe S. 61, Kap. IV, Punkt 1 und 2).

1.3.2. Analyse der Fraktion SPE_C2_MeOH20_1 mittels LC-MS

Um über die Fraktion SPE_C2_MeOH20_1 (siehe S. 28, Kap. III, 1.3., Tab. 9) genauere Aussagen treffen zu können, wurde eine LC-MS-Analyse durchgeführt (Parameter zur Messung siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7). Die dabei erhaltenen Spektren sind auf den folgenden Seiten abgebildet (siehe Abb. 17 - Abb. 21). Zur besseren Orientierung wurde auch das entsprechende Chromatogramm der HPLC-Analyse nochmal abgebildet (siehe Abb. 16).

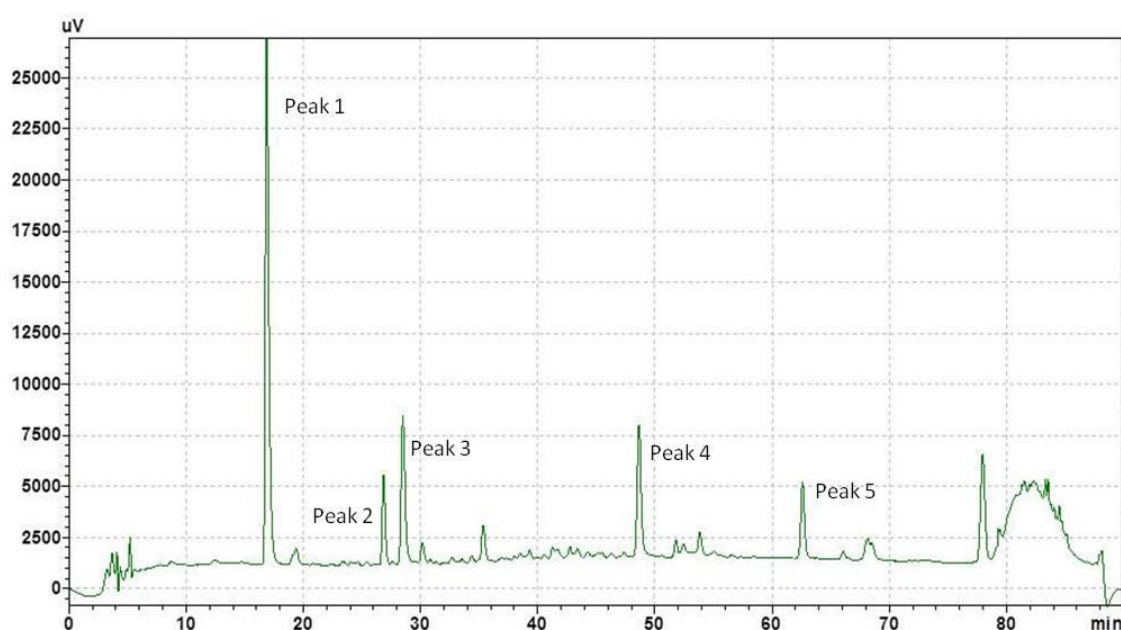


Abb. 16: Analyse der Fraktion SPE C2_MeOH20_1 (siehe S. 28, Kap. III, 1.3., Tab. 9) mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), Detektion bei UV 254 nm
Die mit den Ziffern 1-5 benannten Peaks stimmen mit den Peaks 1-5 der in Folge abgebildeten Massenspektren überein; die etwas abweichenden Retentionszeiten ergeben sich daraus, dass nicht das Chromatogramm der LC-MS-Analyse, sondern ein zuvor aufgenommenes Chromatogramm der Analyse der Fraktion SPE C2_MeOH20_1 mittels HPLC, unter Verwendung der gleichen Methode (Parameter siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), abgebildet wurde.

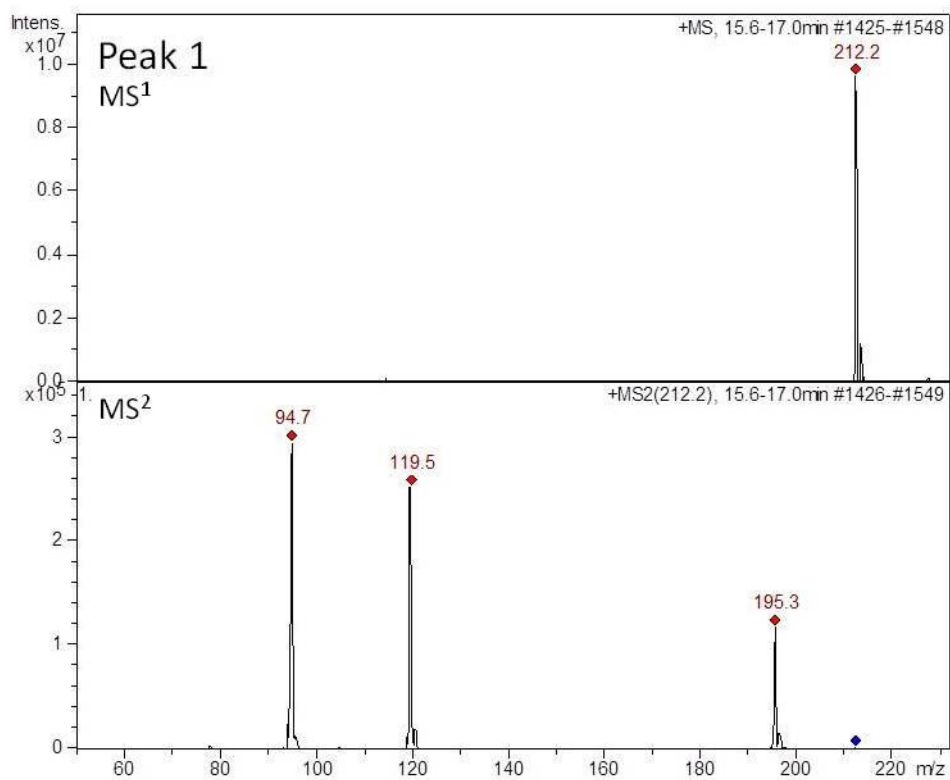


Abb. 17: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 1 (siehe S. 32, Kap. III, 1.3.2., Abb. 16) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions bei m/z 212.2, positiv-Modus
(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

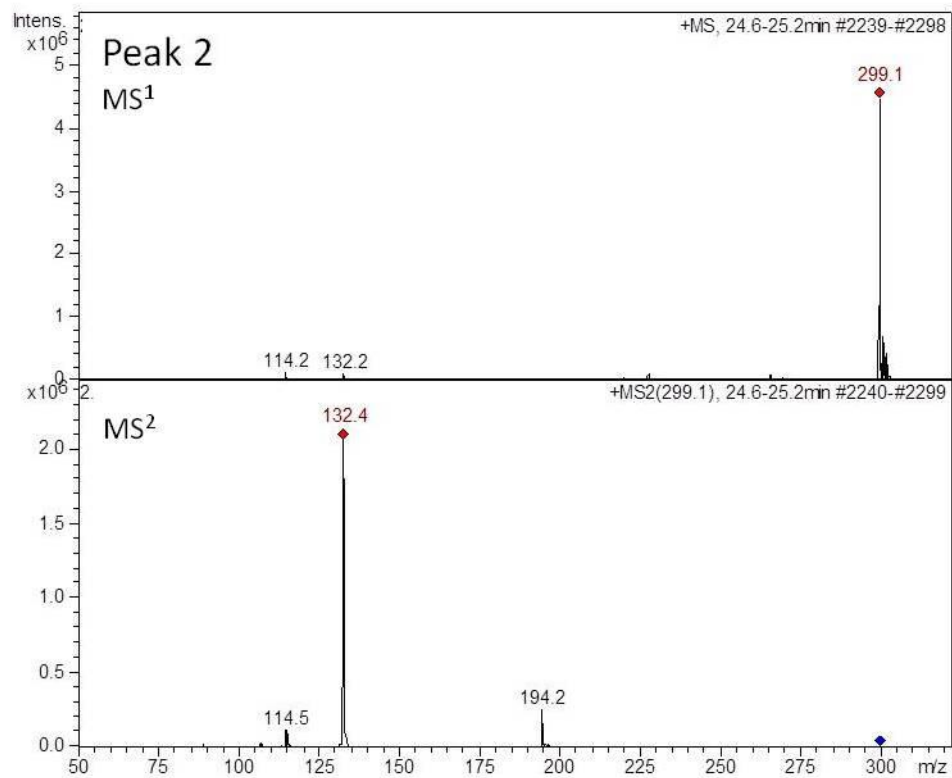


Abb. 18: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 2 (siehe S. 32, Kap. III, 1.3.2., Abb. 16) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions bei m/z 299.1., positiv-Modus
(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

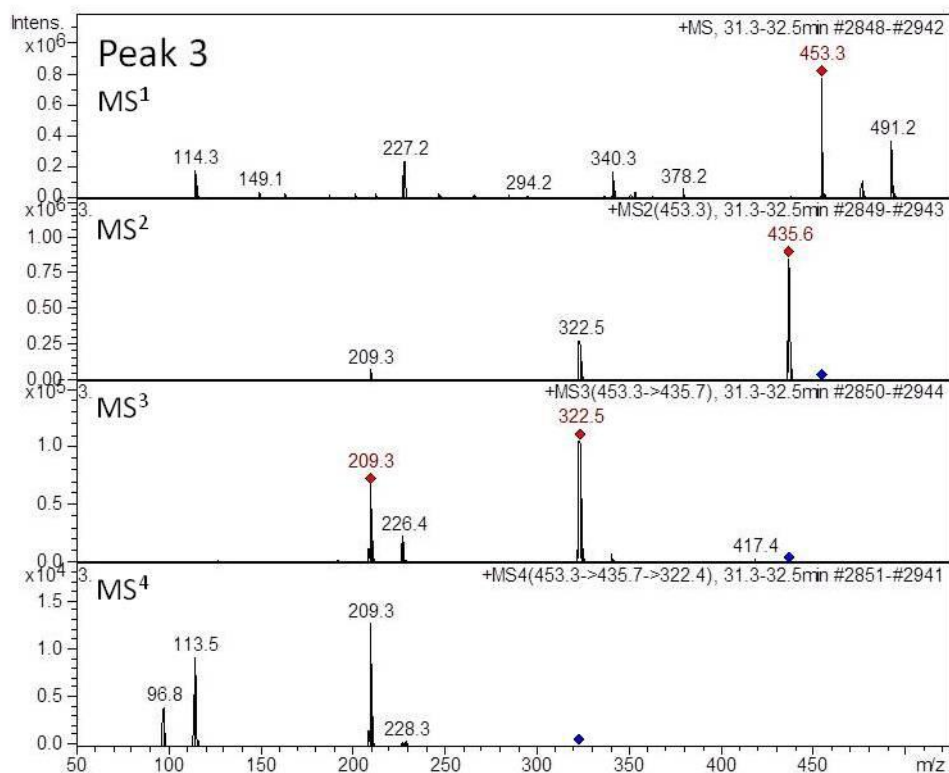


Abb. 19: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 3 (siehe S. 32, Kap. III, 1.3.2., Abb. 16) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions bei m/z 453.1, ESI-MS³-Spektrum des [M+H]⁺-Ions bei m/z 435.6 und ESI-MS⁴-Spektrum des [M+H]⁺-Ions bei m/z 322.5, positiv-Modus
(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

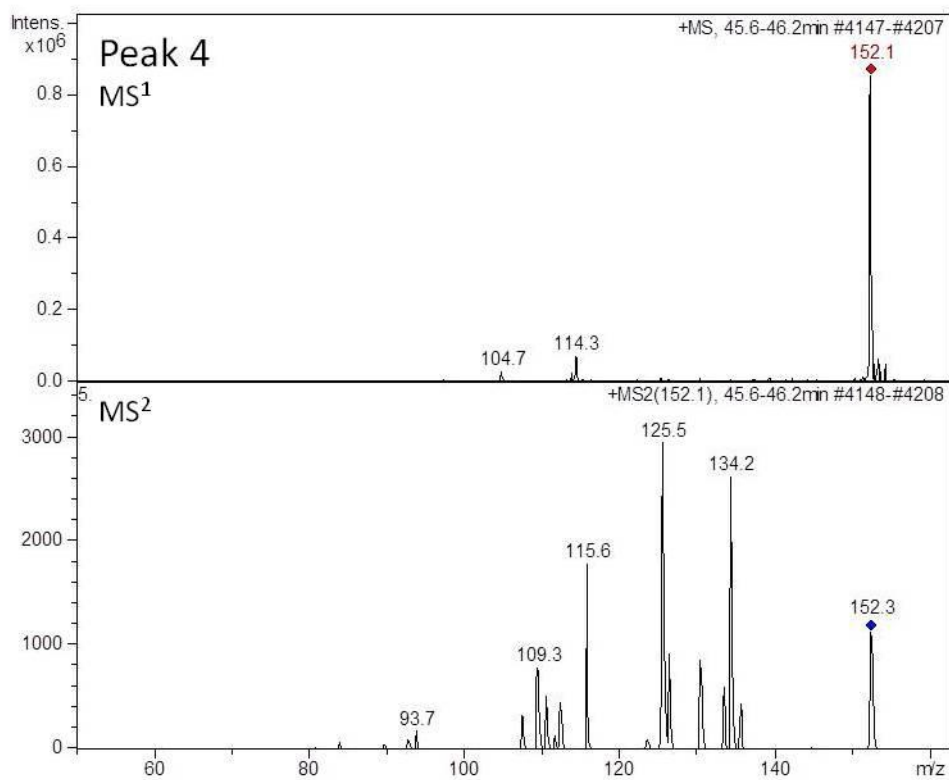


Abb. 20: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 4 (siehe S. 32, Kap. III, 1.3.2., Abb. 16) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M+H]⁺-Ions bei m/z 152.1, positiv-Modus
(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

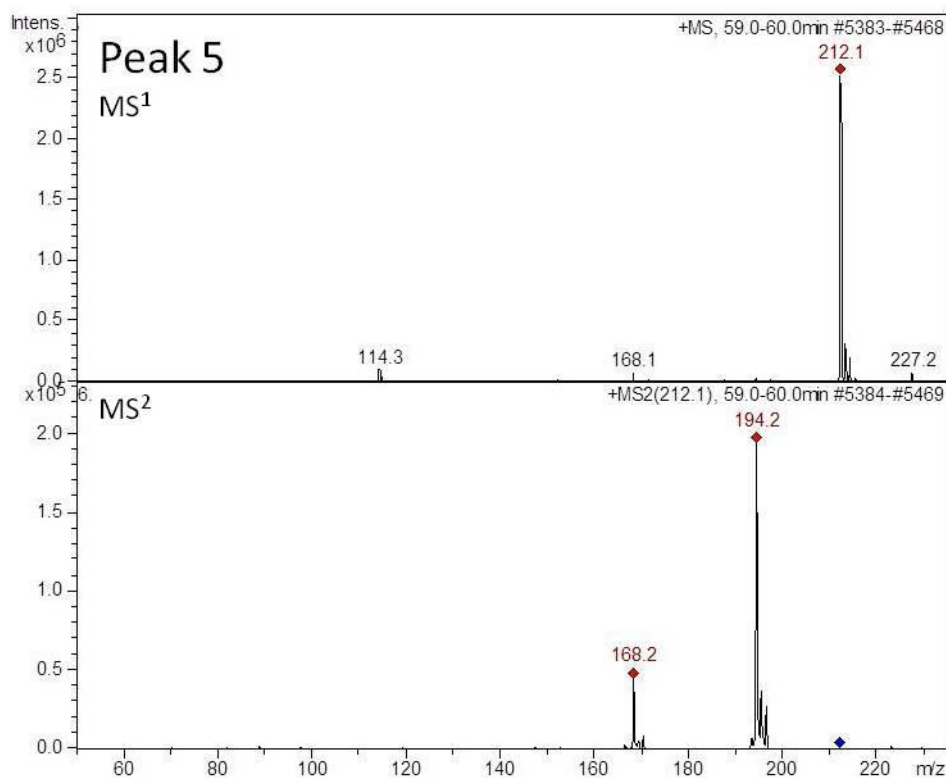


Abb. 21: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 5 (siehe S. 32, Kap. III, 1.3.2., Abb. 16) sowie ESI-MS²-Spektrum des $[M+H]^+$ -Ions bei m/z 212.1, positiv-Modus
(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

Die Analyse der erhaltenen Daten ergab, dass hier kleine, stickstoffhaltige Verbindungen vorhanden waren. Da in den anderen LC-MS-Spektren keine derartigen Substanzen gefunden wurden, könnte eine nähere Untersuchung von Interesse sein.

2.) Aufreinigung des OWE an Sephadex LH20

Ziel der an Sephadex LH20 durchgeführten Größenausschlusschromatographie war eine Auftrennung des OWE. In weiterer Folge sollten die erhaltenen Fraktionen analytisch genauer untersucht, und Inhaltsstoffe identifiziert werden (Material und Durchführung siehe S. 13, Kap. II, 2.3.).

Die 24 erhaltenen Fraktionen (siehe S. 14, Kap. II, 2.3., Tab. 5) wurden zur Trockene gebracht und gewogen. Anschließend wurden die Fraktionen erneut gelöst und eine dünnschichtchromatographische Analyse durchgeführt, wobei auf die Detektion von Flavonoiden, Zuckern und Betainen Wert gelegt wurde (Material, Durchführung sowie Fließmittelsysteme siehe S. 10, Kap. II, 2.1.). Zucker und Betaine wurden hier berücksichtigt, um zu sehen, ob sich die Methode auch für die Abtrennung dieser Stoffgruppen eignen würde.

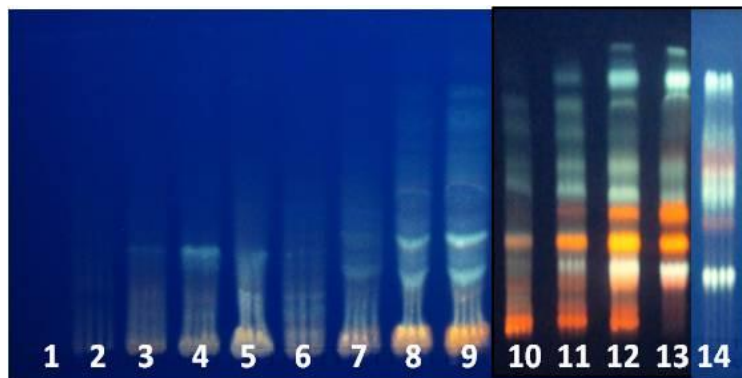


Abb. 22: Dünnschichtchromatographische Analyse der Fraktionen MeOH100_1 – MeOH100_14 (siehe S. 14, Kap. II, 2.3., Tab. 5), Detektion der Flavonoide (Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

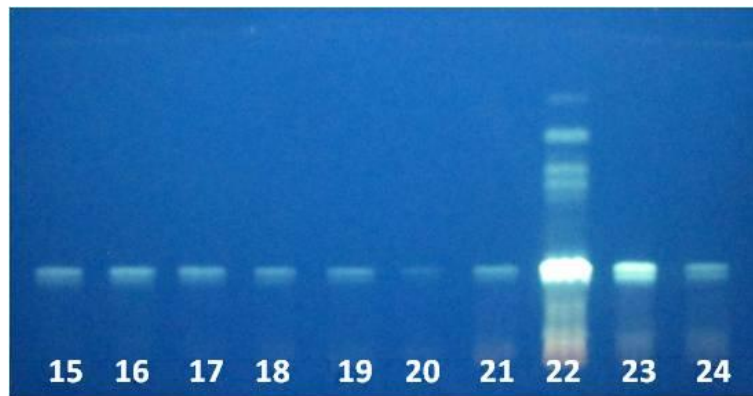


Abb. 23: Dünnschichtchromatographische Analyse der Fraktionen MeOH70_15 – MeOH70_24 (siehe S. 14, Kap. II, 2.3., Tab. 5), Detektion der Flavonoide (Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

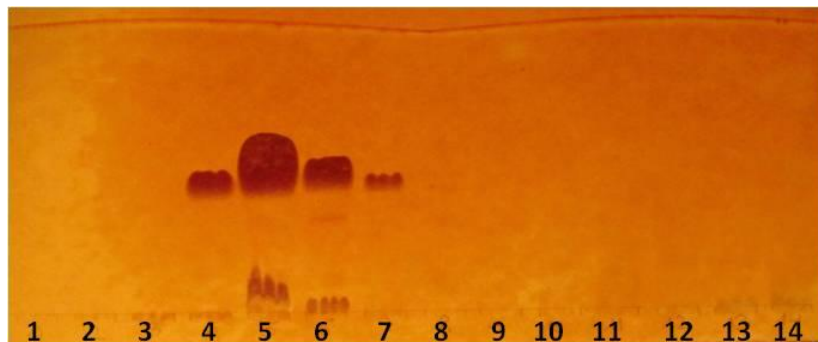


Abb. 24: Dünnschichtchromatographische Analyse der Fraktionen MeOH100_1 - MeOH100_14 (siehe S. 14, Kap. II, 2.3., Tab. 5), Detektion der Betaine (Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

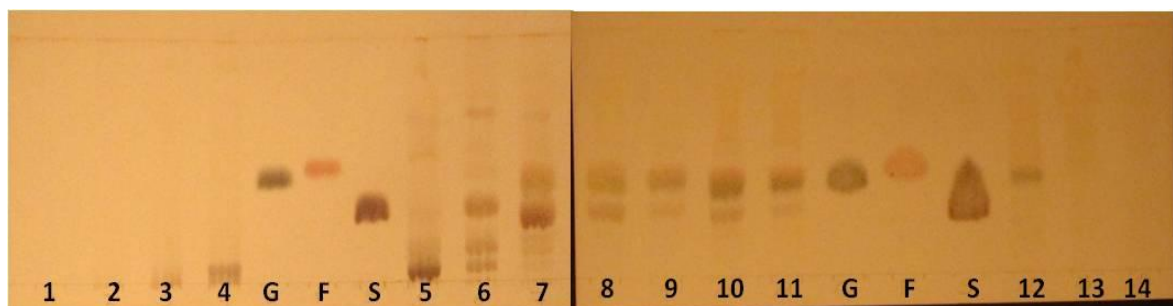


Abb. 25: Dünnschichtchromatographische Analyse der Fraktionen MeOH100_1 - MeOH100_14 (siehe S. 14, Kap. II, 2.3., Tab. 5), Detektion der Zucker (Parameter siehe S. 10, Kap. II, 2.1., Tab. 1 und 2)

G = Glucose, F = Fructose, S = Saccharose

Wie in Abbildung 24 gut zu sehen ist, waren die Betaine in den Fraktionen MeOH100_4 - MeOH100_7 zu finden, eine Abtrennung dieser Stoffgruppe scheint also mittels Größenausschlusschromatographie gut zu funktionieren. Da in den Fraktionen MeOH70_15 - MeOH70_24 keine Betaine mehr zu sehen waren, ist dieses Dünnschichtchromatogramm nicht mehr abgebildet. Bezüglich der Zucker konnte jedoch keine zufriedenstellende Abtrennung, bzw. Anreicherung in einigen wenigen Fraktionen, erreicht werden (siehe Abb. 25). Sie fanden sich über die Fraktionen MeOH100_3 - MeOH100_12 verteilt wieder. Wie auch bei den Betainen waren bei der Detektion der Zucker in den Fraktionen MeOH70_15 - MeOH70_24 keine Zucker mehr zu sehen, weswegen diese DC ebenfalls nicht abgebildet wurde.

Nach eingehender Betrachtung der angefertigten Dünnschichtchromatogramme wurden die Fraktionen MeOH100_8 - MeOH100_14, sowie die Fraktion MeOH70_22 zur weiteren Analyse mittels HPLC ausgewählt (siehe Abb. 26 und 27).

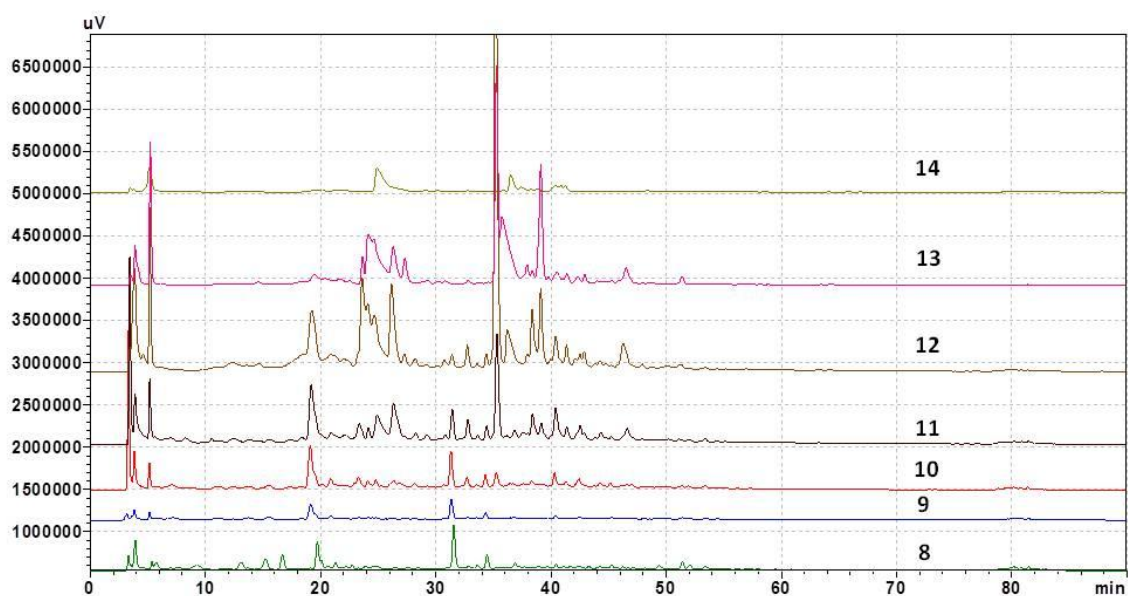


Abb. 26: Analyse der Fraktionen MeOH100_8 - MeOH100_14 mittels HPLC

(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), Detektion bei UV 254 nm

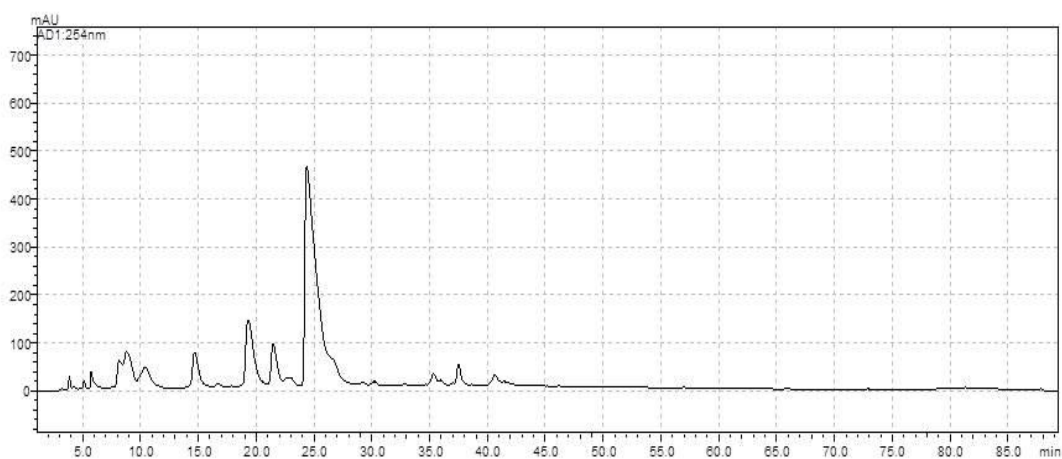


Abb. 27: Analyse der Fraktion MeOH70_22 mittels HPLC

(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), Detektion bei UV 254 nm

Für die Identifizierung von Inhaltsstoffen des OWE wurden die während der HPLC-Analysen aufgenommenen UV-Spektren herangezogen (siehe S. 67, Kap. IV, Punkt 3).

3.) Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen mittels LC-MS

Um die im Extrakt vorhandenen Substanzen identifizieren zu können, wurde mit den Sephadex-Fractionen MeOH100_8 - MeOH100_14 eine LC-MS-Analyse durchgeführt (Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7). Zur besseren Übersicht wurden das zugehörige Chromatogramm der HPLC-Analyse sowie das UV- Spektrum des betreffenden Peaks den jeweiligen MS-Daten der identifizierten Substanz vorangestellt.

1) Quercetin-trihexosid:

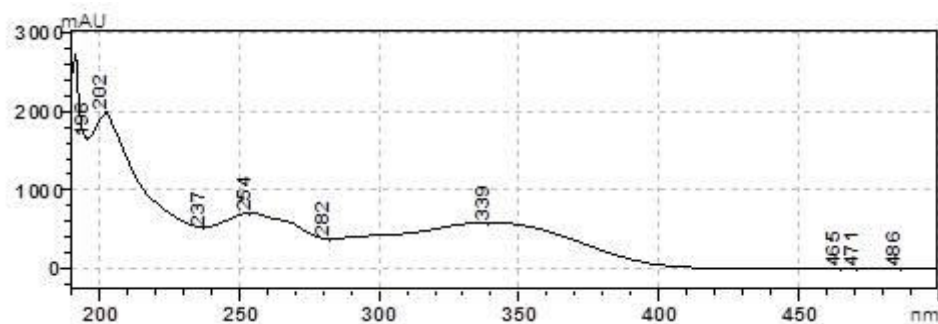
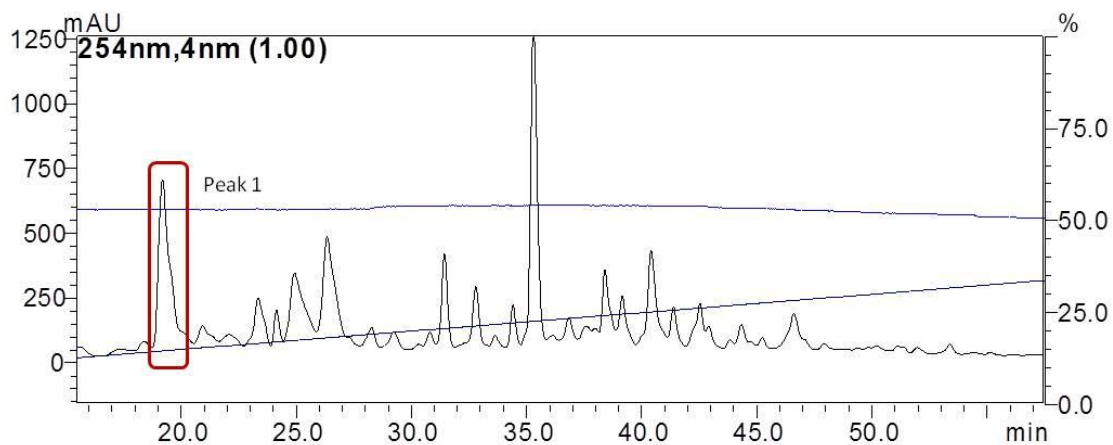


Abb. 28: oben: Analyse der Sephadex-Fraktion MeOH100_11 mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), markierter Peak = Quercetin-trihexosid; unten: während der HPLC-Analyse aufgenommenes UV-Spektrum von Quercetin-trihexosid

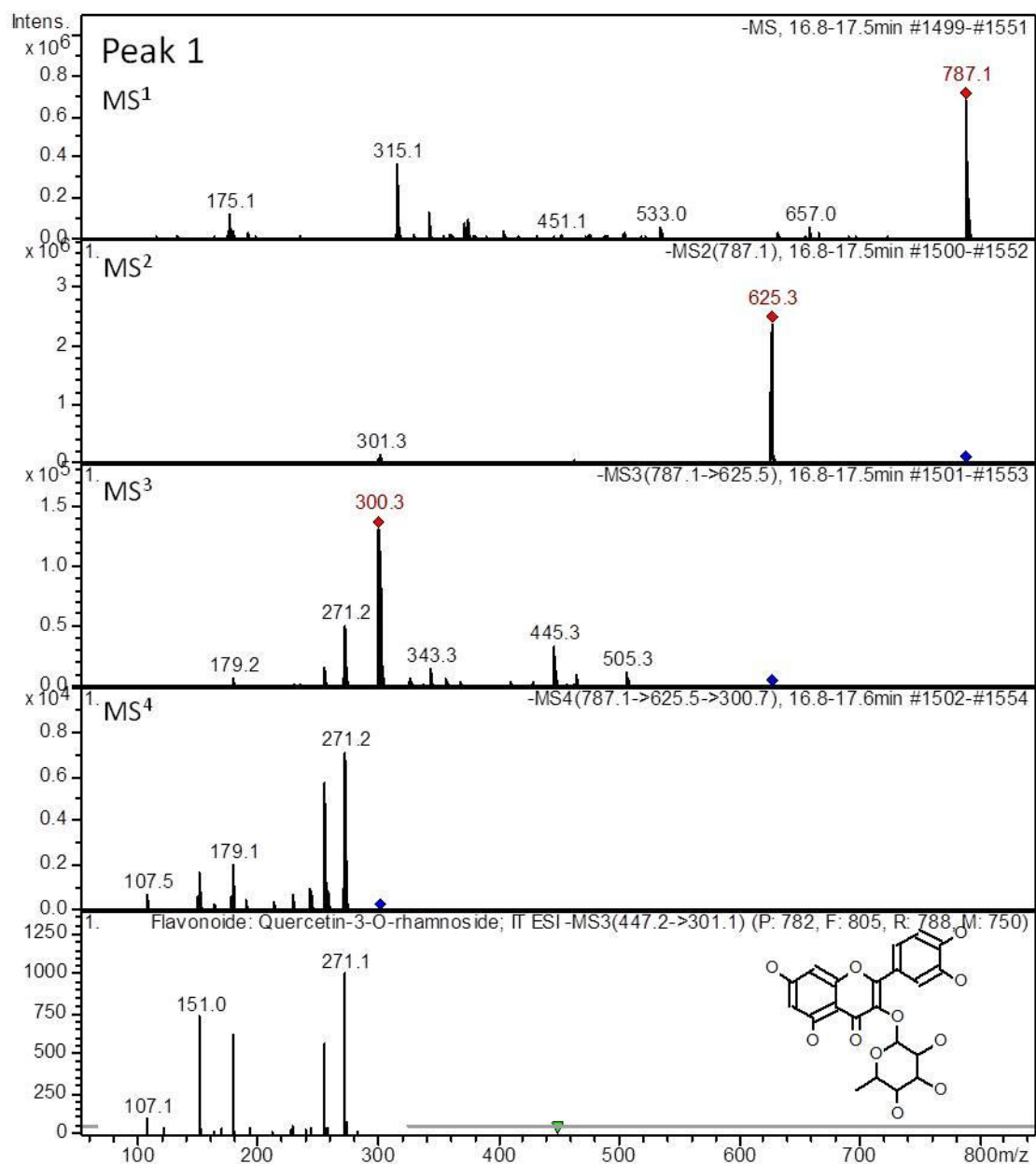


Abb. 29: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 1 (siehe S. 43, Kap. III, Punkt 3, Abb. 28) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 787.1, ESI-MS³-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 625.3 und ESI-MS⁴-Spektrum [M-H]⁻-Ions bei m/z 300.3, negativ-Modus; ganz unten: Ergebnis nach Vergleich mit einer Library (Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

2) Quercetin-dihexosid:

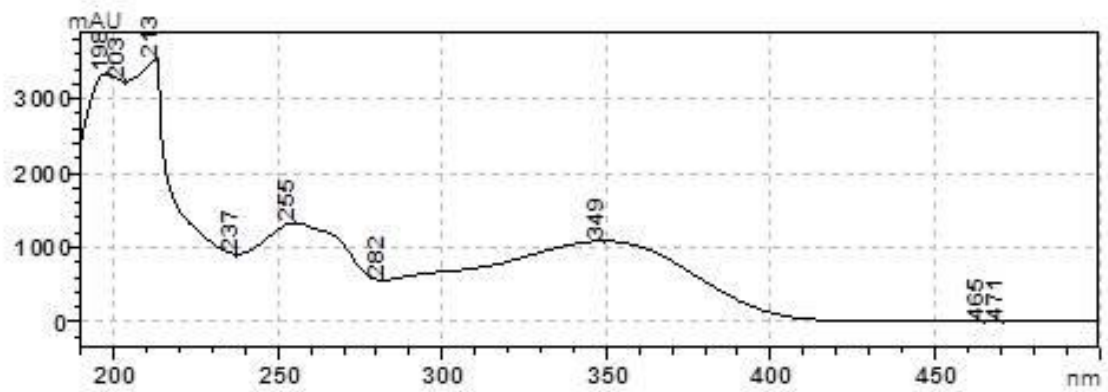
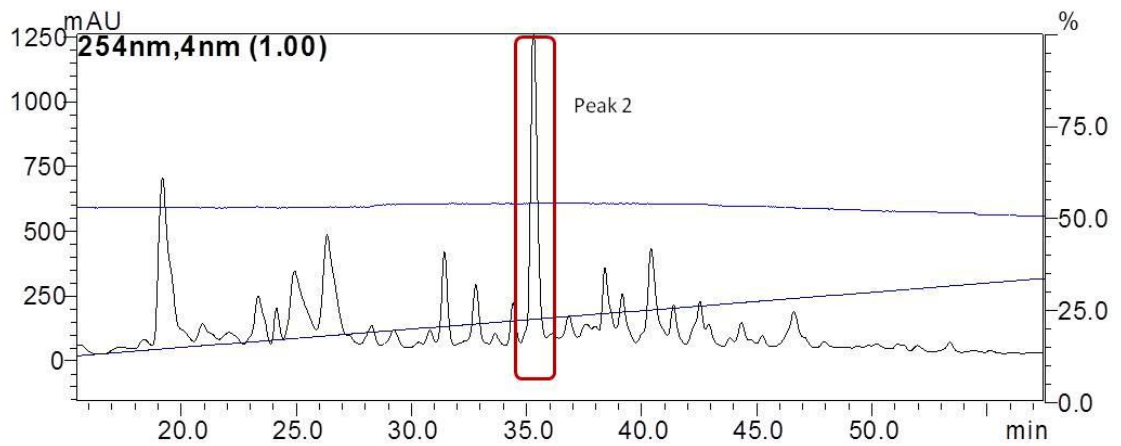


Abb. 30: oben: Analyse der Sephadex-Fraktion MeOH100_11 mittels HPLC
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), markierter Peak = Quercetin-dihexosid;
unten: während der HPLC-Analyse aufgenommenes UV-Spektrum von Quercetin-dihexosid

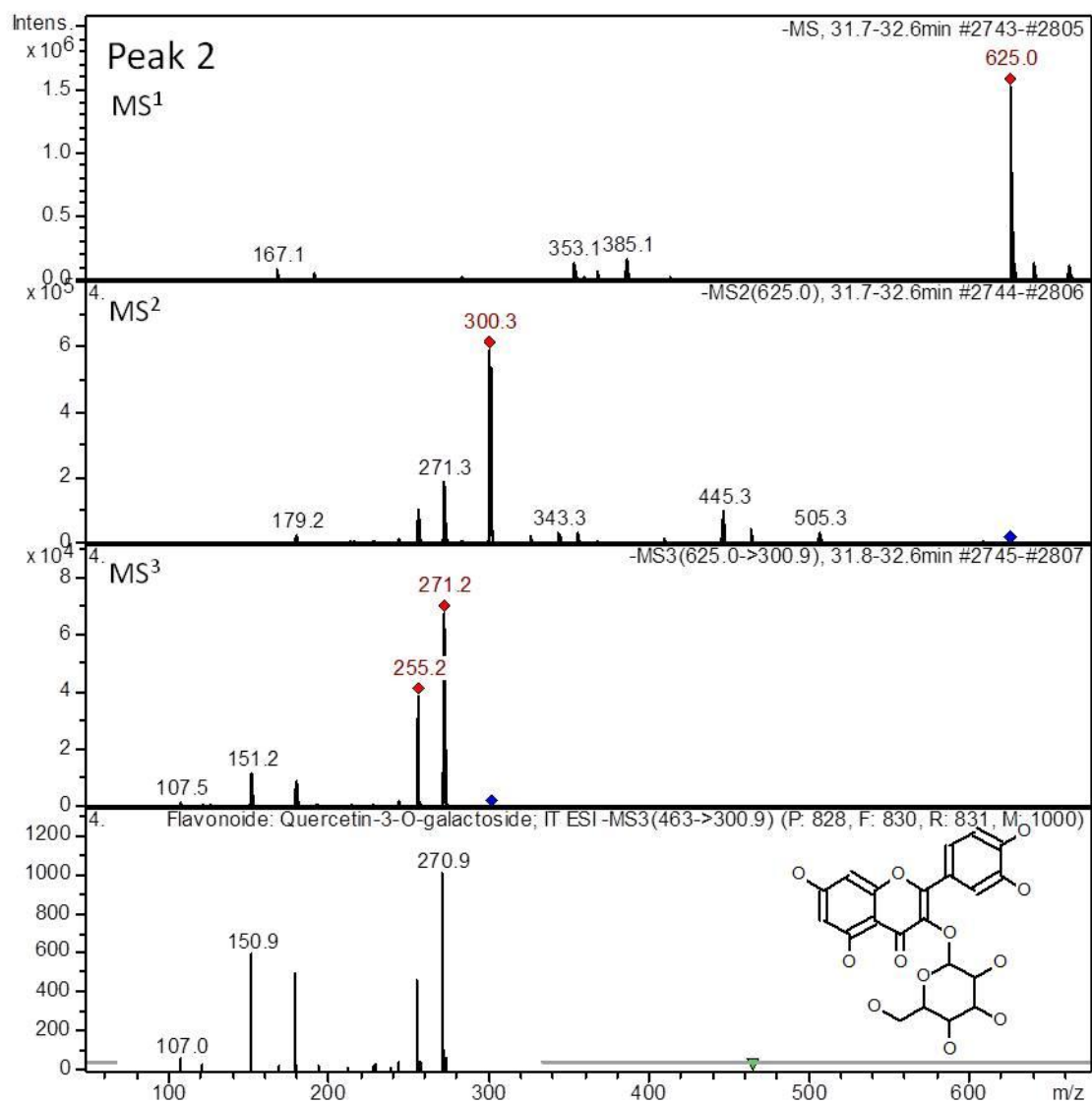


Abb. 31: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 2 (siehe S. 45, Kap. III, Punkt 3, Abb. 30) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 625.0 und ESI-MS³-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 300.3, negativ-Modus;
ganz unten: Ergebnis nach Vergleich mit einer Library
(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

3) Lavandulifoliosid:

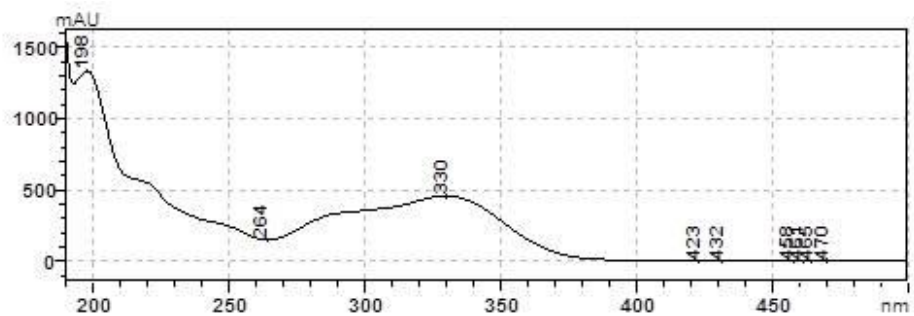
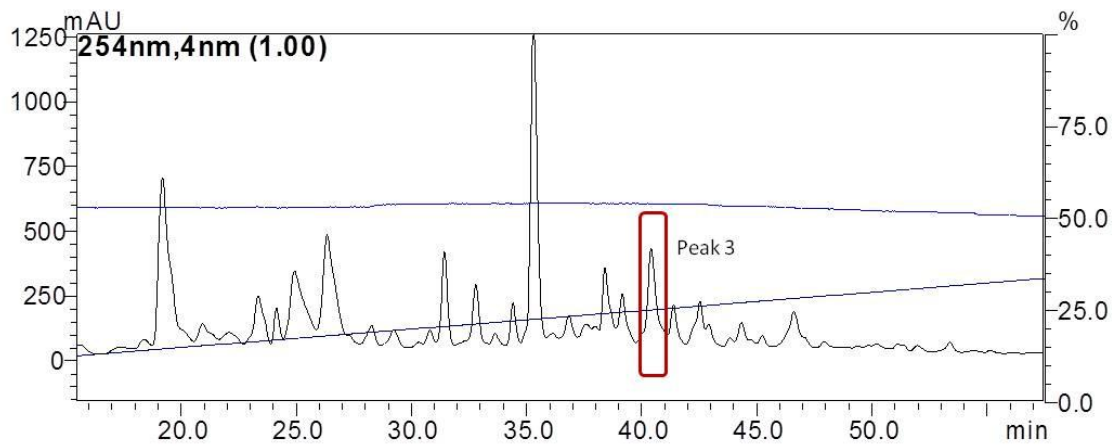


Abb. 32: oben: Analyse der Sephadex-Fraktion MeOH100_11 mittels HPLC

(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), markierter Peak = Lavandulifoliosid;

unten: während der HPLC-Analyse aufgenommenes UV-Spektrum von Lavandulifoliosid

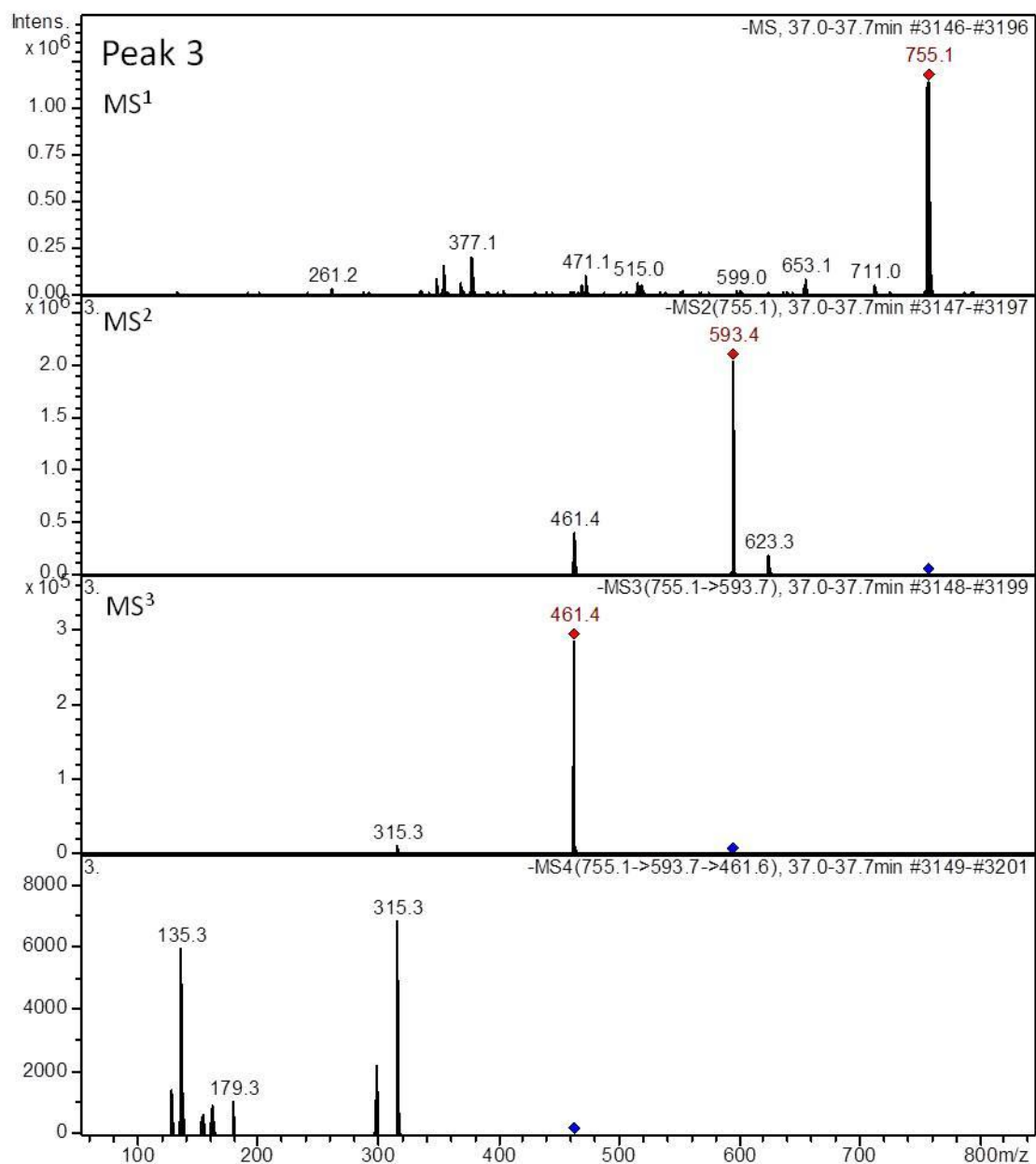


Abb. 33: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 3 (siehe S. 47, Kap. III, Punkt 3, Abb. 32) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 755.1, ESI-MS³-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 593.4 und ESI-MS⁴-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 461.4, negativ-Modus;

(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

4) Verbascosid

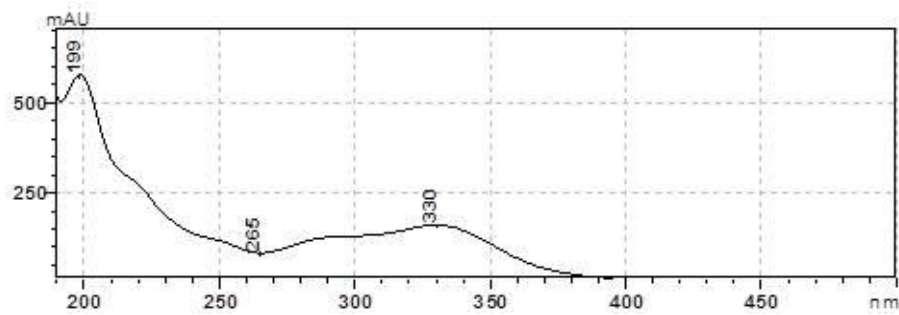
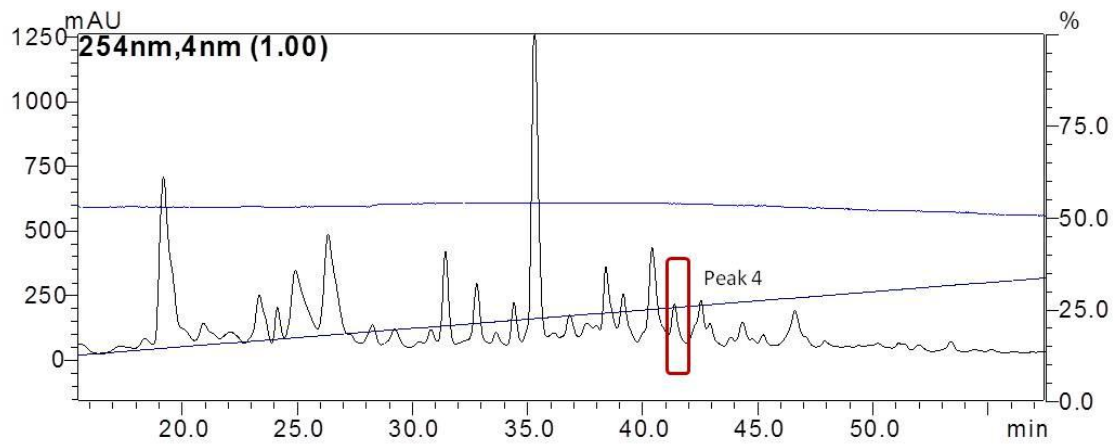


Abb. 34: oben: Analyse der Sephadex-Fraktion MeOH100_11 mittels HPLC
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), markierter Peak = Verbascosid;
unten: während der HPLC-Analyse aufgenommenes UV-Spektrum von Verbascosid

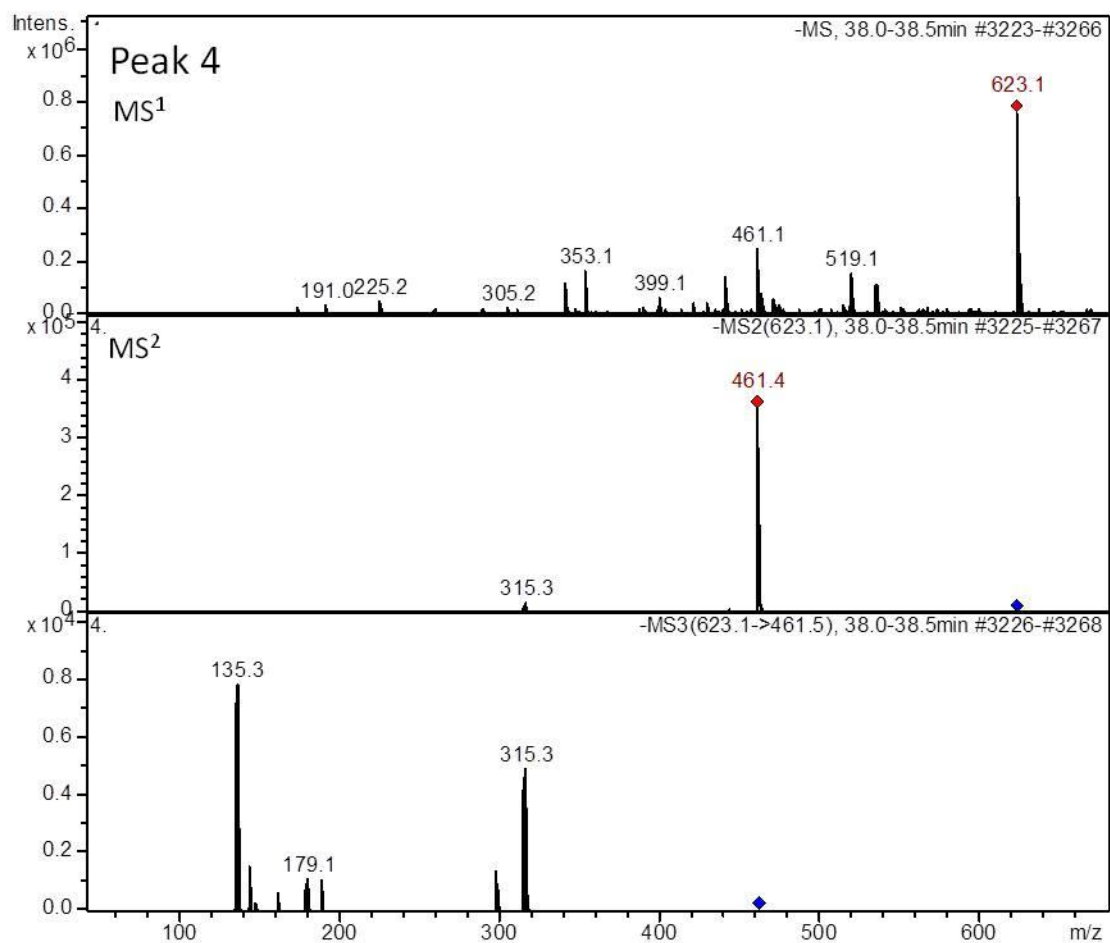


Abb. 35: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 4 (siehe S. 49, Kap. III, Punkt 3, Abb. 34) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 623.1 und ESI-MS³-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 461.4, negativ-Modus; (Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

5) Kaempferol-dihexosid

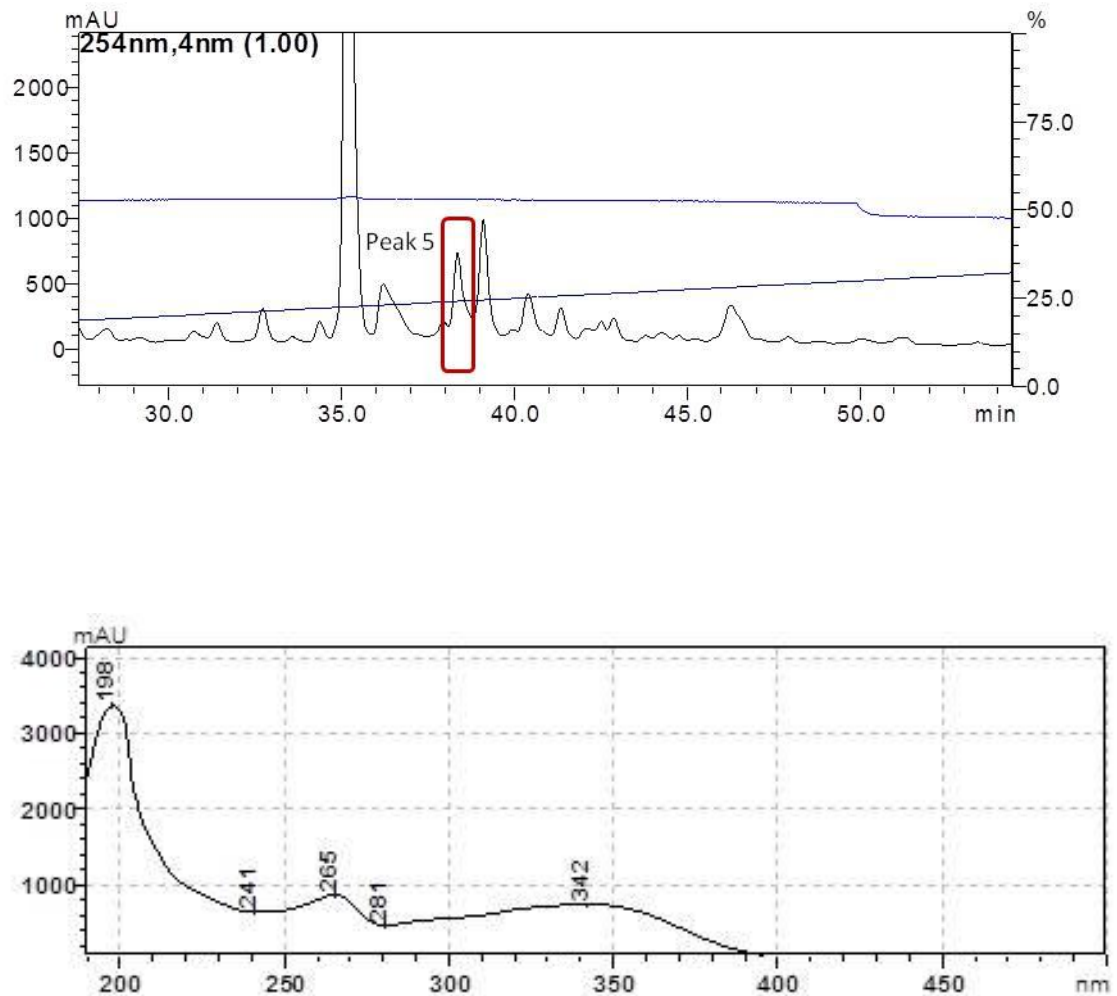


Abb. 36: oben: Analyse der Sephadex-Fraktion MeOH100_12 mittels HPLC
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), markierter Peak = Kaempferol-dihexosid; unten: während der HPLC-Analyse aufgenommenes UV-Spektrum von Kaempferol-dihexosid

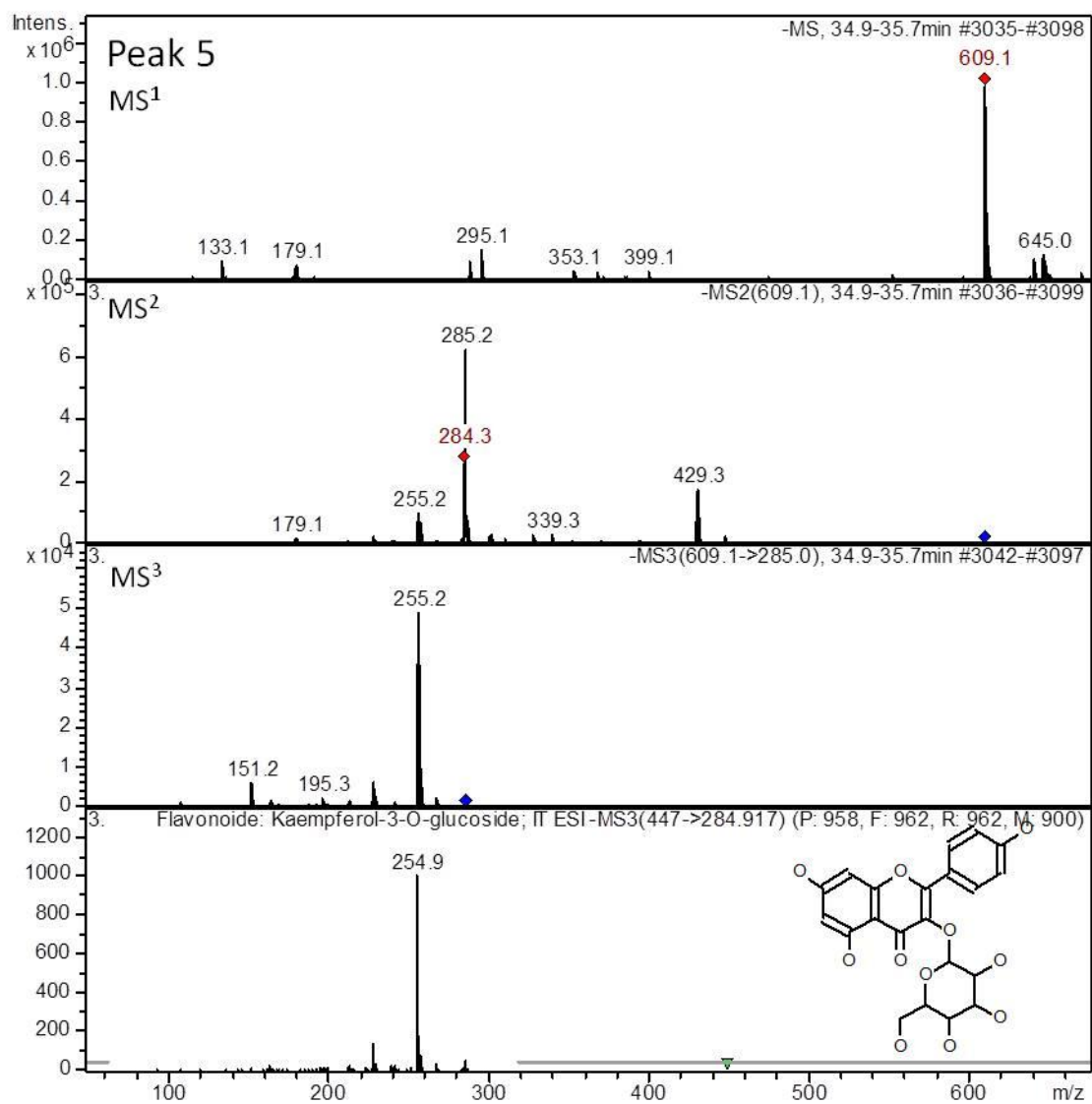


Abb. 37: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 5 (siehe S. 51, Kap. III, Punkt 3, Abb. 36) sowie ESI-MS²-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 609.1 und ESI-MS³-Spektrum des [M-H]⁻-Ions bei m/z 284.3, negativ-Modus;
ganz unten: Ergebnis nach Vergleich mit einer Library
(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

6) Rutin:

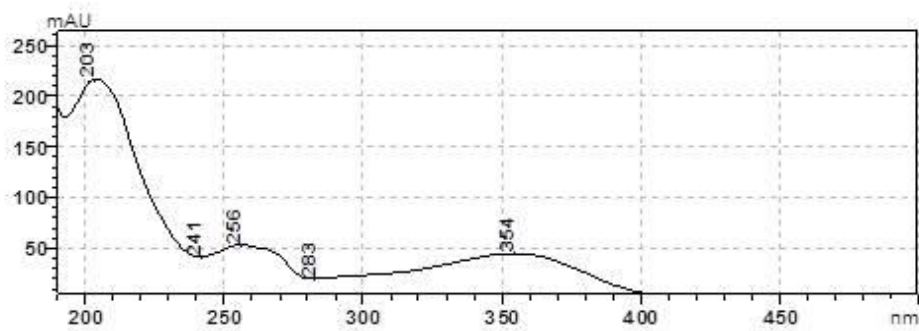
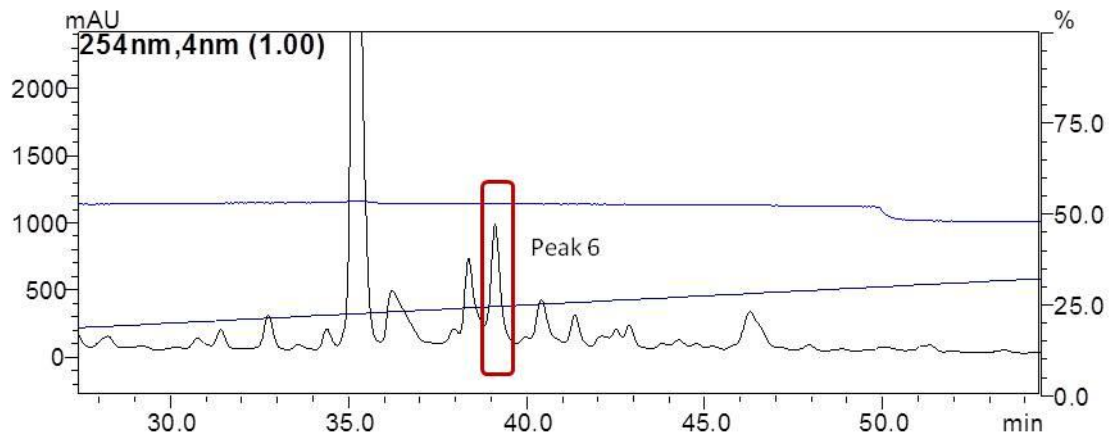


Abb. 38: oben: Analyse der Sephadex-Fraktion MeOH100_12 mittels HPLC
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), markierter Peak = Rutin;
unten: während der HPLC-Analyse aufgenommenes UV-Spektrum von Rutin

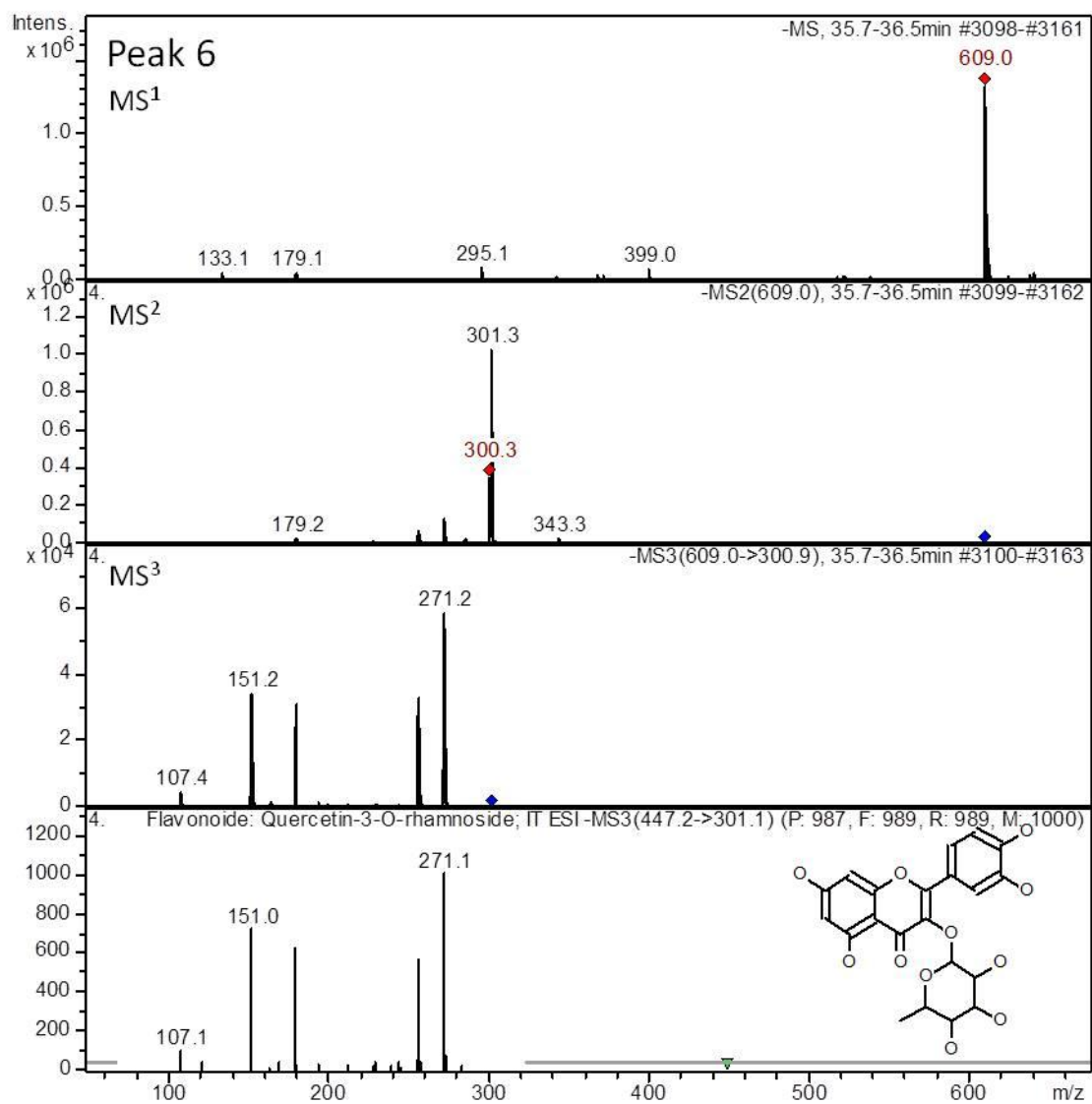


Abb. 39: ESI-MS¹-Spektrum von Peak 6 (siehe S. 45, Kap. III, Punkt 3, Abb. 30) sowie ESI-MS²-Spektrum des $[M-H]^-$ -Ions bei m/z 609.0 und ESI-MS³-Spektrum des $[M-H]^-$ -Ions bei m/z 300.3, negativ-Modus;
ganz unten: Ergebnis nach Vergleich mit einer Library
(Parameter der LC-MS-Analyse siehe S. 16, Kap. II 2.4., Tab. 6, sowie S. 17, Kap. II, 2.5., Tab. 7)

Durch die Analyse der erhaltenen massenspektrometrischen Daten, und deren Vergleich mit unserer Datenbank, konnten die genannten Substanzen identifiziert werden. Aus den mittels HPLC-Analyse erhaltenen Chromatogrammen der Sephadex-Fractionen wurden in weiterer Folge die UV-Spektren der entsprechenden Peaks ermittelt. Diese wurden herangezogen, um auch in den Chromatogrammen der HPLC-Analysen der SPE C8-Fractionen, und in weiterer Folge des OWE, die Peaks den entsprechenden Substanzen zuordnen zu können. Diese Zuordnung, als auch die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse wird in Kapitel vier behandelt (siehe S. 61, Kap. IV, Punkt 1 und 2).

4.) Lokalisierung der Chlorogensäuren auf Kieselgel (RP8-Material) und im Chromatogramm der HPLC-Analyse

Um die von meiner Kollegin Carina Burgstaller im OWE nachgewiesene Chlorogensäure (13) auf der DC-Platte lokalisieren zu können, wurde unter Verwendung des Flavonoid-Systems (siehe S. 10, Kap.II, 2.1., Tab. 1) eine DC angefertigt. Die Reinsubstanz wurde dabei neben dem OWE aufgetragen (siehe Abb. 40).

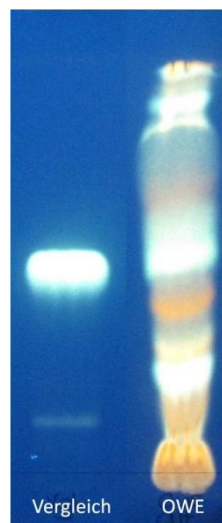


Abb. 40: Dünnschichtchromatographische Analyse des Original-Wasserextraktes; Vergleich = Chlorogensäure

Um die zahlreichen Isomere der Chlorogensäure in den Chromatogrammen der HPLC-Analysen zuordnen und auch unterscheiden zu können, wurden von den im Labor vorhandenen Vertretern HPLC-Analysen durchgeführt und von den erhaltenen Chromatogrammen die zugehörigen UV-Spektren ermittelt (Parameter der HPLC-Analyse siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6).

Exemplarisch für die anderen Vertreter, ist hier das Formelbild der erstgenannten 1,5-Dicaffeoylchinasäure abgebildet:

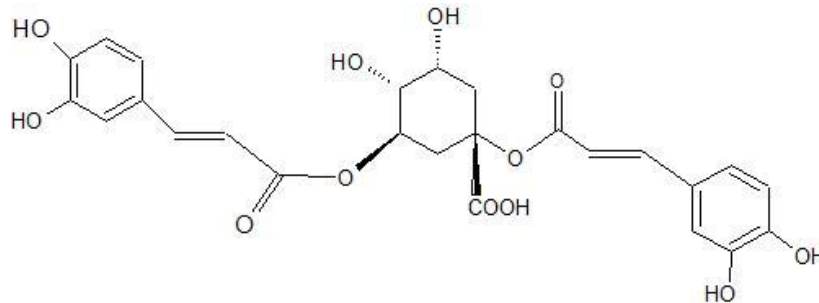


Abb. 41: 1,5-Dicaffeoylchinasäure

1,5-Dicaffeoylchinasäure:

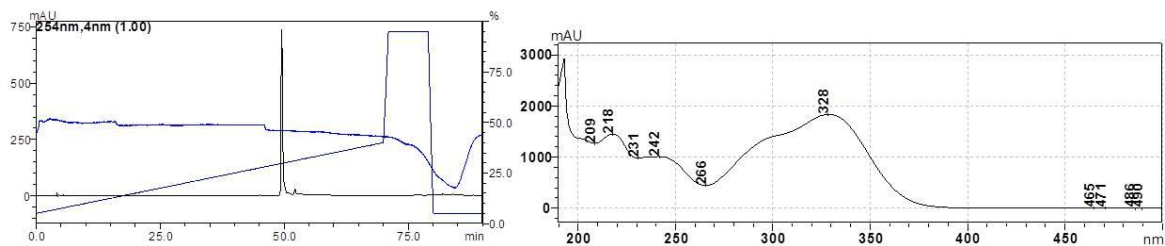


Abb. 42: Analyse der 1,5-Dicaffeoylchinasäure mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), rechts: während der Analyse aufgenommenes UV-Spektrum

1,3-Dicaffeoylchinasäure:

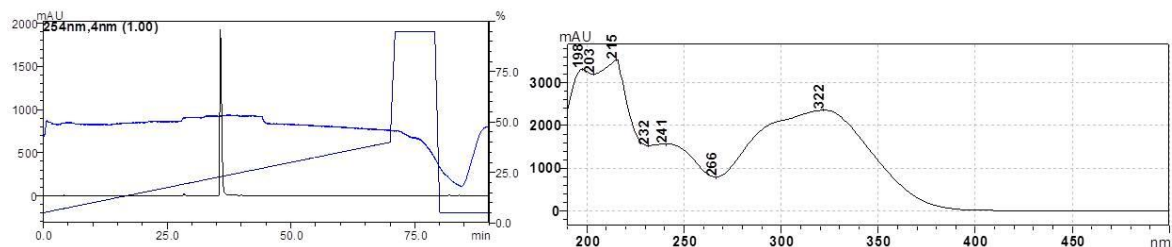


Abb. 43: Analyse der 1,3-Dicaffeoylchinasäure mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), rechts: während der Analyse aufgenommenes UV-Spektrum

3,4,5-Tricaffeoylchinasäure:

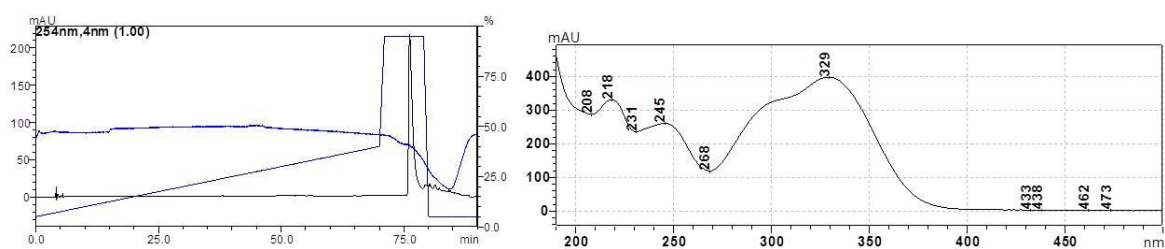


Abb. 44: Analyse der 3,4,5-Tricaffeoylchinasäure mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), rechts: während der Analyse aufgenommenes UV-Spektrum

3,4-Dicaffeoylchinasäure:

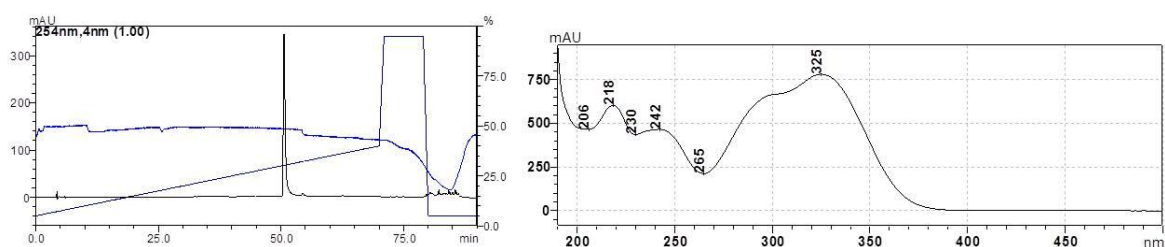


Abb. 45: Analyse der 3,4-Dicaffeoylchinasäure; mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), rechts: während der Analyse aufgenommenes UV-Spektrum

3,5-Dicaffeoylchinasäure:

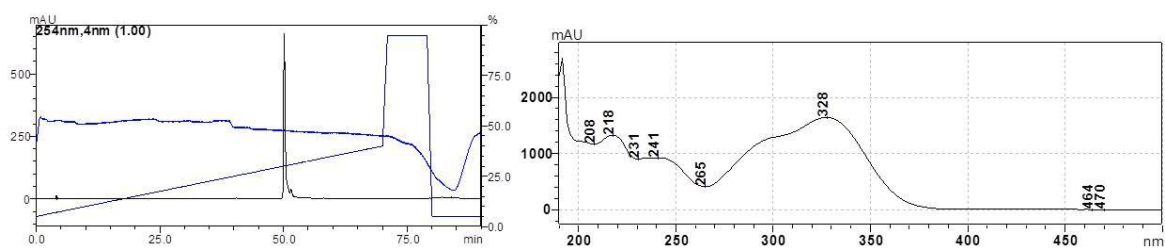


Abb. 46: Analyse der 3,5-Dicaffeoylchinasäure mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), rechts: während der Analyse aufgenommenes UV-Spektrum

4,5-Dicaffeoylchinasäure:

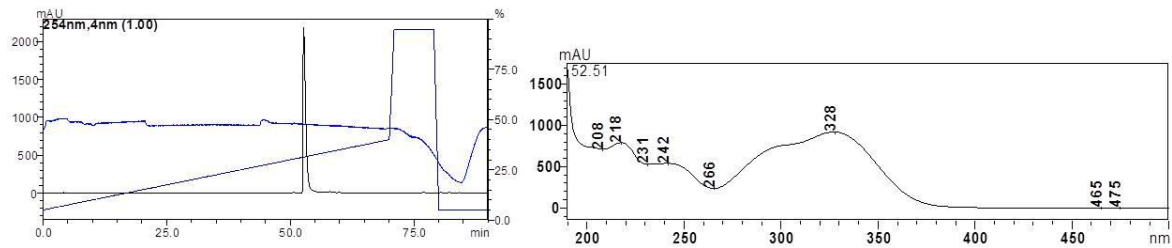


Abb. 47: Analyse der 4,5-Dicaffeoylchinasäure mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), rechts: während der Analyse aufgenommenes UV-Spektrum

Cryptochlorogensäure (= 4-O-Caffeoylchinasäure)

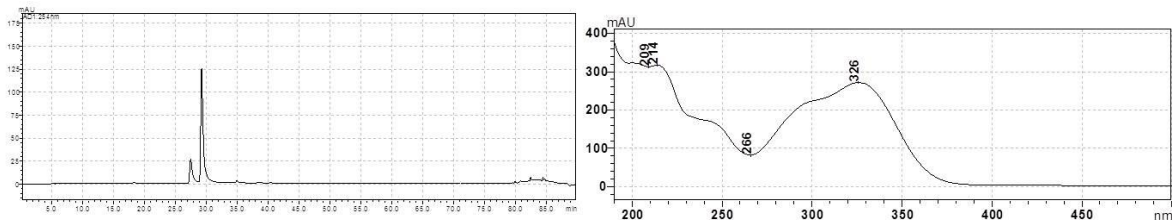


Abb. 48: Analyse der Cryptochlorogensäure mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), rechts: während der Analyse aufgenommenes UV-Spektrum

Neochlorogensäure (= 5-O-Caffeoylchinasäure):

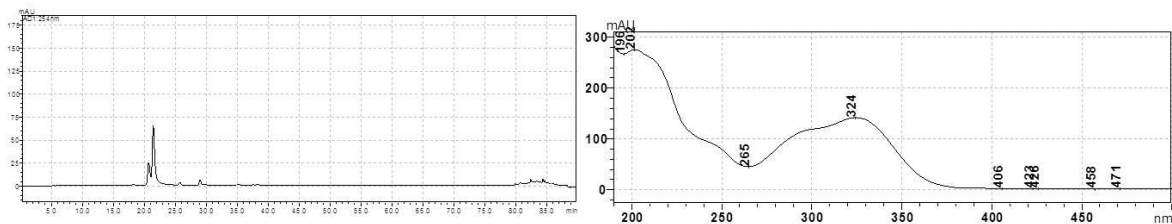


Abb. 49: Analyse der Neochlorogensäure; links mittels HPLC (Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6), rechts: während der Analyse aufgenommenes UV-Spektrum

Zur besseren Übersicht sind die Chromatogramme aller mittels HPLC analysierten Chlorogensäurederivate nochmals in einer Abbildung dargestellt (siehe Abb. 50).

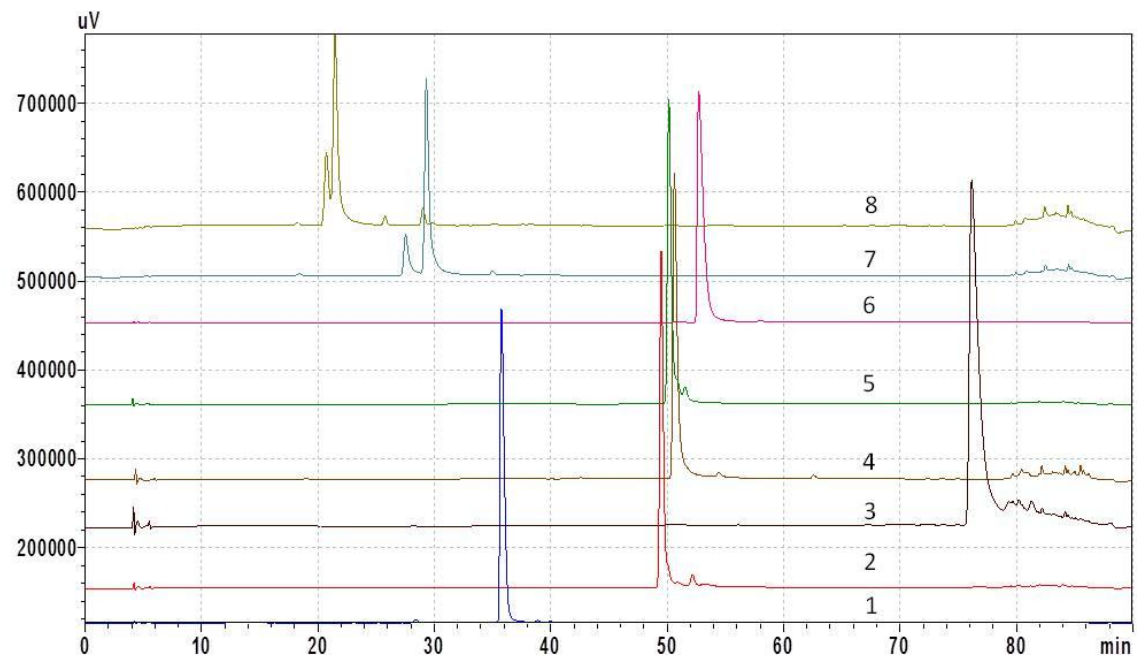


Abb. 50: Übersicht über die Chromatogramme der analysierten Chlorogensäuren, Analyse mittels HPLC
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6)

- | | |
|---------------------------------|------------------------------|
| 1 = 1,3-Dicaffeoylchinasäure | 5 = 3,5-Dicaffeoylchinasäure |
| 2 = 1,5-Dicaffeoylchinasäure | 6 = 4,5-Dicaffeoylchinasäure |
| 3 = 3,4,5-Tricaffeoylchinasäure | 7 = Cryptochlorogensäure |
| 4 = 3,4-Dicaffeoylchinasäure | 8 = Neochlorogensäure |

Um die Chlorogensäuren in den Chromatogrammen der HPLC-Analysen zuordnen zu können, wurden die ermittelten UV-Spektren mit jenen der Peaks in den Chromatogrammen verglichen (siehe S. 62, Kap. IV, Punkt 2).

IV) ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im folgenden Kapitel werden die während der Analyse des OWE gewonnenen Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

1.) Substanzen der Sephadex-Fractionen

Durch die Interpretation der erhaltenen Massenspektren und deren Vergleich mit MS-Spektren von Reinsubstanzen unserer Datenbank (siehe S.43, Kap. III, Punkt 3) konnten die in Tabelle 10 angeführten Substanzen identifiziert werden.

Fraktion	Retentionszeit (min)	m/z	Substanz
MeOH100_9 - MeOH100_11	20	798	Quercetin-trihexosid
MeOH100_11	25	342	Kaffeesäurederivat
MeOH100_11	26	354	Chlorogensäureisomer
MeOH100_8 - MeOH100_11	31	358	Kaffeesäurederivat
MeOH100_11 - MeOH100_13	35	626	Quercetin-dihexosid
MeOH100_12	38	610	Kaempferol-dihexosid (Hexosen in Kette)
MeOH100_12 - MeOH100_13	39	664	Rutin
MeOH100_10	40	756	Lavandulifoliosid
MeOH100_10	41	624	Verbascosid
MeOH100_10	42	756	Lavandulifoliosid-Isomer

Tab. 10: Durch Interpretation der Massenspektren der Sephadex-Fractionen identifizierte Substanzen;

m/z = Masse/Ladungsverhältnis

2.) Identifizierung von Substanzen in den Chromatogrammen der HPLC-Analyse der SPE C8-Fractionen

Die in den Massenspektren der Sephadex-Fractionen identifizierten Substanzen sollten den Peaks in den Chromatogrammen der HPLC-Analyse der SPE C8-Fractionen zugeordnet werden. Dafür wurden die während der HPLC-Analysen der Sephadex-Fractionen, als auch der Caffeoylchinasäuren aufgenommenen UV-Spektren herangezogen (Parameter zur verwendeten HPLC-Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6).

2.1. Zuordnung der Peaks im Chromatogramm der SPE C8-H₂O-Fraktion

Die während der HPLC-Analyse der SPE C8-H₂O-Fraktion (siehe S. 22, Kap. III, 1.2., Tab. 8) aufgenommenen UV-Spektren wurden mit den zuvor erwähnten UV-Spektren verglichen. Auf diese Weise wurde versucht, die vorhandenen Peaks möglichst den zuvor identifizierten Substanzen zuzuordnen.

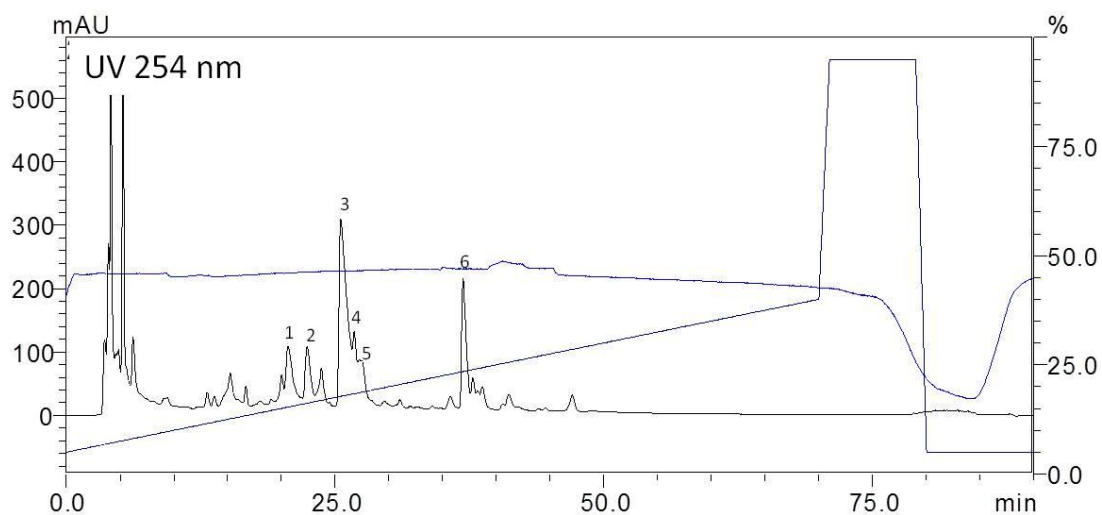


Abb. 51: Analyse der SPE C8-H₂O-Fraktion mittels HPLC;
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6)

Bei Peak 1, 2, 3, 4 und 6, dürfte es sich aufgrund des ähnlichen UV-Spektrums (siehe Abb. 36) um eine Caffeoylchinasäure handeln.

Da die Retentionszeiten jedoch mit keiner der vorhandenen Vergleichssubstanzen übereinstimmten, konnte keine genauere Aussage getroffen werden.

Die entsprechenden UV-Spektren sind exemplarisch anhand von Peak zwei und der 3,5-Dicaffeoylchinasäure dargestellt (siehe Abb. 52). Peak fünf wurde der Cryptochlorogensäure zugeordnet (siehe Abb. 53).

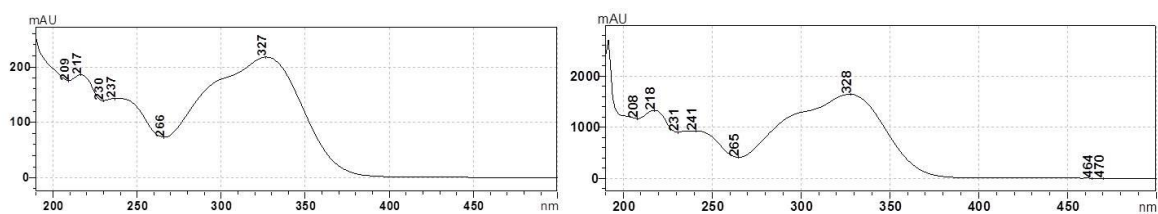


Abb. 52: links: UV-Spektrum Peak 2, rechts: UV-Spektrum 3,5-Dicaffeoylchinasäure

Peak 5: Cryptochlorogensäure

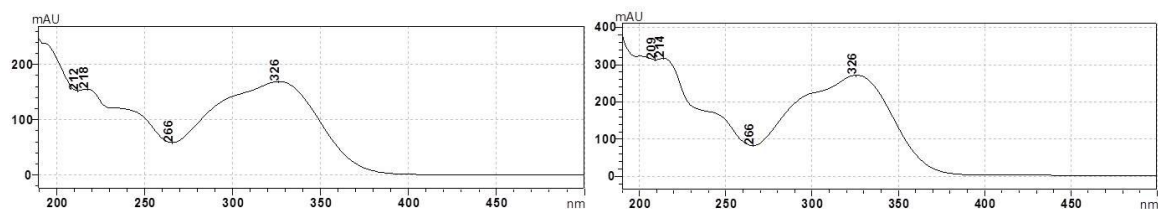


Abb. 53: links: UV-Spektrum Peak 5, rechts: UV-Spektrum Cryptochlorogensäure

2.2. Zuordnung der Peaks im Chromatogramm der SPE C8-MeOH-Fraktion

Mit den während der HPLC-Analyse der SPE C8-MeOH-Fraktion aufgenommenen UV-Spektren wurde in gleicher Weise verfahren. Sie wurden mit den UV-Spektren der Sephadex-Fractionen und der Caffeoylchinasäuren verglichen, um möglichst viele Substanzen im Chromatogramm der HPLC-Analyse der SPE C8-MeOH-Fraktion lokalisieren und zuordnen zu können.

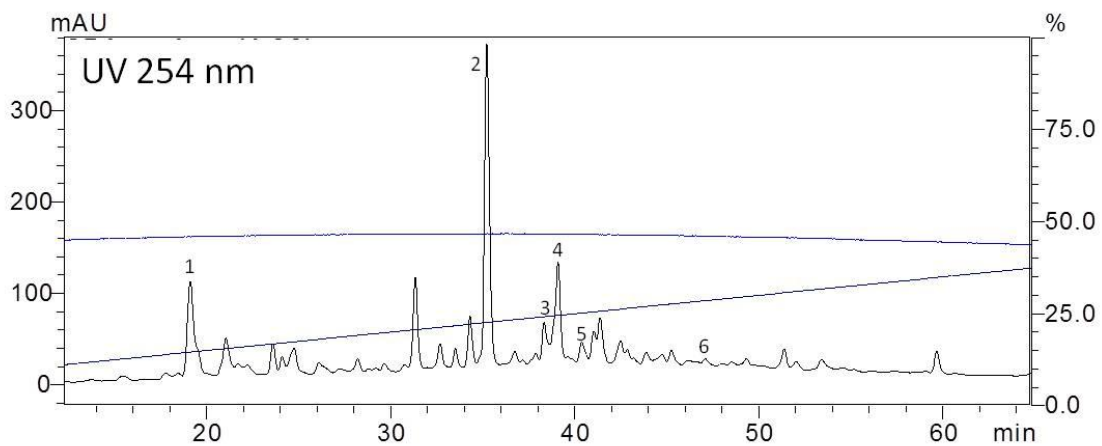


Abb. 54: Analyse der SPE C8-MeOH-Fraktion (siehe S. 22, Kap. III, 1.2., Tab. 8) mittels HPLC;
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6)

Peak 1) Quercetin-trihexosid

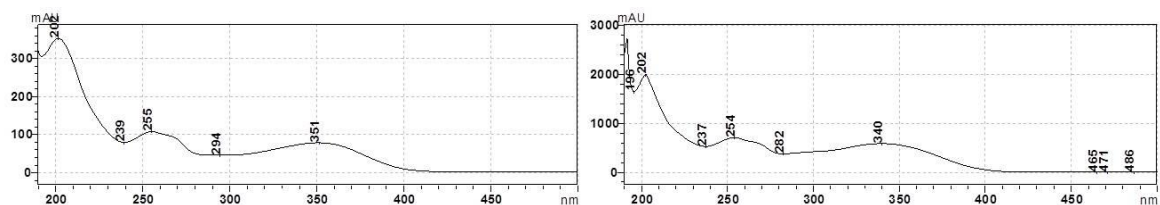


Abb. 55: links: UV-Spektrum Peak 1, rechts: UV-Spektrum Quercetin-trihexosid

Peak 2) Quercetin-dihexosid

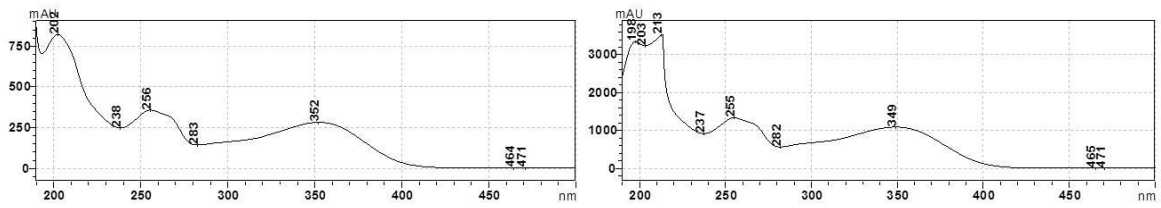


Abb. 56: links: UV-Spektrum Peak 2, rechts: UV-Spektrum Quercetin-dihexosid

Peak 3) Kaempferol-dihexosid

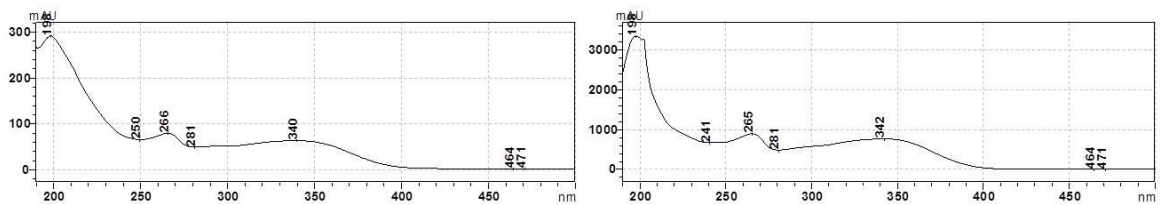


Abb. 57: links: UV-Spektrum Peak 3, rechts: UV-Spektrum Kaempferol-dihexosid

Peak 4) Rutin

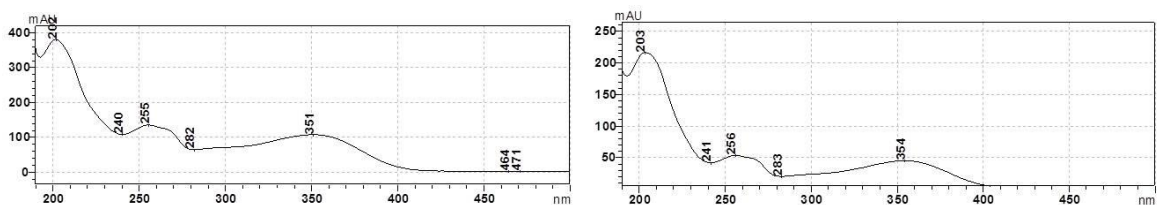


Abb. 58: links: UV-Spektrum Peak 4, rechts: UV-Spektrum Rutin

Peak 5) Lavandulifoliosid

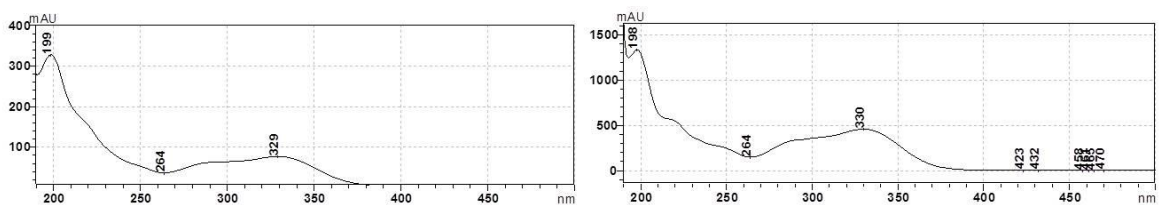


Abb. 59: links: UV-Spektrum Peak 5, rechts: UV-Spektrum Lavandulifoliosid

Peak 6) Verbascosid

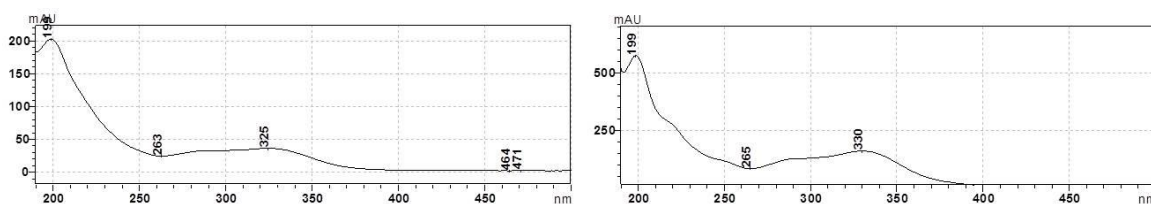


Abb. 60: links: UV-Spektrum Peak 6, rechts: UV-Spektrum Verbascosid

Zur besseren Übersicht wurden die in den jeweiligen Fraktionen gefundenen Substanzen in Tab. 11 zusammengefasst.

In der SPE C8-H ₂ O-Fraktion gefundene Substanzen	In der SPE C8-MeOH-Fraktion gefundene Substanzen
Cryptochlorogensäure	Quercetin-trihexosid
verschiedene Caffeoylchinasäuren	Quercetin-dihexosid
	Kaempferol-dihexosid
	Rutin
	Lavandulifoliosid
	Verbascosid

Tab. 11: Übersicht über die in den einzelnen Fraktionen der Aufreinigung des OWE mittels SPE C8-Kartusche (siehe S. 22, Kap. III, 1.2., Tab. 8) gefundenen Substanzen

Da die Cryptochlorogensäure als auch die Caffeoylchinasäuren aufgrund ihres Säurecharakters bessere Wasserlöslichkeit aufweisen, werden diese in der ersten Phase der Aufreinigung des OWE mittels SPE C8-Phase eluiert und verweilen nicht an der stationären Phase.

Die Flavonoide, Lavandulifoliosid und Verbascosid weisen hingegen ausreichend apolaren Charakter auf, um an der C8-Phase, einem Umkehrphasen-Sorbens, retentiert und erst in der zweiten Phase der Aufreinigung mittels Methanol eluiert zu werden.

3.) Identifizierung von Substanzen im Chromatogramm der HPLC-Analyse des OWE

Die während der HPLC-Analyse des OWE aufgenommenen UV-Spektren wurden für einen Vergleich mit den während der HPLC-Analysen der SPE C8-Fractionen aufgenommenen UV-Spektren herangezogen. Auf diese Weise sollten die bereits in den Chromatogrammen der SPE-Fractionen identifizierten Substanzen auch im Chromatogramm des OWE zugeordnet werden. Die Vergleiche der UV-Spektren sind im Anhang abgebildet (siehe S. 76). So konnten die in Tab. 12 angeführten Substanzen zugeordnet werden.

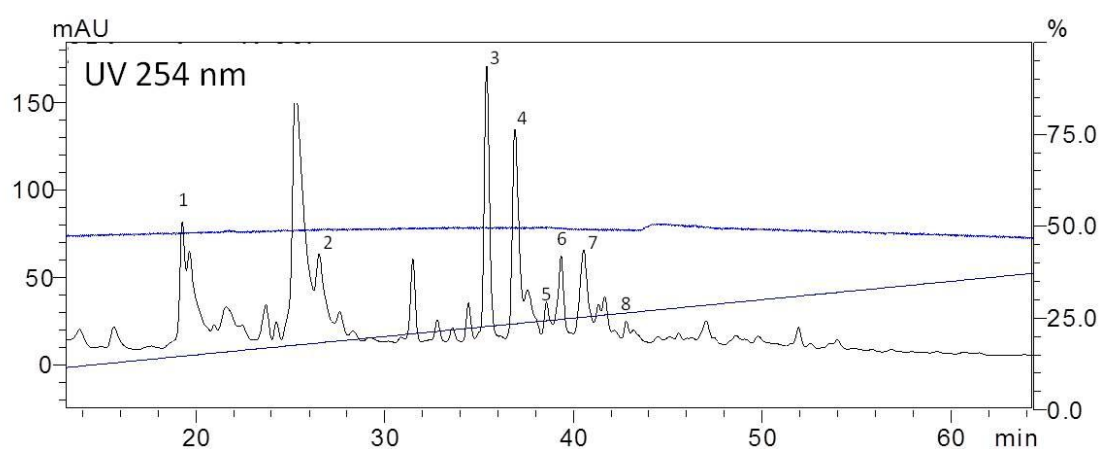


Abb. 61: Analyse des OWE von *Leonurus sibiricus* L. mittels HPLC
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6)

Peak-Nummer	Substanz
1	Quercetin-trihexosid
2	Neochlorogensäure
3	Quercetin-dihexosid
4	Cryptochlorogensäure
5	Kaempferol-dihexosid
6	Rutin
7	Verbascosid
8	Lavandulifoliosid

Tab. 12: Im Chromatogramm des OWE identifizierte Substanzen

Auf diese Weise konnten die meisten der im Chromatogramm relevant erscheinenden Peaks identifiziert werden, zu den Peaks bei 25 bzw. 32 min konnte keine Aussage getroffen werden.

4.) Zusammenfassung aller gefundenen Substanzen und deren Strukturen

Zur Orientierung und kurzen Zusammenfassung der Arbeit bietet Abb. 62 eine schematische Darstellung über die Aufreinigung des OWE, die dadurch gewonnen Fraktionen und die mit diesen durchgeführten Analysen.

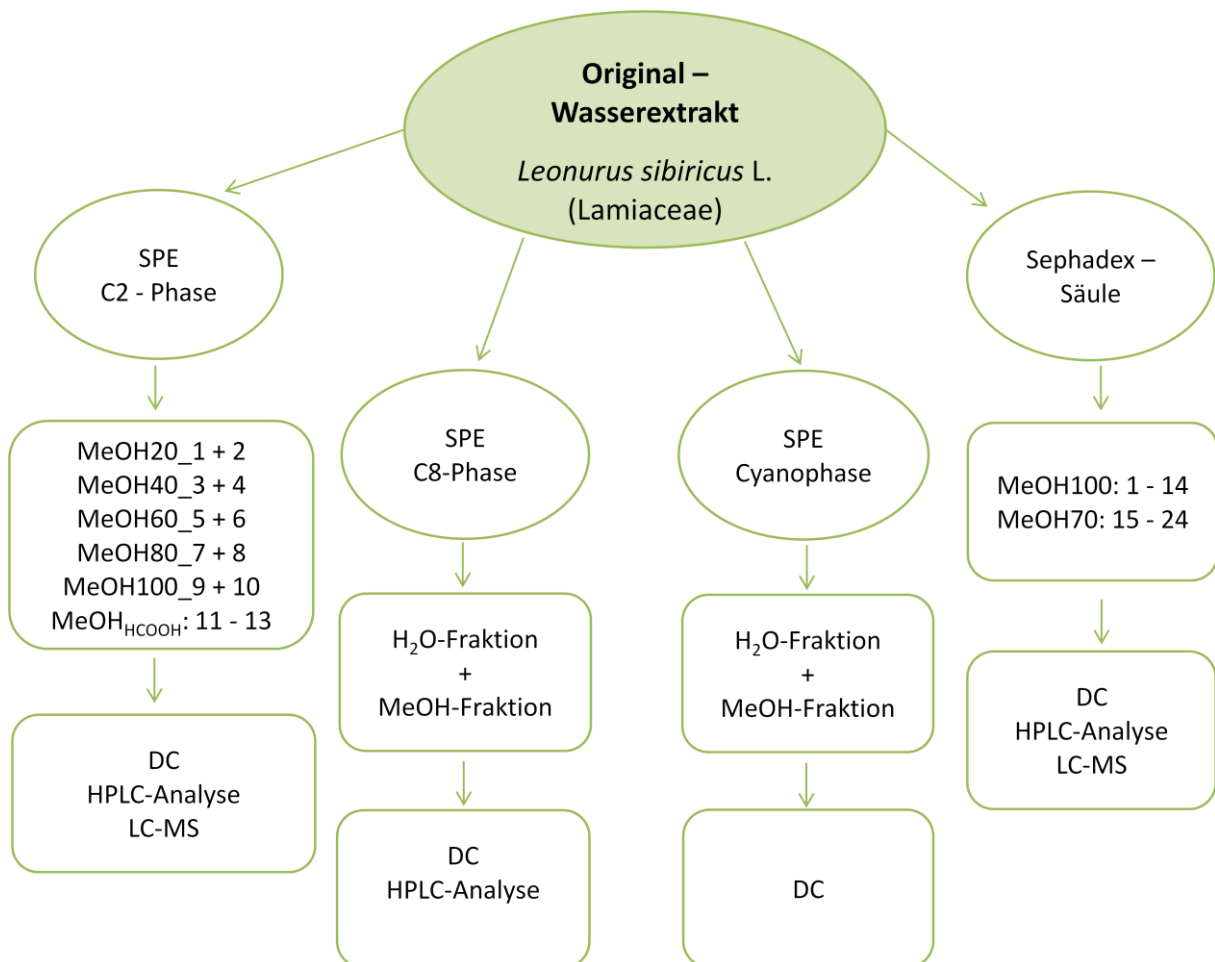
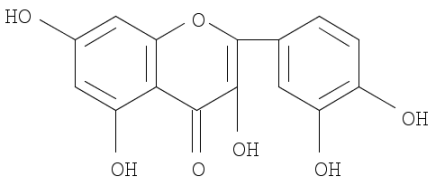
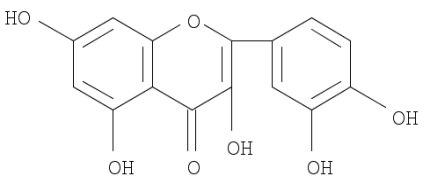
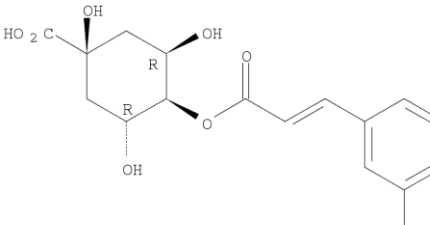
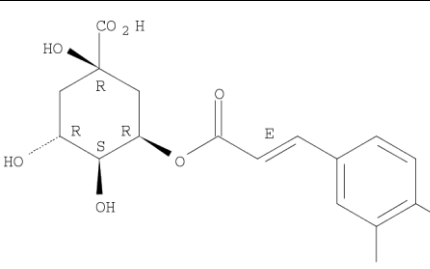
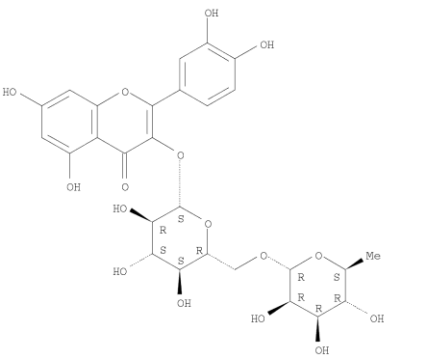
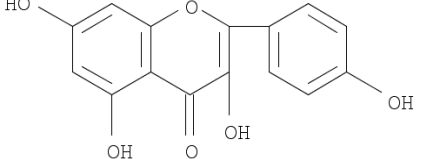
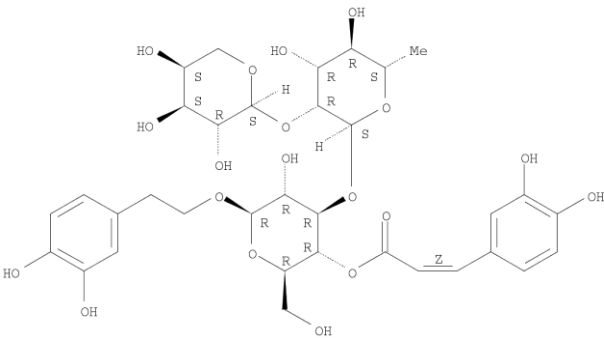
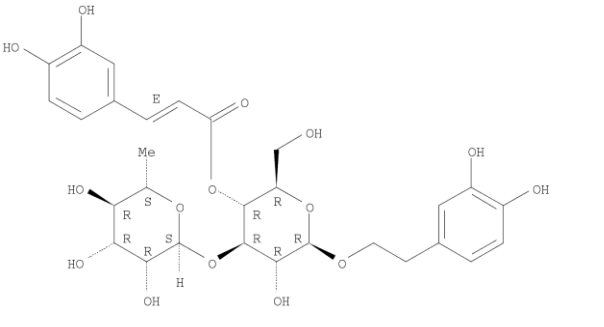
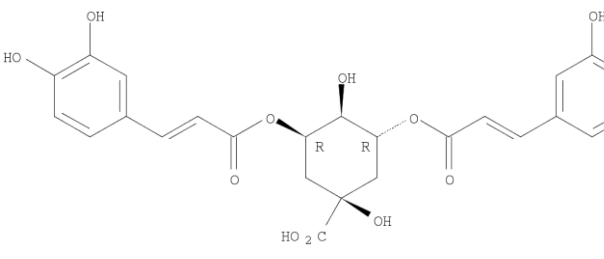


Abb. 62: Schematischer Überblick zur Aufreinigung des OWE, den gewonnen Fraktionen und den damit durchgeführten Analysen

Alle mittels HPLC- und LC-MS-Analyse in den SPE- und Sephadex-Fractionen identifizierten Substanzen wurden zur Übersicht in Tabelle 13 zusammengefasst.

Substanz	Formel
Quercetin-trihexosid	 (3-fach glykosyliert)
Quercetin-dihexosid	 (2-fach glykosyliert)
Cryptochlorogensäure	
Neochlorogensäure	
Rutin	
Kaempferol-dihexosid	

Lavandulifoliosid	
Verbascosid	
3,5-Dicaffeoylchinasäure	

Tab. 13: Liste aller gefundenen Substanzen und deren Strukturformel

Wie in einer Austestung eines MeOH/BuOH-Extraktes von *Leonurus sibiricus* L. auf erhöhten Glucose-uptake an Adipozyten bereits festgestellt wurde, zeigen sowohl Lavandulifoliosid als auch Verbascosid keinen antidiabetischen Effekt (12).

Bei der Gruppe der Flavonoide handelt es sich grundsätzlich um natürlich vorkommende phenolische Verbindungen, welche vielfältige biologische Aktivität zeigen. Ihrem Potential in der Behandlung von Diabetes und anderen Krankheiten wurde daher bereits viel Aufmerksamkeit geschenkt (20).

Es finden sich Studien, in denen sowohl Rutin als auch Chlorogensäure ein antidiabetischer Effekt nachgewiesen wurde. So zeigten beispielsweise Ratten, in denen Diabetes induziert wurde, in einer Studie aus Ungarn nach Verabreichung von Rutin bzw. Chlorogensäure eine dosisabhängige Senkung des Blutzuckerspiegels (21). Eine weitere Studie belegt, dass in Ratten, in denen ebenfalls Diabetes ausgelöst worden war, nach Gabe von Rutin der Glucosespiegel als auch der Spiegel an glykosyliertem Hämoglobin signifikant gesenkt werden konnte, während der Insulinspiegel gesteigert wurde (22). Auch die Aktivität von α -Glucosidase und α -Amylase konnte durch Einwirkung von Quercetin, Rutin und Kaempferol gesenkt werden (20).

Aufgrund dieser Literaturdaten und identer Inhaltsstoffe wie Rutin, als auch glykosylierter Aglyka wie Kaempferol-dihexosid, Quercetin-dihexosid bzw. Quercetin-trihexosid, wäre es vorstellbar, dass auch die antidiabetische Wirkung von *Leonurus sibiricus* L. auf diese Inhaltsstoffe zurückzuführen ist bzw. diese Flavonoide im Sinne eines synergistischen Effektes an der Wirkung beteiligt sind. Ein Nachweis für diese Annahme muss jedoch erst erbracht werden.

V) ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Diplomarbeit liefert einen Beitrag zur näheren Untersuchung des Original-Wasserextraktes (OWE) der mongolischen Arzneipflanze *Leonurus sibiricus* L.. Diese Medizinalpflanze findet in der Traditionellen Mongolischen Medizin Anwendung bei der Behandlung von Diabetes mellitus. Da die Zahl der von Diabetes mellitus betroffenen Personen stetig ansteigt, ist die Suche nach neuen oder ergänzenden Behandlungsmöglichkeiten von großer Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es einerseits, eine möglichst einfache Möglichkeit zu finden, die im Extrakt vorhandenen Zucker als auch die Stoffgruppe der Betaine vom OWE abzutrennen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Varianten der Solid Phase Extraction (SPE) erprobt. Nach einigen Versuchen und Analyse der erhaltenen Fraktionen mittels DC und HPLC, konnte die SPE mittels C8-Kartuschen als die am besten geeignete Methode identifiziert werden (siehe S. 20, Kap. III, 1.2., Abb. 8 - 10).

Der zweite Teil der Aufgabenstellung bestand darin, möglichst viele Komponenten des OWE zu identifizieren. Durch die komplexe Zusammensetzung des OWE war hierfür zuerst eine Auftrennung des OWE in kleinere Fraktionen erforderlich, was mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20 erfolgte. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels HPLC-UV-DAD und LC-MS charakterisiert. Durch Kombination der Informationen aus den einzelnen Spektren konnten die in Tab. 13 angeführten Inhaltsstoffe in den vorliegenden Fraktionen identifiziert werden. Es ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass diese Substanzen zwar identifiziert werden konnten, einige wichtige Fragestellungen aber unbeantwortet bleiben. So konnten zwar an Quercetin und Kaempferol Glykosylierungen festgestellt werden, eine genauere Aussage über die Art der vorliegenden Hexosen konnte jedoch nicht getroffen werden. Weiters konnte an Lavandulifoliosid eine Methylierung bzw. eine Dimethylierung festgestellt werden, genauere Aussagen über die Lokalisation der Methylgruppen am Molekül konnten jedoch nicht getätigt werden.

VI) ABSTRACT

This diploma thesis contributes to a better understanding of the aqueous extract of the Mongolian medicinal plant *Leonurus sibiricus* L., which is used in Traditional Mongolian Medicine to treat diabetes mellitus. Owing to the rising number of people affected by diabetes, the search for new treatment options is of great importance.

The first scope of this work was finding a simple possibility of separating sugars and betaines from the aqueous extract. Various types of solid phase extraction (SPE) were tested. After analyzing the obtained fractions using thin-layer chromatography, HPLC-UV-DAD and LC-MS, the SPE via C8-cartridge was found to be the best alternative (see p. 20, Kap. III, 1.2., Abb. 8 - 10).

The second task consisted of identifying as many components of the aqueous extract as possible. Owing to the complexity of the extract, it had to be divided into smaller fractions, for which size exclusion chromatography at Sephadex LH20-material was chosen. The obtained fractions were characterised via thin-layer chromatography, HPLC-UV-DAD and LC-MS. The combination of the results led to identification of the substances listed in table 13.

Although these substances could be identified, it is important to say, that there are some questions, which could not be answered. First, glycosylation of Quercetin and Kaempferol was confirmed, but further conclusions concerning the hexoses present in the sample could not be made. Second, methylation of Lavandulifoliosid was detected, but the exact location of these groups could not be determined.

VII) LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Thews, Mutschler, Vaupel: „Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen“, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 5. Auflage
- (2) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html> (1.8.2013)
- (3) Patel DK, Kumar R, Laloo D, Hemalatha S: Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, May 2012, 411–420
- (4) <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/facts-and-figures> (1.8.2013)
- (5) Salimifar M, Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M.: A Review on Natural Products for Controlling Type 2 Diabetes with an Emphasis on their Mechanisms of Actions, Curr Diabetes Rev., September 2013, 402-411
- (6) Misbah H, Aziz A, and Aminudin N: Antidiabetic and antioxidant properties of Ficus deltoidea fruit extracts and fractions, BMC Complementary and Alternative Medicine 2013, 13:118
- (7) Hu-Yin H, Sheng-Ji P: Wild Plants in the diet of Arhorchin Mongol Herdsmen in Inner Mongolia, Khasbagan, Economic Botany, October–December 2000, 528-536
- (8) Pitschmann A, Purevsuren S, Obmann A, Natsagdorj D, Gunbilig D, Narantuya S, Kletter Ch, Glasl S: Traditional Mongolian Medicine: history and status quo, Phytochemical Rev, September 2013, 943-959
- (9) Kletter C, Glasl S, Thalhammer T, Narantuya S: Traditional Mongolian Medicine-A Potential for drug discovery, SciPharm, February 2008, 49-63
- (10) Bernstein J.A., Stibich M. A., LeBaron S.: Use of Traditional Medicine in Mongolia: A Survey, Complementary Therapies in Medicine, March 2002, 42–45
- (11) Khookhor O, Sato Y: Mongolian plant extracts with potential glucose absorption inhibiting effects in rats, Journal of Traditional Medicine, 74-79

- (12) Sigmund A: Medicinal plants against Diabetes mellitus – Search for new blood glucose lowering agents from traditional medicines, Fakultätsöffentliche Präsentation, Department für Pharmakognosie Wien, Mai 2010
- (13) Burgstaller C: Charakterisierung von phenolischen Inhaltsstoffen aus wässrigen Extrakten von *Leonurus sibiricus* L., Diplomarbeit in Vorbereitung
- (14) <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1301346>, 6.8.2013
- (15) Adam K.P.: Analytik biogener Arzneistoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2000
- (16) <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/Phenyl-Hexyl>, 21.1.2013
- (17) www.phenomenex.com/Products/HPLC-Detail/Luna/Phenyl-Hexyl?culture=de;
26.3.2013
- (18) Grebe S, and Singh R J: LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here?, The Clinical Biochemist Reviews, February 2011, 5-31
- (19) <https://www.chromspec.com/pdf/e/ag78.pdf>, 19.7.2013
- (20) Mohan S, Nandhakumar L: Role of various flavonoids: Hyptheses on novel approach to treat diabetes, Journal of Medical Hypotheses and Ideas, January 2014, 1-6
- (21) Hunyadi A, Martins A, Hsieh T-J, Seres A, Zupkó I: Chlorogenic Acid and Rutin play a Major Role in the In Vivo Anti – Diabetic Activity of Morus alba Leaf Extract on Type II Diabetic Rats, Plos One, November 2012, 7(11): e50619
- (22) Kamalakkannan N; Prince P S M: Antihyperglycaemic and Antioxidant Effect of Rutin, a Polyphenolic Flavonoid, in Streptozotocin – Induced Diabetic Wistar Rats, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, January 2006, 97–103

VIII) ANHANG

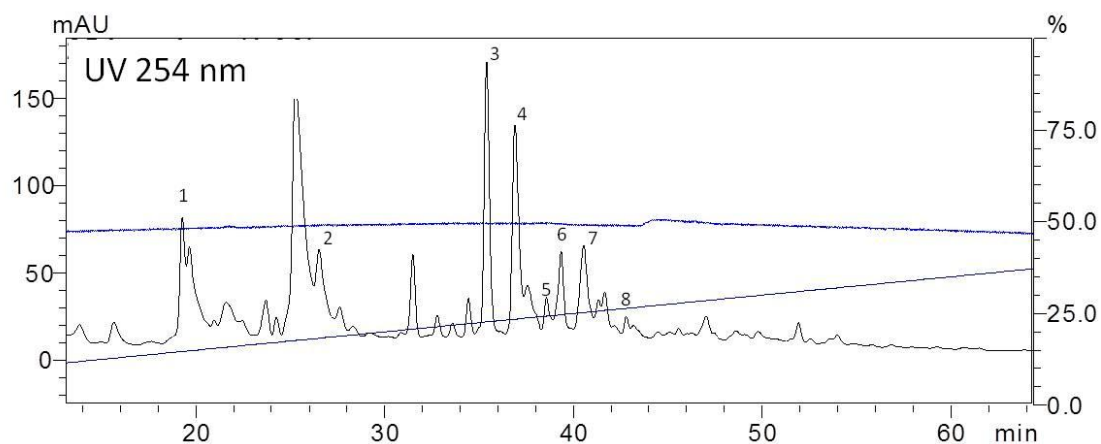


Abb. 66: Analyse des OWE von *Leonurus sibiricus* L. mittels HPLC
(Parameter zur verwendeten Methode siehe S. 16, Kap. II, 2.4., Tab. 6)

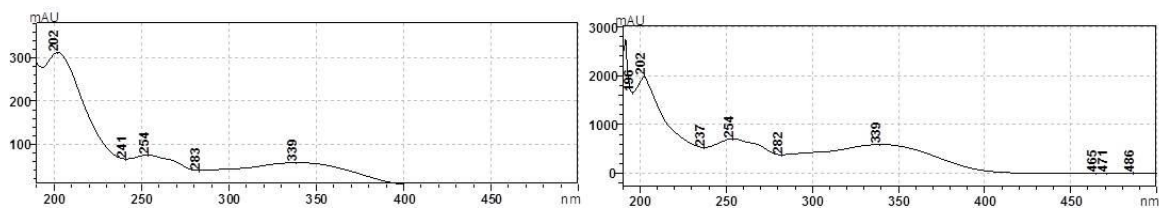


Abb. 67: links: UV-Spektrum Peak 1; rechts: UV-Spektrum Quercetin-trihexosid

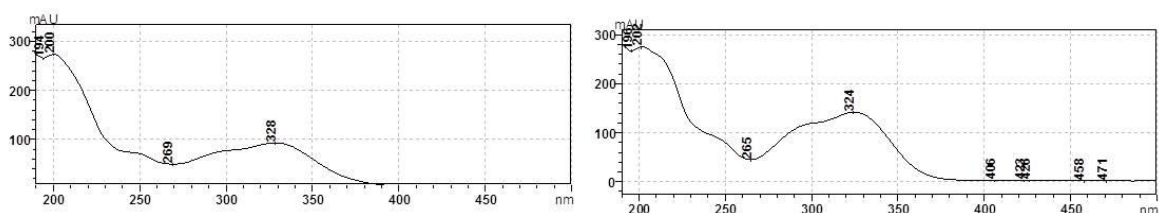


Abb. 68: links: UV-Spektrum Peak 2; rechts: UV-Spektrum Neochlorogensäure

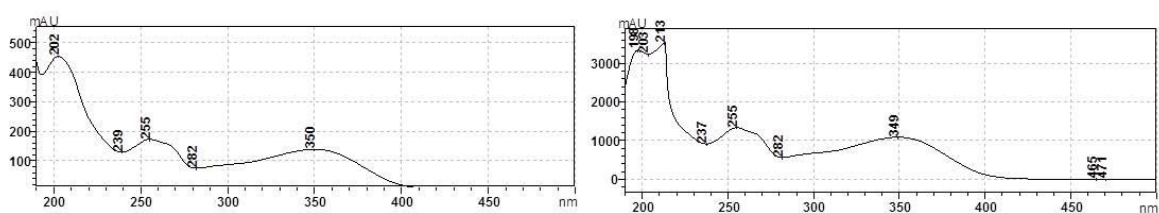


Abb. 69: links: UV-Spektrum Peak 3; rechts: UV-Spektrum Quercetin-dihexosid

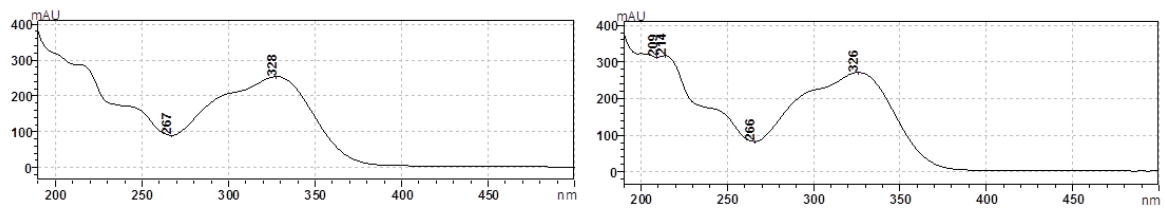


Abb. 70: links: UV-Spektrum Peak 4; rechts: UV-Spektrum Cryptochlorogensäure

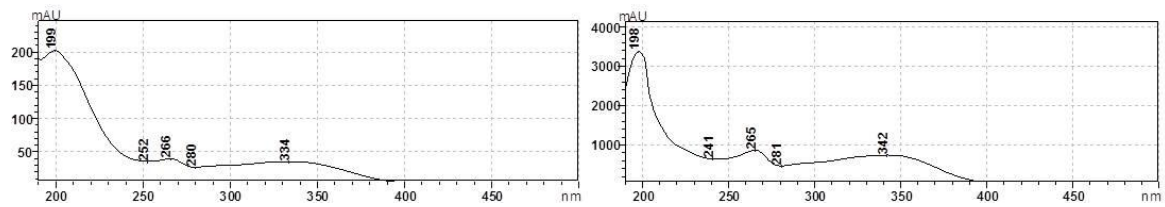


Abb. 71: links: UV-Spektrum Peak 5; rechts: UV-Spektrum Kaempferol-dihexosid

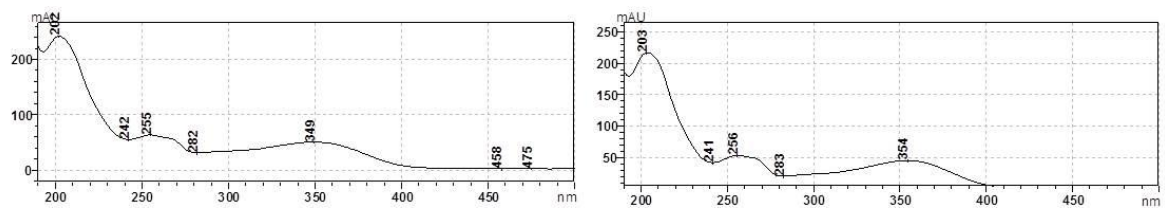


Abb. 72: links: UV-Spektrum Peak 6; rechts: UV-Spektrum Rutin

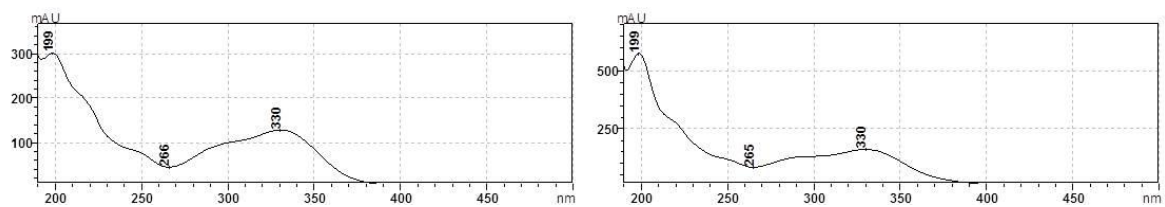


Abb. 73: links: UV-Spektrum Peak 7; rechts: UV-Spektrum Verbascosid

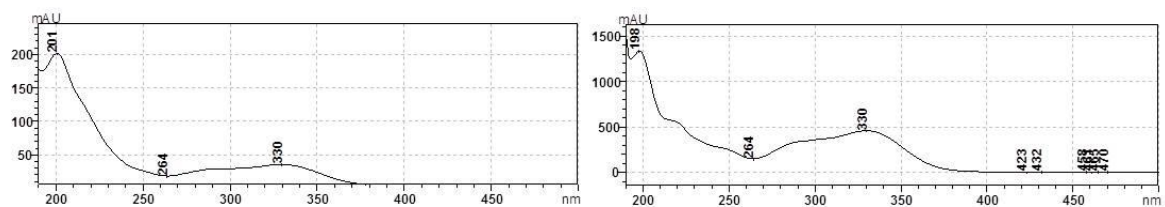


Abb. 74: links: UV-Spektrum Peak 8; rechts: UV-Spektrum Lavandulifoliosid

IX) LEBENSLAUF

Name: Gudrun Schallauer

Schulische Ausbildung:

1990 – 1994 Volksschule Göstling/Ybbs

1994 – 1998 Hauptschule Göstling/Ybbs

1998 – 2003 Besuch der HLW Amstetten

2003 Reife- und Diplomprüfung

Seit 2003 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Oktober 2012 – März 2013 Praktische Arbeiten für die Diplomarbeit
am Department für Pharmakognosie

Berufliche Erfahrung:

Oktober 2006 – Juli 2012 Geringfügig beschäftigt bei Bärenapotheke,
1020 Wien

März 2012 – Juni 2014 Geringfügige Beschäftigung als Tutorin am
Department für Pharmakognosie, Universität Wien