universität wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Untersuchungen zu *Plantago coronopus* L. (Plantaginaceae)"

verfasst von / submitted by

Christina Maria Gradwohl

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree programme code as it appears on the student record sheet:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt / degree programme as it appears on the student record sheet:	Diplomstudium Pharmazie
Betreut von / Supervisor:	A.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie sowie für die engagierte und vor allem nette Betreuung bedanken. Nicht nur sie, sondern die gesamte Spange, bildeten die optimalen Rahmenbedingungen für ein produktives und freundschaftliches Arbeiten. Dank gilt in diesem Fall auch meinen langjährigen Studienkolleginnen Elena und Claudia, welche mich meine gesamte Studienzeit lang begleitet haben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Wolfgang Kubelka, welcher ebenso als Initiator meines Diplomarbeitsthemas galt. Seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung war mir zu jedem Zeitpunkt sicher. Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Peter Pechlaner, der eine wesentliche Rolle für die Entstehung dieser Diplomarbeit spielte.

Ein großer Dank gebührt auch Herrn Dr. Martin Zehl für die Messungen an der LC-MS, Frau DI Barbara Theiler für ihre Unterstützung an vielen Ecken und Enden, Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek für die Hilfe an der HPLC, sowie Herrn Ramin Nikzad Msc., der immer für Fragen meinerseits offen war. Ein großer Dank gilt Frau Dr. Iphigenia Naidis für ihre übersetzerische Tätigkeit im Laufe der Diplomarbeit. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Mag. Dieter Reich und Herrn Mag. Christian Gilli (*Flora Ionica Working Group*[1]) für die Sammlung und Bereitstellung des Pflanzen- und Samenmaterials bedanken.

Der wohl größte Dank gilt meinen Eltern. Ohne ihr Zutun wäre mir das Studium in dieser Form nicht gelungen. Auch meine Geschwister, mein Bruder Hans-Peter und meine Schwester Marie, waren mir stets eine große Unterstützung. Danke für die vielen, vor allem lustigen Stunden.

Zuletzt bedanke ich mich noch bei Michael, der mir immer zur Seite stand, mich aufmunterte und motivierte. Ich bewundere ihn für seine Geduld mit mir.

[1] https://floraionica.univie.ac.at

Inhaltsverzeichnis

1 Allgemeiner Teil 1

1.1 Einleitung 1

1.2 Zielsetzung 2

1.3 Literaturübersicht 3

1.3.1 Botanik 3

1.3.2 Verbreitung 4

1.3.3 Morphologie 4

1.3.4 Inhaltsstoffe 5

1.3.5 Wirkungen 18

1.3.6 Traditionelle Anwendung 20

1.4 Benigne Prostatahyperplasie (BPH) 22

1.4.1 Definition 22

1.4.2 Therapie 23

1.4.3 *In-vitro-*/*in-vivo* Testung von *Sabal serrulata* MICHX 24

2 Material und Methoden 27

2.1 Reagenzien 27

2.2 Pflanzenmaterial 28

2.3 Extraktherstellung 29

2.4 Herstellung der Standardlösungen für Vergleichszwecke 31

2.5 Morphologische Untersuchungen 31

2.6 Anatomische Untersuchungen 32

2.7 Chromatographische Untersuchungen 33

2.7.1 Dünnschichtchromatographie (DC) 33

2.7.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) 36

2.7.3 Untersuchungen mittels LC-MS 40

3 Ergebnisse 42

3.1 Morphologische Untersuchungen 42

3.2 Anatomische Untersuchungen 44

3.2.1 Blatt 44

3.2.2 Sprossachse 51

3.2.3 Blüte 53
3.3 Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie 55
3.3.1 Untersuchung von Extrakten unterschiedlicher Polarität zur Findung einer geeigneten HPTLC-Methode 55
3.3.2 Fingerprint-Vergleich mittels HPTLC 59
3.3.3 Vergleich des Extrakts mit Referenzsubstanzen (Standards) 64
3.4 Untersuchungen mittels HPLC 70
3.4.1 Methodenentwicklung 70
3.4.2 Vergleich eines Extrakts mit Referenzsubstanzen (Standards) 74
3.4.3 Untersuchung von Extrakten unterschiedlicher Polarität 76
3.5 Untersuchungen des methanolischen Extrakts mittels LC-MS 78

4 Diskussion und Ausblick 85
4.1 Morphologische und anatomische Untersuchungen 85
4.2 Phytochemische Untersuchungen 86
4.3 *P. coronopus* bei benigner Prostatahyperplasie 88

5 Zusammenfassung - Abstract 90

6 Literaturverzeichnis 93

7 Curriculum vitae 99

8 Anhang 100
8.1 HPTLC - Untersuchung von Extrakten unterschiedlicher Polarität 100
8.2 HPLC 105
8.2.1 Vergleich mit Standardsubstanzen 105
8.2.2 Untersuchung von Extrakten unterschiedlicher Polarität 107

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Die vorliegende Diplomarbeit beleuchtet verschiedene pharmakognostische Aspekte der Pflanze *Plantago coronopus* L. (Plantaginaceae). Initiiert wurde das Projekt durch einen Allgemeinmediziner aus Lofer (Salzburg), Dr. Peter Pechlaner, dem diese Pflanze aus der Volksmedizin Griechenlands bekannt war, wo sie bei Prostatabeschwerden zum Einsatz kommt. Eigenversuche bzw. Versuche an ausgewählten Patienten wiesen auf eine vielversprechende Wirksamkeit hin (Pechlaner 2009), weshalb sich Dr. Pechlaner an das Department für Pharmakognosie wandte, um die Pflanze einer wissenschaftlichen Untersuchung zuzuführen.

Dr. Pechlaner führte in seiner Praxis eine Anwendungsbeobachtung über 3 Jahre hinweg durch, die ein Patientenkollektiv von etwa zehn bis fünfzehn Personen umfasste. Die Patienten wurden aufgeklärt, dass sie eine Kombinationstherapie von Tamsulosin und anstatt des ansonsten üblichen Arzneimittels Finasterid (einem 5-α-Reduktasehemmer) als Kombinationspartner einen *P. coronopus* - Tee einzunehmen hatten. Dafür wurde ein gehäufter Teelöffel ober- und unterirdischer Pflanzenteile, getrocknet und zerkleinert, mit 150 mL kochendem Wasser aufgegossen und nach zehnminütiger Ziehzeit zweimal täglich getrunken. Zur Anwendung kam die Monodroge, Qualitätsprüfung derer erfolgte keine. Die Patienten hatten sich regelmäßigen ärztlichen Kontrollen zu unterziehen bei denen der PSA-Wert bestimmt wurde. Das Pflanzenmaterial bezog Dr. Pechlaner aus Griechenland und heimischen Anbaugebieten in der Nähe von Salzburg, wobei Prof. Dr. Heiselmayer (Universität Salzburg) die nötige Information zur Kultivierung lieferte. Bei allen Studienteilnehmern konnten eine Verbesserung des Uroflows sowie eine PSA-Wert-Senkung erzielt werden, wobei die besonders rasche Abnahme des PSA hervorzuheben ist. Unterbrechungen der Therapie, beispielsweise verursacht durch Lieferschwierigkeiten des Drogenmaterials, gingen mit einem erneuten PSA-Anstieg einher. Es wurden keine Neben- oder Wechselwirkungen während der Anwendungsdauer bemerkt. Nach 3 Jahren wurde die Anwendungsbeobachtung beendet.

1.2 Zielsetzung

Da es sich um die erste Diplomarbeit zum Thema *P. coronopus* am Department für Pharmakognosie der Universität Wien handelte, wurde im ersten Schritt eine umfassende Literaturrecherche betrieben. Diese umfasste vorerst eine Sammlung und Sortierung sämtlicher verfügbarer Literatur. Besonderes Augenmerk wurde hier auf mögliche Hinweise zur Anwendung bei benigner Prostatahyperplasie gelegt. Im praktischen Teil sollte eine überblickshafte phytochemische Charakterisierung erfolgen, die Aufschluss über enthaltene Inhaltsstoffe und Inhaltsstoffgruppen liefern sollte. Ebenso wurden morphologische und anatomische Untersuchungen durchgeführt, um erste Anhaltspunkte für makro- und mikroskopische Merkmale zu geben. Des weiteren sollte der Versuch unternommen werden, Frischpflanzen- und Samenmaterial zu akquirieren, um dieses Material für Vergleichszwecke im Arzneipflanzengarten des Departments für Pharmakognosie zu kultivieren.

1.3 Literaturübersicht

Die Ergebnisse der Literatursuche zum Thema *P. coronopus* wurden anhand von elektronischen Datenbanken sowie verfügbaren Büchern erarbeitet.

Folgende Datenbanken wurden durchsucht:

- Scopus
- SciFinder
- PubMed
- MedLine
- Web Of Science
- The Plant List

Es wurde jeweils nach den Stichwörtern "P. coronopus", "plantago benign prostatic hyperplasia" und "P. coronopus benign prostatic hyperplasia" gesucht. Die Suche wurde ohne Verwendung eines zeitlichen Rahmens der Publikationsjahre durchgeführt. Die Trefferquote bei der Suche nach "P. coronopus" lag zwischen 23 (PubMed, 18.03.2015) und 144 Publikationen (Web Of Science, 18.03.2015). Die Erweiterung des Suchbegriffs auf "plantago benign prostatic hyperplasia" erzielte maximal sieben (Web Of Science), die Erweiterung auf "P. coronopus benign prostatic hyperplasia" null Treffer in den angegebenen Datenbanken.
Die gefundene Literatur wird im folgenden Kapitel abgehandelt bezüglich Botanik, Verbreitung, Morphologie, Inhaltsstoffen, Wirkung, sowie der traditionellen Anwendung.

1.3.1 Botanik

Plantago beinhaltete laut Pilger et al. (1937) 260 Spezies, die 2 Subgenera (*Plantago* und *Psyllium*) zugeordnet werden. Die Gattung wurde 1978 von Rahn überarbeitet, indem er *Coronopus* (ursprünglich Sektion *Coronopus,* Subgattung *Plantago* sensu Pilger, 1937) als dritte Subgattung beschrieb und *Psyllium* um 5 zusätzliche Sektionen der Subgattung *Plantago* sensu Pilger (1937) ergänzte. Nach neueren Erkenntnissen von Rahn (1996) wurde *Plantago* in 6 Subgattungen untergeteilt: *Plantago, Coronopus, Albicans, Psyllium, Littorella* und *Bougueria.* In einer weiteren noch aktuelleren Untersuchung von Rønsted et al. (2002) erfolgte die Unterteilung in 5 monophyletische Kladen: *Plantago,*

Coronopus, Bougueria, Psyllium s.l. und *Littorella. Psyllium* s.l. beinhaltet hierbei die Spezies der Subgattung *Albicans. P. coronopus* wird neben anderen Spezies wie *Plantago serraria* L., *Plantago crassifolia* FORRSK. und *Plantago macrorhiza* POIR. der Subgattung *Coronopus* zugeordnet (Rønsted et al., 2003).

Der Familie der Wegerichgewächse (Plantaginaceae) wurden demnach, nachdem mittels modernerer Techniken neue Erkenntnisse gewonnen worden waren, immer neue Genera zugeordnet, darunter bekannte Pflanzen wie *Digitalis* L. oder *Veronica* L.. Dies zeigt, wie komplex sich die Verwandtschaftsverhältnisse gestalten und liefert Grund zur Annahme, dass auch künftig mit neuen Zuordnungen zu rechnen ist (Shehata et al., 2006).

1.3.2 Verbreitung

Bei *P. coronopus* handelt es sich um eine Pflanze, die vor allem an Europas Küsten heimisch ist und im Binnenland nur vorübergehend auftritt (Sebald et al., 1996). Dies lässt sich vor allem auf ihre salzliebende Eigenschaft zurückführen. Laut List et al. (1977), zitiert aus Hager's Handbuch der pharmazeutischen Praxis, beschränkt sich die Verbreitung nicht nur auf Europa, man findet sie auch in Nordafrika, den Azoren und Vorderasien sowie eingeschleppt in Nordamerika, Australien und Neuseeland.

In Europa ist *P. coronopus* im mediterranen Raum verbreitet, darunter in Italien, Spanien, Portugal, Zypern oder Griechenland. Auch in Nord- und Mitteldeutschland findet man vor allem entlang der Meeresküsten Standorte, aber auch entlang salziger Stellen des Binnenlandes (Potonié, 1910 und Pott, 1995). Von dort aus zieht sich das Verbreitungsgebiet bis nach Dänemark und in die Niederlande (Ellenberg, 2010). Berichtet wird auch von Populationen in Großbritannien. Hier gilt er als fester Bestandteil der Vegetation der Heide von Cornwall (Rübel, 1930).

Bevorzugt wächst *P. coronopus* auf sandigen Stellen, Dünen, entlang von Wegrändern, auf Erdwällen, oder sogar auf Ameisenhaufen und in Pfützen (Hegi, 1931). Er benötigt in der Regel feuchte, verdichtete Tonböden, die mindestens mäßig kochsalz- und stickstoffsalzreich sein sollten, oder auch entsprechend salzig-tonige Sandböden (Aichele, 1995).

1.3.3 Morphologie

P. coronopus wird in der Regel 5-15 cm hoch und ist durch eine spindelförmige, fasrige Wurzel in der Erde verankert (List et al., 1977). Gelegentlich wird auch von größeren

Exemplaren, welche eine Höhe von bis zu 40 cm erreichen können, berichtet. Charakteristisch ist die Anordnung der Blätter, welche eine grundständige Rosette bilden, wobei in einer bis zu 50 Blätter auftreten können (Häupler et al., 2000). Die Blätter sind länglich, einfach fiederspaltig, mit lineal-lanzettlichen, ungeteilten oder fiederlappigen Abschnitten, etwas dicklich und mit kurzen, abstehenden Trichomen besetzt (List et al., 1977). Die Behaarung kann zum Teil sehr schütter, aber auch sehr dicht ausfallen (Aichele, 1995). Die hingegen stets ziemlich dicht und kurz behaarten Blütenschäfte sind blattlos und gebogen, wobei die innersten zur Gänze aufgerichtet sind. Die 2 - 4 cm langen Ähren der Pflanze (Aichele, 1995) sind walzlich-lineal geformt und stielrund. Der Kelch hingegen ist eiförmig und zugespitzt, grün sowie häutig berandet und am Rand bewimpert. Die Blumenkrone ist kaum 2 mm lang, deren Kronröhre behaart sowie mit einem weißlichen Kronzipfel mit braunem Mittelnerv versehen. Die Staubblätter sind typischerweise über doppelt so lang wie die Blumenkrone und weißlich gefärbt, deren Antheren hingegen gelblich. Die Fruchtform stellt eine Kapsel dar, die in etwa 1.5 mm lang ist. Gebildet werden jeweils ein bis fünf Samen, welche ca. 0.7 mm lang, elliptisch und braun sind (List et al., 1977 und Aichele, 1995). List et al. sprechen hingegen von der Ausbildung einer stets viersamigen Kapsel.

1.3.4 Inhaltsstoffe

Im folgenden Kapitel werden sämtliche in der Literaturrecherche erfassten Inhaltsstoffe aufgelistet. Eine vollständige Aufzählung, die Details zu Extraktion, Erntezeitpunkt und Herkunft der Droge beinhaltet, ist am Ende des Kapitels in Tabelle 1 auf S.11 dargestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Menge an Inhaltsstoffen zu ermöglichen, wurden die aus der Literatur entnommenen Zahlenwerte zum Teil umgerechnet. Dazu wurden vor allem Prozentangaben (%) in Gewichtsangaben (zum Beispiel in mg/g) umgewandelt. Die ursprünglichen, als solches in der Literatur angegebenen Werte sind als Fußnote in Tabelle 1 auf S. 11 angegeben.

Phenole

Phenolische Komponenten sind häufig im Inhaltsstoffspektrum von Pflanzen zu finden. Sie sind gekennzeichnet durch ein aromatisches System, welches mit einer oder mehreren Hydroxy-Gruppen substituiert ist. Strukturell unterschiedlichste Grundkörper wie Flavo-

noide und Phenylpropanderivate können phenolische Teilstrukturen beinhalten. Um deren Gesamtgehalt zu bestimmen wird in der Regel die Folin-Ciocalteu-Methode genutzt. Gálvez et al. ermittelten 2005 eine Gesamtkonzentration von 71.1 mg/g an Phenolen im methanolischen Extrakt der oberirdischen Teile von *P. coronopus*. Bezogen auf das Trockengewicht der Droge rangieren die Werte zwischen 9.25 mg/g (Janković et al., 2012), wobei hier die oberirdischen Anteile mit 50 %-igem Ethanol extrahiert wurden, bis hin zu 48.94 mg/g (Gatto et al., 2011). Gatto et al. verwendeten wässrigen Methanol (80 %) als Auszugsmittel für die Blätter von *P. coronopus*. 54.5 mg/g Trockengewicht Polyphenole erhielt man aus den Blättern (Jurišić Grubešić et al., 2005), welche mit 30 %-igem Methanol bei 70° im Wasserbad ausgezogen wurden. Die Studie von Jurišić Grubešić et al. zeigte des weiteren, dass der Gehalt an Phenolen abhängig vom gewählten Pflanzenteil variiert: In den Blättern ermittelte man 54.5 mg/g, im Stängel 35.5 mg/g und in den Blüten 31.3 mg/g. Dies könnte die niedrigen Werte von Janković et al. erklären, da dort alle oberirdischen Teile gemeinsam extrahiert wurden. Des weiteren erzielten die mit Methanol hergestellten Extrakte die größere Ausbeute im Vergleich zu den mit Ethanol hergestellten. Dies bestätigte auch das Ergebnis von Heimler et al. (2007): bezogen auf das Frischgewicht der Blätter konnten im mit 70 %-igem Ethanol bereiteten Extrakt nur 1.35 mg/g wiedergefunden werden.

- *Flavonoide*

Die Gesamtmenge an Flavonoiden in *P. coronopus* beträgt laut Gálvez et al. (2005) 10.5 mg/g im methanolischen Extrakt der getrockneten, oberirdischen Organe. Heimler et al. ermittelten via HPLC-DAD-Analyse eines ethanolischen Extrakts der Blätter einen Gehalt von 0.32 mg/g Frischpflanze. In der Studie von Janković et al. (2012) bestimmte man für *P. coronopus* mittels LC-MS/MS einen Gehalt an Luteolin von 29.39 µg/g Trockengewicht. Des weiteren waren größere Mengen an Apigenin-7-O-glucosid (3.25 µg/g Trockengewicht), Luteolin-7-O-glucosid (3.60 µg/g Trockengewicht) und Apigenin (10.42 µg/g Trockengewicht) detektierbar. In Spuren war Rutin auffindbar. Extrahiert wurde mit 50 %-igem Ethanol im Ultraschallbad. Andere Analysen, wie die von Gatto et al. (2011), konnten mittels HPLC

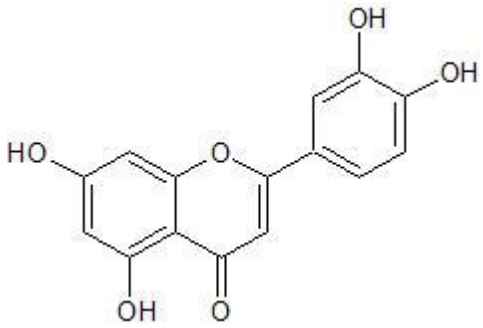


Abbildung 1 Luteolin

weder Apigenin, Kämpferol, Quercetin oder Luteolin feststellen. Die Unterschiede in den Ergebnissen könnten durch das unterschiedliche Auszugsmittel (wässriger 80 %-iger Methanol bei Gatto et al.) oder den unterschiedlichen Erntezeitpunkt bedingt sein. Das Pflanzenmaterial bei der von Gatto et al. durchgeführten Studie wurde im Frühling in Spanien geerntet, jenes von Janković et al. im Juni in Montenegro. Da die Bildung von Sekundärmetaboliten in der Pflanze durch Stresssituationen wie Hitze oder Trockenheit begünstigt wird, könnte dies einen Einfluss auf das Inhaltsstoffspektrums haben. Heimler et al. bestätigten 2007 das Vorkommen von Luteolin in mit 70 %-igem Ethanol extrahierten Blättern. Weitere in *P. coronopus* bestimmte Flavonoide stellen Hyperosid (130 µg/g bezogen auf das Trockengewicht) und sehr geringe Mengen (9 µg/g) Quercitrin dar (Jurišic Grubešic et al., 2013) dar. Als Auszugsmittel wurde eine Wasser-Methanol (1:1)-Mischung verwendet.

- *Hydroxyzimtsäurederivate*

P. coronopus ist arm an Hydroxyzimtsäurederivaten. In dem methanolischen Extrakt, in der von Jurišic Grubešic et al. (2013) durchgeführten Studie, detektierte man 0.03 mg/g Chlorogen- und 0.46 mg/g Kaffeesäure in den Blättern bezogen auf deren Trockengewicht. Heimler et al. ermittelten 2007 einen Wert von 1.02 mg/g an Kaffeesäurederivaten in einem 70 %-igen ethanolischen Auszug von frischen oberirdischen Anteilen.

Phenylpropanoide

Der Gesamtgehalt an Phenylpropanoidglykosiden betrug bei Gálvez et al. (2005) nach Auszug der oberirdischen Teile mit Methanol 24.5 mg/g Extrakt. 7 Jahre später (2012) ermittelte Janković nach Extraktion der oberirdischen Teile mit 50 %-igem Ethanol einen Gehalt von 24.1 mg/g Trockengewicht an Phenylpropanoiden, davon 4.14 mg/g Trockengewicht Verbascosid. Laut Rønsted et al. (2000) sind 0.2 mg/g Salidrosid und 2.0 mg/g Verbascosid enthalten. Beide Angaben beziehen sich auf den ethanolischen Rohextrakt, der verwendete Pflanzenteil wird nicht genannt. Gatto et al. konnten 2011 einen höheren Gehalt an Verbascosid (46.21 mg/g) feststellen, wobei sich dieser auf das Trockengewicht der Blätter bezieht. Die Extraktion erfolgte mit 80 %-igem Methanol. Weitere Differenzen liegen in der verwendeten Extraktionsmethode: Rønsted et al. homogenisierten das gefrorene Pflanzenmaterial mit reinem Ethanol bei Raumtemperatur, Gatto et al. extrahierten mit 80 %-igem Methanol unter Rückfluss.

Iridoide

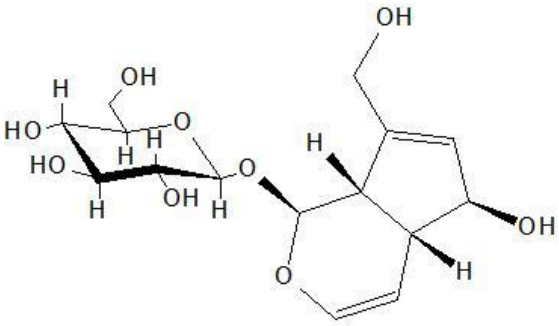


Abbildung 4 Aucubin

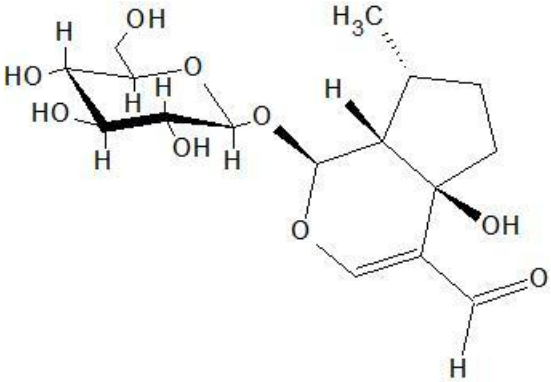


Abbildung 3 Plantarenalosid

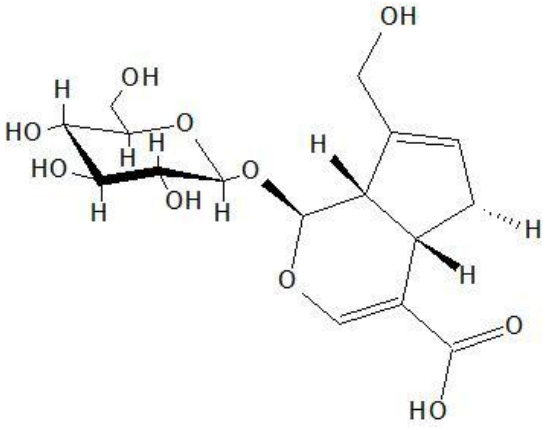


Abbildung 2 Geniposidsäure

Iridoide stellen eine bekannte Komponente in *Plantago* - Arten dar. In *P. coronopus* konnte jedoch nur ein geringer Iridoidgehalt festgestellt werden. Während Gálvez et al. 2005 kein Vorhandensein solcher Strukturen in einem mit Methanol hergestellten Extrakt deklarierten, konnten Janković et al. 2012 einen Gesamtgehalt an Iridoiden von 0.37 mg/g Trockengewicht, davon 59.46 % Aucubin, ermitteln. In beiden Fällen wurde der Gehalt spektrophotometrisch bestimmt. Grund für die Unterschiede könnte die Wahl von 50 %-igem Ethanol als Auszugsmittel oder der unterschiedliche Erntezeitpunkt bzw. Standort (Gálvez et al. ernteten im April in Spanien, Janković et al. im Juni in Montenegro) sein. Ähnliche Ergebnisse erhielten Janković et al. (2010): es wurden zwischen 0.22 mg/g und 0.30 mg/g Trockengewicht Aucubin in einem ethanolischen Extrakten wiedergefunden. Die Bestimmung erfolgte mittels HPLC, HPTLC und LC-MS. Taskova et al. bestätigten 2002 das Vorhandensein von Aucubin und einem weiteren Iridoid, der Geniposidsäure, in einem methanolischen Extrakt. Gesammelt wurde in Bulgarien zwischen Mai und Juni, bestimmt mittels Densitometrie. Unter dem Detektionslimit lag die Menge an Aucubin und Catalpol bei Jurišić et al. (2004). Hierbei wurden die Blätter im Juni in Kroatien gesammelt, mit heißem Wasser extrahiert und der Extrakt mit MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography) vermessen. Ein weiteres im ethanolischen Extrakt der Pflanze nachgewiesenes Iridoid stellt

Plantarenalosid (Rønsted et al., 2000 und 2003) dar. Rønsted et al. bestimmten mittels NMR. Ob die Unterschiede in den Studienergebnissen auf die Wahl der Extraktionsmethode und des -mittels, den Erntezeitpunkt oder Standort oder gänzlich andere Faktoren, wie beispielsweise die Wahl verschiedener Subspezies, zurückzuführen sind, muss weiter überprüft werden.

Alkaloide

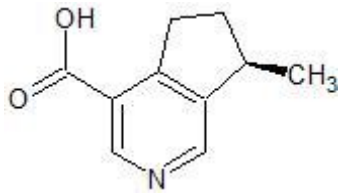


Abbildung 5 Boschniakinsäure

Plantago - Spezies sind nicht bekannt für einen hohen Alkaloidgehalt. In *P. coronopus* konnten dennoch 0.20 mg/g Plantagonin, welches zu den Monoterpen-Alkaloiden zählt und Base A ($C_{12}H_{17}NO$ Fp. 240°) wiedergefunden werden (List et al., 1977). Des weiteren ist Boschniakinsäure (Fp. 218-220°) in der (R)-Form, welche zu den Plantagoninen zählt und die Summenformel $C_{10}H_{11}NO_2$ sowie ein Molekulargewicht von 177.202 besitzt (Southon et al., 1989), enthalten.

Xanthonderivate

In *P. coronopus* konnte nach Extraktion der oberirdischen Teile mit 50 %-igem Ethanol Mangiferin in Spuren nachgewiesen werden (Janković et al., 2012).

Gerbstoffe

Jurišić Grubešić et al. bestimmten 2005 den Gehalt an Tanninen in unterschiedlichen getrockneten Organen von *P. coronopus*. Es wurden Extrakte mit 30 %-igem Methanol bei 70° im Wasserbad hergestellt. Den höchsten Gehalt bestimmte man in den Blüten (10.7 mg/g), den niedrigsten in den Blättern (8.2 mg/g). Im Stängel konnte man 10.0 mg/g Tannine feststellen.

Inhaltsstoffe der Samen

P. coronopus enthält 18.8 % (Smith et al., 2014) bis 20.6 % (List et al. 1977) fettes Öl im Samen, davon 27.3 % gesättigte und 72.7 % ungesättigte Fettsäuren (Rizk, 1986). Die Zusammensetzung gestaltet sich wie folgt: 19.4 % Elaidinsäure (18:1 $^{\Delta 9}$), 28.7 % Linolsäure (18:2 $^{\Delta 9,12}$) und 33.9 % α-Linolensäure (18:3 $^{\Delta 9,12,15}$) (Smith et al., 2014). Extrahiert wurden die Samen mit Hexan. Die Schleimfraktion, von *P. coronopus*, welche 44.2 % des Samens ausmacht, enthält: 24.3 % Galacturonsäure, 6.9 % Galactose, keine Glucose,

15.2 % Arabinose, 41.2 % Xylose und 13.6 % Rhamnose (Rizk, 1986). Folgende Mono- und Oligosaccharide sind, neben den in der Schleimfraktion bereits enthaltenen, vorhanden: spezielle Zucker wie das Disaccharid Planteobiose und das Trisaccharid Planteose, aber auch gewöhnliche wie Saccharose, Glucose, L-Fructose und L-Rhamnose. Bemerkenswert ist auch der Gehalt an Zuckeralkoholen wie Sorbitol oder Mannitol (Rizk, 1986). Hoppe (1975) und Rizk (1986) berichten von einer Coronopussäure, die charakterisiert ist durch die Summenformel $C_{54}H_{66}O_2$ und einen Schmelzpunkt von 281-282°C, und einer Plantagosäure (plantagenic acid), die charakterisiert ist durch die Summenformel $C_9H_{12}O_2$ und einen Schmelzpunkt von 210°C. Die Strukturen dieser Verbindungen sind unbekannt. Rizk beschrieb ebenso das Vorhandensein von Sterolen. Zannettou-Pandeli bestätigte 2000 das Vorkommen von Sitosterol. Zusätzlich enthält der Same ätherisches Öl und lösliches Harz (Rizk, 1986).

Tabelle 1 Zusammenfassung der mittels Literatur erhobenen Inhaltsstoffe in *P. coronopus*

Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden einige der Literatur entnommenen Werte umgerechnet. Die Originaldaten sind der jeweiligen Fußnote zu entnehmen.

Inhaltsstoff	Gehalt	Quantifizierungsmethode	Bezogen auf	Pflanzenteil	Extraktion	Herkunft	Erntezeitpunkt	Voucher	Autor
PHENOLE									
Gesamtphenole	71.1 mg/g[2]	Spektrophotometrie	Extrakt	Oberirdische Teile	Methanol, Soxhlet, 48 h	Don Benito, Badajoz (Spanien) (wild)	April	SEV 160808	Gálvez M. et al., 2005
Gesamtphenole	48.94 mg/g[3]	HPLC	Trockengewicht	Blätter	Wässriges Methanol (80 %), Rückfluss, 1h	Murgia Plateau, Apulien (Italien) (wild)	Frühling	Keine Angabe	Gatto M.A. et al., 2011
Gesamtphenole	1.35 mg/g	Spektrophotometrie	Frischgewicht	Essbarer Teil (Blätter)	70 % Ethanol (pH = 3.2 durch Ameisensäure), über Nacht	Lastra a Signa, (Italien) (Kultur)	September	Keine Angabe	Heimler D. et al., 2007
Gesamtphenole	9.25 mg/g	Spektrophotometrie	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, (Montenegro) (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
Gesamtpolyphenole	Blätter: 54.5 mg/g[4] Stängel: 35.5 mg/g[5] Blüten: 31.3 mg/g[6]	Spektrophotometrie	Trockengewicht	Blätter, Stengel, Blüten	30 % Methanol (70° im Wasserbad), 15 min	Istrien (Kroatien)und auf den Inseln Cres u. Lošinj (Kroatien) (wild)	Juni	Herbarium of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia No. 0071-0078	Jurišić Grubešić R. et al., 2005
FLAVONOIDE									
Gesamtflavonoide	10.5 mg/g[7]	Spektrophotometrie	Extrakt	Oberirdische Teile	Methanol, Soxhlet, 48 h	Don Benito, Badajoz (Spanien) (wild)	April	SEV 160808	Gálvez M. et al., 2005
Gesamtflavonoide	0.32 mg/g	HPLC	Frischgewicht	Essbarer Teil (Blätter)	70 % Ethanol (pH = 3.2 durch Ameisensäure), über Nacht	Lastra a Signa, (Italien) (Kultur)	September	Keine Angabe	Heimler D. et al., 2007
Apigenin	10.42 µg/g	LC/MS	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, (Montenegro) (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012

[2] 7.11 %
[3] 4894 mg/100 g
[4] 5.45 %
[5] 3.55 %
[6] 3.13 %
[7] 1.05 %

Inhaltsstoff	Gehalt	Quantifizierungsmethode	Bezogen auf	Pflanzenteil	Extraktion	Herkunft	Erntezeitpunkt	Voucher	Autor
Apigenin-7-O-glucosid	3.25 µg/g	LC/MS	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, (Montenegro) (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
Hyperosid	130 µg/g[8]	HPLC	Trockengewicht	Blätter	Wasser, Methanol (1:1); Ultraschallbad, 1 h	Medulin, Südistrien (Kroatien) (wild)	Juni	Herbarium of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia No. 0071-0078	Jurišic Grubešic R. et al., 2013
Luteolin	29.39 µg/g	LC/MS	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, (Montenegro) (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
Luteolinderivat	Vorhanden	HPLC/MS	Frischgewicht	Essbarer Teil (Blätter)	70 % Ethanol (pH = 3.2 durch Ameisensäure), über Nacht	Lastra a Signa, (Italien) (Kultur)	September	Keine Angabe	Heimler D. et al., 2007
Luteolin-7-O-glucosid	3.60 µg/g	LC/MS	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, (Montenegro) (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
Quercitrin	9 µg/g[9]	HPLC	Trockengewicht	Blätter	Wasser, Methanol (1:1); Ultraschallbad, 1 h	Medulin , Südistrien(Kroatien) (wild)	Juni	Herbarium of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia No. 0071-0078	Jurišic Grubešic R. et al., 2013
Rutin	Spuren	LC/MS	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, Montenegro (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
Rutin, Quercetin, Isoquercitrin und Isochlorogensäure	Nicht vorhanden. Isoquercitrin überdeckt von anderen Peaks	HPLC	Trockengewicht	Blätter	Wasser, Methanol (1:1); Ultraschallbad, 1 h	Medulin (Kroatien) (wild)	Juni	Herbarium of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia No. 0071-0078	Jurišic Grubešic R. et al., 2013
Kein Apigenin, Luteolin, Quercetin oder Kämpferol	Nicht vorhanden	HPLC	Trockengewicht	Blätter	Wässriges Methanol (80 %), Rückfluss 1h	Murgia Plateau, Apulien (Italien) (wild)	Frühling	Keine Angabe	Gatto M.A. et al., 2011

[8] 0.013 %
[9] 0.0009 %

Inhaltsstoff	Gehalt	Quantifizierungsmethode	Bezogen auf	Pflanzenteil	Extraktion	Herkunft	Erntezeitpunkt	Voucher	Autor
HYDROXYZIMTSÄUREDERIVATE									
Chlorogensäure	0.03 mg/g[10]	HPLC	Trockengewicht	Blätter	Wasser, Methanol (1:1); Ultraschallbad, 1 h	Medulin, Südistrien (Kroatien) (wild)	Juni	Herbarium of the Department of Pharmacognosy (Faculty of Pharmacy and Biochemistry), Zagreb, No. 0071-0078	Jurišic Grubešic R. et al., 2013
Kaffeesäure	0.46 mg/g[11]	HPLC	Trockengewicht	Blätter	Wasser, Methanol (1:1); Ultraschallbad, 1 h	Medulin, Südistrien (Kroatien) (wild)	Juni	Herbarium of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia No. 0071-0078	Jurišic Grubešic R. et al., 2013
Kaffeesäurederivate	1.02 mg/g	HPLC	Frischgewicht	Essbarer Teil (Blätter)	70 % Ethanol (pH = 3.2 durch Ameisensäure), über Nacht	Lastra a Signa, (Italien) (Kultur)	September	Keine Angabe	Heimler D. et al., 2007
PHENYLPROPANDERIVATE									
Phenylpropanoidglycoside	24.5 mg/g[12]	Spektrophotometrie	Extrakt	Oberirdische Teile	Methanol, Soxhlet, 48 h	Don Benito, Badajoz (Spanien) (wild)	April	SEV 160808	Gálvez M. et al., 2005
Gesamtphenylpropanderivate	24.1 mg/g[13]	Spektrophotometrie	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, (Montenegro) (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
Salidrosid	0.2 mg/g[14]	NMR	Rohextrakt	Gesamte Pflanze ?	Homogenisation mit Ethanol, zweimal	Bot. Garten Tåstrup (Dänemark)	Keine Angabe	Rahn-674	Rønsted N. et al. 2000
Verbascosid	46.21 mg/g[15]	HPLC	Trockengewicht	Blätter	Wässriges Methanol (80 %), Rückfluss, 1h	Murgia Plateau, Apulien (Italien) (wild)	Frühling	Keine Angabe	Gatto M.A. et al., 2011
Verbascosid	Vorhanden	HPLC/MS	Frischgewicht	Essbarer Teil (Blätter)	70 % Ethanol (pH = 3.2 durch Ameisensäure), über Nacht	Lastra a Signa, (Italien) (Kultur)	September	Keine Angabe	Heimler D. et al., 2007

[10] 0.003 %
[11] 0.046 %
[12] 2.45 %
[13] 2.41 %
[14] 0.02 %
[15] 4621 mg/100 g

Inhaltsstoff	Gehalt	Quantifizierungsmethode	Bezogen auf	Pflanzenteil	Extraktion	Herkunft	Erntezeitpunkt	Voucher	Autor
Verbascosid	4.14 mg/g	HPTLC	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, (Montenegro)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
Verbascosid	2.0 mg/g[16]	NMR	Rohextrakt	Gesamte Pflanze ?	Homogenisation mit Ethanol, zweimal	Bot. Garten Tåstrup (Dänemark)	Keine Angabe	Rahn-674	Rønsted N. et al. 2000
IRIDOIDE									
Gesamtiridoide	Nicht vorhanden	Spektrophotometrie	Extrakt	Oberirdische Teile	Methanol, Soxhlet, 48 h	Don Benito, Badajoz (Spanien) (wild)	April	SEV 160808	Gálvez M. et al., 2005
Gesamtiridoide	0.37 mg/g, davon 59.46 % Aucubin	Spektrophotometrie	Trockengewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, (Montenegro) (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
Aucubin	0.29 mg/g HPLC, 0.22 mg/g HPTLC und 0.30 mg/g LC-ESI-MS	HPLC, HPTLC, LC/MS	Trockengewicht	Keine Angabe	50 % (v/v) Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Visitor und Hajla (Montenegro) (wild)	Juni	Institute of Botany, Faculty of Biology, University of Podgorica, Montenegro	Janković T. et al., 2010
Aucubin	In sehr geringen Mengen vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Aichele, D., 1995
Aucubin	1.0 mg/g[17]	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Aucubin, Catalpol	Nicht vorhanden	MEKC	Trockengewicht	Blätter	HWE (Hot Water Extraction)	Istrien und auf den Inseln Cres u. Lošinj (Kroatien) (wild)	Juni	Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia No. 0061-0069	Jurišić R. et al., 2004
Aucubin und Geniposidsäure	Vorhanden	Densitometrie	Keine Angabe	Oberirdische Teile	Methanol, zweimal 24 h	Struma valley und Black sea coast (Bulgarien)	Mai, Juni	SOM 154175, SOM 154176	Taskova R. et al. 2002
Plantarenalosid	0.2 mg/g[18]	NMR	Rohextrakt	Gesamte Pflanze (?)	Homogenisation mit Ethanol, zweimal	Bot. Garten Tåstrup (Dänemark)	Keine Angabe	Rahn-674	Rønsted N. et al. 2000

[16] 0.2 %
[17] 0.10 %
[18] 0.02 %

Inhaltsstoff	Gehalt	Quantifizierungsmethode	Bezogen auf	Pflanzenteil	Extraktion	Herkunft	Erntezeitpunkt	Voucher	Autor
Plantarenalosid, Verbascosid und Salidrosid	Vorhanden	NMR	Keine Angabe	Oberirdische Teile	Homogenisation mit Ethanol, zweimal	Bot. Garten Copenhagen, Bot. Garten Palermo	Keine Angabe	Keine Angabe	Rønsted N. et al., 2003
ALKALOIDE									
Plantagonin und Base A ($C_{12}H_{17}NO$ Fp. 240°)	0.20 mg/g[19]	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	List, P.H. et al., 1977
Plantagonin und Base „A“	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
XANTHONDERIVATE									
Mangiferin	In Spuren vorhanden	LC/MS	Trocken-gewicht	Oberirdische Teile	50 % Ethanol, Ultraschallbad, 30 min	Cemovsko polje, Montenegro (wild)	Juni	IP 03/08	Janković T. et al., 2012
GERBSTOFFE									
Tannine	Blätter: 8.2 mg/g[20], Stängel: 10.0 mg/g[21], Blüten: 10.7 mg/g[22]	Spektrophotometrie	Trockengewicht	Blätter, Stengel, Blüten	30 % Methanol (70° im Wasser-bad), 15 min	Istrien und auf den Inseln Cres u. Lošinj (Kroatien) (wild)	Juni	Herbarium of the Department of Phar-macognosy, Faculty of Pharmacy and Bio-chemistry, Zagreb, Croatia No. 0071-0078	Jurišić Grubešić R. et al., 2005
FETTES ÖL									
Ölgehalt	18.8 %	Keine Angabe	Öl	Samen	Hexan	Saskatchewan (Kana-da) (wild)	Keine Angabe	Keine Angabe	Smith A.M. et al., 2014
Ölgehalt	20.6 %	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	List, P.H. et al., 1977
Elaidinsäure 18:1 $^{\Delta 9}$	19.4 %	Keine Angabe	Öl	Samen	Hexan	Saskatchewan (Kana-da) (wild)	Keine Angabe	Keine Angabe	Smith A.M. et al., 2014
Linolsäure 18:2 $^{\Delta 9,12}$	28.7 %	Keine Angabe	Öl	Samen	Hexan	Saskatchewan (Kana-da) (wild)	Keine Angabe	Keine Angabe	Smith A.M. et al., 2014
Linolsäure	36 %	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	List, P.H. et al., 1977
α-Linolensäure 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$	33.9 %	Keine Angabe	Öl	Samen	Hexan	Saskatchewan (Kana-	Keine Angabe	Keine Angabe	Smith A.M.

[19] 0.02 %
[20] 0.82 %
[21] 1.00 %
[22] 1.07 %

Inhaltsstoff	Gehalt	Quantifizierungsmethode	Bezogen auf	Pflanzenteil	Extraktion	Herkunft	Erntezeitpunkt	Voucher	Autor
						da) (wild)			et al., 2014
Linolensäure	2.6 %	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	List, P.H. et al., 1977
Ölsäure	33 %	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	List, P.H. et al., 1977
Ungesättigte FS	72.7 %	Keine Angabe	Öl	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Gesättigte FS	27.3 %	Keine Angabe	Öl	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
SCHLEIM									
Schleim	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Aichele, D., 1995
Schleim mit D-Galacturonsäure	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Hoppe, H., 1975
Schleim	44.2 %	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Wasserlöslicher Gummi	4-6 % (Anteil am Schleim)	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Arabinose	15.2 % (Anteil am Schleim)	Keine Angabe	Keine Angabe	Samenschleim	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Galactose	6.9 % (Anteil am Schleim)	Keine Angabe	Keine Angabe	Samenschleim	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Galacturonsäure	24.3 % (Anteil am Schleim)	Keine Angabe	Keine Angabe	Samenschleim	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Glucose	Nicht vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samenschleim	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Rhamnose	13.6 % (Anteil am Schleim)	Keine Angabe	Keine Angabe	Samenschleim	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Xylose	41.2 % (Anteil am Schleim)	Keine Angabe	Keine Angabe	Samenschleim	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
KOHLENHYDRATE									
Glucose	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
L-Fructose	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986

Inhaltsstoff	Gehalt	Quantifizierungsmethode	Bezogen auf	Pflanzenteil	Extraktion	Herkunft	Erntezeitpunkt	Voucher	Autor
L-Rhamnose	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Planteobiose	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Planteose	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Sorbitol, Mannitol	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Blätter	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Sucrose	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
WEITERE INHALTSSTOFFE									
Ätherisches Öl	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Coronopussäure	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Hoppe, H., 1975
Coronopussäure ($C_{54}H_{66}O_2$ Schmelzpunkt: 281-282°C)	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Lösliches Harz	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Plantagosäure (Plantagenic Acid $C_9H_{12}O_2$ Schmelzpunkt: 210°C)	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986
Sitosterol	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Zannettou-Pandeli K., 2000.
Sterole	Vorhanden	Keine Angabe	Keine Angabe	Samen	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	Rizk, A.M., 1986

1.3.5 Wirkungen

Antiinflammatorische Wirkung

Um die antientzündliche Aktivität festzustellen, testete man den Effekt nicht toxischer Konzentrationen von Hexan-Extrakten auf die NO - Produktion stimuliert durch die Wirkung von Lipopolysacchariden auf RAW264.7 Makrophagen (Rodrigues et al., 2014). Man ermittelte für den Hexan-Extrakt von getrocknetem *P. coronopus* eine IC_{50} von 98 µg/mL. Eine gewisse antiinflammatorische Wirkung scheint also gegeben. Der für die Analyse verwendete Pflanzenteil ist in der Literatur nicht angegeben.
In einer anderen Studie wurde die Wirkung von Aucubin, einem in der Literatur beschriebenen Inhaltsstoff von *P. coronopus*, auf ein Carrageenan - induziertes Mauspfotenödem sowie dessen Hemmung der NF-κB-Aktivierung in Mastzellen untersucht (Janković T. et al, 2010). Es war keine Aktivität feststellbar.

Antioxidative Wirkung

Eine der am häufigsten untersuchten Wirkungen von *P. coronopus* ist die antioxidative. Bei Heimler et al. (2007) und Gálvez et al. (2005) erfolgte die Analyse mittels DPPH - Assay, bei Rodrigues et al. (2014) via ABTS und DPPH - Assay. Bei Gálvez et al. wurden zusätzlich Messungen über die Hemmung der Fe^{2+}/Ascorbat–induzierten Lipidperoxidation durchgeführt.
Heimler et al. bestimmten mittels eines 70 %-igen ethanolischen Extrakts aus den Blättern eine IC_{50} von 456.97 mg Probe (Frischgewicht)/mg DPPH-Radikal. Rodrigues et al. stellten Auszüge unterschiedlicher Polarität her und verglichen jene im Hinblick auf ihre antioxidativen Eigenschaften. Wässrige und methanolische Auszüge erreichten die höchste Aktivität, Auszüge aus Hexan und Diethylether und Chloroform die geringste. Die IC_{50} für den Extrakt aus Methanol betrug 0.9 mg Trockenextrakt/mL DMSO.
Im Vergleich zu anderen *Plantago* - Arten ordnete sich die Stärke der antioxidativen Aktivität im Mittelfeld ein, wobei Unterschiede je nach verwendetem Assay auftraten (Gálvez et al.):

P. serraria > *P. lagopus* > *P. lanceolata* > *P. coronopus* > *P. afra* (Analyse mittels DPPH-Assay)

P. lanceolata ≥ *P. serraria* > *P. coronopus* ≥ *P. lagopus* > *P. afra* (Analyse mittels Hemmung der Fe^{2+} / Ascorbat – induzierten Lipidperoxidation)

Antimikrobielle Wirkung

Extrakte unterschiedlicher Polarität (Petrolether, Methanol, Ethylacetat) der getrockneten, oberirdischen Teile von *P. coronopus* wurden auf ihre antimikrobielle Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien untersucht (Sassi et al., 2007). Es wurden sechs Organismen der ATCC (American Type Culture Collection) verwendet: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27950, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 und *Shigella flexneri* ATCC 12022. Acht Organismen wurden vom Laboratory of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Monastir, Tunisia erhalten: *Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophiticus, Staphylococcus aureus, Enterobacter cloaceae, Klebsiella pneumoniae, Aeromonas hydrophila, Serratia marcescens* und *Escherichia coli*. Es zeigte sich keine statistisch signifikante Wirkung (definiert als Durchmesser im Agardiffusionstest > 15 mm). Der Petrolether-Extrakt erzielte den größten Durchmesser (11 mm).

Antivirale Wirkung

2007 untersuchten Sassi et al. die antivirale Aktivität von *P. coronopus* gegen HSV-1. Es wurden drei Extrakte unterschiedlicher Polarität hergestellt (Methanol, Petrolether und Aceton). Keiner davon zeigte eine statistisch signifikante Wirkung. Die EC_{50} konnte zwar für die Extrakte aus Methanol und Aceton berechnet werden, lag allerdings bei über 500 µg/mL.

Cytotoxische Wirkung

Die cytotoxische Wirkung von *P. coronopus* ist gut untersucht. Gálvez et al. untersuchten 2003 einen methanolischen Extrakt und stellten, im Vergleich zu anderen in der Studie analysierten *Plantago* - Arten, die geringste LC_{50} und die stärkste Aktivität bei Testung auf MCF-7 (Adenokarzinom der Brust) sowie UACC-62 (Melanom)-Zelllinien im Sulphorhodamine-B-Assay fest. Ebenfalls reduzierte der Hexanauszug mit einer Konzentration von 50 mg/mL die Zellviabilität von HepG2-Zellen um 39 % (Rodrigues et al., 2014). Andere Arbeitsgruppen untersuchten die Wirkung einzelner in *P. coronopus* be-

schriebenen Inhaltsstoffe auch in Hinblick auf eine mögliche Anwendung bei benigner Prostatahyperplasie. Aucubin scheint hierbei nicht cytotoxisch wirksam zu sein (Janković et al., 2010). Für Apigenin ermittelte man Aktivität gegen nicht-maligne Prostatazellen im MTT-Assay (Bektic et al., 2006). Eine Konzentration von 30 µM war in der Lage, die Proliferation der Zellen signifikant zu inhibieren. Der Angriff scheint dabei am Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen (MAPK) - Pfad zu erfolgen. Luteolin zeigt in Versuchen eine signifikante Reduktion des Prostatagewichts männlicher Mäuse nach oraler Gabe über das Trinkwasser der Tiere (Markaverich et al., 1997). Des weiteren ist das Flavonoid in der Lage, in *in vitro* Testungen die Proliferation von Prostatakrebszellen (LNCaP Zellen) zu inhibieren. Für die Hemmung waren 6-10 µg Luteolin/mL Gewebekulturmedium erforderlich. Markaverich et al. vermuten, dass die Wirkung unter anderem über einen Antagonismus an der Typ II [^{3}H] Estradiol-Bindungsstelle verläuft. Verbascosid erreichte eine Steigerung der Apoptose von Prostatazellen in lebenden Ratten bei hochdosierter Gabe (Sun et al., 2008). Dieses Paper ist allerdings auf Chinesisch und steht nur als Abstract in Englisch zur Verfügung.

Fungizide Wirkung

P. coronopus wurde auf Hemmung des Pilzwachstums auf Obst und Gemüse untersucht (Gatto et al., 2011). Dafür wurden methanolische Extrakte der getrockneten Blätter hergestellt und auf mit Pathogenen inkubierte, verletzte Stellen aufgetragen. Es erwies sich eine besonders gute protektive Wirkung auf Marillen. Dieses Ergebnis ist insofern relevant, als dass Pflanzenextrakte chemische Fungizide ersetzen könnten.

1.3.6 Traditionelle Anwendung

Traditionell angewandt wird *P. coronopus* vor allem im Mittelmeerraum. Prominent ist seine Anwendung vor allem in **Zypern** als Mittel bei Beschwerden im Urogenitaltrakt. Wässrige Auszüge der oberirdischen Organe kommen in Form von Infusen oder Dekokten bei Nierensteinen (sowohl prophylaktisch als auch akut), Nierenproblemen im Allgemeinen (Schmerzen, Nierengries, eventuell Cystitis), Hämorrhoiden, Diarrhoe und Bronchitis zur Anwendung. Auch als Diuretikum kommt *P. coronopus* zum Einsatz. Für all diese Krankheitsbilder werden Ähre und Blätter genutzt (Lardos et al., 2013). Eine der führenden Heilpflanzenexpertinnen Zyperns, Dr. Zannettou-Pandeli K. beschrieb 2000 noch weitere traditionelle Anwendungsgebiete von *P. coronopus*. Darunter befindet sich

unter anderem der Einsatz bei Vergrößerung der männlichen Prostata, Nierenkoliken, Entzündungen der Augen (starkes Tränen, Geschwüre, Pusteln, Schwellungen) und Fieber. González-Tejero et al. beschreiben eine nicht näher definierte Wirkung auf das Reproduktionssystem (2008). Abgesehen von dem medizinischen Gebrauch werden die Blätter auf Zypern ebenso gedämpft oder gekocht und gemeinsam mit anderem gesammelten Grün als Gemüsegericht mit Olivenöl und Zitronensaft verzehrt (Lardos et al., 2013).

Ebenso findet *P. coronopus* Anwendung in **Spanien**, die Anwendungsbereiche sind im Gegensatz zu Zypern unterschiedlich. Zu den dort behandelten Krankheitsbildern zählen Diarrhoe, Gastralgie (Benítez et al., 2010), Katarrhe oder Wunden die durch Konjunktivitis verursacht wurden (Förderung der Narbenbildung). Ebenso angewandt wird der Hirschhornwegerich als Emmenagogum und bei Dysmenorrhoe. Für all diese Beschwerden wird aus den oberirdischen Teilen ein Infus bzw. im Fall des Durchfalls und der Gastralgie aus der Frucht ein Dekokt hergestellt und oral verabreicht. Zur Behandlung von Menstruationsbeschwerden werden traditionell auch Bäder genommen (Blanco et al., 1999). Des weiteren ist *P. coronopus* zur Behandlung von Hämorrhoiden im Einsatz: Hierfür wird in einem magisch-religiösen Ritual ein Infus oder Dekokt bereitet und oral sowie topisch appliziert (Benítez et al., 2010).

Ebenso wird die Pflanze in **Ägypten** phytotherapeutisch genutzt. Die Blätter sind traditionell bei Malaria und Fieber, Blätter und Wurzeln hingegen bei Hämorrhoiden und Hautirritationen im Einsatz (Eissa et al., 2014).

In **Italien** werden die Blätter von *P. coronopus* als Dekokt oral zur Reinigung (als „Depurativum") sowie als mildes Laxans verwendet (Uncini Manganelli et al., 1999).

In **Portugal** findet die traditionelle Anwendung im Bereich der Dermatologie als hautglättendes und weichmachendes Mittel sowie in Form einer Gurgellösung als Antiseptikum statt. Genutzt werden dazu Blätter und Blüten (Neves et al., 2009). In Form eines solchen Gurgelmittels hat *P. coronopus* besonders bei Tonsillitis Bedeutung (Novais et al., 2004).

1.4 Benigne Prostatahyperplasie (BPH)

Im folgenden Kapitel werden das Krankheitsbild der benignen Prostatahyperplasie erläutert sowie aktuelle Therapiemöglichkeiten besprochen. Die gegebenen Informationen stammen aus verfügbaren Büchern der Fachbereichsbibliothek für Pharmazie der Universität Wien. Dieses Kapitel dient unter anderem der Zusammenfassung der jüngeren Literatur zum Thema BPH, um aktive Forschungsgruppen und deren Testsysteme für künftige Kooperationen zu identifizieren. Dies erfolgte anhand von *Sabal serrulata* MICHX..

1.4.1 Definition

"*Bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) handelt es sich um eine noduläre, teils diffuse Vergrößerung des stromalen/epithelialen Gewebes im periurethralen Bereich mit Einengung der Harnröhre."* (Dingermann et al., 2003)

Die daraus resultierenden Beschwerden sind anfangs unter anderem gekennzeichnet durch Miktionsstörungen, Restharnbildung und Nykturie. In späteren Stadien sind die auftretenden Symptome die Folge des steigenden Harnrückstaus. Die BPH zählt zu den häufigsten Erkrankungen von Männern über 60 Jahren, wobei sich ab dem 80. Lebensjahr bei nahezu allen eine histologisch vergrößerte Prostata nachweisen lässt. Wichtig ist die Unterscheidung zwischen BPH-Trägern, deren Prostata zwar vergrößert ist aber keine Beschwerden verursacht, und BPH-Patienten, die zusätzlich an den typischen Symptomen leiden. Nicht immer ist demnach eine Behandlung indiziert (Dingermann et al., 2003). Die genaue Ätiologie und Pathogenese sind bis dato noch nicht geklärt. Es werden unterschiedliche Hypothesen diskutiert. Sexualhormone wie das Testosteron und das Östrogen sollen unter anderem maßgeblich beteiligt sein. Vor allem Testosteron, das intraprostatisch durch die 5-α-Reduktase in das noch stärker androgen wirksame Dihydrotestosteron umgewandelt wird, kann das Wachstum des Prostataepithels stark stimulieren. Östrogen hingegen scheint für die stromale Vergrößerung verantwortlich zu sein. Weitere Faktoren, die für die Pathogenese entscheidend sein könnten, stellen das Sexualhormonbindende-Globulin, dessen Plasmaspiegel mit steigendem Alter zunimmt, Prostaglandine, Leukotriene und Wachstumsfaktoren wie EGF dar (Dingermann et al., 2003).

1.4.2 Therapie

Es werden vor allem folgende pharmakodynamische Angriffspunkte und Wirkmechanismen nach Schilcher (1992) diskutiert:

- **Prostatotrope Wirkung** durch Beeinflussung des endokrinen Stoffwechsels
- **Direkte/Indirekte antiphlogistische Wirkung** zur Besserung der Beschwerden
- **Antiödematöse bzw. diuretische Wirkung** zur Beseitigung von Stauungsödemen im Bereich der unteren Harnwege und der Prostata
- **Muskulotrope Wirkung** zur Verstärkung der Harnentleerung
- **Bakteriostatische Wirkung** vor allem bei gleichzeitiger Prostatitis
- **Sedierende und antikonvulsive Wirkung** zur Symptomreduktion und Besserung der Nykturie
- **Antilithogene Wirkung** zur Verhinderung von Blasen- und Prostatasteinen

Schulmedizinisch sind vor allem 5-α-Reduktasehemmer, α-Adrenozeptorantagonisten und im selteneren Fall Muskarinrezeptorantagonisten im Einsatz. Erstere verhindern die Umwandlung von Testosteron in das stark androgen wirksame Dihydrotestosteron und verzögern somit die fortschreitende Vergrößerung der Prostata. Zweitere relaxieren die glatte Muskulatur und erleichtern die Miktion.

Phytopharmaka sind vor allem zur Behandlung der subjektiven Beschwerden in weniger fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung im Einsatz. Jüngere experimentelle und klinische Untersuchungen bekräftigen vor allem die Wirkung folgender Pflanzen in absteigender Reihenfolge des Bekanntheitsgrades: Kürbissamen, Brennnesselwurzel, Früchte der Sägepalme, ein Phytosterolgemisch aus der afrikanischen *Hypoxis rooperi* T. Moore und Roggenpollen (Schilcher, 1992). Vor allem den Präparaten aus Sägepalmenfrüchten wird eine hohe Wirksamkeit zugeschrieben. Sie sind nebenwirkungsarm und den chemisch-synthetischen Präparaten durchaus ebenbürtig (Grünwald et al., 2004). Wichtige Inhaltsstoffe scheinen vor allem Phytosterole, Agglutinine (wie sie in der Brennnessel vorkommen) oder die Tocopherole der Kürbisssamen darzustellen.

Es erfolgte eine umfassende Literaturrecherche zum Thema "Benigne Prostatahyperplasie", um Testsysteme bzw. Arbeitsgruppen ausfindig zu machen, die sich mit der Wirkung von pflanzlichen Extrakten auf die Prostata beschäftigen. Dies erfolgte anhand von *Sabal serrulata* MICHX..

1.4.3 *In-vitro-/in-vivo* Testung von *Sabal serrulata* MICHX

In-vitro Testsysteme

Hemmung der 5-α-Reduktase und der Fibroblastenproliferation

Scaglione et al. (2012) testeten unterschiedliche *Sabal serrulata* - Extrakte auf eine Hemmung der 5-α-Reduktase an 10-Tages-Fibroblasten und Epithelzellkulturen. Zusätzlich überprüften sie die Hemmung der Proliferation, welche durch den humanen Fibroblastenwachstumsfaktor (hFGF) induziert wird. Sämtliche Extrakte waren in der Lage, die 5-α-Reduktase Typ I und II sowie die Fibroblastenproliferation zu hemmen, allerdings lagen die EC_{50}-Konzentration weit auseinander. Die stärkste Hemmung der 5-α-Reduktase Typ I erzielte Permixon® mit einer EC_{50} von 6.717 mg/mL, die schwächste Beltrax Uno® mit einer EC_{50} von 18.58 mg/mL. Die beste 5-α-Reduktase Typ II-Hemmung erzielte Permixon® mit einer EC_{50} von 3.994 mg/mL, die schwächste Urocaps® mit einer EC_{50}.von 20.96 mg/mL. Die stärkste Inhibierung der Fibroblastenproliferation erfolgte mit Permixon®.

Hemmung von EGF- und LPS-induzierter Proliferation des Prostataepithels

Iglesias-Gatto et al. testeten die Wirkung von Prostasan® auf die Androgen-unabhängige Zelllinie PC-3. Gemessen wurde die Inhibierung von EGF- und LPS-induzierter Proliferation des Prostataepithels. Unter Anwendung einer effektiven Konzentration von 50 µg/mL konnte Prostasan® EGF zum Teil vom EGF-Rezeptor verdrängen und die EGF-induzierte Zellproliferation zur Gänze blocken. Gleichzeitig wurde die LPS-induzierte Proliferation der PC-3 Zellen gehemmt, ohne die über den toll-like Rezeptor-4 vermittelte LPS-Aktivierung des NFκB-Pfades zu beeinflussen. Des weiteren wurden die konstitutive Sekretion des monozytischen chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) sowie die LPS-induzierte Sekretion von IL-12 reduziert und MCP-1 sowie die Produktion des Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden-Faktors (GM-CSF) gehemmt bei zeitgleicher Anwendung von LPS an PC-3 Zellen.

Modulierung der Genexpression

Sirab et al. (2013) testeten die Wirkung des lipidosterolischen Extrakts (Permixon®) der Sägepalme auf das mRNA-Genexpressionsprofil zweier repräsentativer Zellmodelle der BPH (BPH1-Epithelzelllinie und primäre stromale Zellen entnommen aus hyperplasier-

tem Prostatagewebe). Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf Gene gelegt, welche für proliferative, apoptotische und inflammatorische Pfade kodieren. Der Extrakt war bereits nach 3 Stunden in der Lage, die Expression von Genen, die eine Rolle bei der benignen Prostatahyperplasie spielen, zu verändern. Darunter befinden sich Gene die für die Immunantwort, Apoptose und Zellproliferation verantwortlich sind. Vor allem antiinflammatorische Pfade, wie die der Zytokinfamilie, der TNF Superfamilie des Glucocorticoid/PPAR-Signalings, des MAPK Signalings und der COX/LOX scheinen beeinflusst zu werden.

Hemmung der PSA - Sekretion

Maroccia et al. (2014) überprüften die Dihydrotestosteron-induzierte PSA - Freisetzung einer Androgen-regulierten Prostataepithelzelllinie (LNCaP - Zelllinie) bei zeitgleicher Testung der Cytotoxizität. Die Zellen wurden mit Sägepalmenextrakt (Sägepalmen-Öl, 90-95 % Fettsäuren, niedriger Sterolgehalt) behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass das Sägepalmenöl die PSA-Produktion bei Zugabe von Dihydrotestosteron statistisch signifikant reduzieren kann. Eine maximale Inhibierung von 25 % der PSA-Sekretion konnte noch bei einer Konzentration von 0.0001 µg/mL erreicht werden.

In-vivo-Testsysteme

Barry et al. führten eine doppelblinde, multizentrische, placebokontrollierte, randomisierte klinische Studie in Amerika durch. Es wurden zuerst eine, dann zwei und zuletzt drei Standarddosen Sägepalmenextrakt (320 mg/d) oder Placebo verabreicht, wobei die Dosiserhöhungen auf zwei Dosen nach 24 Wochen und auf drei Dosen nach 48 Wochen erfolgten. Der Effekt wurde anhand des *American Urological Association Symptom Index* (AUASI) bewertet (Barry et al., 2011). Der AUASI sank unter Einnahme des Sägepalmenextrakts von 14.42 auf 12.22 Punkte und unter Einnahme des Placebos von 14.69 auf 11.70 Punkte. Der Sägepalmenextrakt war demnach nicht effektiver als das Placebo.

Suter et al. führten eine offene, multizentrische klinische Studie durch. Das am Patienten zu testende Präparat war Prostasan®. 82 Patienten nahmen an der 8-wöchigen Studie teil und nahmen je eine Kapsel, die 320 mg Sägepalmenextrakt beinhaltete, täglich ein (Suter et al., 2013). Die Verbesserung der Beschwerden (in diesem Fall der Symptome ausgelöst durch BPH und der sexuellen Dysfunktion) wurden anhand des *International Prostate Symptom Scores*, der *Sexual Function Inventory* und des *Urolife BPH Qol-9 sex total*

überprüft. Der *International Prostate Symptome Score* nahm von 14.4 auf 6.9 ab, die *Sexual Function Inventory* - Messung ergab eine Verbesserung von 22.4 auf 31.4 und der *Urolife BPH QoL-9 sex total* verbesserte sich von 137.3 auf 195.0. Die gute Wirksamkeit wurde von Prüfern und Patienten bestätigt.

Minutoli et al. (2014) testeten den Effekt von Selen, Lycopin und *Sabal serrulata* alleine oder kombiniert auf die Expression von vier Hemmern von Apoptoseproteinen (IAP = inhibitors of apoptosis proteins). Die Angaben, um welchen Extrakt von *Sabal serrulata* es sich hierbei handelt, sind mangelhaft. Evaluiert wurden cIAP-1, cIAP-2, NAIP und Survivin in Ratten mit experimenteller Testosteron-abhängiger BPH. Im weiteren Verlauf wurden Caspase-3, Interleukin-6 und PSMA (Prostata-spezifisches Membranantigen) ermittelt. Die Ratten erhielten entweder ein Placebo (Maiskeimöl) oder Testosteronpropionat (3 mg/kg subkutan in Maiskeimöl) in Kombination mit Selen (3 mg/kg subkutan in Maiskeimöl), Lycopin (1 mg/kg subkutan in Maiskeimöl) oder *Sabal serrulata* (25 mg/kg subkutan in Maiskeimöl) per Injektion. Eine weitere Gruppe erhielt Testosteron in Kombination mit allen dreien. Nach 14 Tagen wurde die Prostata für die Analyse der Ergebnisse entfernt. Die Kombination aus *Sabal serrulata*-Selen-Lycopin zeigte die höchste Wirksamkeit bezogen auf die Reaktivierung der Apoptose. Des weiteren konnten die IL-6- und PSMA-Spiegel sowie die Prostatavergrößerung und das Prostatagewicht signifikant reduziert werden. Das Prostatawachstum war in den mit der Kombination behandelten Tieren um 43.3 % geringer.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel wird erläutert, welches Pflanzenmaterial und welche Reagenzien für die praktische Arbeit verwendet wurden, und wie die Herstellung von Pflanzenextrakten und Standards erfolgte. Alle angewandten mikroskopischen, chromatographischen und spektroskopischen Methoden werden genau beschrieben.

2.1 Reagenzien

In diesem Kapitel werden sämtliche für die Analysen mittels DC, HPLC, HPTLC und LC-MS benötigten Reagenzien aufgelistet.

- Aceton dest.
- Acetonitril for HPLC-Super Gradient (VWR Chemicals)
- Aqua bidest.
- Chloralhydrat-Ethanol (2:3)
- Chloroform dest.
- Dichlormethan dest.
- Essigsäure$_{konz.}$ (Gatt-Koller)
- Essigsäure$_{konz.}$ in HPLC Qualität (Roth)
- Ethylacetat dest.
- Ameisensäure$_{konz.}$ (Gatt-Koller)
- Ameisensäure$_{konz.}$ in HPLC Qualität (Roth)
- Ammoniak$_{konz.}$ in HPLC Qualität
- Methanol dest.
- Methanol HPLC Gradient Grade (J. T. Baker)
- n-Butanol dest.
- n-Heptan zur Analyse (MERCK)
- Toluol ≥ 99.5 % zur Synthese (Carl Roth)

2.2 Pflanzenmaterial

Das für sämtliche Analysen verwendete Pflanzenmaterial von *Plantago coronopus* L. **(PC)** stammt im Wesentlichen aus drei Bezugsquellen, welche in Tabelle 2 sind. Zum einen wurde uns Drogenmaterial von der Fa. Kottas zur Verfügung gestellt **(PC_1)**, was zu einem sehr frühen Zeitpunkt während des Verlaufs dieser Diplomarbeit erfolgte. Zum anderen gelang es im späteren Verlauf der Diplomarbeit, Lebendpflanzen aus dem Botanischen Garten Salzburg zu akquirieren **(PC_3)**. Letztlich konnten wir Kollegen vom Institut für Botanik dafür gewinnen, bei einer bereits seit langem geplanten Sammelreise nach Korfu zur Kartierung der dortigen Flora, *P. coronopus* zu sammeln (**PC_2)**. Aufgrund der verwandtschaftlichen Nähe von *P. coronopus* zu den Arten *Plantago serraria* L. **(PS)** und *Plantago macrorhiza* subsp. *humilis* POIR. **(PMH)**, ernteten die Kollegen bei ihrer Reise nach Korfu auch diese beiden Arten.

Tabelle 2 Für die Untersuchungen akquiriertes Pflanzenmaterial

Arbeitsbezeichnung	Beleg-Nr.	Herbarium	Herkunft	Sammler/Determinator	Sammeljahr/ Datum
PC_1 Getrocknete Droge von *Plantago coronopus*	Keine Angabe	Keine Angabe	Griechenland	Keine Angabe	2015
PC_2 Herbarmaterial und getrocknete Droge von *Plantago coronopus*	0082505	WU	Griechenland, Korfu	D. Reich, C. Gilli	2015/21.05.
PC_3 Lebendpflanze und getrocknete Droge von *Plantago coronopus*	Keine Angabe	Keine Angabe	Bot. Garten Salzburg	Keine Angabe	Keine Angabe
PS Herbarmaterial und getrocknete Droge von *Plantago serraria*	0082506	WU	Griechenland, Korfu	D. Reich, C. Gilli	2015/21.05.
PMH Herbarmaterial und getrocknete Droge von *Plantago macrorhiza*	0082507	WU	Griechenland, Korfu	D.Reich, C. Gilli	2015/24.05.

Begleitend zur vorliegenden Diplomarbeit wurde Samenmaterial (Tabelle 3) eingebracht, welches für den Anbau im Arzneipflanzengarten des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien bestimmt war, um zu gewährleisten, dass für allfällige künftige Isolierungsarbeiten im Rahmen nachfolgender Diplomarbeiten, ausreichend Pflanzenmaterial zur Verfügung steht. Das Samenmaterial stammte zum größten Teil von Herbarbelegen des Herbariums WU (Institut für Botanik, Univ. Wien) und wurde nach Verfügbarkeit von Samen und nach unterschiedlichen Herkunftsländern ausgewählt. Das Material

SAM_3 stammte von einem Exemplar, welches über den Arzt Dr. Pechlaner ans Department für Pharmakognosie kam, und zu welchem es keine näheren Angaben hinsichtlich des Herkunftslandes gibt. Zum Anbau der Samen wurde ein Blumenerde-Sand-Gemisch hergestellt, in dem die Keimung der Samen erfolgte. Die Jungpflanzen wurden nach etwa sechs Wochen ins Freiland transferiert und erwiesen sich als äußerst robust in der Kultivierung. Einige Exemplare kamen bereits zwei Monate nach dem Transfer außen zur Blüte, sodass weiteres Samenmaterial für die Kultivierung im nächsten Jahr zur Verfügung steht.

Tabelle 3 Gesammeltes und kultiviertes Samenmaterial

Arbeitsbezeichnung	Beleg-Nr.	Herbarium	Herkunft	Taxon
SAM_1	6143	WU	Kroatien	*P. coronopus* L.
SAM_2	2001-659	WU	Deutschland	*P. coronopus* L.
SAM_3	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe	*P. coronopus* L. (Dr. Pechlaner)
SAM_4	27733	WG	Griechenland	*Plantago macrorhiza* subsp. *humilis* POIR.
SAM_5	64778	WU	Spanien	*Plantago serraria* L.
SAM_6	22886	WG	Griechenland	*Plantago weldenii* RCHB.
SAM_7	WU021090	WU	Zypern	*Plantago weldenii* RCHB.

2.3 Extraktherstellung

Um die phytochemischen Untersuchungen durchführen zu können, war es nötig, Extrakte des akquirierten Pflanzenmaterials (s. Tabelle 2 S.28) herzustellen.

Zunächst galt es, ein optimales Extraktionsmittel für vergleichende Analysen zu finden. Dazu wurde das Drogenmaterial PC_2 (s. Tabelle 2 S.28) herangezogen, da es für uns bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Diplomarbeit zur Verfügung stand. Mit diesem Extraktionsmittel sollten ausschließlich vergleichende Analysen der Materialien unterschiedlicher Herkunft durchgeführt werden. So wurden elf Extrakte unterschiedlicher Polarität von PC_2 (Tabelle 2 S.28) hergestellt (Tabelle 4). Dazu wurden 0.25 - 0.30 g getrocknete und zerkleinerte Blätter des Pflanzenmaterials mit je 2 mL Lösungsmittel

versetzt und 10 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur extrahiert. Anschließend wurde durch Watte filtriert. Der erhaltene Drogenauszug wurde über Nacht im Kühlschrank bei 5 - 8 °C gelagert. Dabei kam es gelegentlich zu einer Trübung bzw. zum Ausflocken, welche in der Regel durch vorsichtiges Erwärmen entfernbar war. Wurde die Lösung nicht vollständig klar, wurden die Feststoffe mittels Zentrifugation abgetrennt mit dem Risiko, bestimmte Inhaltsstoffe dadurch zu verlieren. Der Fokus lag auf der qualitativen Beurteilung der Extrakte, Ausbeuten wurden nicht bestimmt und blieben unberücksichtigt.

Tabelle 4 Aus PC_2 (Tabelle 2 S.28) hergestellte Extrakte unterschiedlicher Polarität

Arbeitsbezeichnung des Extrakts	Extraktionsmittel
E_1	Heptan
E_2	Toluol
E_3	Dichlormethan
E_4	Aceton
E_5	Methanol
E_6	Wasser
E_7	Methanol - Wasser (8+2)
E_8	Methanol - Essigsäure $_{konz.}$ (9+1)
E_9	Wasser - Essigsäure $_{konz.}$ (9+1)
E_10	Methanol - Ammoniak$_{konz.}$ (8+2)
E_11	Wasser - Ammoniak$_{konz.}$ (8+2)

Für die vergleichenden Analysen wurden aus dem akquirierten Pflanzenmaterial (s. Tabelle 2 S.28) methanolische Auszüge hergestellt. Die Extraktion und Aufbereitung erfolgte wie auf S. 29 beschrieben, jedoch wurde anstelle von PC_2 die in Tabelle 5 dargestellte jeweilige Stammpflanze gewählt. Die bereiteten Extrakte sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Methanolische Extrakte des akquirierten Pflanzenmaterials (s. Tabelle 2 S.28)

Extraktionsmittel: Methanol	
Arbeitsbezeichnung des Extrakts	**Stammpflanze (s. Tabelle 2 S.28)**
H_1	PC_1 (*Plantago coronopus*)
H_2	PC_2 (*Plantago coronopus*)
H_3	PC_3 (*Plantago coronopus*)
H_4	PS (*Plantago serraria*)
H_5	PMH (*Plantago macrorhiza*)

2.4 Herstellung der Standardlösungen für Vergleichszwecke

Um eine Identifizierung bestimmter Substanzen bzw. eine Zuordnung zu Substanzklassen zu ermöglichen, wurden Referenzlösungen von Reinsubstanzen hergestellt. Dazu wurde eine kleine Spatelspitze der jeweiligen Verbindung in ein Vial überführt und in etwas (ca. 100 - 150 µL) Methanol von HPLC-Qualität gelöst. Bei Isoquercitrin trat nach Zugabe von Methanol eine Trübung der Lösung auf, weshalb ein bis zwei Tropfen zweifach-destilliertes Wasser dazugegeben wurden.

Tabelle 6 Für die phytochemischen Untersuchungen verwendete Standards

Arbeitsbezeichnung des Standards	Standard
St_1	Rutin
St_2	Isoquercitrin
St_3	Chlorogensäure
St_4	Chlorogensäure + Kaffeesäure
St_5	Aucubin
St_6	Sitosterol
St_7	Verbascosid

Die Reinsubstanzen, die für die Herstellung der Standards verwendet wurden, wurden nach den in der Literatur beschriebenen, in *P. coronopus* vorhandenen Verbindungen und nach Verfügbarkeit am Department für Pharmakognosie der Universität Wien ausgewählt und sind in Tabelle 6 dargestellt.

2.5 Morphologische Untersuchungen

In diesem Kapitel wird die Vorgangsweise bei den morphologischen Untersuchungen an *P. coronopus* wiedergegeben. Diese wurden an den getrockneten Blättern vor allem von PC_1 (s. Tabelle 2 S.28) durchgeführt, um einen ersten Überblick über das Aussehen und die Beschaffenheit der Droge zu liefern. PC_1 wurde gewählt, da diese Droge bereits zu einem frühen Zeitpunkt zur Verfügung stand, als die Akquisition des Pflanzenmaterials aus den anderen Quellen noch im Gange war. Das übrige Drogenmaterial aus Tabelle 2 wurde im weiteren Verlauf der Diplomarbeit ebenso stichprobenartig untersucht, jedoch nicht fotographisch dokumentiert.

Die Morphologie der Blätter wurde mittels einer *Nikon SMZ-U Zoom 1:10* Stereolupe erarbeitet. Die getrocknete und zerkleinerte Droge wurde dafür auf ein weißes Blatt Papier gelegt, ausreichend beleuchtet und durch das Okular betrachtet.

Für die Fotodokumentation diente ein Stativ der Fixierung einer Canon 30D - Spiegelreflexkamera. Fotografiert wurde mit einem *Canon Makro Photo Lens MP-E 65 mm 1:2,8 1-5x ø 58 mm* Objektiv.

2.6 Anatomische Untersuchungen

Im folgenden Kapitel wird die Durchführung der anatomischen Untersuchungen an *P. coronopus* näher beschrieben. Dies umfasst die Herstellung der Präparate für das Mikroskop sowie die Fotodokumentation. Die anatomischen Untersuchungen wurden an PC_1, PC_2 und PC_3 (s. Tabelle 2 S.28) durchgeführt. Bei PC_3 erfolgte sowohl die Untersuchung der frischen, als auch der getrockneten Pflanze. Die Blattstücke wurden per Zufallsprinzip ausgewählt. Die Merkmale des Blattquerschnitts wurden anhand von PC_1, PC_2 und PC_3 erarbeitet, jene des Blütenstands und des Sprosses anhand von PC_2. Die anatomischen Merkmale wurden mittels *Nikon Labophot-2* Lichtmikroskop mit 10-facher Okularvergrößerung erhoben. Es verfügt des weiteren über eine 4x, 10x, 20x, 40x und 60x Objektivvergrößerung. Die Gesamtvergrößerung ergibt sich aus dem Produkt von Objektiv- und Okularvergrößerung.

Präparation und Schnitttechnik

Bevor die Pflanzenteile unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden konnten, waren die Herstellung von Schnitten und eine Aufhellung nötig. Die verwendete Schnitttechnik wurde an die von Julia Eberlberger (2014) angelehnt. Zunächst wurde die Droge in Wasser eingelegt, um das Gewebe aufzuweichen und das Schneiden zu ermöglichen. Um einen **Querschnitt** zu erhalten, wurde das dafür ausgewählte Stück auf einen Objektträger platziert und mit einem zweiten Objektträger, der auf den ersten gelegt wurde, abgedeckt. Das eingeweichte Fragment befand sich nun zwischen den Objektträgern. Für die Herstellung der Schnitte wurde unter der Lupe gearbeitet und der obere Objektträger ein kleines Stück parallel zum unteren nach hinten bewegt, so, dass etwas Drogenmaterial nicht abgedeckt war. Dann erfolgte der gleichmäßige, zügige Schnitt mithilfe einer *Wilkinson*

Rasierklinge. Der obere Objektträger fungiert hier als Lineal und ermöglichte gerade Schnitte.

Um einen **Längsschnitt** zu erhalten, wie es bei dem Spross von *P. coronopus* nötig war, wurde das Organ zwischen Zeigefinger und Daumen gehalten und mit Hilfe einer Rasierklinge, die möglichst flach und parallel an der Oberfläche positioniert wurde, zügig und fein geschnitten.

Für die **Blattaufsicht** der Ober- und Unterseite wurde das eingeweichte Blattstück auf einem Objektträger positioniert und in der Mitte durchgeschnitten. Anschließend wurde eins der beiden erhaltenen Teile um 180 ° gewendet. Im Anschluss erfolgte die Aufhellung mittels einer Chloralhydrat + Ethanol (2+3)-Mischung. Dafür wurde das zu betrachtende, geschnittene Pflanzenstück in ein bis zwei Tropfen dieser Chemikalie mittels Pinsel überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Das Präparat wurde bis zum leichten Aufkochen des Chloralhydrats über einer Flamme erhitzt. Nach kurzer Abkühlungszeit und Entfernung des überschüssigen Chloralhydrats war eine Betrachtung durch das Lichtmikroskop möglich.

Um die im Mikroskop untersuchten Merkmale festzuhalten, erfolgte eine Bildaufnahme mittels einer Canon 30D Spiegelreflexkamera (*Canon Makro Photo Lens MP-E 65 mm 1:2,8 1-5x ø 58 mm* Objektiv).

2.7 Chromatographische Untersuchungen

Im folgenden Kapitel werden die Methoden aller durchgeführten chromatographischen Untersuchungen (DC, HPTLC und HPLC) genauer erläutert und eine kurze Einführung in das chromatographische Trennprinzip gegeben.

2.7.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Ziel der im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten dünnschichtchromatographischen Analysen war, das Inhaltsstoffspektrum von *P. coronopus* zu erschließen, dessen phytochemischen Fingerprint mit dem des übrigen akquirierten Pflanzenmaterials (s. Tabelle 2 S.28) zu vergleichen und mithilfe von Referenzsubstanzen (=Standards) eine Identifizierung von Komponenten zu ermöglichen.

Bei der DC handelt es sich um ein Trennverfahren mit dem Prinzip der fest-flüssig-Verteilung. Als Festphase dient eine Glas- oder Metallplatte auf der sich eine dünne, aus feinkörnigem Material bestehende stationäre Phase befindet. Als flüssige "mobile" Phase dient ein Lösungsmittel oder ein Gemisch solcher. Ein Säure- oder Basenzusatz ist ebenso möglich. Säuren werden beispielsweise zugesetzt, um saure Verbindungen wie Phenole, die zur Dissoziation neigen, optimal analysieren zu können. Die Komponenten eines Stoffgemischs verteilen sich nach dem Auftragen dieser auf die Startzone zwischen beiden Phasen - so wird eine Auftrennung solcher möglich (Hänsel et al., 2010).

Die gewählte stationäre Phase war abhängig davon, ob es sich um eine Analyse der klassischen Dünnschichtchromatographie oder der Hochleistungsdünnschichtchromatographie handelte (s. Unterkapitel *Klassische Dünnschichtchromatographie* und *Hochleistungsdünnschichtchromatographie*). Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde ausschließlich mit Kieselgelplatten gearbeitet. Auf dieser stationären Phase werden polare Verbindungen stärker zurückgehalten als apolare. In diesem Fall besitzen Fließmittel mit hoher Polarität die stärkere Elutionskraft. Im Laufe der Arbeit kamen des weiteren unterschiedliche mobile Phasen zum Einsatz, die in Tabelle 7 zusammengefasst sind. Die gewählten Fließmittel wurden von Reich et al. (2007) übernommen. Die Auswahl richtete sich nach der Polarität der zu untersuchenden Extrakte und Standards. Die Derivatisierung erfolgte mittels der in Tabelle 8 dargestellten Detektionsreagenzien. Diese wurden angewandt, sofern bestimmte Substanzklassen nach der Entwicklung der Platte weder bei Tageslicht, noch unter UV_{254} oder UV_{366} sichtbar waren.

Tabelle 7 Für die DC und HPTLC verwendete mobile Phasen

Arbeitsbezeichnung des Fließmittels	Mobile Phase	Analysierte Stoffgruppe
FM1	Toluol-Ethylacetat (95:5)	Apolare Komponenten und ätherisches Öl
FM2	Chloroform-Methanol-Wasser (70:30:4)	Saponine und Lignane
FM3	Ethylacetat-Essigsäure $_{konz.}$-Ameisensäure$_{konz.}$-Wasser (100:11:11:27)	Flavonoide
FM4	1-Butanol-Essigsäure $_{konz.}$-Wasser (7:1:2)	Polare Komponenten

Tabelle 8 Für die DC und HPTLC verwendete Detektionsreagenzien

Reagenz 1: Anisaldehyd- Schwefelsäure-Reagenz		
Zusammensetzung / Herstellung	*Detektierbare Substanzklasse*	*Auswertung*
425 mL Methanol mit 50 mL Essigsäure $_{konz.}$ und 25 mL konz. Schwefelsäure versetzen und zuletzt 2.5 mL Anisaldehyd zugeben	Zucker, Steroide, Terpene	100 °C Tageslicht, UV_{366}
Reagenz 2: Naturstoffreagenz A		
Zusammensetzung / Herstellung	*Detektierbare Substanzklasse*	*Auswertung*
Diphenylborsäure-β-aminoethylesterlösung (1 % in Methanol)	Flavonoide	UV_{366}

Klassische Dünnschichtchromatographie

Die klassische DC wurde zur Identifizierung von Substanzen im Extrakt PC_2 (s. Tabelle 2 S.28) mithilfe von Standardsubstanzen eingesetzt.

Es kamen zugeschnittene 5x10 cm Aluminium-TLC-Kieselgelplatten 60 F_{254} der Firma MERCK zum Einsatz. Als Entwicklungskammer wurde ein CAMAG-DC Trog verwendet, der mit ausreichend mobiler Phase (s. Tabelle 7 S.34) gefüllt wurde. Nach Verschluss des Troges wurde zur Erreichung der Kammersättigung 25 - 30 min gewartet. Währenddessen erfolgte der bandenförmige Auftrag (5 µL) der Proben. Nach Trocknung dieser, wurde die Platte in den Trog überführt. Die im Anschluss an die Entwicklung folgende Derivatisierung mittels Tauchreagenzien und Fotodokumentation erfolgte mittels der dafür vorgesehenen Geräte des CAMAG-HPTLC-Systems (s. Unterkapitel *Hochleistungsdünnschichtchromatographie*).

Hochleistungsdünnschichtchromatographie

Die HPTLC diente dem Vergleich der Extrakte unterschiedlicher Polarität, dem Fingerprint-Vergleich des akquirierten Pflanzenmaterials sowie der Identifizierung von Substanzen im Extrakt PC_2 mithilfe von Standardsubstanzen.

Bei der HPTLC handelt es sich um eine weiterentwickelte Version der klassischen DC. Die für die Chromatographie essentiellen Schritte wie das Auftragen, die Entwicklung, die Derivatisierung und die Fotodokumentation gestalten sich hier nach standardisierten Vorgaben, um die Vergleichbarkeit von Dünnschichtchromatogrammen, die zu verschiedenen Zeitpunkten entwickelt wurden, zu gewährleisten. Die Reproduzierbarkeit und Trennleistung sind im Gegensatz zur klassischen DC deutlich höher.

Im Falle der HPTLC wurden 10 x 20 cm große Glas-DC-Kieselgelplatten 60 F_{254} der Firma MERCK eingesetzt. Die HPTLC-Anlage stammte von der Firma CAMAG. Sie setzt sich in diesem Fall aus vier Geräten und der dazugehörigen Software *Vision Cats* zusammen. Ein einheitliches Auftragen ermöglicht der *CAMAG Automatic TLC Sampler 4*. Es wurde ein Auftragevolumen von 5 µL für Proben und 10 µL für Standards bei variabler Bandenbreite, je nach Zahl der aufzutragenden Banden, definiert. Aufgetragen wurde auf Glas-DC-Kieselgelplatten 60 F_{254} der Firma MERCK: Die Trocknungszeit entsprach dem jeweiligen Lösungsmittel, wobei sie gemäß dem am langsamsten verdampfenden gewählt wurde. Anschließend startete die Entwicklung in der *CAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2)*. Zur Erreichung einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit von 33 % in der Entwicklungskammer diente eine stark übersättigte Lösung von Magnesiumchlorid Hexahydrat (Einwaage ca. 75 g/L). Die Dauer der Kammersättigung und der Entwicklung war vom Gerät vorgegeben. Es wurden 25 mL Fließmittel zur Erreichung der Sättigung des Dampfraums sowie 10 mL für den eigentlichen Lauf eingefüllt. Im Anschluss an die vom Gerät eingeleitete Trocknung erfolgte die erste Fotodokumentation unter UV_{254} und UV_{366} mittels *CAMAG TLC Visualizer*. Um bestimmte nicht sichtbare Substanzklassen nach der Entwicklung der Platte zu detektieren, wurden die gesuchten Verbindungen mit Tauchreagenzien (Tabelle 8 S.35) derivatisiert. Dies erfolgte mit Hilfe des *CAMAG Chromatogram Immersion Device (III)*. Im Anschluss erfolgte erneut eine Aufnahme von Bildern unter Tageslicht und UV_{366}.

2.7.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Dieses Kapitel listet alle im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit genutzten HPLC - Methoden auf. Ziel der Untersuchungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) war es, eine geeignete Methode zur Analyse von *P. coronopus* - Extrakten zu finden, sowie Informationen zum Inhaltsstoffspektrum der Pflanze zu bekommen.

Bei der HPLC handelt es sich um ein Verfahren, dass sowohl präparativ als auch analytisch eingesetzt werden kann. Es zählt zu den am weitesten verbreiteten chromatographischen Verfahren zur Trennung von Substanzgemischen. Grund dafür ist die hohe Trennleistung, sowie unter anderem die Möglichkeit, nahezu jede Substanz optimal analysieren zu können. Hierfür verantwortlich ist die Tatsache, dass die HPLC-Anlage mit unter-

schiedlichen Detektoren, stationären und mobilen Phasen gekoppelt werden kann (Hänsel et al., 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde die HPLC ausschließlich für qualitative Zwecke genutzt. Geräte sowie deren Parameter sind in Tabelle 9 auf S.38, Methoden in Tabelle 10 auf S. 38 dargestellt. Die durchgeführten Analysen zur Entwicklung der Methoden sind in Tabelle 11 auf S.39 beschrieben. Die verwendeten stationären Phasen waren variabel. Die mobile Phase setzte sich aus bidestilliertem Wasser, welches mit 0.1 % konzentrierter Ameisensäure versetzt wurde, um das Tailing der Peaks zu reduzieren und die Trennschärfe zu erhöhen, und Acetonitril zusammen. Die Elution erfolgte je nach Methode isokratisch oder mittels Gradientenelution. Das Injektionsvolumen betrug 5 µL. Als Detektoren dienten sowohl ein Dioden-Array-Detektor (DAD) sowie ein Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (ELSD- engl. Evaporating Light Scattering Detector). Der DAD ist als UV/Vis-Detektor in der Lage, ausschließlich chromophore Systeme nachzuweisen, der ELSD kann hingegen alle Verbindungen detektieren.

Tabelle 9 HPLC - Geräteparameter

GERÄTE
SHIMADZU Degasser DGU-20A_5 SHIMADZU Pump LC-20AD SHIMADZU Autosampler SIL-20AC $_{HT}$ SHIMADZU Interface CBM-20A SHIMADZU Column Oven CTO-20AC
DETEKTOREN
DAD: SHIMADZU SPD-M20A ELSD: SHIMADZU ELSD-LT
SOFTWARE
SHIMADZU LAB-Solution-LC-Solution
STATIONÄRE PHASE
Variabel, s. Tabelle 10
MOBILE PHASE
Aqua bidest. + 0.1 % Ameisensäure$_{konz.}$ Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure$_{konz.}$

Tabelle 10 HPLC-Methoden und Parameter der mobilen und stationären Phase

Bezeichnung der Methode	**SÄULE**	**STATIONÄRE PHASE**	**MOBILE PHASE**
M1	Acclaim C18 150 mm x 2.1 mm + Pre-Column	C18 Partikeldurchmesser 3 µm	**Gradient**: rate: 0.5 %/min: 0 min: 10 % ACN 60 min: 40 % ACN rate: 4 %/min: 60 min: 40 % ACN 75 min: 100 % ACN **Fluss**: 0.5 mL/min **Injektionsvolumen**: 5 µL
M2	Luna Phenyl-Hexyl 250 mm x 2.00 mm + Pre-Column	Phenyl-Hexyl Partikeldurchmesser 5 µm	**Gradient**: rate: 0.5 %/min: 0 min: 5 % ACN 26 min: 18 % ACN rate: 0.25 %/min: 26 min: 18 % ACN 46 min: 23 % ACN **Fluss**: 0.5 mL/min **Injektionsvol**umen: 5 µL

Tabelle 11 Durchgeführte HPLC-Analysen zur Entwicklung einer Methode für den *P. coronopus* - Extrakt H_2 (s. Tabelle 5 S.30)

Bezeichnung der Analyse	SÄULE	STATIONÄRE PHASE	MOBILE PHASE
A1	Acclaim C18 150 mm x 2.1 mm + Pre-Column	C18 Partikeldurchmesser 3 µm	**Gradient**: rate: 2 %/min: 0 min: 10 % ACN 45 min: 100 % ACN **Fluss**: 0.5 mL/min **Injektionsvol**.: 5 µL
A2	Acclaim C18 150 mm x 2.1 mm + Pre-Column	C18 Partikeldurchmesser 3 µm	**Gradient**: rate: 0.5 %/min: 0 min: 10 % ACN 60 min: 40 % ACN rate: 4 %/min: 60 min: 40 % ACN 75 min: 100 % ACN **Fluss**: 0.5 mL/min **Injektionsvol**.: 5 µL
A3	Aquasil C18 150 mm x 2.1 mm + RP-18 Pre-Column 5 µm	C18 Partikeldurchmesser 3 µm	**Gradient**: rate: 0.5 %/min: 0 min: 10 % ACN 60 min: 40 % ACN rate: 4 %/min: 60 min: 40 % ACN 75 min: 100 % ACN **Fluss**: 0.5 mL/min **Injektionsvol**.: 5 µL
A4	Synergi Polar-RP + Phenomenex AF0-8497 Pre-Column	Ether-verknüpfte Phenylreste Partikeldurchmesser 4 µm	**Gradient**: rate: 0.5 %/min: 0 min: 10 % ACN 60 min: 40 % ACN rate: 4 %/min: 60 min: 40 % ACN 75 min: 100 % ACN **Fluss**: 0.5 mL/min **Injektionsvol**.: 5 µL
A5	Luna 3u CN 50 mm x 3.00 mm + Pre-Column	CN Partikeldurchmesser 3 µm	**Gradient**: rate: 0.5 %/min: 0 min: 2 % ACN 20 min: 12 % ACN **Fluss**: 1 mL/min **Injektionsvol**.: 5 µL
A6	Luna 3u CN 50 mm x 3.00 mm + Pre-Column	CN Partikeldurchmesser 3 µm	**Gradient**: rate: 0.25 %/min: 0 min: 2 % ACN 40 min: 12 % ACN **Fluss**: 1 mL/min **Injektionsvol**.: 5 µL
A7	Luna 3u CN 50 mm x 3.00 mm + Pre-Column	CN Partikeldurchmesser 3 µm	**Gradient**: rate: 2 %/min: 0 min: 95 % ACN 40 min: 15 % ACN **Fluss**: 1 mL/min **Injektionsvol**.: 5 µL
A8	Luna Phenyl-Hexyl 250 mm x 2.00 mm + Pre-Column	Phenyl-Hexyl Partikeldurchmesser 5 µm	**Gradient**: rate: 0.5 %/min: 0 min: 5 % ACN 26 min: 18 % ACN rate: 0.25 %/min: 26 min: 18 % ACN 46 min: 23 % ACN **Fluss**: 0.5 mL/min **Injektionsvol**.: 5 µL

2.7.3 Untersuchungen mittels LC-MS

Dieses Kapitel beinhaltet sämtliche Informationen zu den für die LC-MS Analyse wesentlichen Methoden. Die LC-MS liefert vor allem wertvolle Informationen zur Strukturaufklärung und Identifizierung von Substanzen. Dies machte man sich zu nutzen, um das Inhaltsstoffspektrum von *P. coronopus* zu charakterisieren.

In der Massenspektrometrie werden aus einem Molekül geladene und in der Gasphase beschleunigte Teilchen erzeugt, welche anschließend durch elektrische und magnetische Felder so aufgetrennt und fokussiert werden, dass Teilchen mit einheitlichem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) an derselben Stelle des Detektors auftreten. Die Analyse muss im Hochvakuum erfolgen. Man erhält ein Linienspektrum der gebildeten Ionen, deren relative Intensitäten gegen die m/z Werte aufgetragen werden. Dem größten Peak, der auch als Basispeak bezeichnet wird, wird die Intensität 100 % zugeordnet. Die restlichen werden in % relativ zu jenem angegeben (Hänsel et al., 2010). Ein wichtiger Schritt ist hierbei der Prozess der Ionisierung: Diese kann "hart" oder "weich" erfolgen. Zu den harten Methoden, bei der hohe Energien eingesetzt werden, zählt beispielsweise die Elektronenstoß-Ionisation (EI), zu den weichen die Elektrospray-Ionisation (ESI). Je nach Art der Ionisierung können Fragmente der ursprünglichen Verbindung (vorwiegend bei harter Ionisierung), Molekülionen oder Molekülionenaddukte (vorwiegend bei weicher Ionisierung) entstehen. Die Wahl der Methode hängt in der Regel von der zu untersuchenden Probe ab (Hänsel et al., 2010). Vorteil der MS ist, dass aus den resultierenden Daten Rückschlüsse auf die Summenformel und Struktur gezogen werden können. Dies ist beispielsweise wichtig im Bereich der Strukturaufklärung innerhalb von Proben, deren Zusammensetzung unbekannt ist.

Es wurde eine standardisierte Vorgangsweise gewählt, welche in der von Lisa Lueger verfassten Diplomarbeit wie folgt beschrieben ist:
"Um die molekularen Massen der einzelnen Verbindungen zu bestimmen, wurde eine LC-MS Analyse auf einem Ultimate 3000 RSLC-Series System (Dionex, Germering, Germany), das an ein 3D-Ionenfallen Massenspektrometer mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) gekoppelt ist, durchgeführt. Der Elutionsfluss wurde ca. 1:4 vor der ESI-Quelle gesplittet, welche mit folgenden Einstellungen betrieben wurde: Kapillarspannung: -3,7/+3,5 kV, Vernebelungsgas: 26 psi (N_2), Trockengasfluss: 9 L/min (N_2), und Trockengastemperatur: 340°C. Positiv- und Negativ-

Ionenmodus Mehrstufenmassenspektren bis zu MS^4 wurden in einem automatischen data-dependent acquisition (DDA) Modus mit Helium als Kollisionsgas, einem Isolationsfenster von 4 Th und einer Fragmentierungsamplitude von 1,0 V gemessen." (Lisa Lueger, 2013). Die Analyse wurde anfangs sowohl im Positiv- als auch im Negativionenmodus durchgeführt, um einen Überblick zu erhalten. Um gezielt zu fragmentieren, erfolgte im Anschluss ein erneuter Lauf im Negativionenmodus, da in diesem Modus bessere MS - Spektren erhalten wurden. Die Parameter der analytischen HPLC-Analyse entsprechen M2 (s. Tabelle 10, S.38). Als zu untersuchender Extrakt wurde H_2, 1:1 mit Methanol in HPLC-Qualität verdünnt, (s. Tabelle 5 S.30) gewählt. Die Extraktherstellung erfolgte gemäß Kapitel 2.3 S.29.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden alle relevanten, im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit erhobenen Resultate zusammengefasst und analysiert. Eine Diskussion dieser erfolgt im Kapitel "Diskussion und Ausblick" auf S.85.

3.1 Morphologische Untersuchungen

Die morphologischen Merkmale wurden anhand von PC_1 (s. Tabelle 2 S.28) erhoben. Dafür wurde die Droge mit einer Stereolupe betrachtet und Fotos zur Dokumentation aufgenommen. Für die genaue Vorgehensweise s. Kapitel 2.5 S.31.

Abbildung 6 PC_1 (s. Tabelle 2 S.28), Blattdroge Lupenaufnahme

Wie in **Abbildung 6** zu erkennen, ist die Blattdroge braun bis hell- bzw. olivgrün gefärbt. In der Lupenaufnahme sind die typische Fiederung der Blätter sowie die starke Behaarung einiger Blattteile zu erkennen. In der Droge sind unterschiedlich geformte Blattstücke zu erkennen. (s. **Abbildung 7** S.43). Die Blattstücke, die oftmals heller gefärbt waren, wiesen eine stärker texturierte Oberfläche auf (s. **Abbildung 7** rechts) als die, die

schwammig-porös aussahen und oftmals dunkler gefärbt waren (s. **Abbildung 7** links). Demnach stellte sich die Frage, ob es sich um einen rein makroskopisch oder gar mikroskopisch sichtbaren Unterschied handelt. Dies könnte auf unterschiedliche Sammelorte oder -zeitpunkte oder eine Verfälschung der Droge hindeuten. Das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchungen ist in Kapitel 3.2 auf S.44. zu finden.

Abbildung 7 PC_1 (s. Tabelle 2 S.28), Lupenaufnahme einzelner Blattstücke

3.2 Anatomische Untersuchungen

Das folgende Kapitel listet die Ergebnisse der anatomischen Untersuchungen an *P. coronopus* auf. Die Merkmale aller Organe wurden anhand von PC_1, PC_2 und PC_3 (s. Tabelle 2 S.28) erhoben. Die anatomischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um einen ersten Überblick über mikroskopische Merkmale einzelner Individuen von *P. coronopus* zu erhalten und die Identität des akquirierten Pflanzenmaterials (s. Tabelle 2 S.28) zu sichern. Die folgenden Merkmale erheben daher keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Für die genaue Beschreibung der Vorgehensweise s. Kapitel 2.6 auf S.32.

3.2.1 Blatt

PC_1, PC_2 sowie PC_3 (s. Tabelle 2 S.28) dienten zur Erfassung der mikroskopischen Charakteristika des Blattes.

Querschnitt

Im Blattquerschnitt (s. **Abbildung 8**) sind Palisaden auf Ober- und Unterseite zu erkennen, die in der Mitte durch lockeres Schwammparenchym getrennt sind. Der Blattbau ist demnach als isolateral zu bezeichnen. Die Palisaden sind lange und schmal.

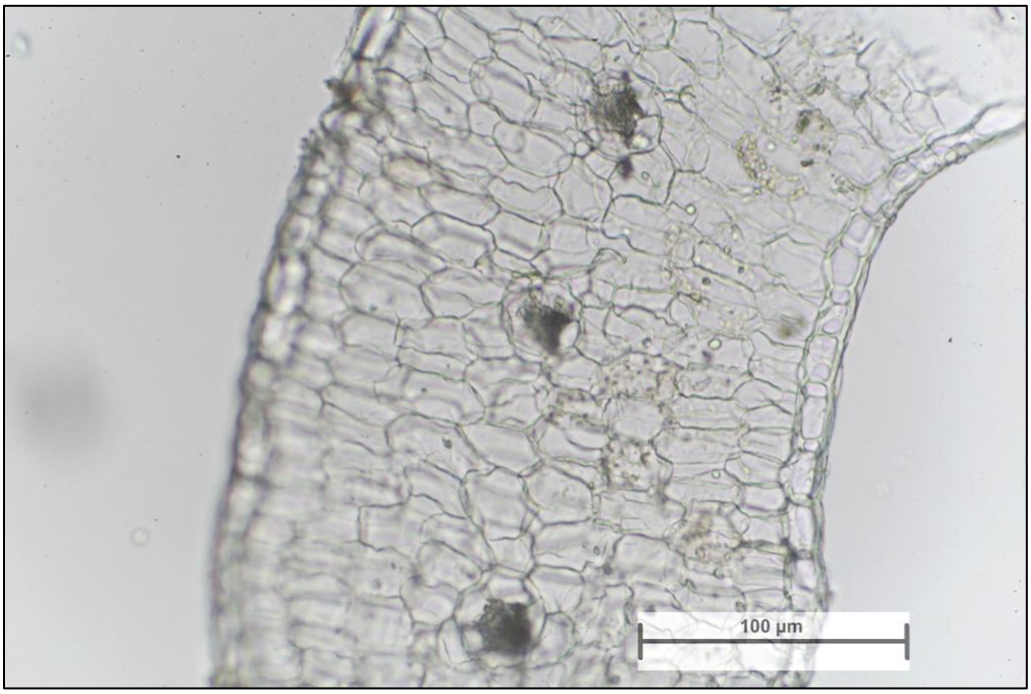


Abbildung 8 PC_1 (s. Tabelle 2 S.28), Blattquerschnitt
Durchlicht 200-fach

Bei PC_1 (s. Tabelle 2 S.28) waren jedoch auch Blätter mit anderem Querschnitt im Mikroskop sichtbar. Makroskopisch zeigten die entsprechenden Blattstücke eine schwammigporöse Oberfläche (s. Kapitel 3.1 S.42). Mikroskopisch ist lockeres Gewebe zu erkennen, das als Aerenchym gedeutet werden kann (**Abbildung 9**). Aufgrund der Beschaffenheit dieser Blätter, war es nur schwer möglich präzise Schnitte anzufertigen. Farblich ist das Gewebe gut von dem anderen Querschnitt zu unterscheiden. Da dies der einzige mikroskopische Unterschied zwischen den so gearteten Blattstücken von PC_1 und dem übrigen Drogenmaterial ist, wurde davon ausgegangen dass es sich nicht um eine Verfälschung handelt. Ein möglicher Grund könnten unterschiedliche Erntezeitpunkte der Droge sein, da im Herbst bestimmte Pflanzen Speichergewebe ausbilden, um Wasser einlagern zu können.

Abbildung 9 PC_1 (s. Tabelle 2 S.28), Blattquerschnitt mit lockerem Gewebe
Durchlicht 100-fach

Die Gefäßbündel sind kollateral offen, wobei das Kambium im Mikroskop kaum sichtbar war. Das Xylem ist stark, das Phloem eher schwach ausgeprägt und von einer dicken Sklerenchymschicht, bei der es sich um Festigungsgewebe handelt, umgeben. An den Enden des Blattspreitenquerschnitts befinden sich verdickte Zellen, die bei Benutzung eines Polarisators leuchten. Im Querschnitt sind des weiteren häufig kleine, runde Tröpfchen erkennbar. **Abbildung 10** auf S. 46 stellt einen Blattquerschnitt von PC_3 (s.

Tabelle 2 S.28) mitsamt diesen Tröpfchen (s. oranger Kreis) dar. Sie sind im frischen Zustand der Droge rot-orange, im getrockneten Zustand grünlich gefärbt. Sie sind nicht in jedem Querschnitt vorhanden, aber wenn vorhanden, über die gesamte Fläche verteilt. Es handelt sich nicht um Cuticularwachs, da es in sämtlichen mikroskopischen Bildebenen zu finden ist. Aufgrund des Aussehens sind es möglicherweise Oleosomen, wobei genauere Untersuchungen durchgeführt werden müssten.

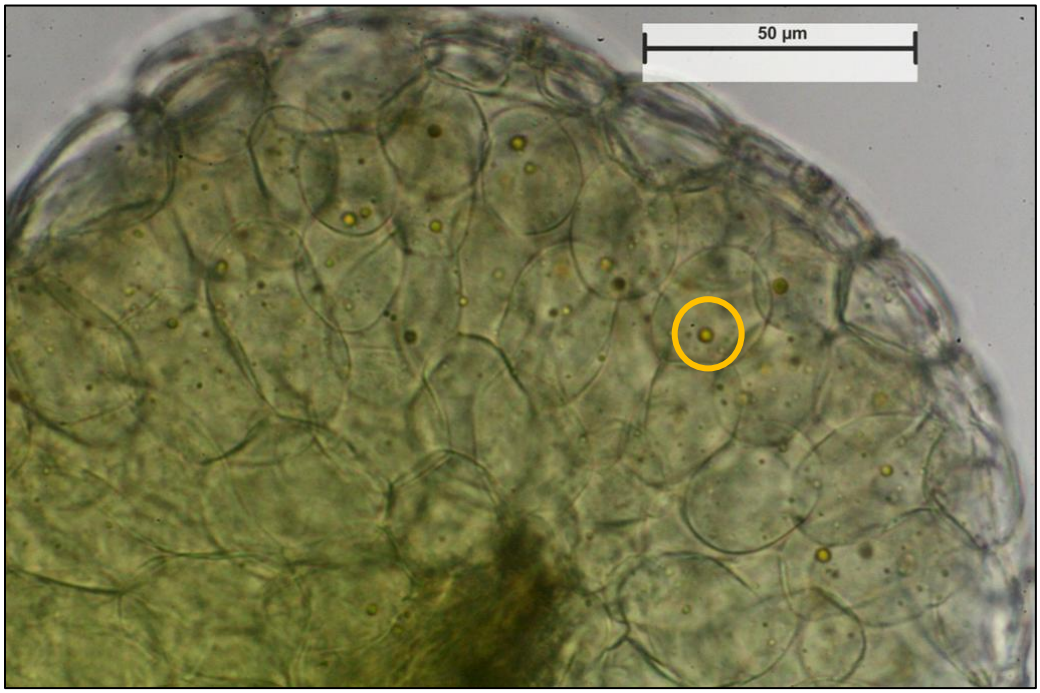


Abbildung 10 PC_3 (s. Tabelle 2 S.28), Blattquerschnitt der Frischpflanze mit gefärbten Tröpfchen Durchlicht 400-fach

Deckhaare

Es sind drei unterschiedliche Typen von Deckhaaren, die auf den folgenden Seiten dargestellt und beschrieben werden, in *P. coronopus* zu finden.

Einzellreihige Deckhaare

Einzellreihige Deckhaare (s. **Abbildung 11**) sind sowohl auf der Blattober- als auch auf der Blattunterseite ausgeprägt und häufig zu finden. Sie laufen spitz zu und werden in der Regel aus 3 - 4 Zellen gebildet. Gelegentlich ist eine Warzung der Cuticula zu erkennen. Laut Andrzejewska-Golec (1992) können Trichome diesen Typs, je nach Subspezies von *P. coronopus*, auch als zweizellreihige Haare ausgebildet werden.

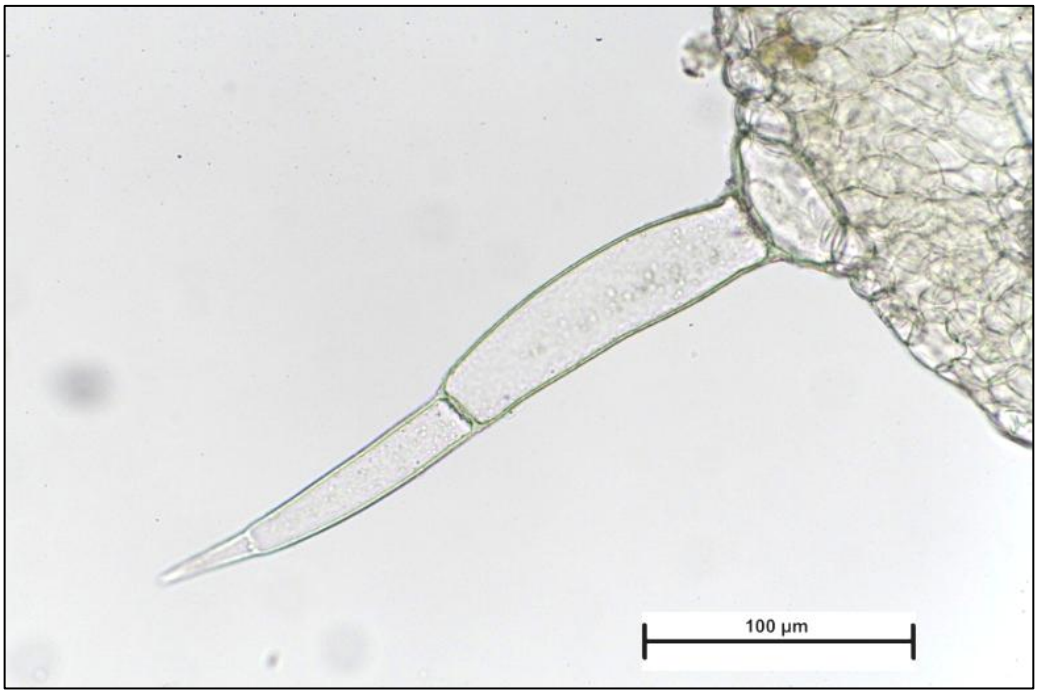


Abbildung 11 Einzellreihiges Deckhaar - PC_3 (s. Tabelle 2 S.28), Blattquerschnitt
Durchlicht 200-fach

Flaschenhaare

Bei den Flaschenhaaren (s. **Abbildung 12**) handelt es sich um einzellreihige Trichome, dennoch sind sie von den gewöhnlichen zu unterscheiden. Charakteristisch ist ihr Aufbau: auf eine breite, kurze Basalzelle folgt eine runde, große Zelle die in den "Flaschenhals", bestehend aus ein bis zwei spitz zulaufenden, kleinen, schmalen Zellen, übergeht. Die Form erinnert an eine Flasche, woher die Haare ihre Bezeichnung nehmen. Sie sind auf Ober- und Unterseite des Blattes zu finden. Die Bezeichnung wurde von Andrzejewska-Golec (1992) übernommen. Andrzejewska-Golec charakterisierte die unterschiedlichen Typen von Flaschenhaaren zur Unterscheidung der Subspezies von *Plantago* sect. *coronopus.* Die Art und Form ist das dabei entscheidende Charakteristikum. Eine Analyse, um welche Subspezies es sich bei den in der vorliegenden Diplomarbeit untersuchten *P. coronopus* - Individuen handelt, wurde nicht durchgeführt.

Abbildung 12 Flaschenhaare - PC_1 (oben) und PC_3 (unten) (s. Tabelle 2 S.28), Blattquerschnitt
Oben: Durchlicht 400-fach, Unten: Durchlicht 600-fach

Wurmhaare

P. coronopus bildet noch weitere ungewöhnliche Haartypen aus, die in **Abbildung 13** auf S. 49 dargestellt sind. Die im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit als Wurmhaare bezeichneten Gebilde liegen über die Blattober- und Blattunterseite verteilt. Sie treten häufig auf und sind im Gegensatz zu den anderen Trichomen von *P. coronopus* klein. Gut sichtbar sind sie in der Blattaufsicht. Die Basis bilden ein bis zwei Zellen, gefolgt von mehreren (in der Regel > 3) kleinen, nahezu rechteckig geformten Zellen. Sie sind leicht gekrümmt und spitz zulaufend.

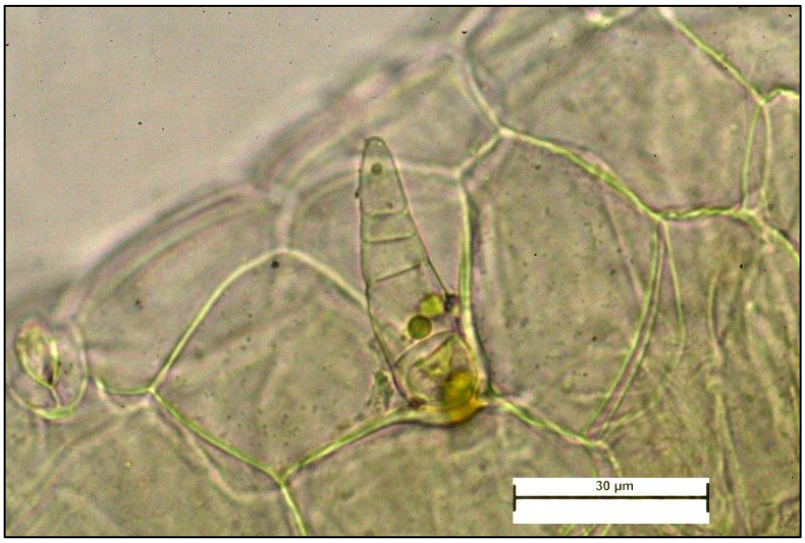


Abbildung 13 Wurmhaar - PC_3 (s. Tabelle 2 S.28), Blattaufsicht
Durchlicht 600-fach

Drüsenhaare

Auf der Blattoberfläche sind ebenso kleine Drüsenhaare wie in **Abbildung 14** zu erkennen. Ihr Aussehen ist wenig charakteristisch. Auf ein bis zwei kleine Basalzellen folgt ein mehrzelliges Köpfchen.

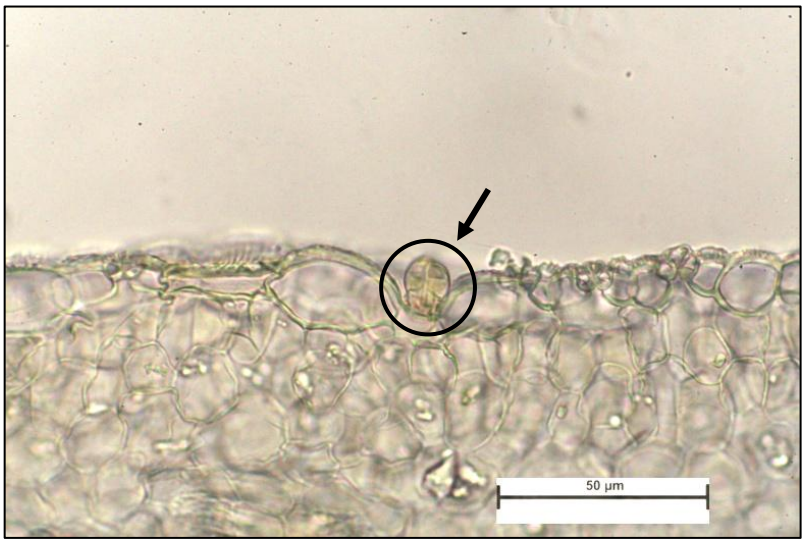


Abbildung 14 Drüsenhaar mit mehrzelligem Köpfchen - PC_2 (s. Tabelle 2 S.28), Blattquerschnitt
Durchlicht 400-fach

Kristalle

Abbildung 15 zeigt Kristalle in den Blättern von *P. coronopus*. Kristalline Einlagerungen können nicht in allen Blattteilen gefunden werden. Es handelt sich vorwiegend um Ein-

zelkristalle, teilweise um feinen Kristallsand. Die Einlagerungen können im gesamten Querschnitt, vereinzelt oder ausschließlich in Epidermiszellen auftreten.

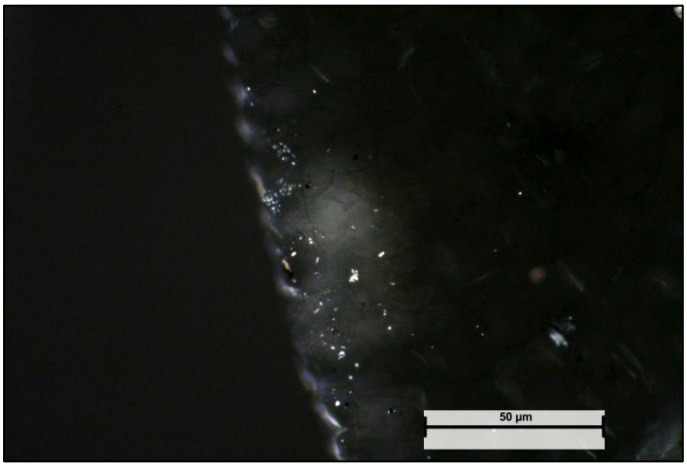


Abbildung 15 Kristallsand unter Zuhilfenahme eines Polarisators - PC_3 (s. Tabelle 2 S.28), Blattquerschnitt Durchlicht 400-fach

Stomata

Die Stomata erweisen sich als typisch für die Gattung *Plantago* und kommen sowohl auf der Blattober- als auch auf der Blattunterseite vor. Sie sind diazytisch und anomozytisch sowie in charakteristischen Reihen angeordnet (**Abbildung 16**). Diazytische Stomata überwiegen.

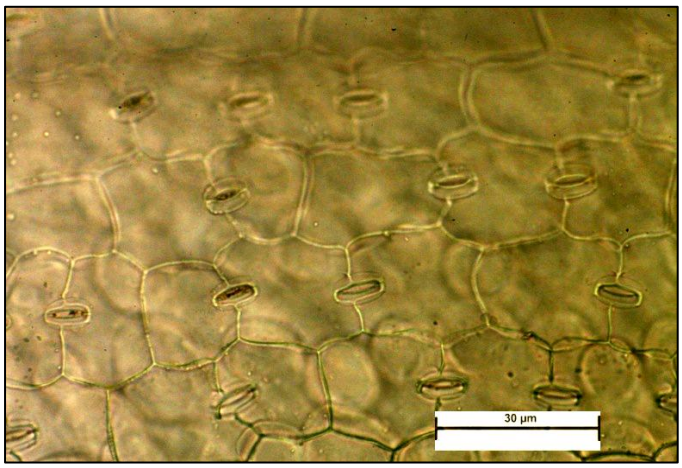


Abbildung 16 Diazytische Stomata in Reihen - PC_2 (s. Tabelle 2 S.28), Blattaufsicht Durchlicht 600-fach

3.2.2 Sprossachse

Die Sprossachse wurde anhand von PC_2 (s. Tabelle 2 S.28) erarbeitet. Für Informationen über die genaue Vorgangsweise s. Kapitel 2.6 auf S.32.

Querschnitt

Der Querschnitt der Sprossachse ist rund, behaart und die Zellen sind nach außen hin verdickt. Die Trichome sind einzellreihig ausgeprägt.

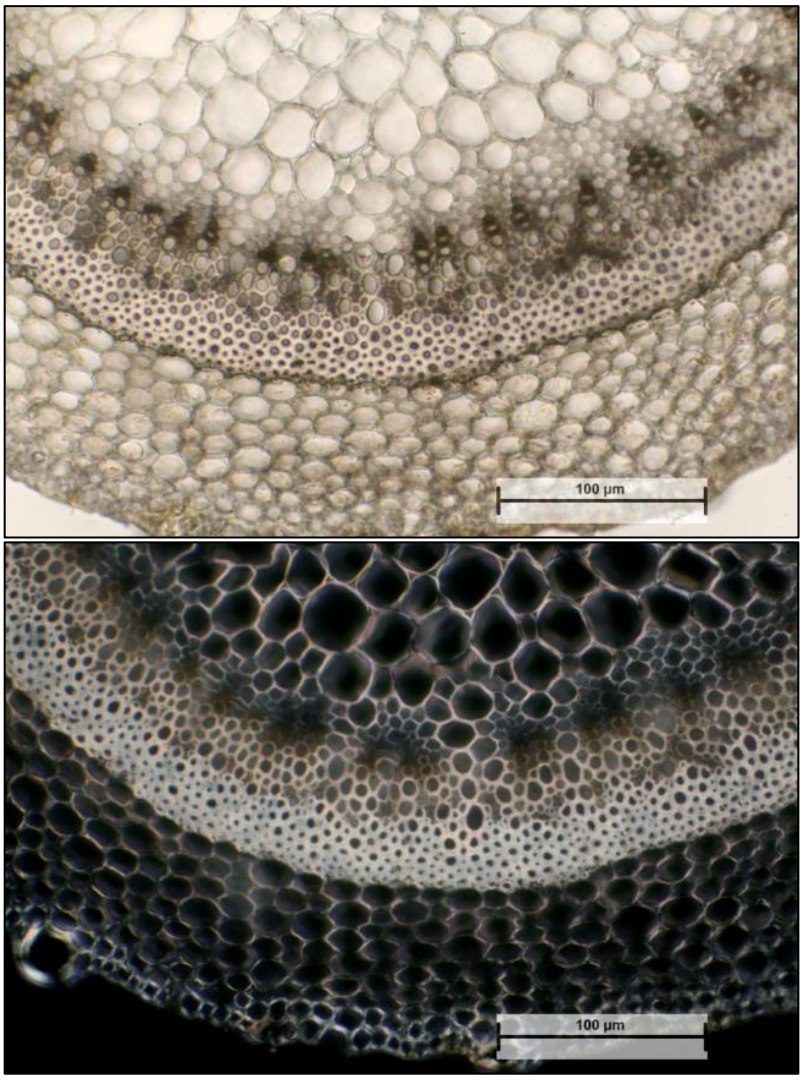


Abbildung 17 Querschnitt der Sprossachse - PC_2 (s. Tabelle 2 S.28) ohne (oben) und mit (unten) Polarisator
Oben: Durchlicht 200-fach, unten: Durchlicht 200-fach

Deckhaare

Abbildung 18 zeigt einen Längsschnitt der Sprossachse von *P. coronopus.* Die einzellreihigen Haare sind im Gegensatz zu den auf den Blättern befindlichen (s. **Abbildung 11** S.47) unterschiedlich ausgeprägt. Die Zellen sind durch quer verlaufende Zellwände getrennt. Das dadurch entstehende Bild erinnert an Treppen. Die Haare sind besonders lang und leuchten bei Verwendung eines Polarisators.

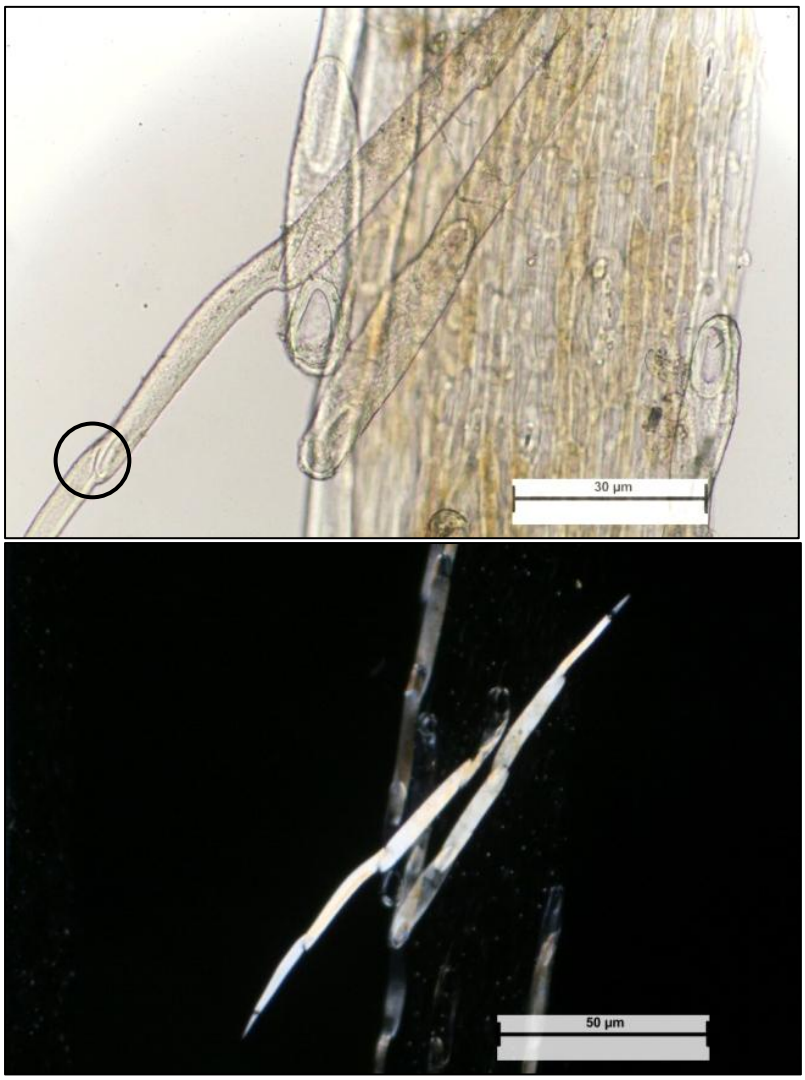


Abbildung 18 Längsschnitt der Sprossachse - PC_2 (s. Tabelle 2 S.28) ohne (oben) und mit (unten) Polarisator. Schwarzer Kreis: Quer verlaufende Zellwände.
Oben: Durchlicht 600-fach, unten: Durchlicht 400-fach

Stomata

Die Stomata der Sprossachse sind dia- bzw. anomozytisch und in Reihen angeordnet.

3.2.3 Blüte

Die Merkmale der Blüte wurden anhand von PC_2 (s. Tabelle 2 S.28) erarbeitet. Für die genaue Vorgangsweise s. Kapitel 2.6 S.32.

Deckhaare

Die Kelchblätter sind mit dickwandigen, einzellreihigen Haaren besetzt (**Abbildung 19**). Diese konnten im Rahmen der Diplomarbeit nicht an Kronblättern festgestellt werden.

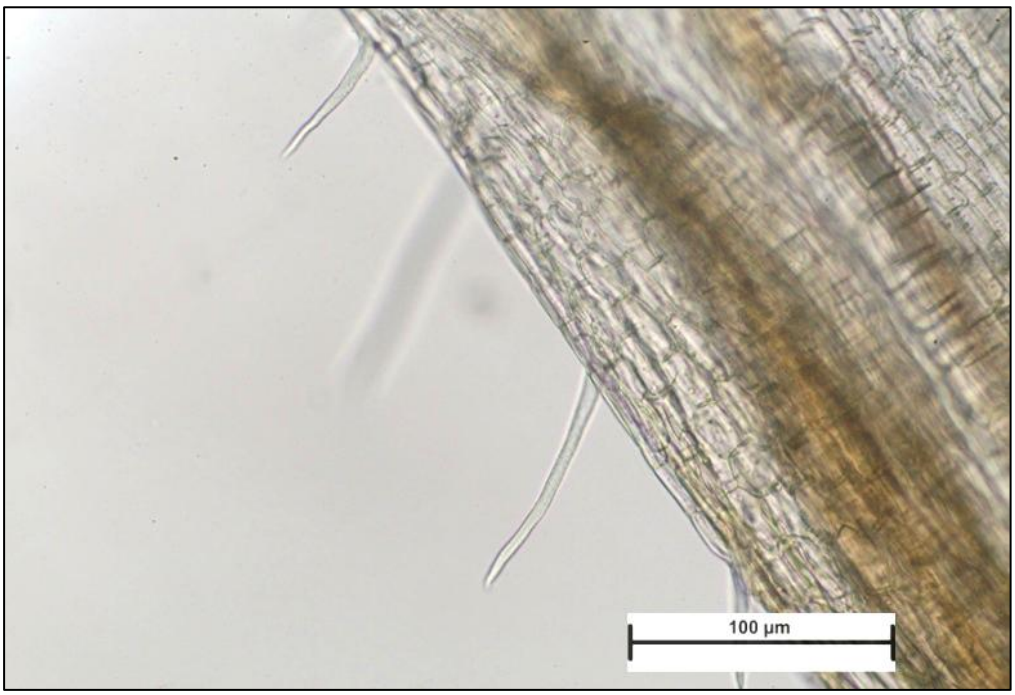


Abbildung 19 Einzellreihige Haare - PC_2 (s. Tabelle 2 S.28), Kelchblatt
Durchlicht 200-fach

Epidermiszellen

Die Epidermiszellen an der Außenseite der Kronblätter sind länglich geformt, wobei die Zellen entlang der Zellwände wellig verzahnt sind (**Abbildung 20**).

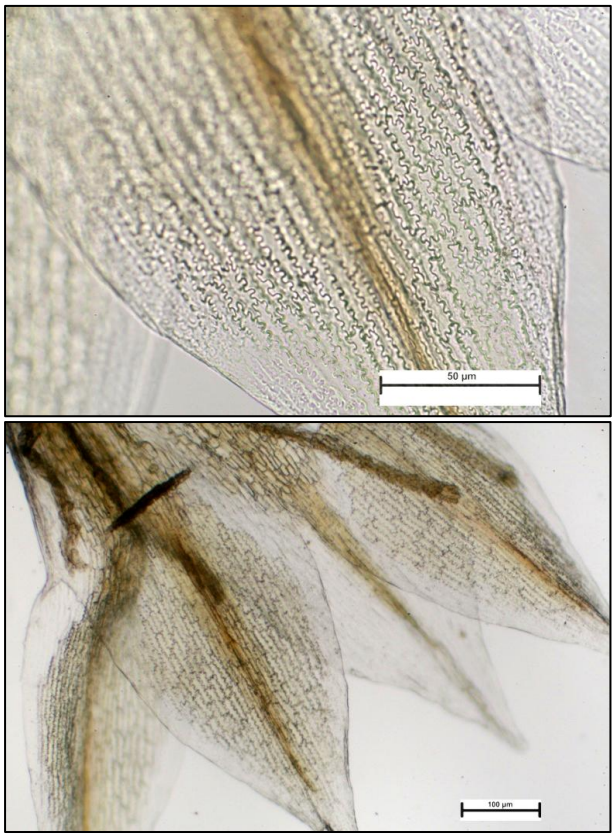


Abbildung 20 Wellig-verzahnte Epidermiszellen - PC_2 (s. Tabelle 2 S.28), Kronblatt
Oben: Durchlicht 400-fach, unten: Durchlicht 100-fach

Pollen

Wie bei *Plantago lanceolata* ist der Pollen rund geformt und besitzt eine kraterartig gestaltete Oberfläche. **Abbildung 21** zeigt einen Pollen neben einem einzellreihigen Deckhaar des Kelchblattes.

Abbildung 21 Pollen mit kraterartiger Oberfläche - PC_2 (s. Tabelle 2 S.28)
Durchlicht 600-fach

3.3 Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie

Dieses Kapitel behandelt alle relevanten dünnschichtchromatographischen Resultate. Eine Diskussion der Ergebnisse folgt in Kapitel 4.2 auf S.86.

Zunächst wurden aus PC_2 (Tabelle 2 S.28) elf Extrakte unterschiedlicher Polarität hergestellt (Tabelle 4 S.30), welche in diversen mobilen Phasen (Tabelle 7 S.34) untersucht und mit zwei Reagenzien (Tabelle 8 S.35) derivatisiert wurden. Ziel war es, aus den elf Extrakten eines auszuwählen, das ein repräsentatives Inhaltsstoffspektrum aufwies und künftig für vergleichende Analysen von Pflanzenmaterial unterschiedlicher Herkunft hergestellt werden sollte. Ebenso galt es, aus der Palette mobiler Phasen unterschiedlicher Polarität ein repräsentatives für künftige Vergleichsanalysen auszuwählen. Zudem wurden die daraus gewonnenen Informationen genutzt, ausgewählte Extrakte mit Referenzsubstanzen (s. Tabelle 6 S.31) zu vergleichen und so eine Identifizierung bestimmter Verbindungen zu ermöglichen.

3.3.1 Untersuchung von Extrakten unterschiedlicher Polarität zur Findung einer geeigneten HPTLC-Methode

Um das gesamte Inhaltsstoffspektrum zu erfassen wurden elf Extrakte unterschiedlicher Polarität (s. Tabelle 4 S.30) hergestellt. Der Auszug erfolgte wie im Kapitel 2.3 auf S.29 beschrieben. Die Extrakte sind in **Abbildung 22** bildlich dargestellt. Die HPTLC-Platten, auf denen zuvor die elf Extrakte aufgetragen worden waren, wurden in den in **Abbildung 23** (S.56) dargestellten HPTLC-Systemen entwickelt. Dabei bediente man sich der von Reich E. (2007) vorgeschlagenen Vorgangsweise. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Extrakt E_5, dem Fließmittel FM2 und Reagenz 1 erhalten und sind in der Abbildung rot gekennzeichnet. In diesem Kapitel folgt die Erklärung warum die Wahl auf diese Methode fiel, sowie ein phytochemischer Vergleich der Extrakte. Die Analyse erfolgte wie im Kapitel 2.7.1 S.33 (Unterkapitel *Hochleistungsdünnschichtchromatographie*) beschrieben. Die gewählten Fließmittel sind in Tabelle 7 auf S.34, die Detektionsreagenzien in Tabelle 8 auf S.35 dargestellt.

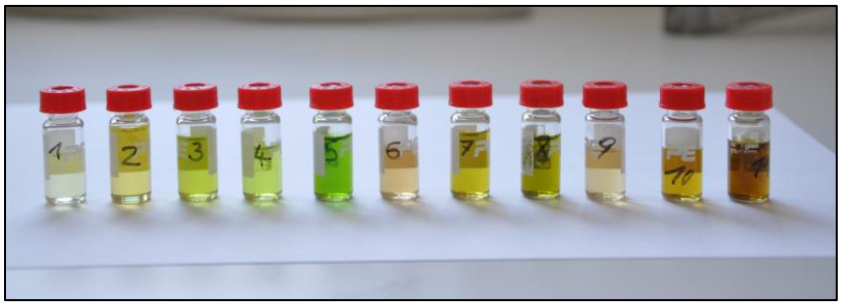


Abbildung 22 Elf Extrakte unterschiedlicher Polarität von PC_2 (s. Tabelle 4 S.30)
PC_2: s. Tabelle 2 S.28

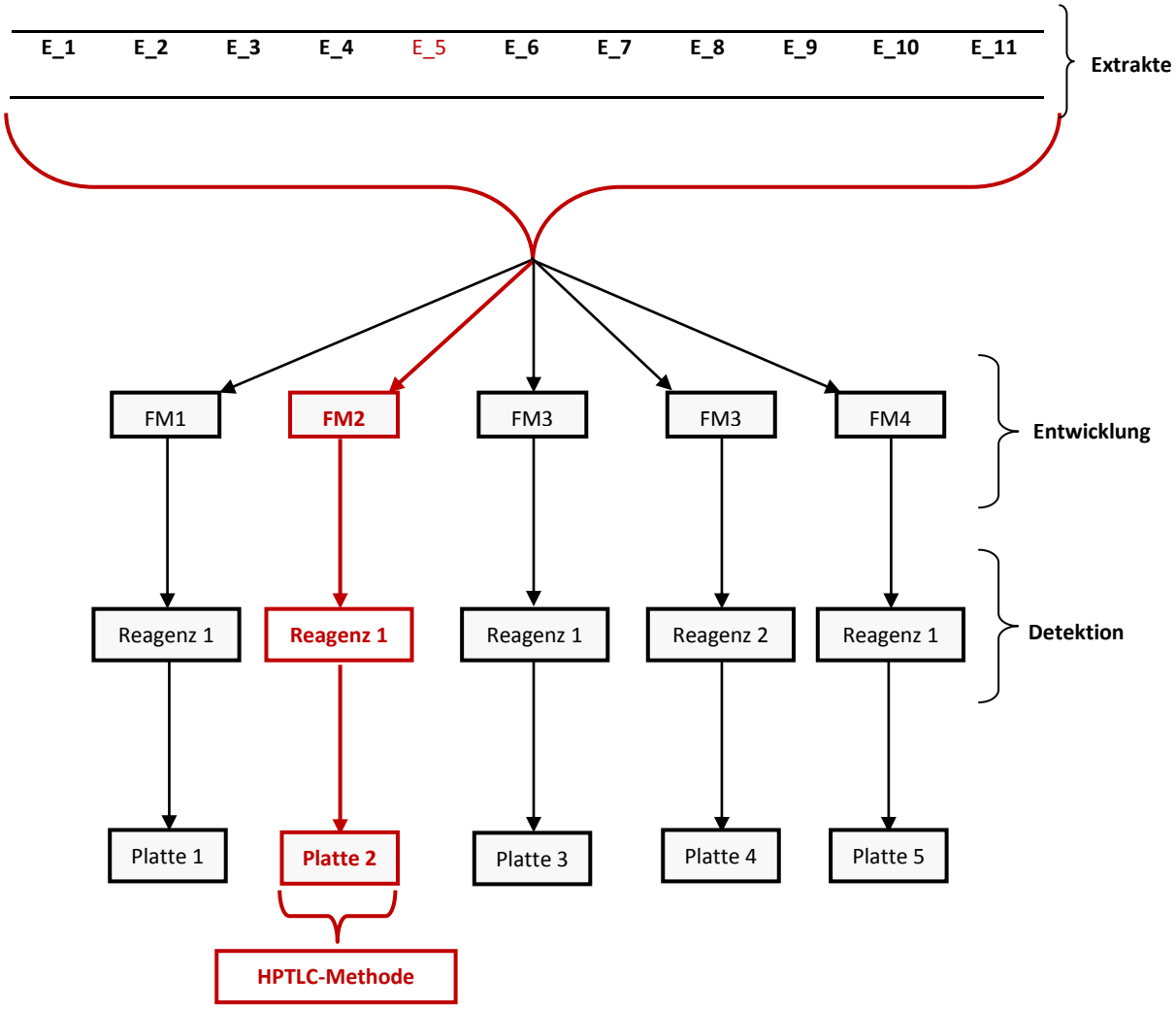


Abbildung 23 Arbeitsschritte und verwendete Methoden zur Auswahl der geeigneten HPTLC-Methode für die Vergleichsanalysen
E_*X*: s. Tabelle 4 S:30
FM*X*: s. Tabelle 7 S.34
Reagenz_*X*: s. Tabelle 8 S.35

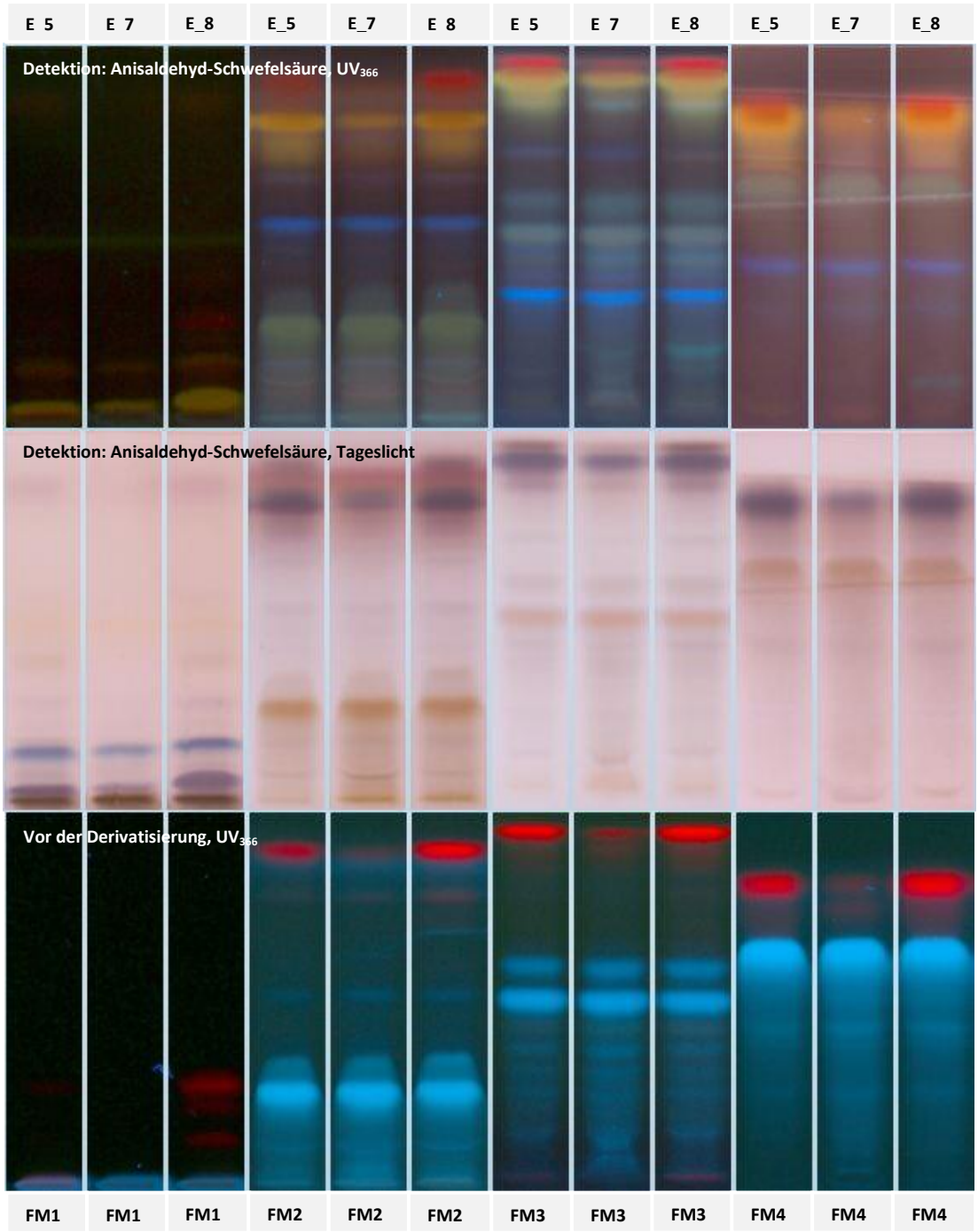


Abbildung 24 Vergleich unterschiedlicher Extrakte und Fließmittel
E_*X*: s. Tabelle 4 S.30
FM*X*: s. Tabelle 7 S.34
Detektionsreagenz: s. Tabelle 8 S.35

- *Auswahl des Extrakts*

Zu Beginn der Methodenentwicklung erfolgte im Anschluss an die in **Abbildung 23** auf S.56 durchgeführten Analysen die Wahl eines geeigneten Extrakts für Vergleichsanalysen von *P. coronopus*. In **Abbildung 24** auf S.57 sind die Extrakte E_5, E_7 und E_8 (s. Tabelle 4 S.30) entwickelt in den mobilen Phasen FM1, FM2, FM3 und FM4 (s. Tabelle 7 S.34) dargestellt.

Bei der Wahl des weiter zu untersuchenden Extrakts entschied man sich für den methanolischen (E_5). Diese Entscheidung lässt sich wie folgt nachvollziehen:
Zunächst musste eine Vorauswahl aus den elf Extrakten unterschiedlicher Polarität (Tabelle 4 S.30) getroffen werden. E_5 (MeOH), E_7 (MeOH+H_2O 8+2) und E_8 (MeOH+Essigsäure$_{konz.}$ 9+1) beinhalteten das größte Inhaltsstoffspektrum. Es umfasste sowohl polare als auch apolare Verbindungen. Die quantitative Ausbeute, wie anhand von **Abbildung 24** erkennbar, war bei E_7, vor allem im Bereich höherer R_f-Werte, am geringsten. E_8 wurde nicht gewählt, da die darin enthaltene konzentrierte Säure in der Lage ist bestimmte Inhaltsstoffe chemisch zu verändern. E_5 (Methanol) ließ ein breites Inhaltsstoffspektrum überblicken, war säurefrei und die quantitative Ausbeute akzeptabel. Der Extrakt wies des weiteren eine hohe Stabilität der Lösung bei der nächtlichen Lagerung im Kühlschrank auf. Es traten zu keinem Zeitpunkt Niederschlagbildung oder Trübungen auf. Darum war kein Erhitzen oder Zentrifugieren, das das Inhaltsstoffspektrum verändern könnten, notwendig.

- *Auswahl des Fließmittels*

Der zweite Schritt in der Findung einer HPTLC-Methode für *P. coronopus* war die Auswahl einer geeigneten mobilen Phase. In **Abbildung 24** ist ein Vergleich der Fließmittel FM1, FM2, FM3 und FM4 anhand der Extrakte E_5, E_7 und E_8 (derivatisiert mit Naturstoffreagenz, Reagenz 2 s. Tabelle 8 S.35) dargestellt. Die verwendeten mobilen Phasen sind Tabelle 7 auf S.34 zu entnehmen, die Extrakte Tabelle 4 S.30.

Entscheidend für die Auswahl des **Fließmittels** war der Wunsch nach einem Überblick über das Polaritätsspektrum an Inhaltsstoffen bei gleichzeitig guter Trennung der Banden. Auf einer stationären Phase wie Kieselgel werden polare Strukturen stärker zurückgehalten, da diese eine intensivere Wechselwirkung mit den Silanolgruppen eingehen können. Sehr polare Fließmittel (wie FM3 oder FM4) besitzen demnach eine starke Elutionskraft,

apolare wie FM1 eine schwache.

Die Entscheidung, welches Fließmittel am geeignetsten für die Analyse von *P. coronopus* sei, fiel auf FM2. Obwohl die Zonierung der einzelnen Banden im Gegensatz zu FM3 unschärfer erscheint, war mit FM2 sowohl im polaren als auch im apolaren Bereich die beste Auftrennung der verschiedenen Substanzklassen erzielbar (s. **Abbildung 24**). Bei FM1 wanderten ausschließlich sehr apolare Substanzen, bei FM3 erfolgte vor allem eine Auftrennung polarer Verbindungen und bei FM4 waren einzelne Banden durch Tailing charakterisiert und die Auftrennung derer schlecht.

- *Auswahl des Detektionsreagenz*

Im letzten Schritt der Methodenfindung erfolgte die Auswahl eines geeigneten Tauchreagenz. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 8 auf S.35 dargestellt. *P. coronopus* erwies sich in ersten Untersuchungen arm an Flavonoiden, weshalb Reagenz 1 (Anisaldehyd - Schwefelsäurereagenz) geeigneter schien. Da aber zusätzlicher Informationsgehalt gewonnen werden konnte, fiel die Wahl sowohl auf Reagenz 1 als auch auf Reagenz 2 (Naturstoffreagenz). Mit Reagenz 1 waren Steroide, Zucker, Terpene und Kohlenwasserstoffe detektierbar, mit Reagenz 2 gelang der Nachweis von phenolischen Verbindungen.

3.3.2 Fingerprint-Vergleich mittels HPTLC

In dem Fingerprint-Vergleich mittels HPTLC wurde das Inhaltsstoffspektrum von drei *P. coronopus* - Individuen unterschiedlicher Herkunft sowie von *Plantago macrorhiza* subsp. *humilis* POIR. und *Plantago serraria* L., zwei der Spezies *P. coronopus* sehr ähnliche Arten, untersucht und verglichen. Dafür wurde von jeder Pflanze ein methanolischer Auszug (Tabelle 5 S.30) hergestellt. Die Extraktbereitung erfolgte wie im Kapitel 2.3 auf S.29 beschrieben. Die fünf Extrakte wurden gemeinsam mit E_5 (s. Tabelle 4 S.30) auf eine DC-Platte aufgetragen. E_5 war bereits drei Tage zuvor hergestellt worden und diente der Überprüfung der Stabilität der Inhaltsstoffe. Die Auftrennung via HPTLC erfolgte in FM2 (Tabelle 7 S.34), die Detektion mit Reagenz 1 und Reagenz 2 (Tabelle 8 S.35). Um die Derivatisierung mit beiden Reagenzien zu ermöglichen, wurde die Platte nach dem Entwicklungsschritt in der Mitte geteilt. Hälfte 1 wurde mit Reagenz 1 und Hälfte 2 mit Reagenz 2 besprüht. Voraussetzung dafür war, dass alle sechs Extrakte auf jeder Hälfte zuvor aufgetragen worden waren. Die Analyse via HPTLC erfolgte wie im Kapitel

2.7.1 auf S.33 (Unterkapitel *Hochleistungsdünnschichtchromatographie*) beschrieben. In Kapitel 3.3.1 auf S.55 ist die Entwicklung der Methode für den Fingerprint-Vergleich mittels HPTLC erklärt.

Um die zu untersuchenden Pflanzen vergleichen zu können, wurden charakteristischen Zonen im Chromatogramm Buchstaben zugewiesen (**Abbildung 25**). Zur Orientierung im Chromatogramm wurde in **Abbildung 25** beispielhaft der Fingerprint von E_5 (s. Tabelle 4 S.30) gewählt.

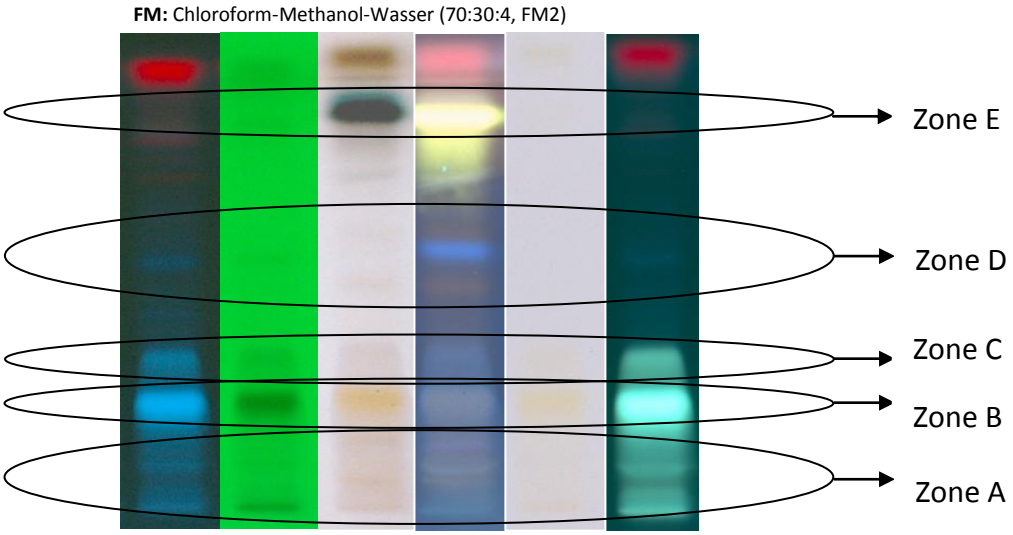


Abbildung 25 Zuordnung unterschiedlicher Zonen anhand von Chromatogrammen von E_5 (s. Tabelle 5 S.30)

- *HPTLC-Fingerprint der Pflanzenextrakte nach dem Entwicklungsschritt*

Bevor nicht-sichtbare Verbindungen derivatisiert wurden, erfolgte eine Fotodokumentation der entwickelten Platte unter UV-Licht bei den Wellenlängen 254 nm und 366 nm. Die Chromatogramme wurden zur besseren Vergleichbarkeit in charakteristische Zonen A - E gegliedert. **Abbildung 26** auf S. 61 zeigt den Fingerprint-Vergleich der Extrakte des akquirierten Pflanzenmaterials (s. Tabelle 5 S.30) im Anschluss an die Entwicklung der Platte. In Zone A findet man die polarsten Inhaltsstoffe der jeweiligen Pflanzen, in Zone E die apolarsten.

In **Zone A** sind optisch geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Auszügen erkennbar. Bei Extrakt H_4 kann man unter UV_{254} eine weitere Bande feststellen.
Zone B lässt vermuten, dass sie eine der Hauptkomponenten beinhaltet. Unter UV_{366} ist eine starke blaue Fluoreszenz und unter UV_{254} eine Löschung erkennbar. Die Intensität

dieser Bande ist, mit Ausnahme von H_5, bei allen Extrakten nahezu ident. Da in Zone B eine stark ausgeprägte, tailende Bande zu erkennen ist, wäre es ebenso möglich, dass die intensive Bande aus mehreren schwächeren gebildet wird. Die Banden von strukturell sehr ähnlichen Verbindungen oder Isomeren liegen bei vergleichbaren R_f-Werten und könnten die intensive Fluoreszenz bewirken.

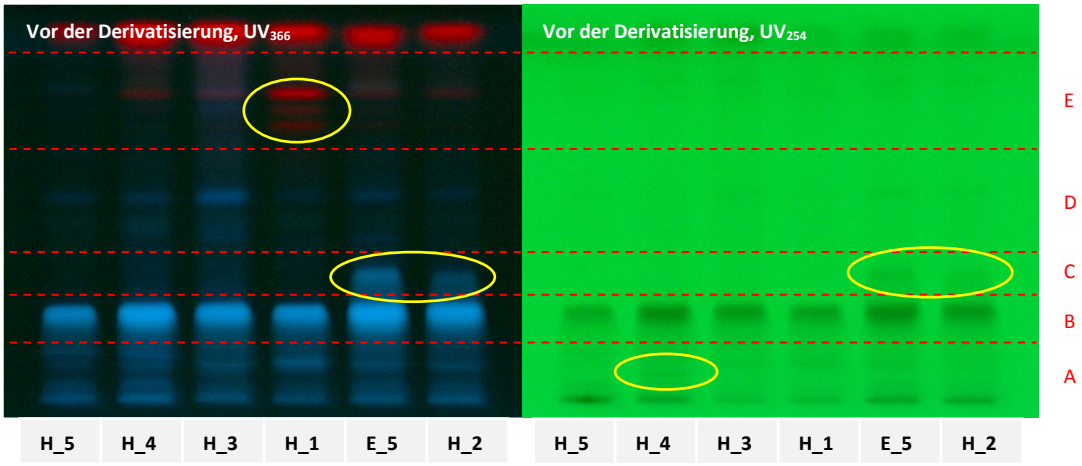


Abbildung 26 HPTLC-Fingerprintvergleich nach der Entwicklung
H_*X*: s. Tabelle 5 S.30
E_*X:* s. Tabelle 4 S.30
rechts (rot): Zone *X*, s. Abbildung 25 S.60
gelb: auffällige Unterschiede zwischen den Pflanzenextrakten
mobile Phase: FM2, s. Tabelle 7 S.34

In **Zone C** treten ausschließlich bei E_5 und H_2 blau fluoreszierende (UV_{366}) und unter UV_{254} löschende Banden auf. Sie sind schwächer konzentriert als die Bande in Zone B, tragen allerdings dieselbe Färbung.

In **Zone D** treten geringfügig unterschiedliche Banden auf. Bei H_1, E_5 sowie H_2 sind drei schwach fluoreszierende, nicht löschende Banden erkennbar. Im Gegensatz dazu sind bei H_3, H_4 und H_5 die Banden in dieser Zone zwar ähnlich gefärbt, treten allerdings an anderer Stelle auf. Die Intensität der Fluoreszenz ist bei allen Pflanzenextrakten sehr gering, die chromatographischen Eigenschaften dieser Substanzen aber ähnlich: Die R_f-Werte liegen nah beieinander, die Banden fluoreszieren unter UV_{366} und löschen nicht unter UV_{254}. Es könnte sich um strukturell ähnliche Verbindungen handeln.

In **Zone E** sind, mit Ausnahme von H_1, wenig Unterschiede erkennbar. Bei H_1 sind 3 intensiv fluoreszierende rote Banden festzustellen, die bei anderen Auszügen nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt sind.

Zusammenfassend konnten durchaus Unterscheide zwischen den Fingerprints des akqui-

rierten Pflanzenmaterials nach der Entwicklung der Platte festgestellt werden. Besonders in Zone C sind ausschließlich bei E_5 und H_2 intensiv blau fluoreszierende, unter UV_{254} löschende Banden erkennbar. In Zone E sind bei H_1 drei rot fluoreszierende Banden sichtbar, die bei anderen Extrakten nicht oder nur schwach ausgeprägt sind. In anderen Zonen des Chromatogramms sind geringfügige Unterschiede festzustellen. Um nicht-sichtbare Verbindungen detektieren zu können, erfolgte im Anschluss die Derivatisierung mit Tauchreagenzien und ein erneuter Vergleich.

- *HPTLC-Fingerprint der Pflanzenextrakte nach der Derivatisierung*

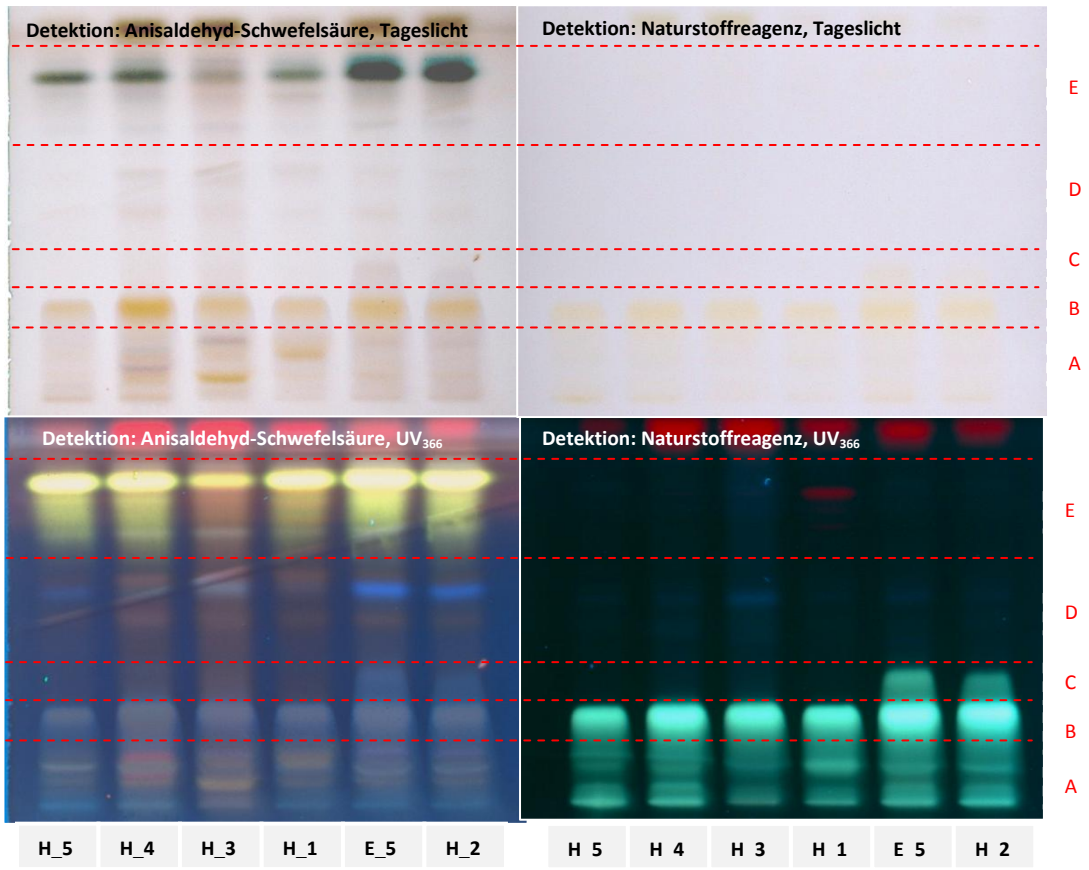


Abbildung 27 HPTLC-Fingerprintvergleich nach Derivatisierung
H_*X*: s. Tabelle 5 S.30
E_*X:* s. Tabelle 4 S.30
rechts (rot): Zone *X*, s. Abbildung 25 S.60
mobile Phase: FM2, s. Tabelle 7 S.34
Detektionsreagenz: s. Tabelle 8 S.35

Abbildung 27 stellt den HPTLC-Fingerprintvergleich nach der Derivatisierungsreaktion mit Reagenz 1 und 2 (s. Tabelle 8 S.35) dar. Die Chromatogramme werden wiederum in

fünf Zonen A - E gegliedert. Nach der Derivatisierung mit Tauchreagenzien, erfolgte erneut eine Fotodokumentation.

In **Zone A** sind nach der Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Reagenz 1, s. Tabelle 8 S.35) sowohl bei Betrachtung unter Tageslicht als auch unter UV_{366} deutliche Unterschiede zu erkennen. Die auftretenden Banden sind ausschließlich bei H_5 und den zwei PC_2 - Extrakten (E_5 und H_2) optisch ähnlich. Bei H_4, H_3 und H_1 erscheinen zusätzliche Banden, die zudem anders gefärbt sind. Nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz (Reagenz 2) erhalten wir in Zone A unter UV_{366} bläulich fluoreszierende Banden. In diesem System treten weniger Unterschiede zu Tage. Bei Tageslicht sind leicht gelb gefärbte Banden erkennbar.
In **Zone B**, in der nach dem Entwicklungsschritt der Platte eine der Hauptkomponenten oder mehrere überlagernde Verbindungen vermutet wurden, ist in allen vier Chromatogrammen bezüglich der Färbung und der R_f - Werte der Bande kaum ein Unterschied erkennbar. Die Intensität ist bei H_5, H_3 und H_1 geringfügig schwächer. Es handelt sich hierbei vermutlich um Inhaltsstoffe, die in allen zu vergleichenden Pflanzen enthalten sind.
In **Zone C** treten ausschließlich bei E_5 und H_2 Banden auf. Die Färbung ist sowohl bei Detektion mit Reagenz 1 als auch mit Reagenz 2 der Bande in Zone B ident. Es handelt sich hierbei vermutlich um strukturell ähnliche Verbindungen.
In **Zone D** treten mehrere Unterschiede auf. Nach Detektion mit Reagenz 1 sind H_5, E_5 und H_2 durch eine rote, gefolgt von einer blauen und wiederum einer roten schmalen Bande charakterisiert, bei H_4, H_3 und H_1 fehlt hingegen die blaue Bande. Nach Derivatisierung mit Reagenz 2 sind kaum Banden erkennbar.
Zone E fällt nach Verwendung von Reagenz 1 durch intensiv gelb fluoreszierende Banden unter UV_{366} auf. Bei Tageslicht sind diese blau-violett gefärbt. Die Intensität ist bei H_3 am schwächsten. Direkt darüber befindet sich eine besonders schmale blaue Bande (Tageslicht). Unter Verwendung von Reagenz 2 diese Banden nicht erkennbar. Bei H_1 ist eine zusätzliche rote Bande zu sehen.
Zusammenfassend sind durchaus Unterschiede zwischen den Extrakten des akquirierten Pflanzenmaterials zu sehen. Diese gestalten sich nach der Derivatisierung mit Tauchreagenzien größer als nach der Entwicklung der Platte. Die Unterschiede betreffen vor allem die Intensität der Banden (Zone B und Zone E), sowie den Fingerprint (Zone A und D).

Vor der Derivatisierung (s. **Abbildung 26** S.61) sind kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Extrakten zu erkennen. E_5 und H_2 (beide PC_2, *P. coronopus*, s. Tabelle 2 S.28) weisen als einzige Auszüge eine zusätzliche Bande auf. Nach der Derivatisierung (s. **Abbildung 27** S.62) mit Naturstoffreagenz (Reagenz 2) verhält sich die Situation ähnlich. Nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz treten Unterschiede zwischen den Extrakten zu Tage. Dabei ähneln die Chromatogramme von H_2 (PC_2) und H_5 (PMH, *Plantago macrorhiza* subsp. *humilis)* einander, sowie die von H_1 (PC_1) und H_4 (PS, *Plantago serraria*). Extrakt H_3 (PC_3) fällt aus der Reihe. Unterschiede zwischen den Auszügen betreffen sowohl die Intensität als auch die Farbe der Banden. In Zone B ist bei allen Extrakten eine einheitlich gefärbte, intensive Bande erkennbar.

- *Überprüfung der Extraktstabilität*

Anhand von E_5 und H_2 (s. Tabelle 5 S.30), die beide mit derselben Droge hergestellt worden waren, wurde die Stabilität des methanolischen Extrakts überprüft. E_5 (3 Tage alt, Kühlung über Nacht bei 5 - 8°) wurde direkt neben H_2 aufgetragen. Die Ergebnisse zeigten, dass der Extrakt stabil ist. In keinem der Chromatogramme kam es zum Auftreten zusätzlicher Banden, das auf die Bildung von Abbauprodukten zurückzuführen sein könnte. Des weiteren war die gleichbleibende Intensität der Banden mit freiem Auge erkennbar.

3.3.3 Vergleich des Extrakts mit Referenzsubstanzen (Standards)

Um eine Identifizierung von Substanzen bzw. Substanzklassen im methanolischen Extrakt H_2 (s. Tabelle 5 S.30) von *P. coronopus* zu ermöglichen, wurde dessen dünnschichtchromatographischer Fingerprint mit der ganzen Palette zur Verfügung stehender Referenzsubstanzen verglichen. Dafür wurden in zwei HPTLC-Analysen jeweils elf Banden aufgetragen. Die elf Banden setzten sich aus viermal *P. coronopus* - Extrakt H_2 (s. Tabelle 5 S.30) und den Standards St_1 bis St_7 (s. Tabelle 6 S.31) zusammen. Die Extraktbereitung erfolgte wie in Kapitel 2.3 auf S.29, die Standardherstellung wie in Kapitel 2.4 S.31 beschrieben. Die Entwicklung der Platten erfolgte mit FM2 (s. Tabelle 7 S.34), die Derivatisierung einer Platte mit Reagenz 1, die einer anderen mit Reagenz 2 (s. Tabelle 8 S.35). Die HPTLC-Analyse erfolgte wie im Kapitel 2.7.1 auf S.33 (Unterkapitel

Hochleistungsdünnschichtchromatographie) beschrieben.
Im Falle der Standards St_1 (Sitosterol) und St_6 (Rutin, s. Tabelle 6 S.31) wurde zusätzlich eine klassische dünnschichtchromatographische Untersuchung durchgeführt, um deren Vorhandensein in anderen Extrakten als dem methanolischen zu überprüfen. St_1, E_6 und E_8 wurden dazu bandenförmig auf die Kieselgelplatte aufgetragen, in FM3 entwickelt und in Reagenz 2 getaucht. St_6 wurde gemeinsam mit H_2 in FM1 entwickelt und mit Reagenz 1 derivatisiert. Die Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.7.1 auf S.33 (Unterkapitel: *Klassische Dünnschichtchromatographie*) beschrieben.

Im folgenden Kapitel wird der Vergleich des Extrakts von *P. coronopus* mit Referenzsubstanzen via HPTLC behandelt. Der Vergleich wurde durchgeführt, um erste Informationen über Inhaltsstoffe zu bekommen.

- *Vergleich mit Referenzsubstanzen nach der Entwicklung der Platte*

Abbildung 28 auf S. 66 stellt den Fingerprint des Extrakts H_2 den verschiedenen Referenzsubstanzen (St_*X*, *s*. Tabelle 6 S.31) nach der Entwicklung der Platte gegenüber. Anhand von **Abbildung 28** lassen sich vor allem zu St_3, St_4 und St_7 Aussagen treffen. Bei diesen Standards handelt es sich um Phenylpropanoide, welche in diesem chromatographischen System eine blaue Fluoreszenz liefern. Der R_f - Wert liegt ca. bei 0.07-0.37. In dem Fingerprint von Extrakt H_2 sind bei R_f - Werten von ca. 0.07 bis 0.32 mehrere ebenso gefärbte Banden erkennbar, weshalb man davon ausgehen kann, dass in *P. coronopus* strukturell ähnliche Phenylpropanoide enthalten sind. Auf der Höhe von St_3 (Chlorogensäure, $R_f = 0.07$) ist bei H_2 eine blau fluoreszierende Bande zu erkennen. Da Chlorogensäure in der Literatur als Inhaltsstoff beschrieben wird, ist ein Vorhandensein in *P. coronopus* denkbar. St_4 setzt sich aus Kaffee- und Chlorogensäure zusammen. Auf der Höhe der Kaffeesäure ($R_f = 0.37$) ist im Auszug eine sehr schwache Bande zu erkennen. St_7 (Verbascosid, $R_f = 0.23$) könnte anhand der HPTLC-Daten Teil des Inhaltsstoffspektrums der Pflanze sein. Dies bestätigt des weiteren die Literatur sowie die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführte phytochemische Analyse mittels HPLC und LC-MS. Verbascosid liegt auf der Höhe der am stärksten konzentrierten Bande ($R_f = 0.22$) im Extrakt.
Zusammenfassend konnten anhand dieser Ergebnisse strukturell sehr ähnliche Phenylpropanoidderivate in *P. coronopus* nachgewiesen werden. Um diese Aussage zu verifizieren, sind jedoch weitere Analysen nötig (s. Kapitel 3.5 S.78).

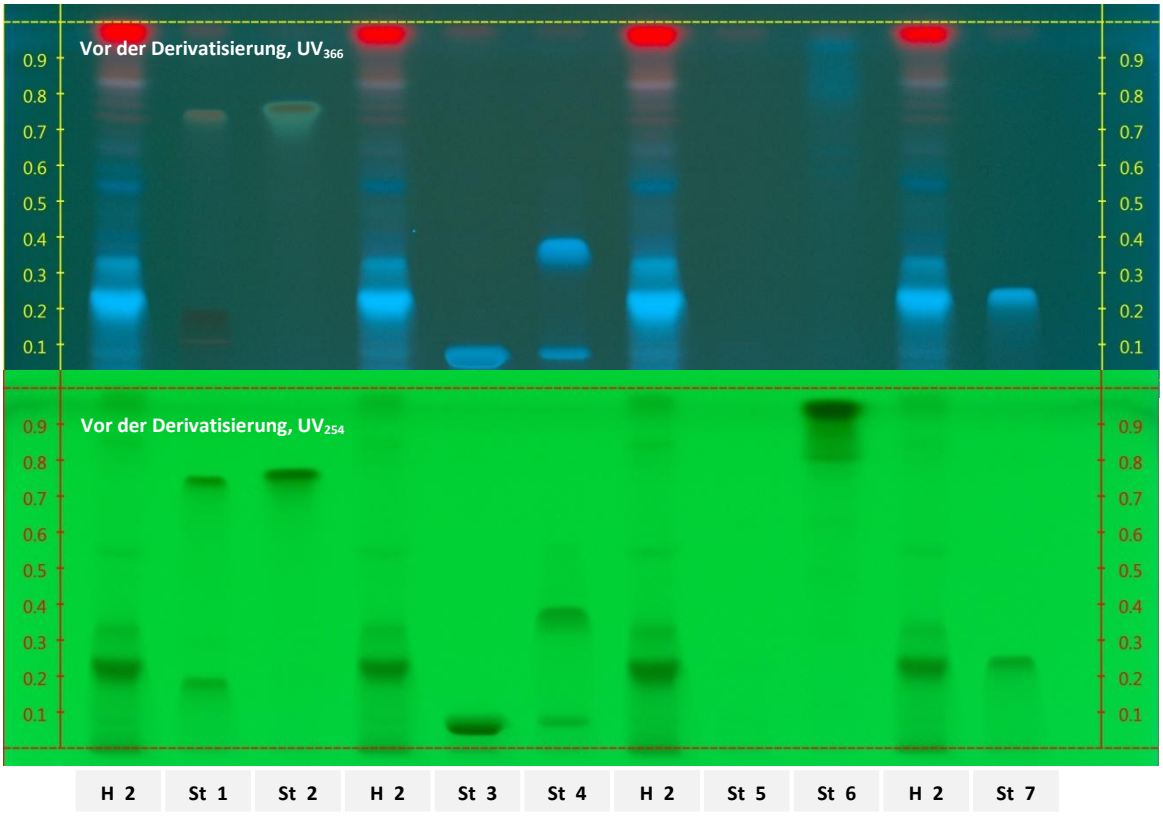


Abbildung 28 Vergleich von H_2 mit Referenzsubstanzen nach der Entwicklung
H_2: s. Tabelle 5 S.30
St_*X*: s. Tabelle 6 S.31
mobile Phase: FM2, s. Tabelle 7 S.34

- *Vergleich mit Referenzsubstanzen nach der Derivatisierung*

Abbildung 29 stellt den Fingerprint des Extrakts H_2 (s. Tabelle 5 S.30) ausgewählten Referenzsubstanzen (St_X, s. Tabelle 6 S.31) nach der Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Reagenz 1, s. Tabelle 8 S.35) gegenüber. Nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Reagenz 1, s. Tabelle 8 S.35) werden vor allem Steroide, Zucker und Terpene sichtbar. St_5 (Aucubin, R_f = 0.27) wurde zu konzentriert aufgetragen. Da das Iridoid allerdings auf der Höhe der Bande von Verbascosid (St_7) zu liegen kommt, ist es schwierig eine Aussage zu treffen. Anhand der Farbgebung im Chromatogramm würde man eher auf das Vorhandensein von St_7 schließen, jedoch ist nicht auszuschließen, dass kleine Mengen von St_5 überdeckt wurden. Bezüglich St_6 (Sitosterol, R_f = 0.91) ist im Fingerprint des Extrakts auf derselben Höhe eine schmale Bande erkennbar. Die violette Farbe (UV_{366}) stimmt ebenso überein.

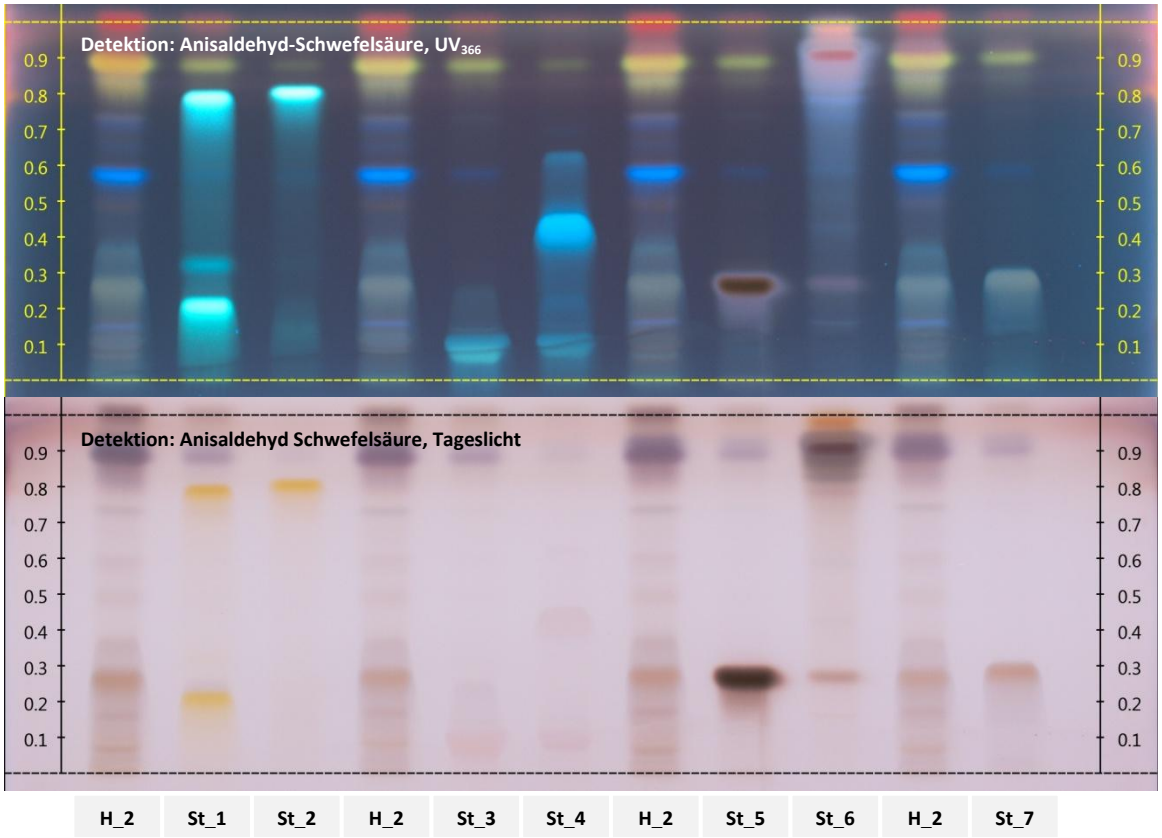


Abbildung 29 Vergleich von H_2 mit Referenzsubstanzen nach Derivatisierung)
H_2: s. Tabelle 5 S.30
St_*X*: s. Tabelle 6 S.31
mobile Phase: FM2, s. Tabelle 7 S.34
Detektionsreagenz: s. Tabelle 8 S.35

Um das Vorhandensein von Sitosterol im Extrakt zu klären, wurde zusätzlich eine klassische dünnschichtchromatographische Untersuchung durchgeführt (s. **Abbildung 31** S.69). Dazu war eine andere mobile Phase nötig, da Sitosterol in FM2 (s. Tabelle 7 S.34) an die Front transportiert wird.

Abbildung 30 stellt den Fingerprint des Extrakts H_2 (s. Tabelle 5 S.30) ausgewählten Referenzsubstanzen (St_*X*, s. Tabelle 6 S.31) nach der Derivatisierung mit Naturstoffreagenz 2 (Reagenz 2, s. Tabelle 8 S.35) gegenüber.

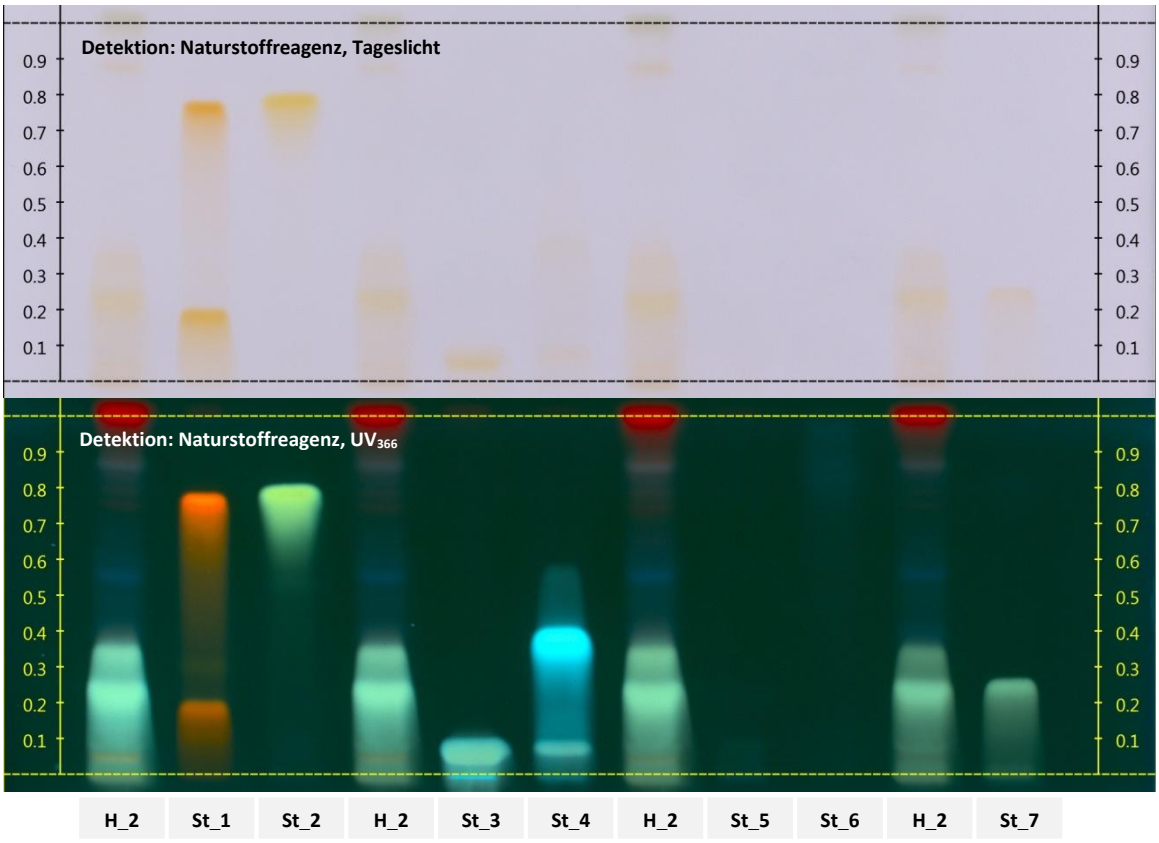


Abbildung 30 Vergleich von H_2 mit Referenzsubstanzen nach Derivatisierung
H_2: s. Tabelle 5 S.30
St_*X*: s. Tabelle 6 S.31
mobile Phase: FM2, s. Tabelle 7 S.34
Detektionsreagenz: s. Tabelle 8 S.35

Bei St_1 und St_2 handelt es sich um Flavonoide, weshalb deren Vorhandensein nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz ausgewertet wurde (s. **Abbildung 30**). Auf der Laufstrecke von St_1 (Rutin, Rf = 0.79) sind 2 gelb-orange Banden (sowohl bei Tageslicht als auch unter UV_{366}) erkennbar. Das deutet auf eine Verunreinigung des Standards, welche vermutlich auf die Bildung von Abbauprodukten des Rutins zurückzuführen ist, hin. Im Extrakt ist bei vergleichbaren R_f- Werten keine Gelb-Orangefärbung erkennbar. Rutin scheint nicht enthalten zu sein. Bei St_2 (Isoquercitrin, R_f = 0.80) verhält sich die Lage ähnlich: Vergleicht man die beiden Fingerprints, ist auf Höhe des St_2 im Extrakt keine Bande erkennbar. Der *P. coronopus* - Extrakt erwies sich demnach arm an Flavonoiden. Nach Derivatisierung mit Reagenz 2 war keine typische Gelb-Orangefärbung

unter Tageslicht oder UV_{366} sichtbar. Um festzustellen, ob in anderen Extrakten als dem methanolischen Flavonoide enthalten sind, wurde in weiterer Folge eine klassische dünnschichtchromatographische Untersuchung durchgeführt (s. **Abbildung 32** S.70).

- *Vergleich mit St_6 (Sitosterol)*

Da es sich bei Sitosterol um eine apolare Substanz handelt, wurde sie unter Verwendung von FM2 (s. Tabelle 7 S.34) an die Front transportiert. Für die klassisch dünnschichtchromatographische Untersuchung wählte man FM1 und verglich St_6 (Sitosterol) mit H_2 (s. **Abbildung 31**).

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz, UV_{366}

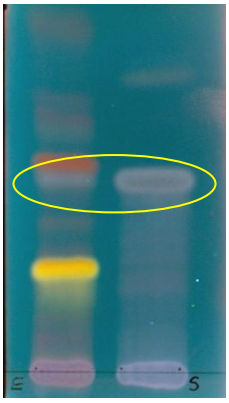


Abbildung 31 Dünnschichtchromatographischer Vergleich von H_2 (linke Bande) mit St_6 (rechte Bande)
H_2: s. Tabelle 5 S.30
St_6: s. Tabelle 6 S.31
mobile Phase: FM1, s. Tabelle 7 S.34
Detektionsreagenz: s. Tabelle 8 S.35

Wie in **Abbildung 31** erkennbar, war auf der Höhe der Bande von St_6 im Fingerprint des Extrakts eine ebenso gefärbte Bande zu erkennen. Sitosterol ist demnach vermutlich eine Komponente des Inhaltsstoffspektrums von *P. coronopus*.

- *Vergleich mit St_1*

Um festzustellen ob in anderen Extrakten als dem methanolischen St_1 (Rutin) enthalten ist, wurde St_1 mit E_6 (Wasser) und E_8 (Methanol - Essigsäure $_{konz.}$ 9+1, s. Tabelle 4 S.30) verglichen (s. **Abbildung 32**). Rutin ist vergleichsweise polar. Darum wurde mit FM2 (s. Tabelle 7 S.34) gearbeitet. Des weiteren handelt es sich um ein Flavonoid, weshalb mit Reagenz 2 (s. Tabelle 8 S.35) derivatisiert wurde.

Detektion: Naturstoffreagenz Tageslicht (links) und UV_{366} (rechts)

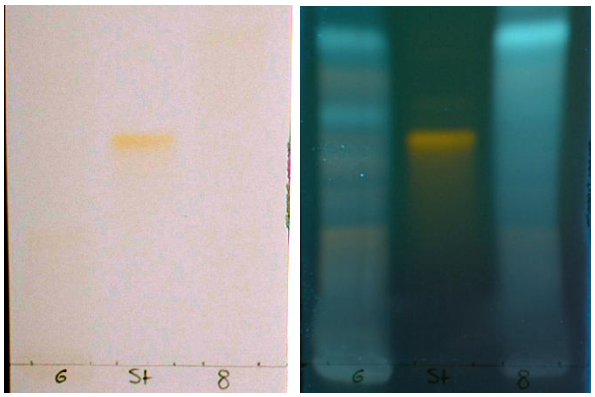


Abbildung 32 Dünnschichtchromatographischer Vergleich von E_6 (*6*) und E_8 (*8*) mit St_1 (mittlere Bande)
E_*X:* s. Tabelle 4 S.30
St_1: s. Tabelle 6 S.31
mobile Phase: FM2, s. Tabelle 7 S.34
Detektionsreagenz: s. Tabelle 8 S.35

Anhand von **Abbildung 32** ist zu erkennen, dass in keinem der beiden Extrakte St_1 enthalten ist. Da die unter UV_{366} blau fluoreszierenden Phenylpropanoide hoch konzentriert enthalten sind, könnte es sein, dass schwache Banden überdeckt wurden. Bei Betrachtung unter Tageslicht sind jedoch im Fingerprint der Extrakte keine Banden sichtbar. Demnach ist keine endgültige Aussage zu treffen, weitere Untersuchung sind erforderlich.

3.4 Untersuchungen mittels HPLC

Das folgende Kapitel fasst sämtliche Ergebnisse der Untersuchungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie zusammen. Zunächst wird die Entwicklung einer geeigneten Methode beschrieben, danach der Vergleich eines Extrakts von *P. coronopus* mit Referenzsubstanzen (= Standards) und zuletzt der Vergleich von Auszügen unterschiedlicher Polarität von *P. coronopus*.

3.4.1 Methodenentwicklung

Ziel der Methodenentwicklung war es, eine Methode, bestehend aus einer mobilen und stationären Phase, zu finden, bei der die wichtigsten Peaks gut voneinander getrennt sind und bei akzeptablen Retentionszeiten erscheinen. Dazu war es nötig unterschiedliche sta-

tionäre und mobile Phasen zu testen. Dafür wurde der Extrakt H_2 (s. Tabelle 5 S.30) 1:1 mit Methanol in HPLC-Qualität verdünnt. Die Extraktherstellung erfolgte wie in Kapitel 2.3 auf S.29 beschrieben. Es wurden 8 Analysen A1 - A8, deren Unterschiede in relevanten HPLC-Parametern wie der gewählten stationären Phase oder dem Gradienten der mobilen Phase lagen, durchgeführt. Die Auswahl der Säulen und Gradienten für die Analysen erfolgte anhand der in der Literatur gegebenen Information über das Inhaltsstoffspektrum von *P. coronopus*. Tabelle 11 auf S. 39 listet die durchgeführten Analysen A1 - A8 auf und enthält alle Informationen zu stationären und mobilen Phasen. Anhand der Ergebnisse entwickelte man Methode M1 und M2 (s. Tabelle 10 S.38), die dem Vergleich eines Extrakts von *P. coronopus* mit Referenzsubstanzen (s. Kapitel 3.4.2 S.74) und dem Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität (s. Kapitel 3.4.3 S.76) dienten.

Abbildung 33 zeigt das Ergebnis der Analyse A1 (s. Tabelle 11 S.39). Es galt, einen ersten Überblick über die im Chromatogramm von H_2 (s. Tabelle 5 S.30) auftretenden Peaks zu gewinnen. Deshalb wurde ein steiler Acetonitril-Gradient von 2 %/min, beginnend bei 10 % ACN, gewählt. H_2 wurde analysiert, da der Extrakt sich anhand der Untersuchungen mittels HPTLC als inhaltsstoffreich herausstellte (s. Kapitel 3.3 S.55). Es wurde mit einer Acclaim C18 - Säule (s. Tabelle 11 S.39) gearbeitet, da diese gut zur Trennung polarer Substanzen geeignet ist. Die Analyse startete bei 10 % ACN und wurde innerhalb von 45 min auf 100 % gesteigert, weshalb sämtliche Verbindungen im Extrakt erfasst werden konnten. Die größten Peaks erschienen bei A1 in einer kurzen Zeitspanne (zwischen 10 - 13 min). Des weiteren kam es zur Ausbildung von Mehrfach-Peaks, strukturell ähnliche Substanzen überlagerten. Da das primäre Ziel von A1 war, einen Überblick über das Peakspektrum zu bekommen, änderte man für die folgende Analyse A2 (s. Tabelle 11 S.39) den Gradienten der mobilen Phase. Im Fall von A2 wurde in den ersten 60 min mit einem weniger steilen Gradienten gearbeitet (0.5 % ACN/min), um eine bessere Trennung der sich in A1 überlagernden Peaks zu ermöglichen (s. **Abbildung 34** S.72). Wie in **Abbildung 34** zu erkennen, war eine bessere Trennung gelungen. A2 gab einen Überblick über das Inhaltsstoffspektrum innerhalb eines großen Polaritätsbereichs. Die Trennung einzelner Peaks sollte in weiterer Folge dennoch optimiert werden.

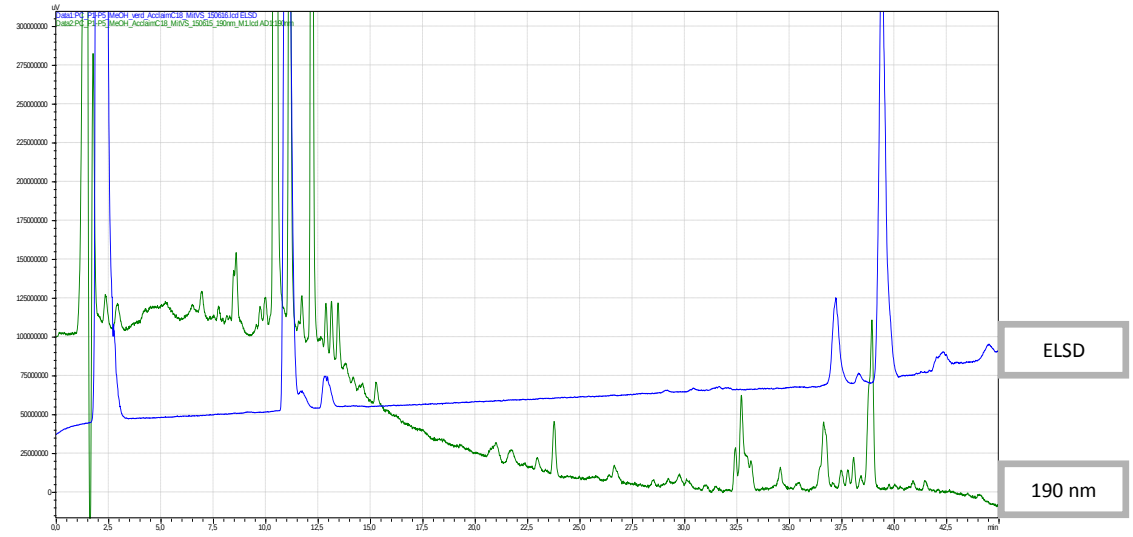


Abbildung 33 HPLC - Analyse A1 von verdünntem H_2 und Detektion mittels DAD und ELSD
H_2: s. Tabelle 5 S.30
A1: s. Tabelle 11 S.39

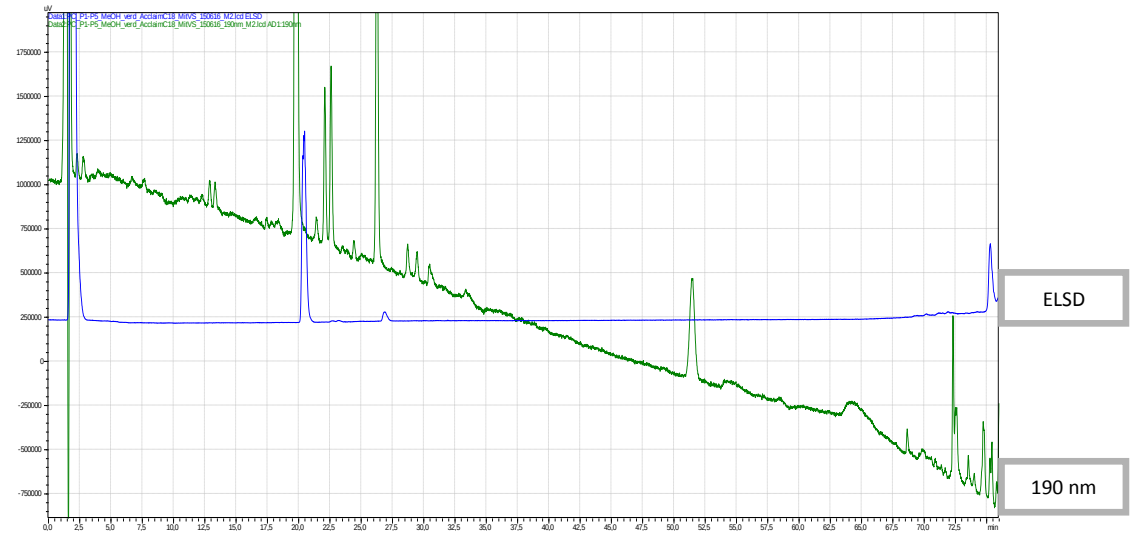


Abbildung 34 HPLC - Analyse A2 von verdünntem H_2 und Detektion mittels DAD und ELSD
H_2: s. Tabelle 5 S.30
A2: s. Tabelle 11 S.39

Um weitere stationäre Phasen zu testen, wählte man für die folgenden Analysen eine Aquasil C18 - sowie eine Synergi Polar-RP - Säule und führte A3 und A4 durch. Die Parameter der mobilen Phase stimmten mit denen von A2 überein. Die Trennung der Peaks war in diesen Analysen allerdings schlechter als in A2. In A5, A6 und A7 wurde eine Luna CN - Säule zur Steigerung der Retention polarer Komponenten eingesetzt. Des weiteren wurde der Gradient der mobilen Phase in diesen Analysen geändert. Alle drei Analysen lieferten allerdings schlechte Ergebnisse, da sämtliche Peaks innerhalb der ersten

Minuten erschienen (s. **Abbildung 35**). In A7 wurde mit abnehmenden anstatt von ansteigenden Acetonitril - Konzentrationen gearbeitet, dennoch konnte keine stärkere Retention der Komponenten ermöglicht werden.

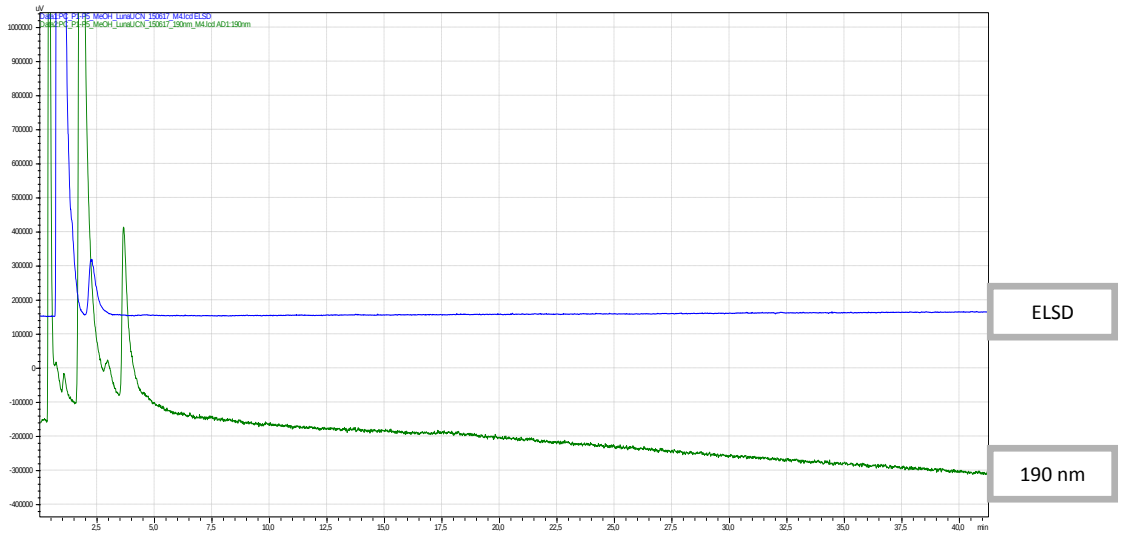


Abbildung 35 HPLC - Analyse A6 von verdünntem H_2 und Detektion mittels DAD und ELSD
H_2: s. Tabelle 5 S.30
A6: s. Tabelle 11 S.39

Mittels der Analyse A8 (s. Tabelle 11 S.39), bei der man sich einer von A. Pitschmann entwickelten Methode bediente (2015), wurde das beste Ergebnis erzielt. **Abbildung 36** auf S.74 stellt das Ergebnis von A8 bei drei Wellenlängen dar. A. Pitschmann führte Experimente mit Verbascosid, einer Substanz, die auch als Inhaltsstoff von *P. coronopus* beschrieben ist, durch. Die Gradientensteigerungsrate, beginnend bei 5 % ACN, betrug bis zu Minute 26 0.5 % ACN/min, anschließend bis zu Minute 46 0.25 % ACN/min. Nach Minute 46 wurde mit 95 % Acetonitril gespült, weshalb einige Komponenten des Pflanzenextrakts H_2 (s. Tabelle 5 S.30) erst im Spülschritt eluiert wurden. Dadurch ist nicht das gesamte Inhaltsstoffspektrum ersichtlich, Peaks von Hauptkomponenten des Extrakts sind allerdings gut getrennt.

Zusammenfassend erzielten A2 und A8 die besten Ergebnisse. Analyse A2 umfasste das gesamte Kontingent an Inhaltsstoffen des Extrakts H_2 (s. Tabelle 5 S.30), allerdings war die Trennung einzelner Peaks schlecht. A8 ermöglichte eine gute Trennung polarer Verbindungen (wie Verbascosid, s. Kapitel 3.4.2 S.74), apolare Substanzen wurden jedoch erst im Spülschritt mit 95 % ACN eluiert. Das Ergebnis dieser Analysen war es, zukünftige Untersuchungen mittels zweier Methoden durchzuführen: Die Methode **M1**, der A2

zugrunde liegt, (s. Tabelle 10 S.38) diente der Analyse apolarer Substanzen, die Methode **M2**, der A8 zugrunde liegt, der Analyse polarer Substanzen. Den wichtigsten Peaks wurden Nummern zugeordnet, die für die Untersuchungen mittels LC-MS von Bedeutung waren (s. Kapitel 3.5 S.78).

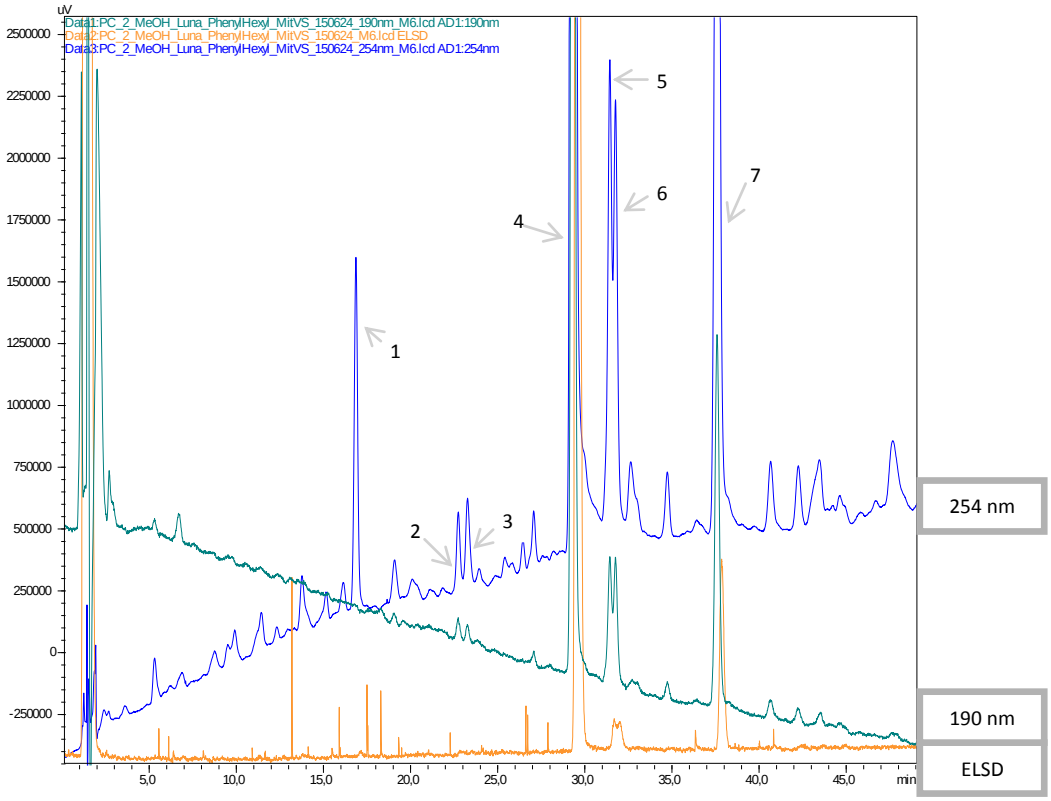


Abbildung 36 HPLC - Analyse A8 von verdünntem H_2 mittels A8 und Detektion mittels DAD und ELSD
H_2: s. Tabelle 5 S.30
A8: s. s. Tabelle 11 S.39

3.4.2 Vergleich eines Extrakts mit Referenzsubstanzen (Standards)

Um den Versuch einer Identifizierung von Substanzen im Extrakt H_2 (s. Tabelle 5 S.30) vorzunehmen, wurden Referenzsubstanzen (St_1, St_2, St_3, St_5 und St_7; s. Tabelle 6 S.31) via HPLC analysiert und mit dem Chromatogramm von mittels M2 (s. Tabelle 10 S.38) analysiertem H_2 verglichen. H_2 wurde gewählt, da sich der Extrakt in den HPTLC-Analysen als inhaltsstoffreich herausstellte (s. Kapitel 3.3 S.55). Die Herstellung der Standards erfolgte wie in Kapitel 2.4 S.31, die des Extrakts wie in Kapitel 2.3 auf S.29 beschrieben. Sowohl Extrakte als auch Standards wurden vor der Analyse 1:1 mit Methanol in HPLC - Qualität verdünnt. Die HPLC-Parameter wurden gemäß Methode

M2 gewählt (s. Tabelle 10 S.38). Für den Vergleich wurde im Anschluss an die Analyse eine Wellenlänge, bei der der jeweilige Standard im Chromatogramm gut sichtbar war, ausgewählt und bei dieser mit dem Chromatogramm des Extrakts verglichen. Konnte ein Peak an derselben Stelle festgestellt werden, wurde dessen UV - Spektrum mit dem des Standards verglichen.

Abbildung 37 zeigt das Chromatogramm von St_7 (Verbascosid, s. Tabelle 6 S.31), analysiert mittels M2 (s. Tabelle 10 S.38). Das Ergebnis der Gegenüberstellung mit dem Fingerprint von H_2 (s. **Abbildung 36** S.74) deutet darauf hin, dass St_7 eine Komponente des Extrakts ist. Die Retentionszeit und das UV - Spektrum (**Abbildung 38**) stimmen mit Peak 4 (s. **Abbildung 36** S.74) überein.

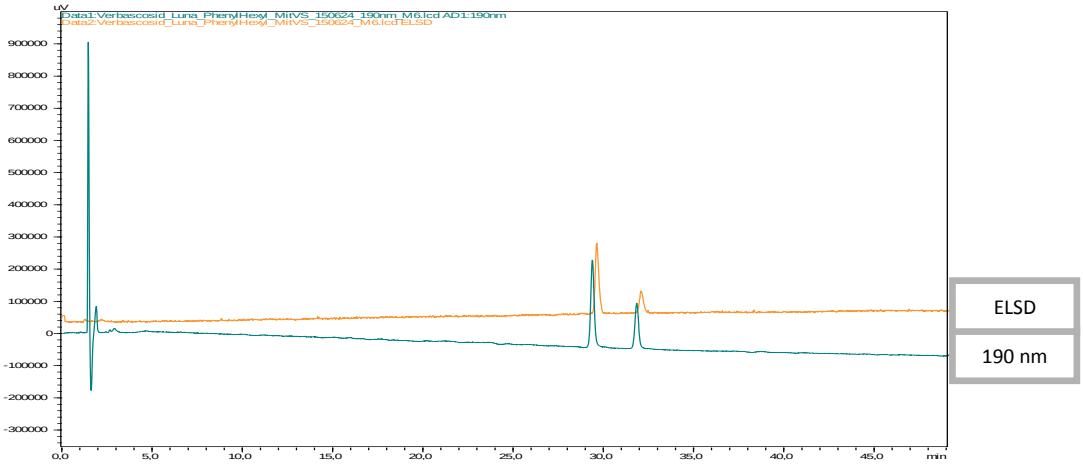


Abbildung 37 HPLC - Analyse von St_7 mittels M2
St_7: Verbascosid, s. Tabelle 6 S.31
M2: s. Tabelle 10 S.38

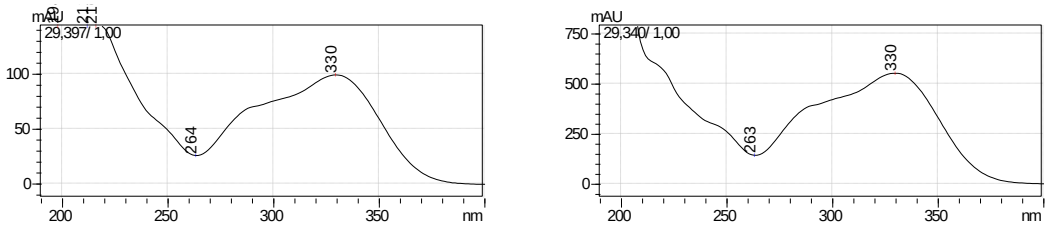


Abbildung 38 UV - Spektrum von St_7 aus **Abbildung 37** (links) und von Peak 4 aus **Abbildung 36** (rechts)
St_7: Verbascosid, s. Tabelle 6 S.31
Peak 4: s. **Abbildung 36** S.74

Auch in der HPTLC-Analyse war St_7 als möglicher Inhaltsstoff detektiert worden (s. Kapitel 3.3.3 S.64). Im Chromatogramm des Standards erscheinen allerdings zwei Peaks, was auf eine Instabilität der Substanz hindeutet. Zum Vergleich wurde der größere Peak

herangezogen, da in vorangegangenen Analysen die Retentionszeit mit diesem Peak übereinstimmte. St_1 (Rutin), St_2 (Isoquercitrin), St_3 (Chlorogensäure) und St_5 (Aucubin) sind anhand der Ergebnisse der HPLC - Analyse nicht im Extrakt von *P. coronopus* nachweisbar. Bei St_1, St_3 und St_5 war kein Peak bei vergleichbarer Retentionszeit im Chromatogramm von H_2 zu erkennen. St_2 wurde erst im Spülschritt mit 95 % Acetonitril eluiert und konnte in diesem System nicht verglichen werden (s. Anhang **Abbildung 56** S.105).

3.4.3 Untersuchung von Extrakten unterschiedlicher Polarität

Um einen Überblick über das Polaritätsspektrum an Verbindungen in *P. coronopus* zu bekommen, wurde ein Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität durchgeführt. Die dafür verwendeten Extrakte E_1 - E_11 wurden gemäß Kapitel 2.3 auf S.29 hergestellt und entsprechen den elf Auszügen aus Tabelle 4 S.30. Vor der Analyse wurden die Extrakte 1:1 mit Methanol in HPLC-Qualität verdünnt. Die HPLC-Parameter wurden gemäß Methode M1 gewählt, da diese einen Überblick über das gesamte Polaritätsspektrum gewährte (s. Tabelle 10 S.38).

Abbildung 39 auf S. 77 stellt den Heptan-Extrakt (E_1, Tabelle 4 S.30) analysiert mittels M1 (Tabelle 10 S.38) dar. Wie schon anhand der Ergebnisse der HPTLC festgestellt wurde (Kapitel 3.3.1 S.55), sind die Extrakte aus apolaren Auszugsmitteln arm an Inhaltsstoffen. Demnach enthält *P. coronopus* wenig apolare Substanzen. Mit steigender Polarität nimmt auch die Zahl an enthaltenen Verbindungen zu. **Abbildung 40** auf S. 77 zeigt das Ergebnis der Analyse unter Säurezusatz anhand von E_8 (Methanol-Essigsäure $_{konz.}$ 9+1), **Abbildung 41** auf S. 78 unter Basenzusatz anhand von E_10 (Methanol-Ammoniak $_{konz.}$ 8+2). Bei Säurezusatz kann die Ausbeute nochmals gesteigert werden, bei Basenzusatz nimmt sie deutlich ab. Die Inhaltsstoff-reichsten Auszüge stellen die aus Methanol (E_5), Methanol + Wasser 8+2 (E_7) und Methanol + Essigsäure$_{konz.}$ 9+1 (E_8) dar. Das Polaritätsspektrum sowie die Ausbeute der enthaltenen Verbindungen ist in diesen Extrakten groß. Die in diesen Systemen auftretenden größten Peaks liegen eng beieinander. Demnach sind vermutlich strukturell sehr ähnliche Verbindungen enthalten. Die wässrigen Auszüge [Wasser (E_6) bzw. Wasser + Essigsäure 9+1 (E_9)] sind besonders reich an polaren Verbindungen, mit steigender Retentionszeit werden dagegen kaum noch Substanzen eluiert. In den Auszügen aus Toluol (E_2) und Dichlormethan (E_3) treten sehr

breite Peaks auf. Die Methode M1 ist demnach nicht geeignet zur Analyse der beiden Extrakte.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse des HPLC-Polaritätsvergleichs die der HPTLC-Analyse. Diese sind dem Kapitel 3.3.1 S.55 entnehmbar.

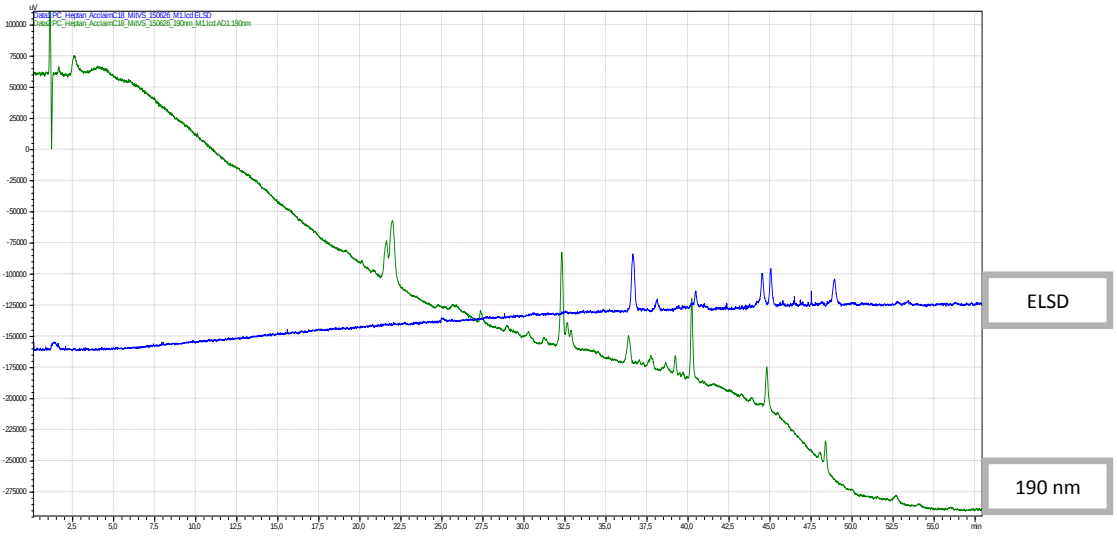


Abbildung 39 Extrakt E_1 analysiert mittels M1 und Detektion mittels ELSD und DAD
E_1: s. Tabelle 4 S.30
M_1: s. Tabelle 10 S.38

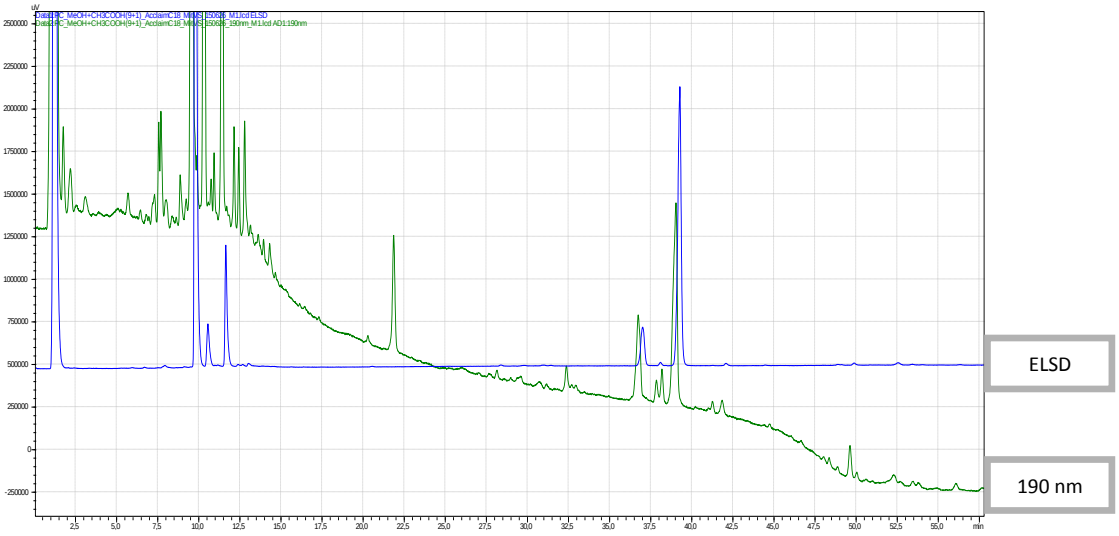


Abbildung 40 Extrakt E_8 analysiert mit M1 und Detektion mittels ELSD und DAD
E_8: s. Tabelle 4 S.30
M_1: s. Tabelle 10 S.38

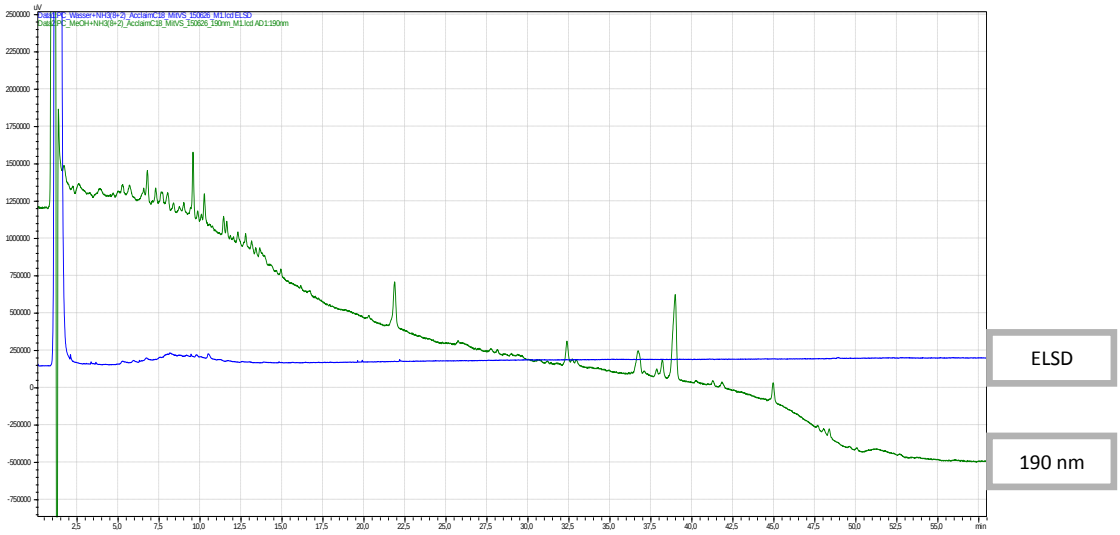


Abbildung 41 Extrakt E_10 analysiert mit M1 und Detektion mittels ELSD und DAD
E_10: s. Tabelle 4 S.30
M_1: s. Tabelle 10 S.38

3.5 Untersuchungen des methanolischen Extrakts mittels LC-MS

Die Untersuchungen mittels LC-MS wurden durchgeführt, um die anhand der HPLC - Analyse ermittelten relevantesten Peaks (s. **Abbildung 36** S.74) zu identifizieren und die bisher mittels HPTLC und HPLC erlangten Resultate zu überprüfen. Vermessen wurde der Extrakt H_2 (s. Tabelle 5 S.30) mittels M2 (s. Tabelle 10 S.38), da dieses System die besten Ergebnisse in der HPLC - Analytik lieferte (s. Kapitel 3.4.1 S.70). Die mittels LC-MS analysierten Peaks wurden jenen von Analyse A8 (s. **Abbildung 36** S.74) zugeordnet. Im Anschluss erfolgten die Analyse und die Auswertung der Daten. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 2.7.3 auf S.40 beschrieben.

Die folgenden Abbildungen stellen die entsprechenden Spektren sowie die Resultate der LC-MS Analyse dar. Die den Peaks zugrunde liegenden Verbindungen wurden als Compound 1 - Compound 7 bezeichnet.

Compound 1 *(Peak 1, s.* **Abbildung 36** S.74)

Abbildung 42 auf S.79 zeigt die ESI-MS Spektren von Compound 1. Für diese Substanz konnte im Negativionenmodus ein Molekulargewicht von 386,1 Da ermittelt werden. Der Peak bei m/z 431.1 kommt durch Bildung eines Formiatadduktions zustande, welches sich durch die in der HPLC-Analytik verwendete Ameisensäure erklären lässt. Das Frag-

mentierungsmuster weist in Richtung eines Iridoids. Es zeigt keine besonderen Charakteristika, was typisch für Iridoide ist, da sie nur schwer positiv oder negativ geladen werden können. Der Grund dafür liegt in der Beschaffenheit der Alkohole, welche allesamt aliphatischer Natur sind. Aus dem Inhalt des Spektrums kann man jedoch schließen, dass jenes Iridoid, sollte es sich um eines handeln, mit einer Hexose (m/z = 179.0) verknüpft ist.

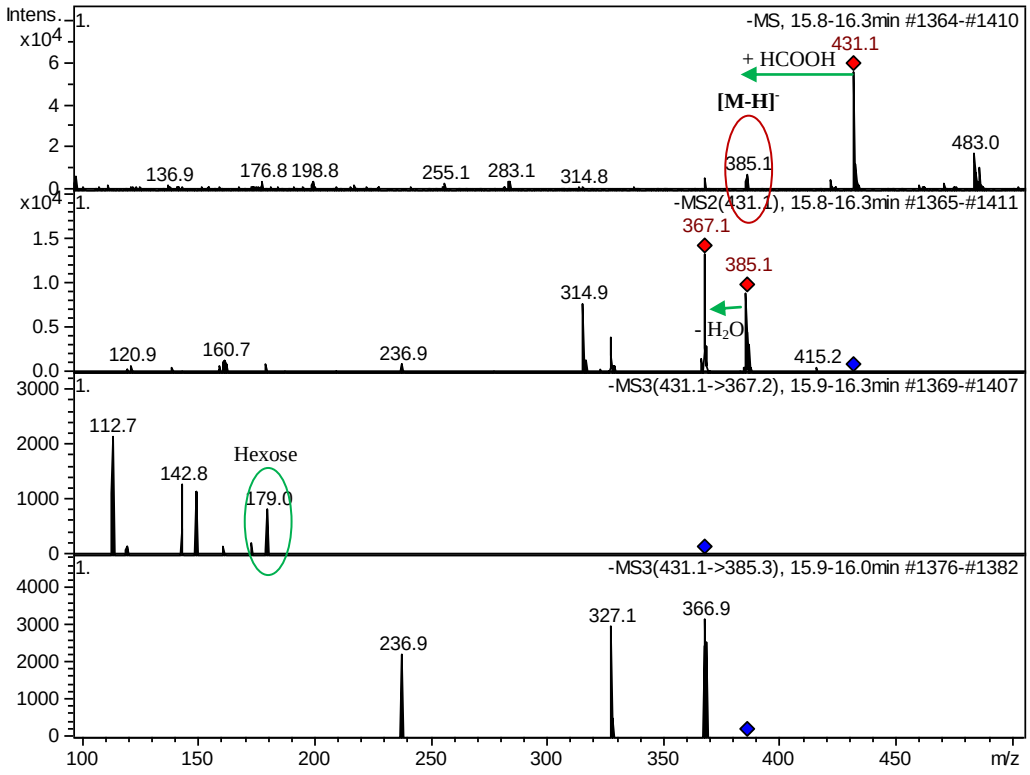


Abbildung 42 ESI - MS Spektren (negativer Ionenmodus) der in H_2 zu untersuchenden Verbindung Compound 1 mittels LC - MS
Compound 1: s. **Abbildung 36**
H_2: s. Tabelle 5 S.30

Compounds 2 und 3 (Peak 2 und 3, **Abbildung 36** S.74)

Abbildung 43 auf S.80 zeigt die ESI-MS Spektren von Compound 3. Es konnte ein Molekulargewicht von 640.1 Da ermittelt werden. Bei Compound 2 und 3 handelt es sich um isomere Phenylpropanoidderivate mit identem Molekulargewicht, des weiteren vermutlich um Strukturisomere des Verbascosids (s. **Abbildung 45** S.82). Die Fragmentierungsmuster der zwei Substanzen sind einander sehr ähnlich, weshalb eine gemeinsame Betrachtung möglich ist: Der Peak bei m/z 477.2 ermöglicht den Rückschluss auf die Ab-

spaltung einer Hexose, der Peak bei m/z 325.1 auf die weitere Abspaltung eines veretherten Phenolrestes. Sofern es sich um ein Strukturisomer des Verbascosids handelt, erfolgt die Fragmentierung fortlaufend: Es wird zunächst Wasser (m/z 621.1) abgespalten. Danach erhält man einen Peak bei m/z 459.0. Die Differenz beträgt 162.1 Da. Dies könnte auf Kaffeesäure oder eine Deoxyhexose hindeuten. Da aber ein Kaffeesäurefragment bei m/z 179.6 auftaucht, kann der Fragmentierungsprozess nur folgendermaßen ablaufen: zunächst werden Wasser, eine Deoxyhexose und anschließend ein verethertes Phenol abgespalten und die Kaffeesäure verbleibt.

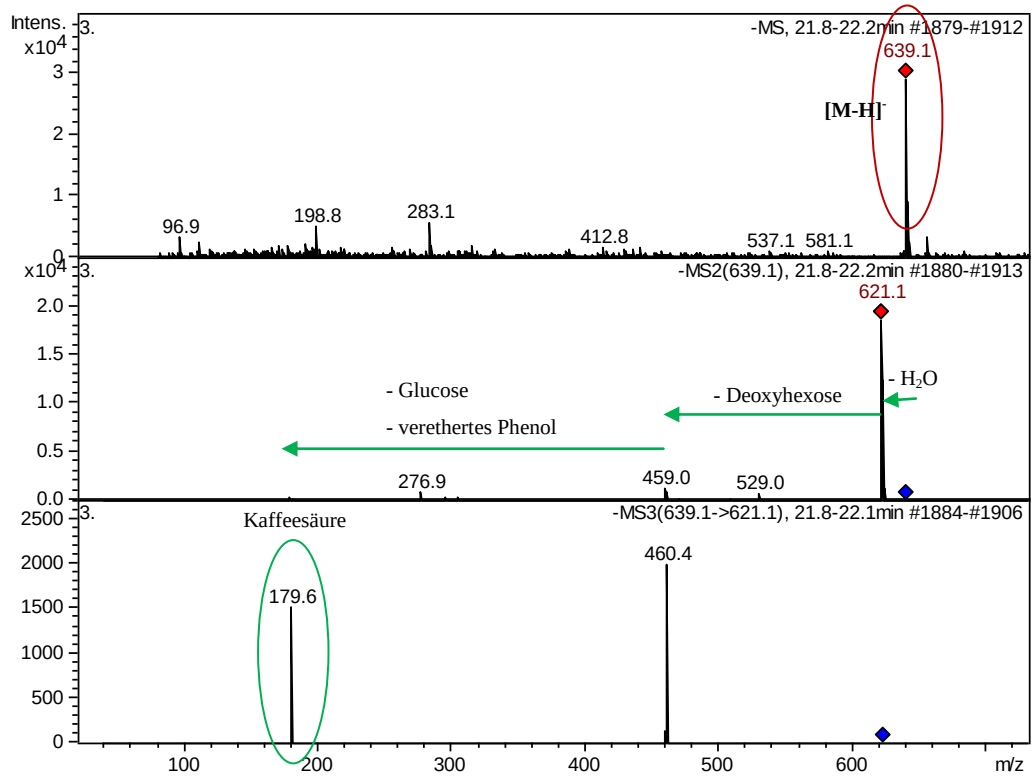


Abbildung 43 ESI - MS Spektren (negativer Ionenmodus) der in H_2 zu untersuchenden Verbindung Compound 3 mittels LC - MS
Compound 3: s. **Abbildung 36**
H_2: s. Tabelle 5 S.30

Compound 4 *(Peak 4,* **Abbildung 36** S.74)

Abbildung 44 zeigt die ESI-MS Spektren von Compound 4 im Positiv- und Negativionenmodus. Es konnte ein Molekulargewicht von 624.2 Da ermittelt werden. Es handelt sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um Verbascosid (**Abbildung 45** S.82), da das Molekulargewicht übereinstimmt. Den weiteren Beweis liefert das Fragmentierungsmus-

ter. Verbascosid besteht aus einem zentralen Glucosemolekül, an welches ein Kaffeesäurerest, ein veretherter phenolischer Rest sowie eine Deoxyhexose geknüpft sind (s. **Abbildung 45** S.82). Im ersten Fragmentierungsschritt wird das veretherte Phenol abgespalten wodurch sich der Peak bei m/z 471.1 ergibt. Zeitgleich kommt es zur Abspaltung der Deoxyhexose, zu erkennen anhand des Peaks bei m/z 325.1. In weiterer Folge besteht auch die Möglichkeit, dass vor allen anderen Substanzen der Caffeoylrest abgespalten wird (m/z 163.0).

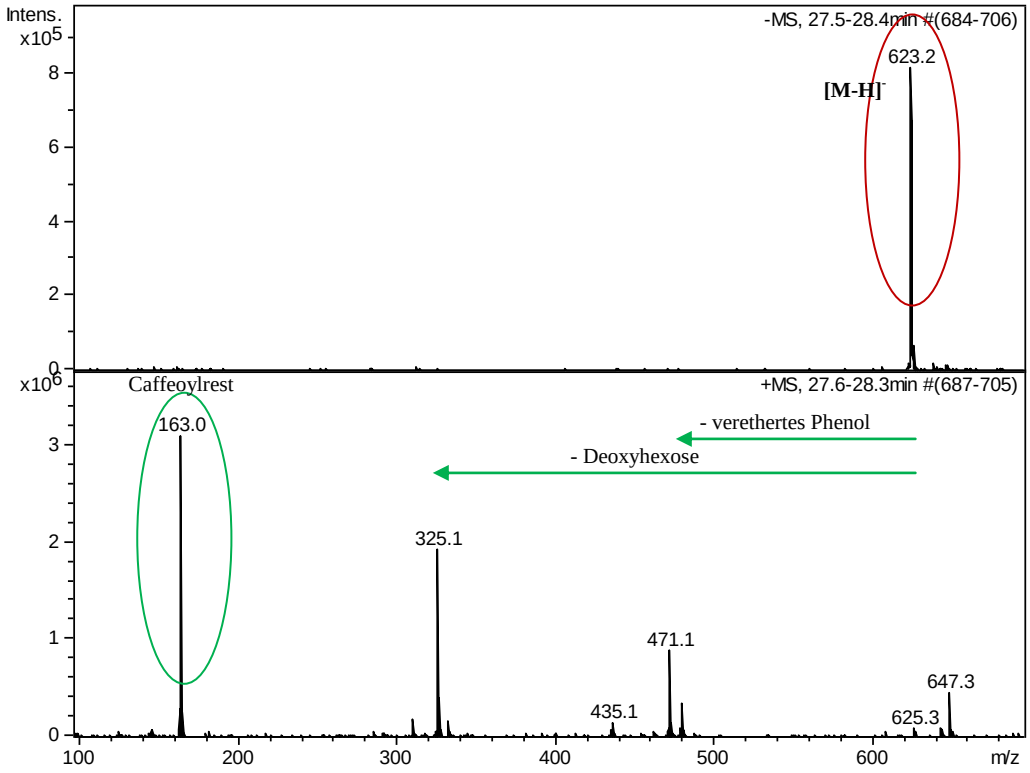


Abbildung 44 ESI - MS Spektren [negativer (oben) und positiver (unten) Ionenmodus] der in H_2 zu untersuchenden Verbindung Compound 4
Compound 4: s. **Abbildung 36**
H_2: s. Tabelle 5 S.30

Anhand des übereinstimmenden Molekulargewichts und des Fragmentierungsmusters kann man *Compound 4* höchstwahrscheinlich als Verbascosid identifizieren. Die Ergebnisse der HPLC - Analyse bestätigen die Annahme (s. Kapitel 3.4.2 S.74), da die Retentionszeit mit der des Standards St_7 (s. Tabelle 6 S.31) übereinstimmt. Es bleibt fraglich, ob der Peak von Compound 4 nur durch eine Substanz verursacht wird. Es ist wahrscheinlich, dass 2 isomere Substanzen überlagern, was gestützt wird durch eine Schulter von Peak 4, die bei starkem Vergrößern zu sehen ist (nicht abgebildet).

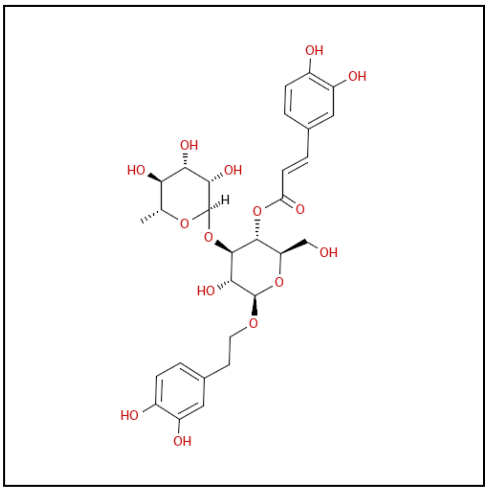


Abbildung 45 Verbascosid (ChEMBL Datenbank, https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL231853, aufgerufen am 31.07.2015)

Compounds 5 und 6 *(Peak 5 und 6,* **Abbildung 36** S.74)

Abbildung 46 zeigt die ESI-MS Spektren von Compound 5 im Positiv- und Negativionenmodus.

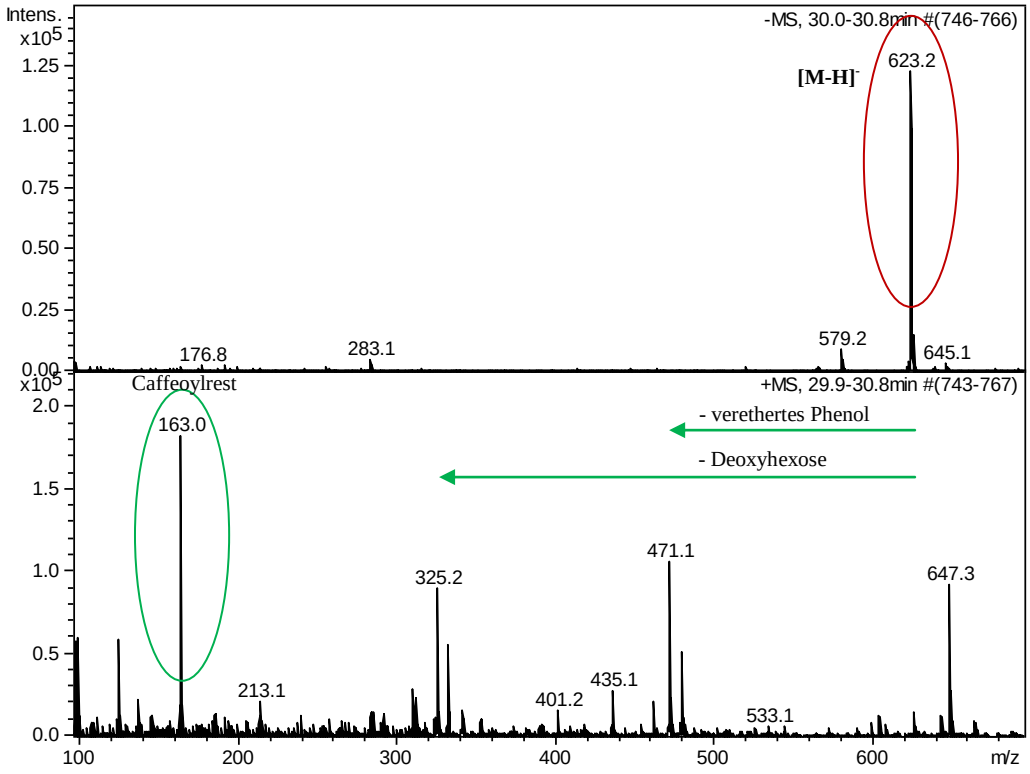


Abbildung 46 ESI - MS Spektren [negativer (oben) und positiver (unten) Ionenmodus der in H_2 zu untersuchenden Verbindung Compound 5
Compound 5: s. **Abbildung 36**
H_2: s. Tabelle 5 S.30

Es wurde ein Molekulargewicht von 624.2 Da ermittelt. Das Molekulargewicht entspricht dem des Verbascosids. Bei Compound 5 und 6 handelt es sich um ein Isomerenpärchen, die Fragmentierungsmuster ähneln einander sehr stark. Aus diesem Grund erfolgt die Auswertung gemeinsam. Die gebildeten Fragmentionen stimmen mit den von Compound 4 gebildeten im größten Teil überein. Es handelt sich demnach vermutlich um Strukturisomere des Verbascosids. Um diese These zu verifizieren, wären weitere Analysen, beispielsweise mittels NMR, erforderlich.

Compound 7 *(Peak 7,* **Abbildung 36** S.74)

Abbildung 47 zeigt die ESI-MS Spektren von Compound 7 im Positiv- und Negativionenmodus.

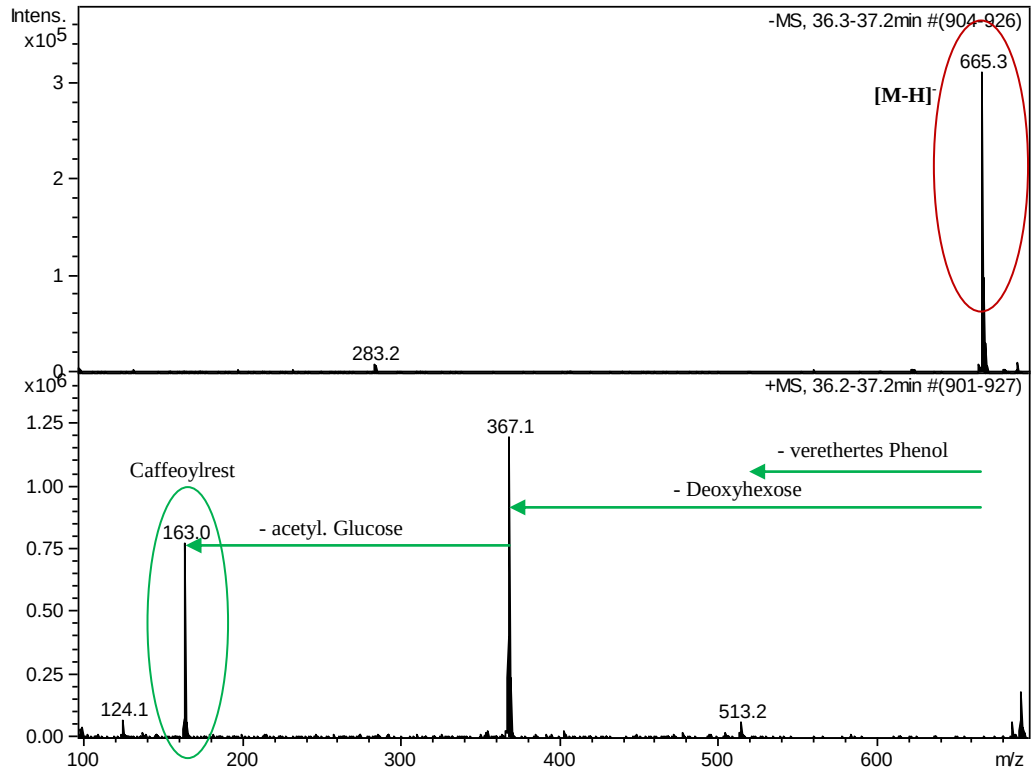


Abbildung 47 ESI - MS Spektren [negativer (oben) und positiver (unten) Ionenmodus] der in H_2 zu untersuchenden Verbindung Compound 7
Compound 7: s. **Abbildung 36**
H_2: s. Tabelle 5 S.30

Es wurde ein Molekulargewicht von 666.3 Da ermittelt. Es ist um 42.1 Da größer als jenes von Verbascosid. Die Abweichung lässt sich auf die Acetylierung des Glucosemoleküls zurückführen. Dies wurde anhand des Vergleichs der Spektren im Positiv- und Negativionenmodus festgestellt. Zunächst kommt es zur Abspaltung des veretherten Phenols (Peak bei m/z 513.2), anschließend zur Abspaltung der Deoxyhexose (Peak bei m/z 367.1). Dieser Ablauf ist bereits von Compound 4 bekannt. Anhand der Differenz im Molekulargewicht ist zu erkennen, dass es im Anschluss nicht zur Abspaltung eines "einfachen" Glucosemoleküls kommt. Eine Differenz von 204.1 Da deutet auf das Vorhandensein einer acetylierten OH-Gruppe an der Glucose hin. Der Peak bei m/z 163.0 stellt die abgelöste Kaffeesäure dar. Die Acetylierung kann dementsprechend nur an der Glucose vorhanden sein, da alle anderen Fragmente bezüglich ihrer Masse den Fragmenten des Verbascosids ident sind. Zusammenfassend handelt sich vermutlich um ein an der Glucose acetyliertes Derivat des Verbascosids.

4 Diskussion und Ausblick

Im folgenden Kapitel erfolgt die Diskussion aller im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit erarbeiteten Ergebnisse. Die Resultate werden kurz zusammengefasst und ein Ausblick auf weitere nötige Untersuchungen gegeben.

4.1 Morphologische und anatomische Untersuchungen

Sowohl die morphologischen als auch die anatomischen Untersuchungen wurden anhand des akquirierten Pflanzenmaterials durchgeführt. Wichtige Merkmale wie die typische Behaarung oder Charakteristika des Blattquerschnitts konnten erhoben werden und einen ersten Überblick liefern. Weil nicht ausreichend Stichproben zur Verfügung standen, sind für eine Charakterisierung der Pflanze noch weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Individuen nötig. *P. coronopus* ist in mehrere Subspezies gegliedert, welche Andrzejewska-Golec (1992) zufolge morphologisch und anatomisch unterschieden werden können. Diese Unterscheidung blieb in der vorliegenden Diplomarbeit unberücksichtigt.

Morphologisch konnten die charakteristische Fiederung der Blätter und eine dichte Behaarung einzelner Blattstücke festgestellt werden. Anhand der anatomischen Untersuchungen konnte man den isolateralen Blattbau erkennen, sowie zwei unterschiedlich gestaltete Blattquerschnitte. Der eine Querschnitt unterschied sich von dem anderen durch ein lockeres Gewebe, das als Aerenchym gedeutet werden kann. Charakteristisch war das Auftreten von kleinen Tröpfchen im Blattquerschnitt, bei denen es sich vermutlich um Oleosomen handelt. Die Deckhaare wurden in drei Gruppen gegliedert: Einzellreihige Haare, Flaschenhaare und Wurmhaare. Besonders sind die entlang der Sprossachse auftretenden einzellreihigen Haare mit quer verlaufenden Zellwänden. In der Literatur (Andrzejewska-Golec, 1992) sind diese Haartypen ebenso abgebildet. Andrzejewska-Golec unterscheidet zwei Subspezies von *P. coronopus*: *P. coronopus* L. subsp. *commutata* (GUSS.) und *P. coronopus* L. subsp. *cupani* (GUSS.). Diese zeigen alle Arten der oben beschriebenen Trichome. Anhand der Ausprägung dieser Haartypen auf den verschiedenen Pflanzenorganen (Blatt, Sprossachse, Tragblatt, Kelch oder Krone) gliedert Andrzejewska-Golec in die Subspezies. Die Einteilung anhand anatomischer Merkmale ist in der Praxis jedoch nicht möglich. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit als "Wurm-

haare" bezeichneten Trichome ordnet Andrzejewska-Golec den einzellreihigen Haaren zu. In weiterer Folge konnten Kristalle (Einzelkristalle und Kristallsand) und dia- und anomozytische Stomata, die in Reihen angeordnet sind, wiedergefunden werden. Die Epidermiszellen der Kronblätter sind länglich geformt und entlang der Zellwände wellig verzahnt, der Pollen ist rund und zeigt ein kraterartiges Relief.

4.2 Phytochemische Untersuchungen

Die phytochemischen Untersuchungen umfassten Untersuchungen mittels klassischer DC, HPTLC, HPLC und LC-MS. Das Ziel, einen Überblick über das Inhaltsstoffspektrum von *P. coronopus* zu generieren, wurde mit diesen Methoden erreicht. Mittels der HPTLC - Analyse war es möglich, ein Auszugsmittel, das einen Großteil der Inhaltsstoffe extrahiert, ausfindig zu machen. Dabei handelte es sich um Methanol. Als adäquate Methode zur dünnschichtchromatographischen Analytik erwies es sich, Chloroform-Methanol-Wasser (70:30:4) als Fließmittel, sowie Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und Naturstoffreagenz A zur Detektion zu wählen.

Der Fingerprint-Vergleich mittels HPTLC ermöglichte eine Gegenüberstellung des akquirierten Pflanzenmaterials. Es konnten durchaus Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen festgestellt werden. Da jedoch ausschließlich qualitativ gearbeitet wurde, konnten keine genauen Aussagen über quantitative Unterschiede gemacht werden.

Ein Vergleich mit Referenzsubstanzen lieferte Informationen über die Zusammensetzung des methanolischen Auszugs. Im Falle der klassischen DC und HPTLC gaben die Farben und R_f - Werte der Banden Aufschluss über das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein bestimmter Inhaltsstoffgruppen oder Inhaltsstoffe. Ein Vergleich mit Standards wurde ebenso mittels HPLC durchgeführt. In diesem Fall waren die Retentionszeiten der Verbindungen ausschlaggebend. Die LC-MS lieferte zusätzliche Daten zum Molekulargewicht und zur Struktur der Substanzen. Mittels dieser analytischen Methoden und Informationen aus der Literatur war es möglich, Verbascosid und Sitosterol mit hoher Wahrscheinlichkeit zu identifizieren. Diese beiden Inhaltsstoffe waren bereits in der Literatur (s. Tabelle 1 S.11) beschrieben worden. Die Farbgebung und der R_f-Wert der Bande (HPTLC), die Retentionszeit (HPLC) sowie das Molekulargewicht (LC-MS) stimmten mit Verbascosid überein. Die in der LC-MS gebildeten Fragmentionen stimmten mit strukturellen Elementen von Verbascosid überein. Sitosterol wurde mittels HPTLC und

klassischer DC nachgewiesen. Die Farbgebung sowie der R_f - Wert der Bande stimmten mit Sitosterol überein. Da keine weiteren Untersuchungen zu Sitosterol durchgeführt wurden, müssen, um die Annahme zu verifizieren, weitere erfolgen.

Der methanolische Extrakt erwies sich anhand der HPTLC - Ergebnisse reich an Phenylpropanoiden, die ähnliche dünnschichtchromatographische Eigenschaften besitzen wie Verbascosid selbst. Diese Vermutung bestätigte im weiteren Verlauf der praktischen Arbeit die HPLC und LC-MS - Analytik. Mittels LC-MS konnte man verschiedene Isomere des Verbascosids, deren exakte Struktur noch geklärt werden muss, detektieren. Es wurde ein an der Glucose acetyliertes Derivat des Verbascosids nachgewiesen. Bezüglich der Position der Acetylierung sind weitere Untersuchungen erforderlich. Da mittels der in der LC angewandten Methode keine optimale Trennung der Peaks erreicht wurde, war die Auswertung der LC-MS Ergebnisse bei bestimmten Verbindungen schwer. In weiterer Folge ist es nötig, eine Methode zu entwickeln, mit der eine Überlagerung von Peaks vermieden werden kann.

Das Vorhandensein von Rutin, Isoquercitrin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und Aucubin im methanolischen Extrakt von *P. coronopus* des Pflanzenmaterials PC_2 (s. Tabelle 2 S.28) wurde untersucht. Diese Verbindungen wurden für die Analyse gewählt, da sie in der Literatur beschrieben worden waren (s. Tabelle 1 S.11). Rutin, Isoquercitrin, Kaffeesäure und Aucubin wurden, sofern man die Ergebnisse der HPTLC und HPLC berücksichtigt, nicht im Extrakt wiedergefunden. Das Vorhandensein von Chlorogensäure konnte anhand der HPTLC - Resultate nicht ausgeschlossen werden, da der Auszug reich an Phenylpropanoiden ist, die bei ähnlichen R_f - Werten gleich gefärbte Banden ergeben. Laut den Ergebnissen der HPLC fehlt Chlorogensäure im Extrakt.

Die Angaben der Literatur konnten demnach nur teilweise bestätigt werden. Verbascosid und Sitosterol konnten wiedergefunden werden, Rutin, Isoquercitrin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und Aucubin nicht. Da die Untersuchungen, bei denen der Extrakt von *P. coronopus* mit Standards verglichen wurde, ausschließlich mit PC_2 durchgeführt wurden, sind weitere Analysen mit Pflanzenmaterial unterschiedlicher Herkunft nötig, um Aufschluss über das Inhaltsstoffspektrum zu bekommen. *P. coronopus* ist in Subspezies, deren Inhaltsstoffspektrum variieren kann, gegliedert. Des weiteren ist die Zusammensetzung von zahlreichen Parametern, wie Erntezeitpunkt und -ort, abhängig. Das könnte auch die unterschiedlichen Ergebnisse, die die phytochemischen Untersuchungen im

Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit im Vergleich zu Ergebnissen der aktuellen Literatur ergaben, erklären.

Zusammenfassend bestimmen polare Komponenten den größten Teil des Inhaltsstoffspektrums. *P. coronopus* ist reich an Phenylpropanoiden, wie dem Verbascosid. Apolare Verbindungen sind kaum enthalten. Eine mögliche enthaltene apolare Substanz ist jedoch Sitosterol, das wesentlicher Bestandteil bestimmter BPH - Therapeutika ist.

4.3 *P. coronopus* bei benigner Prostatahyperplasie

Im Hinblick auf die im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit erfassten Ergebnisse, ist es nicht möglich, ein Urteil über den Nutzen von *P. coronopus* bei BPH zu fällen. In der aktuellen Literatur werden kaum Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang gegeben. Ausschließlich auf Zypern konnte ein Bericht über die traditionelle Anwendung bei Prostatahyperplasie gefunden werden (Zannettou-Pandeli, 2000). Die Wirkung der Pflanze wird laut Literatur als antioxidativ, cytotoxisch, antimikrobiell und entzündungshemmend beschrieben - Wirkungsweisen, die auch bei gängigen BPH - Therapeutika eine Rolle spielen. Hier bedarf es jedoch weiteren Untersuchungen, vor allem *in - vitro* und *in - vivo* Testungen. Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden anhand von *Sabal serrulata* MICHX. Beispiele von Testsystemen recherchiert. Die Ergebnisse der phytochemischen Untersuchungen lieferten Hinweise auf die Zusammensetzung des Inhaltsstoffspektrums. Im Hinblick auf die Behandlung der BPH könnten Sitosterol, Iridoide und Phenylpropanoide eine Rolle spielen. Es sind allerdings weitere Analysen nötig, um sämtliche Extraktkomponenten zu erfassen. Des weiteren ist es nötig, deren Wirkung zu prüfen. Phytotherapeutika stellen bei milden bis moderaten Krankheitsbildern eine gute Alternative zur Schulmedizin dar und dürfen nicht außer Acht gelassen werden. Im Anfangsstadium der BPH können Symptome mit derzeit am Markt befindlichen Phytopharmaka wirkungsvoll bekämpft werden, außerdem ist mit einer geringeren Rate an Nebenwirkungen zu rechnen. *Plantago* - Arten sind seit jeher Teil der Ethnomedizin und haben sich bereits bei zahlreichen Krankheitsbildern bewährt. Es scheint daher begründet, die Literatur hinsichtlich dieser Arzneipflanze im Auge zu behalten und zum Beispiel methanolische Extrakte in entsprechenden *in-vitro* Assays (beispielsweise auf Hemmung der PSA-Sekretion wie

bei Maroccia et al., 2014, oder auf Hemmung der 5-α-Reduktase und der Fibroblastenproliferation wie bei Scaglione et al., 2012) auszutesten.

5 Zusammenfassung - Abstract

Die benigne Prostatahyperplasie (BPH) zählt zu den häufigsten Erkrankungen von Männern über 60 Jahren. Unbehandelt schreitet sie langsam voran, wobei vor allem die damit einhergehende Symptomatik eine große Belastung für die betroffenen Personen darstellt. Besonders in Anfangsstadien werden Phytotherapeutika gerne verschrieben, da sie nebenwirkungsarm, aber dennoch in der Lage sind, das Krankheitsbild zu verbessern. *P. coronopus* L., eine im Mittelmeerraum beheimatete Pflanze, wird traditionell bei dieser Indikation angewandt und stellt eine potentielle neue Quelle zur Herstellung von BPH - Therapeutika dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, die gesamte zu dem Thema verfügbare Literatur zu sammeln und zu sichten sowie Pflanzenmaterial für phytochemische Untersuchungen zu akquirieren. Im Anschluss sollten morphologische und anatomische Merkmale erfasst, sowie ein Überblick über das Inhaltsstoffspektrum von *P. coronopus* erarbeitet werden. Die phytochemischen Analysen wurden mittels klassischer DC, HPTLC, HPLC und LC-MS durchgeführt. Ein Vergleich des akquirierten Pflanzenmaterials erfolgte mittels HPTLC.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden grundlegende morphologische sowie anatomische Merkmale zusammengefasst und beschrieben. Das Aussehen der Querschnitte verschiedener Organe, charakteristische Haartypen wie Flaschenhaare, Stomata, Pollen und Kristalle wurde erhoben und fotografisch dokumentiert. Das Inhaltsstoffspektrum wurde zunächst durch das Herstellen von Extrakten unterschiedlicher Polarität mittels HPTLC und HPLC analysiert. Der methanolische Auszug, der ein besonders großes Spektrum überblicken ließ, wurde in HPTLC und HPLC - Analysen mit Referenzsubstanzen verglichen, um eine Identifikation von Inhaltsstoffen vorzunehmen. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde der Extrakt mittels LC-MS analysiert und die Hauptkomponenten charakterisiert. Verbascosid (Compound 4) konnte anhand der Ergebnisse der HPTLC und HPLC - Analysen mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Verbascosid und dem Verbascosid ähnliche Phenylpropanoide (Compound 2, 3, 5, 6), welche die Hauptkomponenten des methanolischen Extrakts darstellen, wurden zudem mittels LC-MS charakterisiert. Die Ergebnisse der HPTLC-Analysen lieferten außerdem einen Hinweis auf das Vorhandensein von Sitosterol im methanolischen Extrakt.

Der Vergleich des akquirierten Pflanzenmaterials mittels HPTLC zeigte Unterschiede im

Inhaltsstoffspektrum auf. Da jedoch ausschließlich qualitativ gearbeitet wurde, konnten quantitative Differenzen nicht erfasst werden.

One of the most frequent diseases of men older than 60 years is the benign prostatic hyperplasia (BPH). Without proper treatment the illness proceeds slowly, whereby the diseases' accompanying symptoms present a big burden for the affected patients. Especially at the beginning of BPH, phytotherapeutics are often prescribed due to their low rate of side effects but they are nevertheless very effective on the clinical picture. *P. coronopus* L., which is a plant located in the Mediterranean area, is traditionally used to treat BPH and therefore it could be a new source of potential BPH - therapeutics.
At first, the aim of this diploma thesis was to collect, sort, and sight all of the available literature on this topic, as well as to acquire plant material for a phytochemical analysis. Then, the plant's morphological and anatomical properties as well as its spectrum of compounds had to be researched and interpreted. For the phytochemical analysis DC, HPTLC, HPLC, and LC-MS - analyses were performed. A comparison of the acquired plant material was performed via HPTLC.
Within the frame of this diploma thesis, basic morphological and anatomical characteristics were examined and summarized. Cross sections of different parts of the plant, different types of hair such as "bottle hair", stomata, pollen, and crystals were investigated and recorded by camera. The spectrum of compounds was evaluated by the preparation of extracts of different polarity and analysed via HPTLC and HPLC. The methanolic one, which revealed the largest spectrum, was compared to reference substances using HPTLC and HPLC. For the confirmation of the results, the extract was analysed via LC-MS and the main components were identified. Based on the results of HTPLC - and HPLC – analyses, Verbascosid (Compound 4) was detected with the utmost probability. Verbascosid and phenylpropanoids similar to Verbascosid (Compound 2, 3, 5, 6), which are the main components of the methanolic extract, were characterized via LC-MS. The results of the HPTLC-analyses suggest that Sitosterol is also present in the methanolic extract. The comparison of the plant material revealed differences in the compound spectrum. However, analyses were performed in a qualitative manner so quantitative distinctions remain unidentified.

6 Literaturverzeichnis

Aichele, D., 1995. Die Blütenpflanzen Mitteleuropas. Frankh-Kosmos, Stuttgart, pp. 204.

Andrzejewska-Golec, E., 1992. Hair morphology in *Plantago* sect. *Coronopus (Plantaginaceae)*. Plant Systematics and Evolution 179, 107-113.

Barry, M.J., Meleth, S., Lee, J.Y., Kreder, K.J., Avins, A.L., Nickel, J.C., Roehrborn C.G., Crawford, E.D., Foster, H.E., Kaplan, S.A., McCullough, A., Andriole, G.L., Naslund, M.J., Williams, O.D., Kusek, J.W., Meyers, C.M., Betz, J.M., Cantor, A., McVary, K.T., 2011. Effect of increasing doses saw palmetto extract on lower urinary tract symptoms: a randomized trial. Journal of the American Medical Association 306(12), 1344-1351.

Bektic, J., Guggenberger, R., Spengler, B., Christoffel, V., Pelzer, A., Berger, A.P., Ramoner, R., Bartsch, G., Klocker, H., 2006. The flavonoid apigenin inhibits the proliferation of prostatic stromal cells via the MAPK-pathway and cell-cycle arrest in G1/S. Maturitas 55 (Suppl. 1), 37-46.

Benítez, G., González-Tejero, M.R., Molero-Mesa, J., 2010. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. Journal of Ethnopharmacology 129, 87-105.

Blanco, E., Macía, M.J., Morales, R., 1999. Medicinal and veterinary plants of El Caurel (Galicia, northwest Spain). Journal of Ethnopharmacology 65, 113-124.

Dingermann, T., Loew, D., 2003. Phytopharmakologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, pp. 259-261.

Eberlberger, J., in Vorbereitung. Beiträge zu morphologisch-anatomischen Untersuchungen des Blattes und Sprosses von *Justicia secunda* VAHL (Acanthaceae). Diplomarbeit, Univ. Wien.

Eissa, T.A.F., Palomino, O.M., Carretero, M.E., Gómez-Serranillos, M.P., 2014. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of CNS disorders in Sinai Peninsula, Egypt. Journal of Ethnopharmacology 151, 317-332.

Ellenberg, H., Leuschner, C., 2010. Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen. Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 606-608, 1020-1021.

Gálvez, M., Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Cortés, F., Ayuso, M.J., 2003. Cytotoxic effect of *Plantago* ssp. on cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology 88, 125 – 130.

Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J., Ayuso, M.J., 2005. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1927 – 1933.

Gatto, M.A., Ippolito, A., Linsalata, V., Cascarano, N.A., Nigro, F., Vanadia, S., Di Venere, D., 2011. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology 61, 72-82.

González-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M.E., Censorii, E., De Pasquale, C., Della, A., Paraskeva-Hadijchambi, D., Hadjichambis, A., Houmani, Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M., ElJohrig, S., 2008. Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. Journal of Ethnopharmacology 116, 341-357.

Grünwald, J., Jänicke, C., 2004. Grüne Apotheke. Gräfe und Unzer, München, pp. 136.

Hänsel, R., Sticher, O., 2010. Pharmakognosie - Phytopharmazie. Springer, Heidelberg, pp. 36-37, 40-41.

Häupler, H., Muer, T., 2000. Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 423.

Hegi, G., 1931. Illustrierte Flora von Mitteleuropa, 6. Band, 1. Hälfte. A. Pichler's Witwe & Sohn, Wien, pp. 188-189.

Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P., Tombelli, S., Romani, A., 2007. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 1724-1729.

Hoppe, H., 1975. Drogenkunde, Angiospermen, Band 1. Walter de Gruyter & Co, Berlin, pp. 849.

Iglesias-Gatto, D., Carsten, T., Vesterlund, M., Pousette, A., Schoop, R., Norstedt, G., 2012. Androgen-independent effects of *Serenoa repens* extracts (Prostasan®) on prostatic epithelial cell proliferation and inflammation. Phytotherapie Research 26, 259-264.

Janković, T., Menković, N., Zdunić, G., Beara, I., Balog, K., Šavikin, K., Mimica-Dukić, N., 2010. Quantitative determination of aucubin in seven *Plantago* species using HPLC, HPTLC and LC-ESI-MS methods. Analytical Letters 43, 2487-2495.

Janković, T., Zdunić, G., Beara, I., Balog, K., Pljevljakušić, D., Stešević, D., Šavikin, K., 2012. Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species. Biochemical Systematics and Ecology 42, 69-74.

Jurišić, R., Debeljak, Ž., Vladimir-Knežević, S., Vuković, J., 2004. Determination of aucubin and catalpol in *Plantago* species by Micellar Electrokinetic Chromatography. Zeitschrift für Naturforschung 59c, 27-31.

Jurišić Grubešić, R., Vuković, J., Kremer, D., Vladimir-Knežević, S., 2005. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39, 837-842.

Jurišic Grubešic, R., Srečnik, G., Kremer, D., Vuković Rodríguez, J., Nikolić, T., Vladimir-Knežević, S., 2013. Simultaneous RP-HPLC-DAD separation, and determination of flavonoids and phenolic acids in *Plantago* L. species. Chemistry and Biodiversity, 1305-1316.

Lardos, A., Heinrich, M., 2013. Continuity and change in medicinal plant use: The example of monasteries on Cyprus and historical iatrosophia texts. Journal of Ethnopharmacology 150, 202-214.

List, P.H., Hörhammer, L., 1977. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 6. Band, Teil A: N-Q. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 708.

Lueger, L., 2013. Phytochemische Untersuchungen wässriger Extrakte von *Justicia secunda* VAHL (Asteraceae), Diplomarbeit, Univ. Wien.

Markaverich, B.M., Alejandro M.A., 1997. Bioflavonoids, type II [3H]estradiol binding sites and prostatic cancer cell proliferation. International Journal of Oncology 11(6), 1311-1319.

Maroccia, D., Georgiev, M.I., Alipieva, K.I., Lorenzetti, S., 2014. Inhibition of the DHT-induced PSA secretion by *Verbascum xanthophoeniceum* and *Serenoa repens* extracts in human LNCaP prostate epithelial cells. Journal of Ethnopharmacology 155, 616-625.

Minutoli, L., Altavilla, D., Marini, H., Rinaldi, M., Irreri, N., Pizzino, G., Bitto, A., Arena, S., Cimino, S., Squadrito, F., Russo, G.I., Morgia, G., 2014. Inhibitors of apoptosis proteins in experimental benign prostatic hyperplasia: effects of *Serenoa repens*, selenium and lycopene. Journal of Biomedical Science 21:19.

Neves, J.M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., Gomes, L.R., 2009. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). Journal of Ethnopharmacology 124, 270-283.

Novais, M.H., Santos, I., Mendes, S., Pinto-Gomes, C., 2004. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). Journal of Ethnopharmacology 93, 183-195.

Pechlaner, P., 2009. *Plantago coronopus* - Von der möglichen Wirkung einer vergessenen Pflanze. Prüfungsunterlagen Diplom "Phytotherapie" FAM Pöchlarn.

Pilger, R., 1937. Plantaginaceae. In: Engler, A. (Ed.), Das Pflanzenreich. H.R. Engelmann, Berlin, pp. 1-466.

Pitschmann, A., 2015. Plants from ethnomedicines used against diabetes mellitus – rationale and quality control of *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae) and *Juglans regia* L. (Juglandaceae). Dissertation, Univ. Wien.

Pott, R., 1995. Die Pflanzengesellschaften Deutschlands. Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 274.

Potonié, H., 1910. Illustrierte Flora von Nord- und Mitteldeutschland. Gustav Fischer, Jena, pp. 41, 303.

Rahn, K., 1978. Nomenclatorial changes within the genus *Plantago* L., infraspecific taxa and subdivisions of the genus. Botanisk Tidsskrift 73, 106-111.

Rahn, K., 1996. A phylogenetic study of the Plantaginaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 120, 145-198.

Reich, E., Schibli, A., 2007. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. Thieme, New York, pp. 180-181.

Rizk, A.M., 1986. The Phytochemistry of the Flora of Qatar. Kingprint of Richmond, Qatar, pp. 307-312.

Rønsted, N., Göbel, E., Franzyk, H., Jensen, S.R., Olsen, C.E., 2000. Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. Phytochemistry 55, 337-348.

Rønsted, N., Chase, M.W., Albach, D.C., Bello, M.A., 2002. Phylogenetic relationships within *Plantago* (Plantaginaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid *trn*L-F sequence data. Botanical Journal of the Linnean Society 139, 323-338.

Rønsted, N., Franzyk, H., Mølgaard, P., Jaroszewski, J.W., Jensen, S.R., 2003. Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L.. Plant Systematics and Evolution 242, 63-82.

Rodrigues, M.J., Gangadhar, K.N., Vizetto-Duarte, C., Wubshet, S.G., Nyberg, N.T., Barreira, L., Varela, J., Custódio, L., 2014. Maritime halophyte species from southern portugal as sources of bioactive molecules. Marine Drugs 12, 2228-2244.

Rübel, E., 1930. Pflanzengesellschaften der Erde. Hans Huber, Bern-Berlin, pp. 123, 291, 355-357.

Sassi, A.B., Harzallah-Skhiri, F., Aouni, M., 2007. Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. Pharmaceutical Biology 45, 421-428.

Sassi, A.B., Harzallah-Skhiri, F., Bourgougnon, N., Aouni, M., 2008. Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against *Herpes simplex* virus type 1. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters 22:1, 53-65.

Scaglione, F., Lucini, V., Pannacci, M., Dugnani, S., Leone, C., 2012. Comparison of the potency of 10 different brands of *Serenoa repens* extracts. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 16, 569-574.

Schilcher, H., 1992. Phytotherapie in der Urologie. Hippokrates, Stuttgart, pp. 71-72.

Sebald, O., Seybold, S., Philippi, G., Wörz, A., 1996. Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs, Band 5. Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 253.

Sirab, N., Robert, G., Fasolo, V., Descazeaud, A., 2013. Lipidosterolic extract of *Serenoa repens* modulates the expression of inflammation related-genes in benign prostatic hyperplasia epithelial and stromal cells. Molecular Sciences 14, 14301-14320.

Smith, A.M., Zhang, H., Purves, R.W., 2014. Identification and distribution of oxygenated fatty acids in *Plantago* seed lipids. Journal of the American Oil Chemists' Society 91, 1313-1322.

Southon, I.W., Buckingham, J., 1989. Dictionary of Alkaloids. Chapman and Hall, London, New York, pp. 155.

Sun, W.D., Chen, F., Sun, Y., 2008. The pharmacological research of acteoside on the action inhibited benign prostatic hyperplasia in rats. Yangzhou Daxue Xuebao, Nongye Yu Shengming Kexueban 29 (4), 33-36.

Suter, A., Saller, R., Riedi, E., Heinrich, M., 2013. Improving BPH symptoms and sexual dysfunctions with a saw palmetto preparation? Results from a pilot trial. Phytotherapy Research 27, 218-226.

Taskova, R., Evstatieva, L., Handjieva, N., Popov, S., 2002. Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. Zeitschrift für Naturforschung 57 c, 42-50.

Uncini Manganelli, R.E., Tomei, P.E., 1999. Ethnopharmacobotanical studies of the Tuscan Archipelago. Journal of Ethnopharmacology 65, 181-202.

Zannettou-Pandeli, K., 2000. i therapeutiki dynatotita ton farmakeutikon fyton tis Kyprou [The therapeutic potential of the medicinal plants of Cyprus]. Private Publikation, Larnaca, pp. 386-369.

7 Curriculum vitae

Christina Maria Gradwohl

24.03.1992	Geboren in Eisenstadt als Tochter von Mag. Gertrude und Mag. Hans Gradwohl
1998-2002	Volksschule St. Georgen
2002-2006	Unterstufe des BG/BRG/BORG Eisenstadt
2006-2010	Oberstufe des BG/BRG/BORG Eisenstadt
Juni 2010	Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
2010 - 2016	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
Juli 2012	Ferialpraxis in der Apotheke "Zum Granatapfel" Eisenstadt
März 2015 - Juni 2015	Theoretische und praktische Arbeit zur Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie an der Universität Wien

8 Anhang

8.1 HPTLC - Untersuchung von Extrakten unterschiedlicher Polarität

Nummer *X*: s. Tabelle 4 S.30

FM*X*: s. Tabelle 7 S.34

Reagenz *X*: s. Tabelle 8 S.35

Fließmittel: FM1

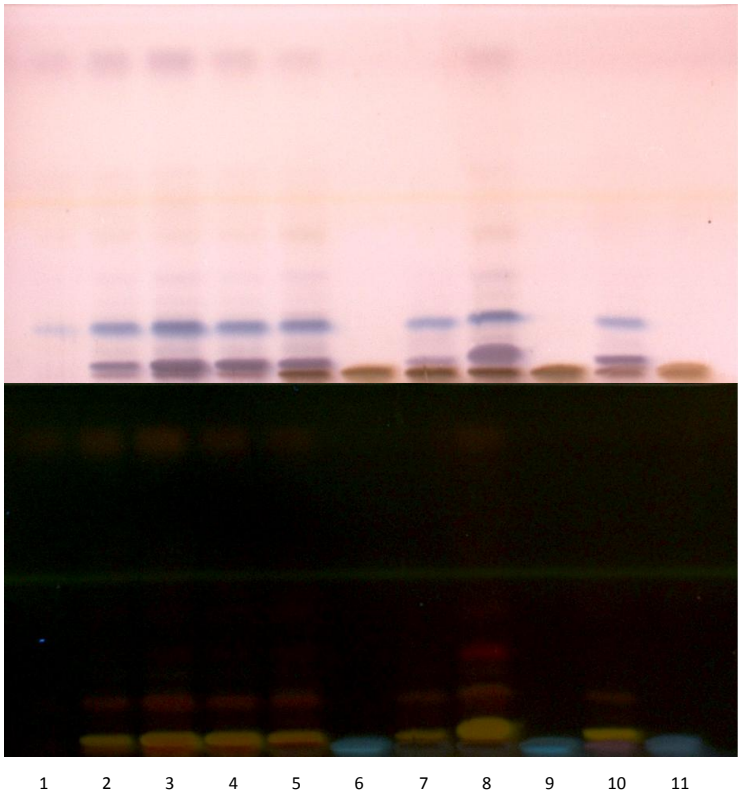


Abbildung 48 Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität nach Derivatisierung mit Reagenz 1 bei Tageslicht (oben) und unter UV_{366} (unten)

Fließmittel: FM2

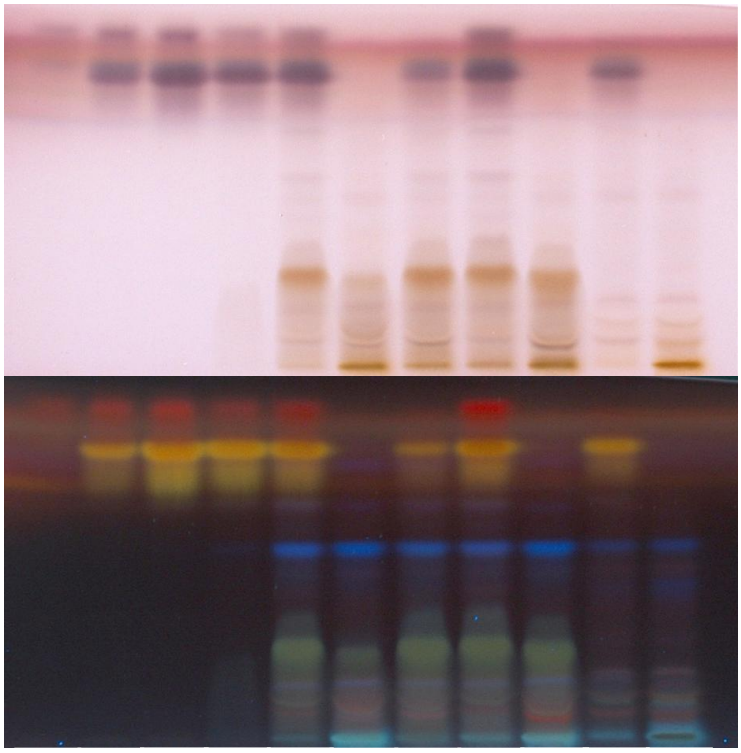


Abbildung 49 Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität nach Derivatisierung mit Reagenz 1 bei Tageslicht (oben) und unter UV_{366} (unten)

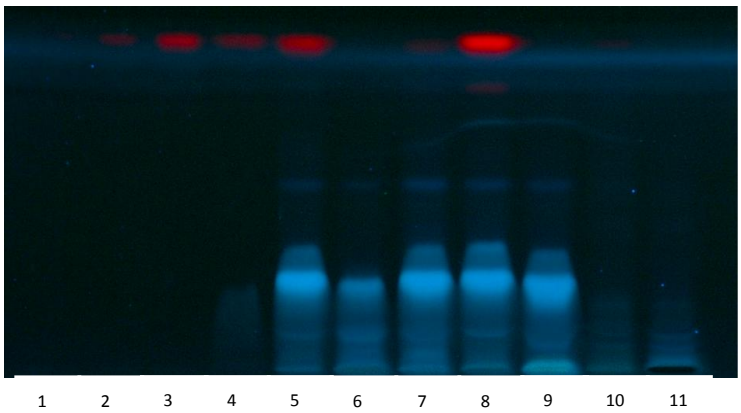


Abbildung 50 Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität nach Entwicklung der Platte unter UV_{254}

Fließmittel: FM3

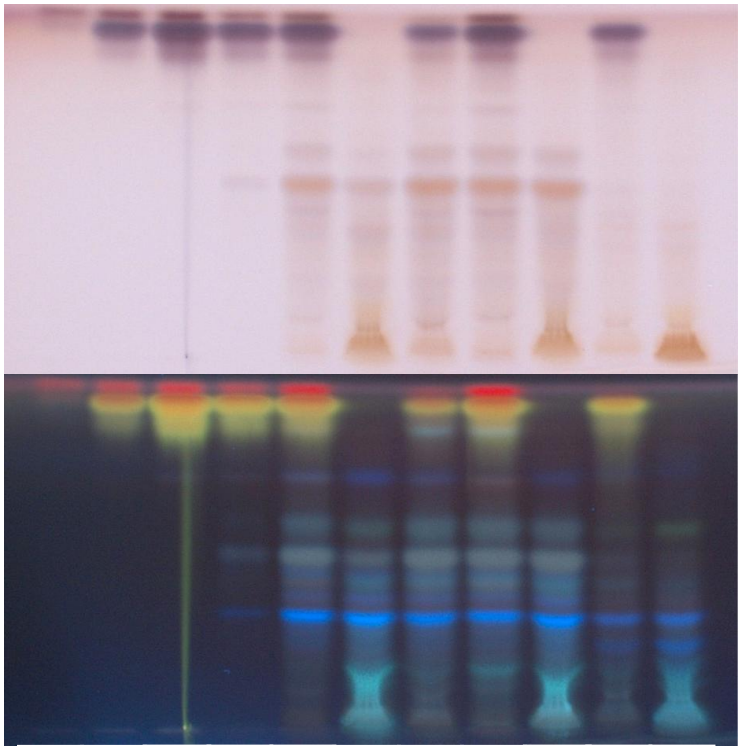


Abbildung 51 Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität nach Derivatisierung mit Reagenz 1 bei Tageslicht (oben) und unter UV_{366} (unten)

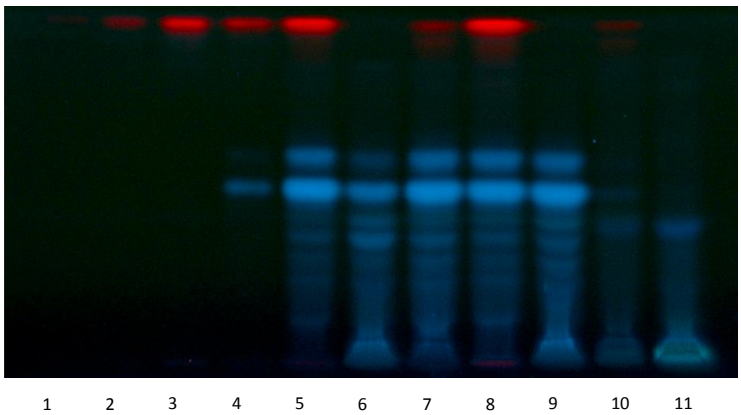


Abbildung 52 Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität nach Entwicklung der Platte unter UV_{366}

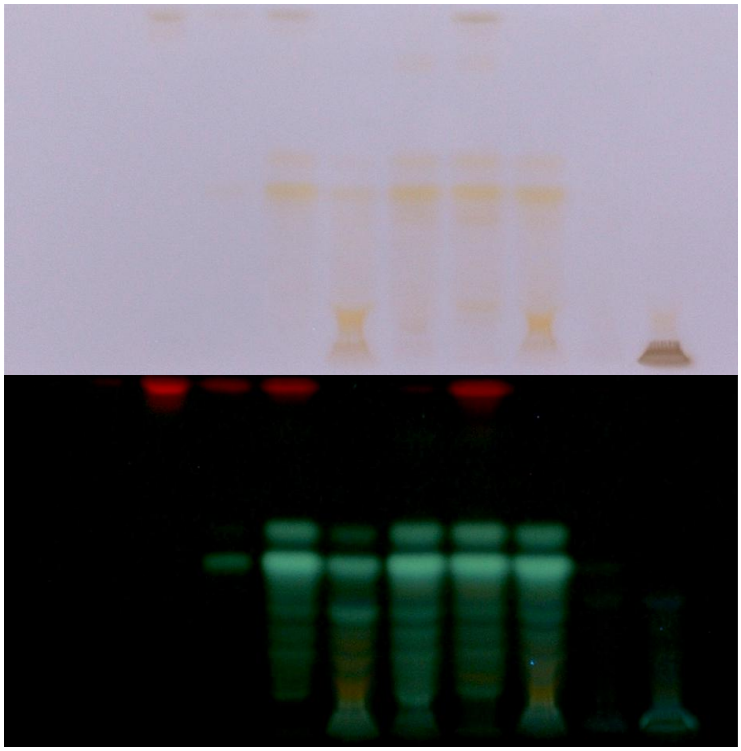


Abbildung 53 Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität nach Derivatisierung mit Reagenz 2 bei Tageslicht (oben) und unter UV_{366} (unten)

Fließmittel: FM4

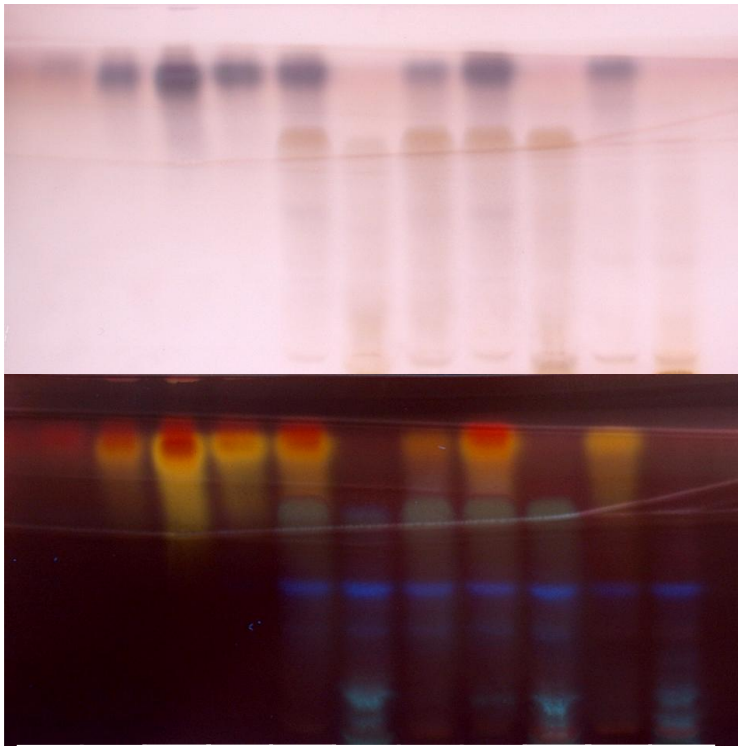


Abbildung 54 Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität nach Derivatisierung mit Reagenz 1 bei Tageslicht (oben) und unter UV_{366} (unten)

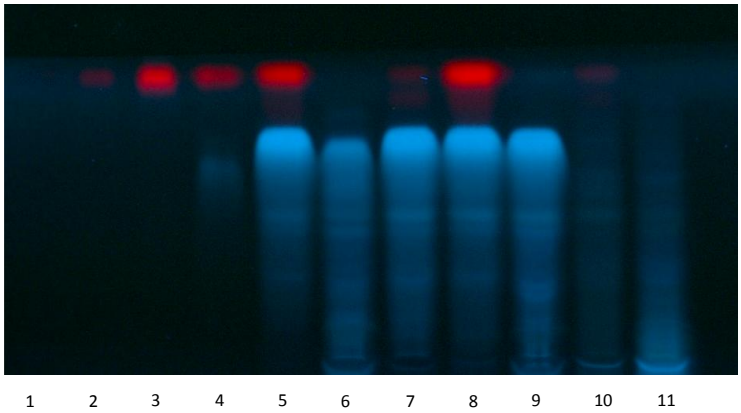


Abbildung 55 Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität nach Entwicklung der Platte unter UV_{366}

8.2 HPLC

8.2.1 Vergleich mit Standardsubstanzen

Methode 1 (s. Tabelle 10 S.38) bei 190 nm:

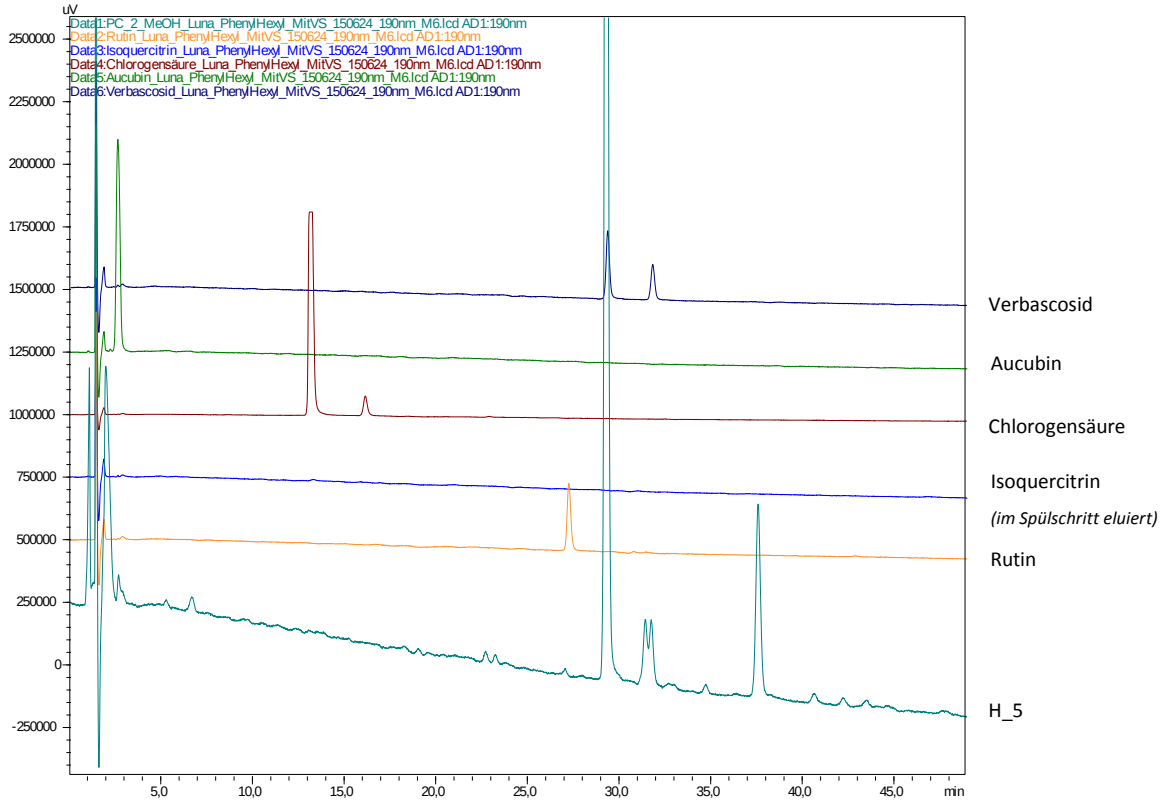


Abbildung 56 Vergleich von H_5 mit Standardsubstanzen anhand von Methode 1
H_5: s. Tabelle 5 S.30

Methode 1 (s. Tabelle 10 S.38) ELSD:

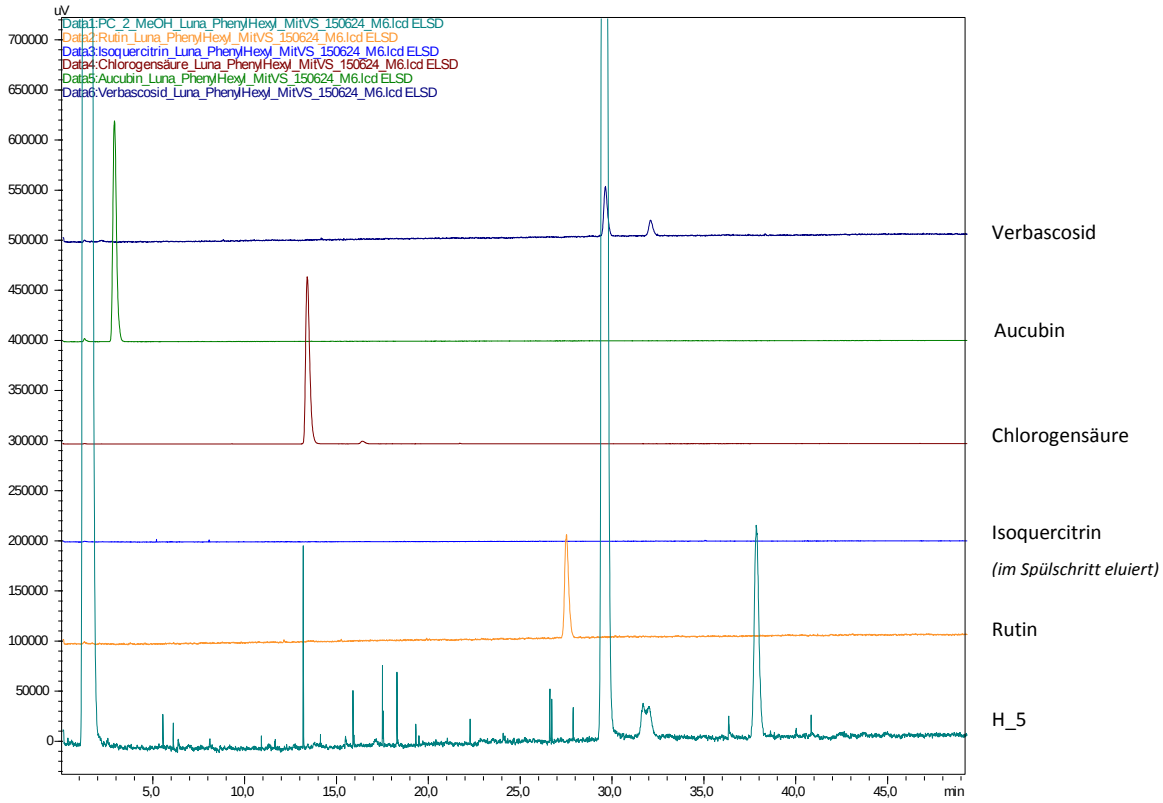


Abbildung 57 Vergleich von H_5 mit Standardsubstanzen anhand von Methode 1
H_5: s. Tabelle 5 S.30

8.2.2 Untersuchung von Extrakten unterschiedlicher Polarität

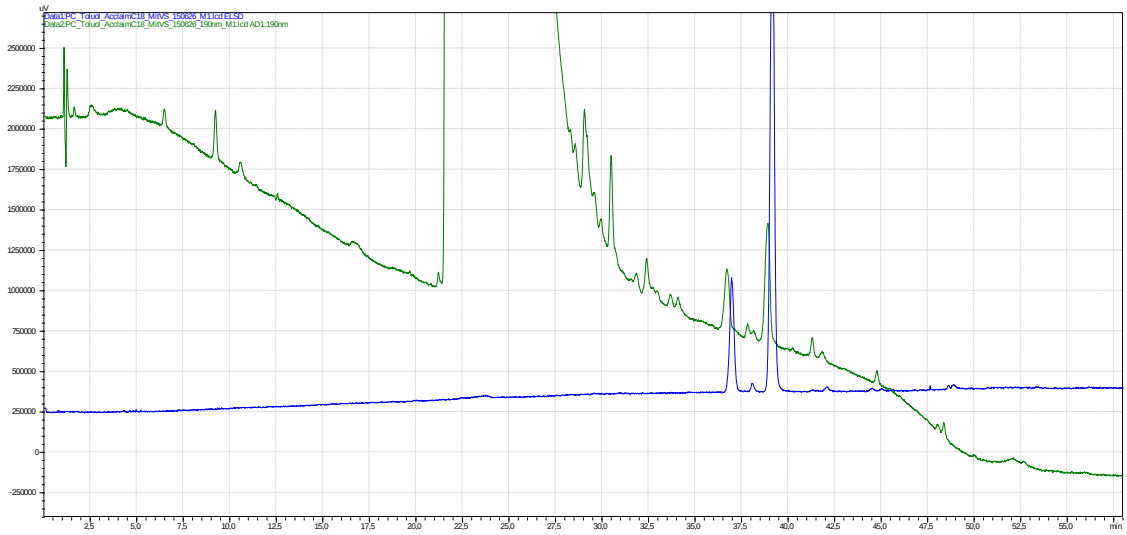
Verwendete Pflanze: PC_2 (Tabelle 2 S.28)

Methode: Methode 1 (Tabelle 10 S.38)

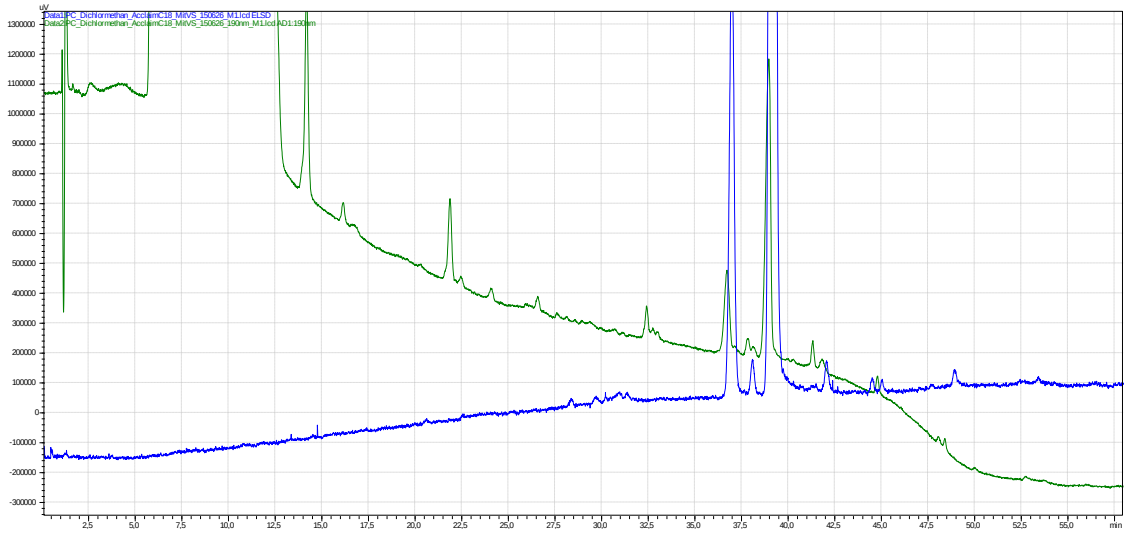
Blaue Spur: ELSD

Grüne Spur: 190 nm

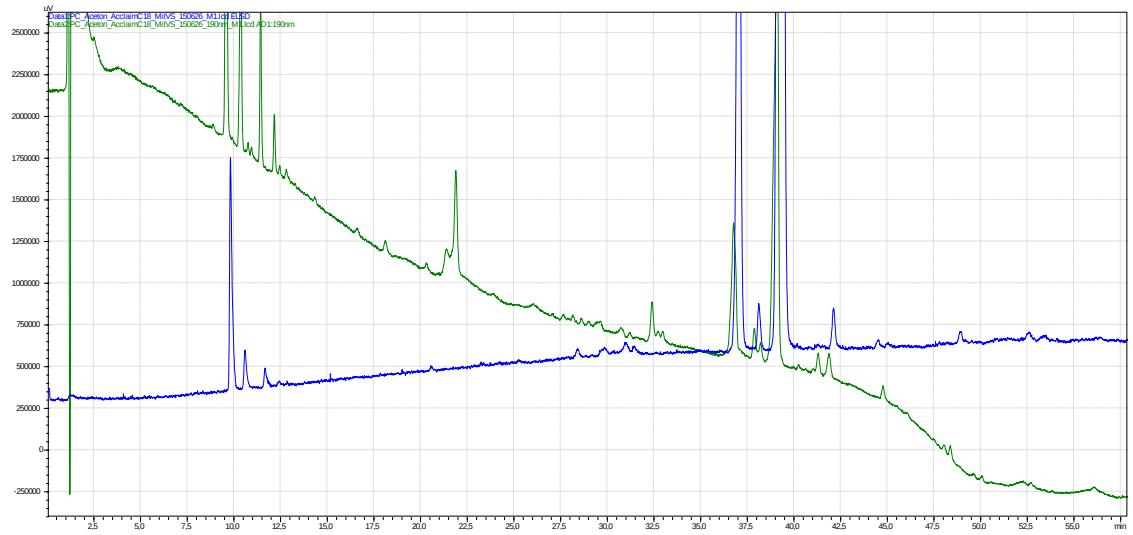
Toluol



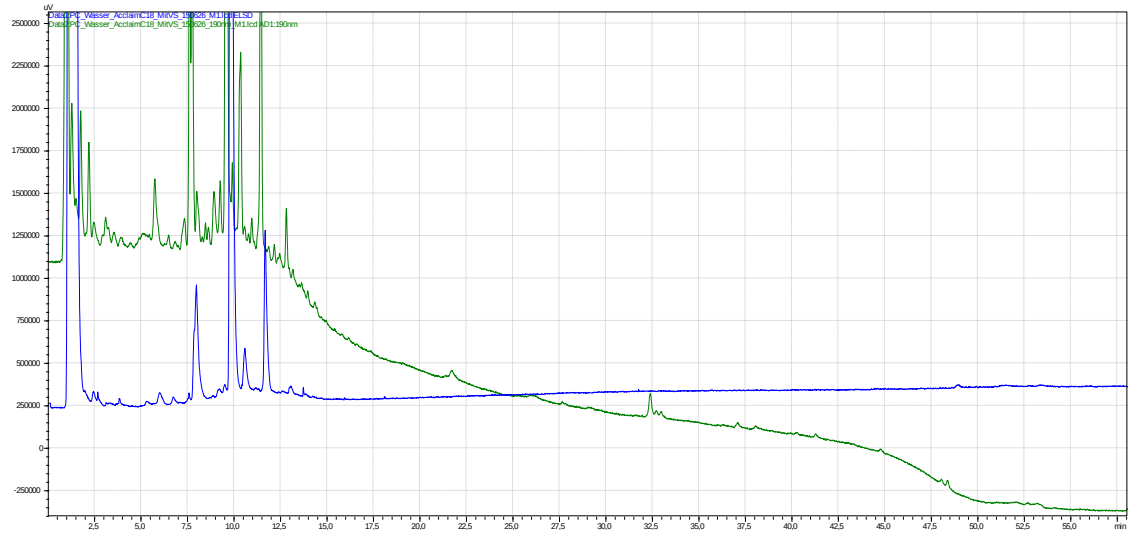
Dichlormethan



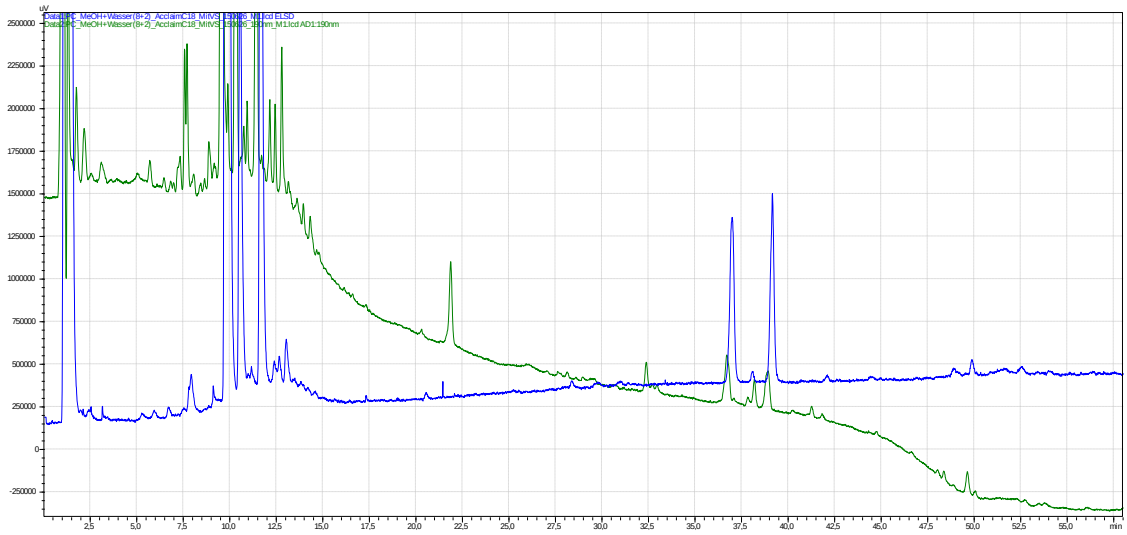
Aceton



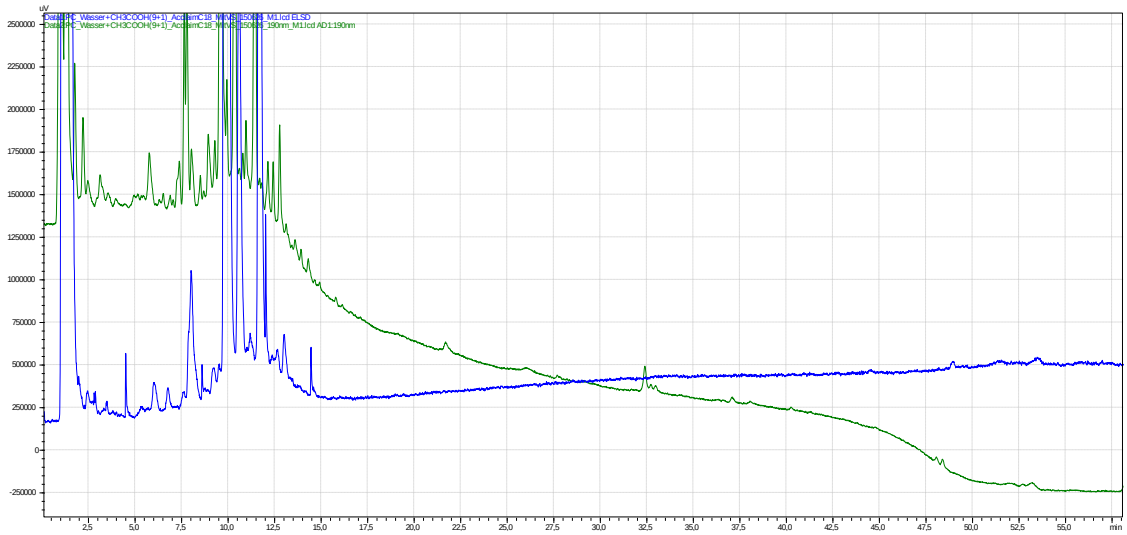
Wasser



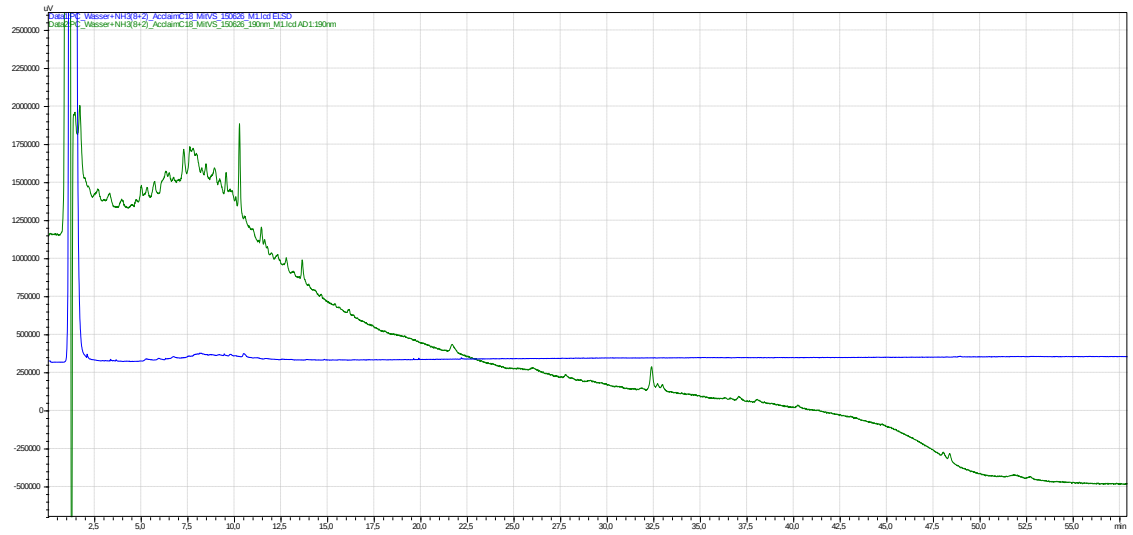
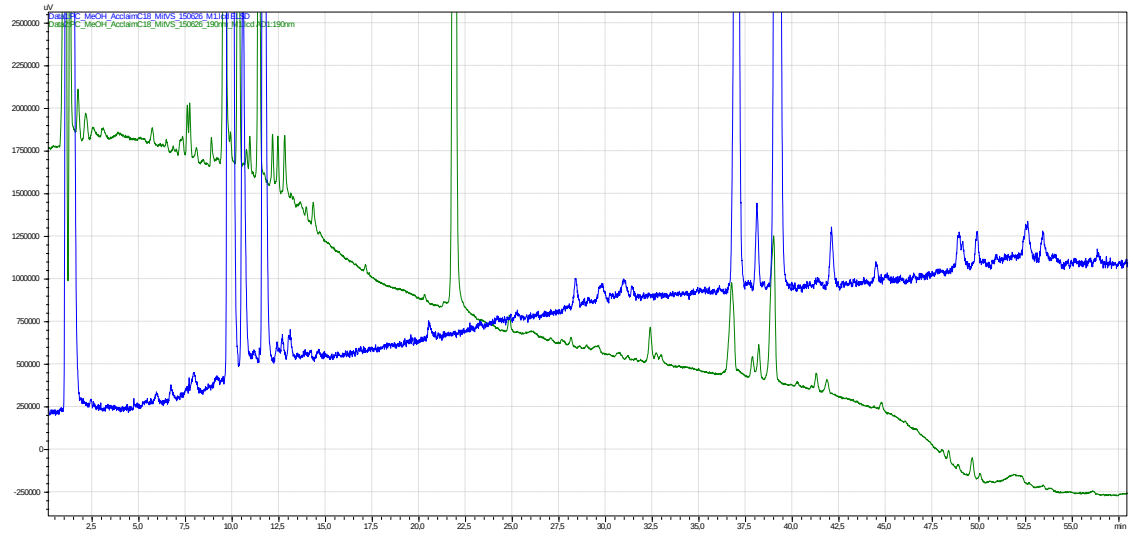
Methanol + Wasser (8+2)



Wasser + Essigsäure$_{konz.}$ (9+1)



Wasser + Ammoniak$_{konz.}$ (8+2)



Methanol