



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Phytochemische Untersuchung von Zubereitungen
aus *Psidium galapageium* Hook. f.“

verfasst von / submitted by

Lisa Krupicka

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the de-
gree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

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:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Univ.-Prof.Dr. Verena M. Dirsch für die Vergabe dieses Arbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die freundliche und herausragende Betreuung während der gesamten Arbeitszeit. Für jede noch so kleine Frage hatte sie immer ein offenes Ohr und ihr gelang es immer wieder, meine Neugier für die Erforschung dieses Themas anzuheizen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Priv. Doz. Mag. Dr. Sabine Tebbich für die Möglichkeit an diesem Projekt arbeiten zu dürfen, sowie bei Priv.-Doz. MBA Ph.D. Rebecca Hood-Nowotny und Timo Schwemhofer für das Sammeln der Blätter sowie die Zubereitung des Ethanol-Extrakts und des ätherischen Öls. Außerdem möchte ich Claudia Martina Ph.D. für die Testung der Extrakte und Fraktionen an den Mosquitos danken.

Da die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht hätte und manchmal auch eine seelische Unterstützung von Nöten war, möchte ich mich auch beim gesamten Department für Pharmakognosie sowie meinen lieben DiplomarbeitkollegInnen bedanken.

Zuletzt aber geht der größte Dank an meinen Freund Philip Szirota, der mich nicht nur während dieser Diplomarbeit unterstützt hat, sondern auch seit vielen Jahren immer an meiner Seite steht und mir in allen Lebenslagen den Rücken stärkt. Danke für alles!

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	v
Zusammenfassung	vii
Abstract.....	ix
1 Zielsetzung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 <i>Psidium galapageium</i>	2
2.2 Darwinfinken.....	3
2.3 Ätherische Öle und deren Komponenten als Repellentien	4
3 Materialien und Methoden	6
3.1 Pflanzenmaterial	6
3.2 Zubereitungen.....	6
3.2.1 Ethanol-Extrakt	6
3.2.2 Ätherisches Öl	6
3.3 Extraktionsmethoden	7
3.3.1 Wasserdampfdestillation nach EuAB.....	7
3.3.2 Einfache Wasserdampfdestillation	8
3.3.3 Supercritical Fluid Extraction (SFE)	8
3.3.4 Ultraschallextraktion.....	10
3.4 Chromatographische Methoden.....	10
3.4.1 Dünnschichtchromatographie	11
3.4.2 Flash-Chromatographie	11
3.4.3 Gaschromatographie und Massenspektrometrie.....	13
3.5 Repellentien-Test	15
3.6 Lösungsmittel und Reinsubstanzen	16
4 Ergebnisse	17
4.1 Ethanol-Extrakt	17
4.1.1 Fraktionierung.....	17
4.1.2 Ethanol-Extrakt in der Repellentien-Testung.....	22
4.1.3 Vereinfachte Herstellung und Testung eines der Fraktion B ähnlichen Gemisches	24
4.2 Ätherisches Öl	28
4.2.1 Fraktionierung.....	28
4.2.2 Ätherisches Öl in der Repellentien-Testung	31
4.2.3 Testung von Reinsubstanzen	33
4.2.4 Testung eines Monoterpen-Gemisches	34

4.3	Versuche zur Gewinnung der aktiven Komponenten mithilfe unterschiedlicher Lösungsmittel.....	35
4.3.1	CO ₂ -Extrakt	35
4.3.2	DCM-Extrakt	37
4.3.3	Hexan-Extrakt	38
5	Schlussfolgerung.....	40
5.1	Die wirksamste Fraktion.....	40
5.2	Ausblick: Eine Möglichkeit für den Schutz der Darwin-Finken.....	41
6	Literaturverzeichnis	44
7	Tabellenverzeichnis	45
8	Abbildungsverzeichnis	46

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAS	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
ÄÖ	ätherisches Öl
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEET	N, N-diethyl-m-toluamid
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EtOH-G	Ethanol-Extrakt, auf den Galapagos Inseln hergestellt
EtOH-W	Ethanol-Extrakt, in Wien hergestellt
EuAB	Europäisches Arzneibuch
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
KI	Kovats Index
MS	Massenspektrometer
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
PDA	Photodiodenarray
R _f	Retentionsfaktor
SFE	Supercritical Fluid Extraction
TLC	Thin Layer Chromatography

ZUSAMMENFASSUNG

Darwin-Finken, welche auf den Galapagos-Inseln beheimatet sind, schützen sich mit den Blättern von *Psidium galapageium* Hook. f. gegen eingeschleppte Ektoparasiten, wie z.B. Mosquitos oder die Larven von *Philornis downsi*.

Um genauere Informationen über die bisher wenig untersuchten Inhaltsstoffe der Pflanze zu erhalten, wurde das ätherische Öl der Blätter sowie ein Ethanol-Extrakt als auch ein Hexan-Extrakt der Blätter untersucht. Die Zubereitungen wurden mittels GC-MS analysiert, um die flüchtigen Komponenten zu identifizieren. Alle Zubereitungen enthielten hauptsächlich Sesquiterpene, vor allem das ätherische Öl aber auch Monoterpene. Die Hauptkomponente des ätherischen Öls war Nerolidol.

Das Ethanol-Extrakt und das ätherische Öl wurden mit Hilfe der Flash-Chromatographie fraktioniert und die daraus gewonnenen Fraktionen mit der DC und GC-MS charakterisiert. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden jene Fraktionen, die sich in ihrer Zusammensetzung signifikant unterschieden, für die Repellentien-Testung an Mosquitos ausgewählt.

Das ätherische Öl, die beiden Extrakte sowie jeweils vier Fraktionen des Öls und des Ethanol-Extrakts wurden in verschiedenen Konzentrationen in Repellentien-Tests untersucht.

Das ätherische Öl zeigte bei einer Konzentration von 6,25 mg/ml die beste Wirksamkeit. Die Fraktionen E, H und J waren ebenfalls als Repellentien aktiv. Fraktion E enthielt hauptsächlich Nerolidol, während Fraktion H vorwiegend Guaiol und Fraktion J β -Eudesmol beinhaltete.

Auch das Ethanol-Extrakt wirkte als Repellent auf die Insekten, jedoch nicht so intensiv wie das ätherische Öl. Hier zeigte die Fraktion B, welche Nerolidol, Guaiol und β -Eudesmol enthielt, die beste Wirksamkeit. Das Hexan-Extrakt zeigte zwar auch Insekten-abwehrende Wirkung. Diese war aber wesentlich schwächer als jene der beiden zuvor erwähnten Zubereitungen, weshalb auf eine weitere Fraktionierung verzichtet wurde.

Um auf den Galapagos-Inseln auf einfachem Wege eine größere Menge eines Auszugs, der der Fraktion B des Ethanol-Extrakts ähnelt, herzustellen, wurden entsprechende Versuche durchgeführt. Dazu wurde ein Ethanol-Extrakt durch Behandlung der Blätter mit Ethanol 96% hergestellt. Das gewonnene Extrakt wurde anschließend destilliert, um die Wirkstoffe anzureichern und inaktive Begleitsubstanzen zu entfernen.

ABSTRACT

Darwin finches, which live on the Galapagos Islands, protect themselves from recently introduced ectoparasites, e.g. mosquitos or the larvae of *Philornis downsi*, with the leaves of *Psidium galapageium*.

To get detailed information about the so far unknown active compounds in *P. galapageium*, the essential oil from the leaves as well as an ethanol and a hexane extract were investigated. The preparations were analysed by GC-MS to identify the volatile substances. All preparations mainly contained sesquiterpenes, while the essential oil also included monoterpenes. The major compound of the essential oil was nerolidol.

The ethanol extract and the essential oil were fractionated by flash chromatography and the resulting fractions were characterised by TLC and GC-MS. Based on these results, fractions with significant differences in their composition were selected for the repellency trials.

The essential oil, both extracts and four fractions, each, of the essential oil and the ethanol extract, were tested in the repellency trials at different concentrations.

The essential oil showed the best efficacy at a concentration of 6,25 mg/ml. Fractions E, H and J also had repellent activity. Fraction E mainly contained nerolidol, while the major component of fraction H was guaïol and of fraction J β -eudesmol.

The ethanolic extract had also a repellent effect on mosquitos, although to a lesser extent as compared to the essential oil. Fraction B of the extract, which contained nerolidol, guaïol and β -eudesmol, showed the best efficacy. The repellent effect of the hexane extract was significantly lower compared to the other preparations. Thus, no further fractionations were performed with this extract.

For the easy preparation of an effective extract, which is similar to fraction B of the ethanolic extract on the Galapagos Islands, several experiments were performed. An ethanolic extract was prepared by sonification of the leaves. The obtained extract was distilled to enrich the active compounds and to eliminate concomitant substances.

1 ZIELSETZUNG

Verhaltensbiologen der Universität Wien konnten beobachten, wie sich Darwinfinken auf den Galapagos-Inseln mit den Blättern des dort heimischen Baums *Psidium galapageium* Hook. f. gegen Ektoparasiten, wie z.B. verschiedene Mosquito-Arten oder die Larven der eingeschleppten parasitären Fliege *Philornis downsi*, schützen (Cimadam et al., 2016).

Die Inhaltsstoffe von *P. galapageium* sind bisher nur wenig charakterisiert. Daher war das Ziel dieser Diplomarbeit, die maßgeblich an der Wirkung als Repellent beteiligten Substanzklassen bzw. Einzelsubstanzen zu identifizieren.

In einem aktivitätsgeleiteten Ansatz sollten ein ethanolisches Extrakt, ein n-Hexan-Extrakt sowie das ätherische Öl der Blätter hergestellt und in unterschiedlichen Verdünnungen gegen Mosquitos getestet werden. In weiterer Folge sollten das Ethanol-Extrakt sowie das Öl mittels Säulenchromatographie aufgetrennt werden. Einzelne Fraktionen, die zuvor durch DC und GC-MS zu charakterisieren waren, sollten erneut auf ihre Wirkung als Repellent überprüft werden. Auf Basis dieser Ergebnisse sollten die potentesten Fraktionen für Feldversuche ausgewählt werden.

Zudem sollte versucht werden, eine Methode zu generieren, die es vor Ort auf den Galapagos-Inseln auf einfachem Weg möglich macht, die aktiven Komponenten zu isolieren und für den Schutz der Vögel vor den Parasiten einzusetzen.

Diese Diplomarbeit fand in Kooperation mit dem Department für Verhaltensbiologie, Universität Wien, sowie dem Universitäts- und Forschungszentrum Tulln (UFT) der Universität für Bodenkultur, Wien, statt und ist Teil des Projekts „Self medication in Darwin’s finches: identifying the mosquito repellent components of *Psidium galapageium*“.

2 EINLEITUNG

2.1 *PSIDIUM GALAPAGEIUM*

Psidium galapageium Hook. f. gehört zur Familie der Myrtaceae und wird im Volksmund auch Galapagos-Guave oder Guayabillo-Baum genannt. Hierbei handelt es sich um einen kleinen Baum bzw. Strauch mit glatter grauer bis rotbrauner Rinde und elliptisch bis ovalen grünen Blättern. Die Pflanze ist nahe verwandt mit der Echten Guave (*Psidium guajava* Linné). Man unterscheidet die Varietäten *P. galapageium* var. *galapageium* und *P. galapageium* var. *howellii* D.M.Porter (Porter, 1968).

Tabelle 1 – Taxonomie *Psidium galapageium*

Taxonomie (inaturalist, 2019)	
Reich	Plantae
Stamm	Tracheophyta
Unterstamm	Angiospermae
Klasse	Magnoliopsida
Ordnung	Myrtales
Familie	Myrtaceae
Gattung	Psidium
Art	<i>galapageium</i>
Varietät	<i>var. galapageium</i> <i>var. howellii</i>

P. galapageium var. *galapageium* wird etwa 8 Meter hoch und einen Meter breit, während *P. galapageium* var. *howellii* mit einer Höhe von 2-6 Metern etwas kleiner ist. Auch die Blüten und Früchte der letzteren Varietät sind im Vergleich kleiner. Außerdem gibt es Unterschiede in der Behaarung der Knospen und der Blätter wie auch in der Dehiscenz der Kelchblätter. Die Unterschiede sind jedoch eher gering, weshalb meist nur die Rede von *Psidium galapageium* ist. Die reifen, gelben Früchte sind genießbar. Es wurde aber beschrieben, dass sie einen leicht an Terpentin erinnernden Geschmack besitzen (Porter, 1968).

Beide Subspezies sind auf den Galapagos-Inseln Isla Floreana, Isla Villamil, Isla Santa Fe, Isla Santa Cruz und Isla Santiago endemisch. Dabei gibt es keine geographische Trennung der beiden Varietäten (inaturalist, 2019; Porter, 1968).



Abbildung 1 - getrocknete Blätter von *P. galapageium*

Ein Ethanol-Extrakt der Blätter war bereits mittels GC-FID analysiert worden. Dabei wurden Monoterpene und Sesquiterpene, allen voran β -Caryophyllen, als Hauptkomponenten identifiziert. Als weitere Inhaltsstoffe wurden z.B. D-Limonen, Linalool oder Nerolidol nachgewiesen (Cimadom et al., 2016).

2.2 DARWINFINKEN

Auch als Galapagos-Finken oder Geospizinae bekannt, stellen die Darwinfinken ein Paradebeispiel für adaptive Radiation dar:

„Adaptive radiation is a rapid increase in the number of species with a common ancestor, characterized by great ecological and morphological diversity. The driving force behind it is the adaptation of organisms to new ecological contexts.“ - (Neige, 2015)

Auf den Galapagos-Inseln sind 14 endemische Arten bekannt. Eine weitere lebt auf Costa Ricas Kokos-Insel. Auffällig sind vor allem die unterschiedlich geformten Schnäbel: Je nachdem, ob sich die Vögel von Körnern oder Insekten ernähren, sind die Schnäbel kräftig und stumpf oder fein und spitz ausgeprägt. Für diese Heterologie

wird das Gen ALX1, welches bei der Entwicklung von Gesichtszügen beteiligt ist, verantwortlich gemacht (Kronberg, 2015).

Durch die Globalisierung werden immer mehr exotische Schädlinge und Pathogene – und folglich auch Krankheiten – auf den Galapagos-Inseln eingeschleppt. Das bedeutet auch eine neue Herausforderung für die Darwinfinken, da beispielsweise Mosquitos oder die Larven von *Philornis downsi* die Fitness und das Überleben der Vögel bedrohen können. Um sich vor diesen Parasiten zu schützen, haben die Tiere eine innovative Technik entwickelt: Die Blätter von *P. galapageium* werden in Form kleiner Stücke durch das Federkleid gerieben bzw. zerkaut als eine Art Lotion aufgetragen. Dieses Verhalten ist unter Vögeln sehr selten und spiegelt die Anpassungsfähigkeit der Darwinfinken wider (Cimadam et al., 2016).

2.3 ÄTHERISCHE ÖLE UND DEREN KOMPONENTEN ALS REPELLENTIEN

Zahlreiche ätherische Öle wurden auf ihre Inhaltsstoffe sowie deren repellierende und larventötende Aktivität analysiert. So wurde z.B. das Öl von *Eucalyptus nitens* (H.Deane & Maiden) Maiden, Myrtaceae, gegen die beiden Mosquito-Arten *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass das ätherische Öl dieser Eucalyptus-Art als Repellent besser wirksam ist als dessen Hauptkomponente 1,8-Cineol allein. Im Vergleich zu der synthetischen, potentiell toxischen Substanz DEET war die Aktivität des ätherischen Öls aber deutlich schwächer ausgeprägt. Grundsätzlich wurde angenommen, dass zyklische β -Triketone für die repellierende Wirkung (mit)verantwortlich sind. Die larventötende Aktivität dürfte hauptsächlich auf Monoterpene, wie beispielsweise D-Limonen oder α -Terpineol, zurückzuführen sein, da diese kleinen, hydrophoben Moleküle eher durch die hydrophobe Cuticula der Insektenlarven dringen und so ihre Toxizität auf die Larven ausüben. Bei dieser Untersuchung konnten bessere Ergebnisse für die larventötende Wirksamkeit auf *A. albopictus* als auf *A. aegypti* erzielt werden, was auf physiologische Unterschiede zwischen den beiden Arten zurückzuführen war (Alvarez Costa et al., 2017).

Ein weiteres Beispiel für ein ätherisches Öl als Repellent ist jenes von *Adenosma buchneroides* Bonati, Plantaginaceae. Diese Pflanze wird in Asien traditionell zum Schutz vor Stechmücken angewandt. Hier wurde das Öl fraktioniert und danach gegen *A.*

albopictus getestet. Dabei zeigten jene Fraktionen, die Carvacrol, Carvacrolmethylester oder die neu entdeckte Substanz Adenosmin A enthielten sowie das gesamte ätherische Öl Wirkung. Dabei waren einige Fraktionen sogar aktiver als die Positivkontrolle DEET. Bezüglich der larventötenden Aktivität konnte man ebenfalls positive Effekte erzielen, die wiederum auf Monoterpene – in diesem Fall vor allem auf Carvacrol – zurückzuführen waren (Ma et al., 2018).

Ätherische Öle mit repellierender Wirkung sind durchaus verbreitet. Der Mensch macht sich diesen schützenden Effekt schon lange zu Nutze. Gründe dafür sind vor allem das weit verbreitete Vorkommen dieser repellierenden ätherischen Öle in großen Pflanzenfamilien, wie z.B. Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Rutaceae oder Cupressaceae. Aber auch die geringe Toxizität sowie die pflanzliche Herkunft dieser Produkte und Inhaltsstoffe machen ätherische Öle zu einer guten Alternative, um sich vor Insekten zu schützen (Alvarez Costa et al., 2017; Ma et al., 2018).

P. galapageium wurde bereits im Feldversuch, aber auch im Labor gegen verschiedene Mosquito-Arten getestet. Im Feldversuch wurden zerkleinerte Blätter auf Arme und Beine gerieben, während im Labor mit Rinderblut präparierte „Würste“ mit Ethanol-Extrakt aus den Blättern von *P. galapageium* benetzt wurden. Beide Versuche lieferten positive Ergebnisse. Das ätherische Öl war aber noch nicht auf seine Aktivität als Repellent untersucht. Da die Pflanze ein Mitglied der Familie der Myrtaceae ist und einige Inhaltsstoffe enthält, welche in anderen ätherischen Ölen wirksamkeitsmitbestimmend sind, sollte geklärt werden, wie stark die repellierende Wirkung des ätherischen Öls ist (Cimadom et al., 2016).

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 PFLANZENMATERIAL

Die Blätter von *P. galapageium* wurden im Februar 2019 von S. Tebbich, R. Hood-Nowotny und T. Schwemhofer im Hochland von Isla Santa Cruz bei Los Gemelos, Ecuador, auf etwa 500 Höhenmetern gepflückt. Anschließend wurden die Blätter für 48 Stunden in einem Trockenschrank getrocknet. Ungefähr 500 g des getrockneten Pflanzenmaterials wurden lichtgeschützt nach Wien transportiert.

Am Department für Pharmakognosie in Wien wurden die Blätter mit einer Mühle der Marke Retsch vom Typ ZM 100 auf eine Korngröße von 0,75 µm gemahlen. Das Drogenpulver wurde luft- und lichtgeschützt gelagert.

3.2 ZUBEREITUNGEN

3.2.1 Ethanol-Extrakt

Das Ethanol-Extrakt wurde auf den Galapagos-Inseln von R. Hood-Nowotny und T. Schwemhofer hergestellt. Dafür wurden 70 g der getrockneten, grob zerkleinerten Blätter mit 750 ml Ethanol 96% versetzt und sieben Tage lang mazeriert. Das Lösungsmittel wurde am Department für Pharmakognosie Wien unter vermindertem Druck entfernt. Die Restfeuchte konnte durch Trocknung über Silicagel entfernt werden. Die Ausbeute betrug 7,53 g. Der Geruch des Extrakts erinnerte an eine Kräuterlimonade. Dieses Extrakt wird in weiterer Folge auch als EtOH-G bezeichnet.

3.2.2 Ätherisches Öl

Wie das Ethanol-Extrakt wurde auch das ätherische Öl auf den Galapagos-Inseln gewonnen. Die getrockneten Blätter wurden im Verhältnis 1:10 1,5h lang ab Erreichen des Siedepunkts einer Wasserdampfdestillation unterzogen. Insgesamt wurden 34 Wiederholungen dieses Prozesses mit jeweils 30 g der Blätter, welche zuvor mit einem Mörser auf eine Größe von 1-2 mm zerkleinert worden waren, durchgeführt. Anschließend wurde das ätherische Öl in 50 ml DCM ausgeschüttelt. Dieses Gemisch wurde eine Stunde lang im Kühlschrank gelagert und die Wasserphase danach vorsichtig abpipettiert. Um das Volumen für den Transport zu verringern, wurde die DCM-Phase auf etwa 25ml eingengt. Am Department für Pharmakognosie wurde

Die Bestimmung der Menge an ätherischem Öl erfolgte 10 Minuten nach dem Ende der Destillation unter Berücksichtigung der zugegebenen Hilfsphase. Hierbei wurden 2,1% ätherisches Öl gewonnen.

3.3.2 Einfache Wasserdampfdestillation

Nach dem Prinzip der Destillation auf den Galapagos-Inseln wurde das ätherische Öl nochmals nachisoliert. Zum Einsatz kamen 30 g gepulverte Droge, welche mit 300 ml Wasser versetzt wurde. 40 ml DCM dienten als Vorlage. Nach Ende der Destillation wurde das Destillat gekühlt und nach etwa einer Stunde mit einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die DCM-Phase wurde abgenommen und die Wasser-Phase zweimal mit je 10 ml DCM gewaschen. Das DCM-ÄÖ-Gemisch wurde mittels Sample Concentrator eingengt. Dabei wurden 0,86% ätherisches Öl gewonnen.



Abbildung 3 – Aufbau der Destillationsapparatur

3.3.3 Supercritical Fluid Extraction (SFE)

Die Supercritical Fluid Extraction ist eine Extraktionsmethode, bei der unter sehr apolaren Bedingungen mit superkritischem CO₂ als Lösungsmittel extrahiert wird. Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde ein Gerät des Typs MV-10 ASFE der Firma Waters verwendet.

Für die Extraktionsversuche wurden je 2 g gepulverte Blattdroge in eine Extraktionszelle aus Metall eingefüllt. Im ersten Schritt „Dynamic Duration“ wurde kontinuierlich Lösungsmittel durch die Extraktionszelle gepumpt. Im „Static State“ wurde die Probe in der Extraktionszelle mit dem Lösungsmittel unter Druck belassen. Darauf folgte ein

weiterer Schritt „Dynamic Duration“, in welchem wieder durch die Extraktionszelle gepumpt wurde. Alle Eluate wurden über das Make-up-Solvent gesammelt.

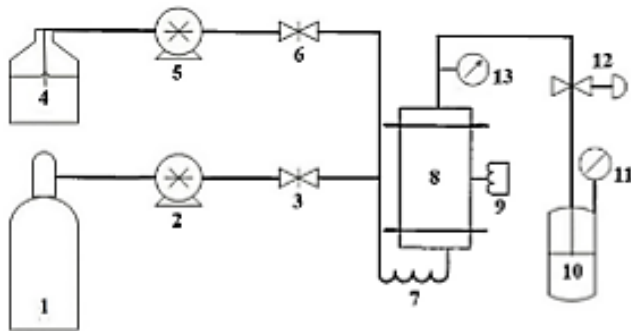


Abbildung 4 – Schematische Darstellung eines SFE-Apparats

(1) CO₂-Flasche, (2) CO₂-Pumpe, (3) und (6) Mikrodosierventil, (4) Co-Solvent-Reservoir, (5) Co-Solvent-Pumpe, (7) Heizspirale, (8) Extraktionszelle, (9) elektronische Temperaturkontrolle, (10) Auffanggefäß, (11) Flowmeter, (12) Rückdruck-Regulierungsventil, (13) Manometer (McHugh, Krukonis, 2013)

Zwei Versuche mit unterschiedlichen Einstellungen wurden durchgeführt:

Tabelle 2 - Geräteeinstellungen während des 1. Versuchs

Step	Co-Solvent	Co-S.-Flow (ml/min)	CO ₂ -Flow (ml/min)	Temperatur (°C)	Druck (bar)	Dynamic Duration 1 (min)	Static Duration (min)	Dynamic Duration 2 (min)	Make-up Flow (ml/min)
1	EtOH	0,00	10,00	40	200	5,00	5,00	5,00	2,00
2	EtOH	0,30	9,70	40	200	5,00	5,00	5,00	1,70
3	EtOH	0,60	9,40	40	200	5,00	5,00	5,00	1,40
4	EtOH	1,00	9,00	40	200	5,00	5,00	5,00	1,00

Im ersten Experiment (Tab. 2) wurde mit Ethanol als Co- und Make-up-Solvent gearbeitet, während im zweiten Versuch gänzlich auf ein Co-Solvent verzichtet wurde und Methanol als Make-up-Solvent verwendet wurde. Zudem wurde die Extraktionszeit verdoppelt (Tab. 3, s. S. 10).

Tabelle 3 - Geräteeinstellungen während des 2. Versuchs

Step	CO ₂ -Flow (ml/min)	Temperatur (°C)	Druck (bar)	Dynamic Duration 1 (min)	Static Duration (min)	Dynamic Duration 2 (min)	Make-up Flow (ml/min)
1	10,00	40	200	10,00	10,00	10,00	2,00
2	10,00	40	200	10,00	10,00	10,00	2,00
3	10,00	40	200	10,00	10,00	10,00	2,00
4	10,00	40	200	10,00	10,00	10,00	2,00

3.3.4 Ultraschallextraktion

Als sehr schnelle und kostengünstige Methode ist die Ultraschallextraktion eine gute Alternative zur Mazeration oder Soxhlet-Extraktion, weil auch thermolabiles Pflanzenmaterial effizient extrahiert werden kann.

Dazu wurde ein Ultraschallbad der Firma Elma Type Transsonic 460 verwendet.

Diese Extraktionsmethode wurde zur Herstellung eines Ethanol-, eines Hexan- und eines DCM-Extrakts verwendet. Für das Ethanol-Extrakt wurden 50 g Drogenpulver mit 500 ml Ethanol 96% für zwei Stunden im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde der Ansatz für vier Tage dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Nach dem Abnutschen wurde das Ethanol unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 17,3 g Extrakt erhalten.

Für das Hexan- bzw. DCM-Extrakt wurden je 2 g gepulverte Blattdroge mit 20 ml des jeweiligen Lösungsmittels versetzt und anschließend für 15 Minuten mittels Ultraschall extrahiert. Die gewonnenen Extrakte wurden 10 Minuten bei 13400 rpm zentrifugiert und anschließend zur Trockene gebracht. Dabei betrug die Ausbeute 41,5 mg bzw. 194,3 mg.

3.4 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN

Während dieser Diplomarbeit wurden verschiedene chromatographische Verfahren zu analytischen, aber auch zu präparativen Zwecken verwendet.

3.4.1 Dünnschichtchromatographie

Für diese Untersuchungen wurden folgende Materialien verwendet:

Stationäre Phase: DC Kieselgel 60 F₂₅₄ Folien von Merck

Mobile Phasen: a) Toluol-Ethylacetat 96:4

b) Toluol-Ethylacetat 90:10

c) Chloroform-Methanol-Wasser 85:8:0,5

Sprühreagens: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AAS)

Herstellung: 0,5 ml Anisaldehyd, 10 ml Essigsäure_{conc.} und 85 ml Methanol vermischen. Anschließend 5 ml Schwefelsäure_{conc.} vorsichtig zugeben. Nach dem Besprühen wird die Platte für etwa 5min bei 105 °C in den Trockenschrank gelegt. Die DC-Platte kann danach im Tageslicht ausgewertet werden.

Kamera: CAMAG TLC Visualizer

Foto-Software: Vision CATS CAMAG TLC Software

3.4.2 Flash-Chromatographie

Für alle im Zuge dieser Diplomarbeit durchgeführten Fraktionierungen wurde ein Gerät der Marke Interchim vom Typ PuriFlash® 4250 verwendet.

Vom Ethanol-Extrakt wurden zwei Portionen von 0,5 g und 1 g Probenmaterial aufgetrennt. Dementsprechend wurden Puriflash Column 30 Silica HP-25g- bzw. Puriflash Column 30 Silica HP-40g-Säulen verwendet. Für die Herstellung des Dryloads zum Probenauftrag verwendete man Kieselgel der Korngröße 0,063-0,200 mm von der Firma Merck (Chargennummer: TA637234) als Sorbens, wobei 0,5 g Extrakt auf 1 g und 1 g Extrakt auf 2 g Sorbens aufgebracht wurden. Als mobile Phase dienten n-Hexan, DCM und Methanol, welche in folgenden Gradienten gemischt wurden (Tab. 4, s. S. 12; Tab. 5, s. S. 12):

Tabelle 4 – Lösungsmittelgradient für die Auftrennung von 0,5 g Ethanol-Extrakt

Zeit (min)	Lösungsmittel	Verhältnis (%)	Flow Rate
0-15	n-Hexan, DCM	50:50	15 ml/min
15-25	n-Hexan, DCM	50:50 auf 100	15 ml/min
25-45	DCM	100	15 ml/min
45-60	DCM, Methanol	100 auf 90:10	15 ml/min
60-70	DCM, Methanol	90:10	15 ml/min
70-90	DCM, Methanol	90:10 auf 70:30	15 ml/min

Tabelle 5 – Lösungsmittelgradient für die Auftrennung von 1 g Ethanol-Extrakt

Zeit (min)	Lösungsmittel	Verhältnis (%)	Flow Rate
0-12,6	n-Hexan, DCM	50:50	26 ml/min
12,6-21,0	n-Hexan, DCM	50:50 auf 100	26 ml/min
21,0-37,9	DCM	100	26 ml/min
37,9-51,1	DCM, Methanol	100 auf 90:10	26 ml/min
51,1-58,9	DCM, Methanol	90:10	26 ml/min
58,9-75,7	DCM, Methanol	90:10 auf 70:30	26 ml/min

Als Detektoren dienten in beiden Versuchen ein PDA und ein ELSD in der Puriflash-Anlage.

Bei der Fraktionierung des ätherischen Öls wurde 1 g Probenmaterial über eine Puriflash Column 30 Silica HP-40g-Säule aufgetrennt. Auch hier wurde ein Dryload mit 2 g Kieselgel hergestellt. Als mobile Phase dienten n-Hexan und DCM in folgenden Verhältnissen:

Tabelle 6 – Lösungsmittelgradient für die Auftrennung von 1 g ätherischen Öl

Zeit (min)	Lösungsmittel	Verhältnis (%)	Flow Rate
0-10	n-Hexan	100	26 ml/min
10-20	n-Hexan, DCM	75:25	26 ml/min
20-30	n-Hexan, DCM	50:50	26 ml/min
30-55	DCM	100	26 ml/min

3.4.3 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Folgendes Gerät wurde zu Analysezwecken im Zuge dieser Diplomarbeit verwendet:

Tabelle 7 – GC-MS-Hardware und Einstellungen

GC	
Gerät	Shimadzu GCMS-QP2010
Stationäre Phase	Marchery Nagel Optima 5; 50 m x 0,25 mm; Filmdicke: 0,5 µm Phenyl-Methyl-polysiloxan
Mobile Phase	Helium
Fluss	1,39 ml/min
Temperaturgradient	50-270 °C, Rate 6 °C/min
Injektortemperatur	270 °C
Injection mode	Splitless
Software	LabSolutions GCMS Real Time Analysis, LabSolutions GC Postrun Analysis
Autosampler	
Gerät	Shimadzu AOC-20i+s
# of rinses with solvent (post-run)	1
# of rinses with sample	2
MS	
Temperatur Ionenquelle	250 °C
Cut-Time	7 min
Scan-Bereich	40-70 0m/z

Eine Analyse dauert ca. 47 min.

Die Zuordnung der Peaks erfolgte über drei Methoden:

- Vergleich mit Bibliotheken

Die Massenspektren aller Peaks wurden mit den in der GC Postrun Analysis Software zur Verfügung stehenden Bibliotheken analysiert: WILEY229.LIB, NIST147.LIB, ETHOEL.LIB, SZTERP.LIB

- Rechromatographie mit Reinsubstanzen

Jede Komponente des Ethanol-Extrakts, die durch den Vergleich mit Literaturdaten (Cimadom et al., 2016) und Bibliotheken identifiziert wurde, wurde als Reinsubstanz mittels GC-MS analysiert und die Retentionszeiten verglichen.

- Ermittlung der Kovats-Indices

Durch Analyse eines Alkangemisches C₈-C₂₀ in der GC-MS nach dem Temperaturprogramm in Tabelle 7 (s. S. 13) wurden die Retentionszeiten normalisiert. Die Kovats-Indices wurden bei der Verwendung eines Temperaturprogramms nach folgender Formel berechnet: (Wikipedia, 2019)

$$I = 100 * \left[x + (X - x) * \frac{t_{r(\text{unbekannt})} - t_{r(x)}}{t_{r(X)} - t_{r(x)}} \right]$$

I Kovats Index

x Kohlenstoffatome im kleineren Alkan

X Kohlenstoffatome im größeren Alkan

t_r Retentionszeit

Tabelle 8 – Vergleich der Kovats-Indices

	Retentionszeit (min)	KI	KI bekannt (Cimadom et al., 2016)
α-Pinen	11,95	944	936
β-Pinen	13,22	990	980
α-Phellandren	13,87	1014	1007
D-Limonen	14,52	1038	1034
Eucalyptol	14,67	1043	1036
α-Terpinolen	16,13	1097	1093
Linalool	16,22	1100	1101
α-Terpineol	18,58	1192	1197
Caryophyllen	24,77	1452	1442
Nerolidol	27,23	1564	1572

Die Kovats-Indices der Analysen stimmten weitgehend mit der Literatur (Cimadom et al., 2016) überein.

3.5 REPELLENTIEN-TEST

Die Repellentien-Tests wurden am Universitäts- und Forschungszentrum Tulln (UFT) der Universität für Bodenkultur, Wien von C. Martina durchgeführt. Für die Durchführung eines solchen Tests wurden Kollagenetze mit entfibrinisiertem bovinem Blut, welches auf Körpertemperatur erwärmt wurde, gefüllt. Pro Durchgang wurden zwei „Blutwürste“ benötigt, welche in einem Plexiglas-Kubus platziert wurden (Abb.5). Je eine dieser Würste wurde mit dem zu testenden Extrakt, die andere mit dem Lösungsmittel unvergällter Ethanol 96% benetzt. Pro Wiederholung wurden mindestens 20 weibliche Mosquitos in dem Kubus gebracht. Ein Versuch dauerte drei Minuten, wobei jeweils bei Minute 1 und Minute 3 die Mosquitos, die aktuell auf den jeweiligen Attrappen saßen, gezählt wurden.



*Abbildung 5 – Versuchsaufbau Repellentien-Testung
©Claudia Martina, PhD*

3.6 LÖSUNGSMITTEL UND REINSUBSTANZEN

Sämtliche verwendete Lösungsmittel entsprachen den ÖAB-Richtlinien.

Tabelle 9 - Reinsubstanzen

Name	Firma/Chargennummer
Alkangemisch C ₈ -C ₂₀	Sigma Aldrich / BCBW1946
Caryophyllen	Dragoco / 4/114355
D-Limonen	Sigma Aldrich / MKCD9298
Eucalyptol	Merck / 9030706
Guaiol	Extrasynthese / 3819S
Linalool	Roth / 2160036
Nerolidol	Roth / 2160036
α -Phellandren	Sigma Aldrich / MKCG0041
α -Pinen	Sigma Aldrich / SHBK3116
α -Terpineol	Roth / 4270036
α -Terpineolen	Dragoco / 3/078930
β -Eudesmol	Sigma Aldrich / BCBX4301
β -Pinen	Dragoco / 11/7
γ -Terpinen	Sigma Aldrich / STBH9503

4 ERGEBNISSE

4.1 ETHANOL-EXTRAKT

Das Ethanol-Extrakt lieferte in der GC-MS folgendes Chromatogramm (Abb. 6):

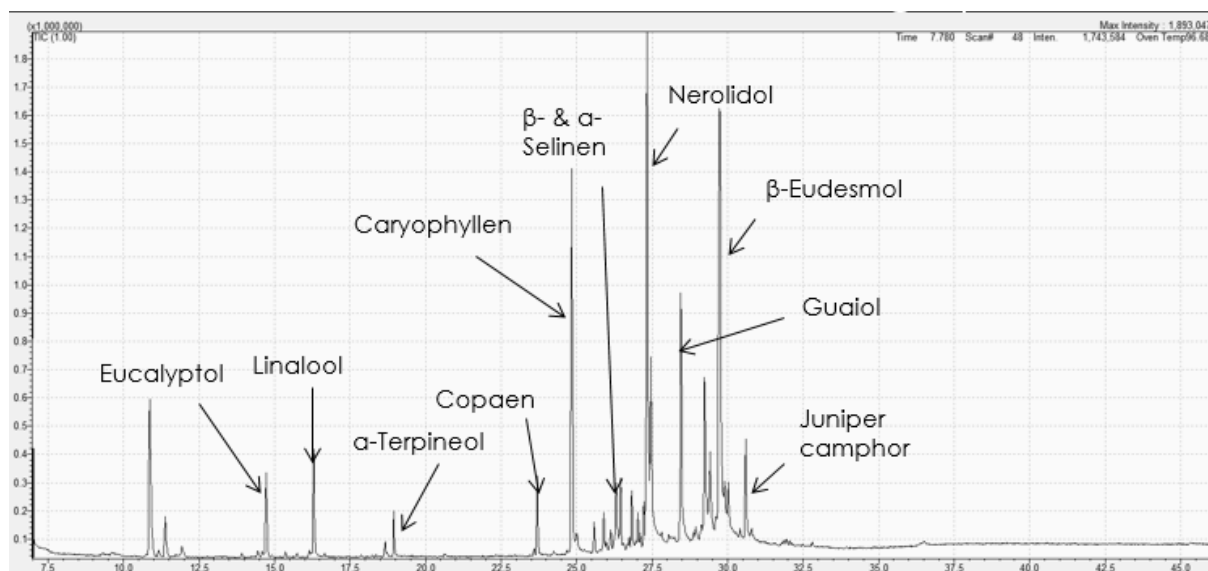


Abbildung 6 – GC-Chromatogramm Ethanol-Extrakt, Bedingungen s. S. 13

In diesem Extrakt wurden als Hauptkomponenten Sesquiterpene detektiert, während nur geringe Anteile an Monoterpenen enthalten waren. Grund für die geringe Menge an Monoterpenen ist vermutlich, dass diese leicht flüchtigen Verbindungen bei der Herstellung des Extrakts bzw. beim Entfernen des Lösungsmittels teilweise abgedampft waren. Zur Identifizierung der Wirkstoffe wurde das komplexe Gemisch an Inhaltsstoffen durch Fraktionierung mittels der Flash-Chromatographie weiter aufgetrennt.

4.1.1 Fraktionierung

In einem ersten Experiment wurden 0,5 g des Ethanol-Extrakts aufgetrennt, um zu testen, ob die in Tabelle 4 (s. S. 12) beschriebene Methode zu einer zufriedenstellenden Trennung des Gemisches führt. Dabei hat man folgendes Fraktionierungsmuster erhalten (Abb. 7, s. S. 18):

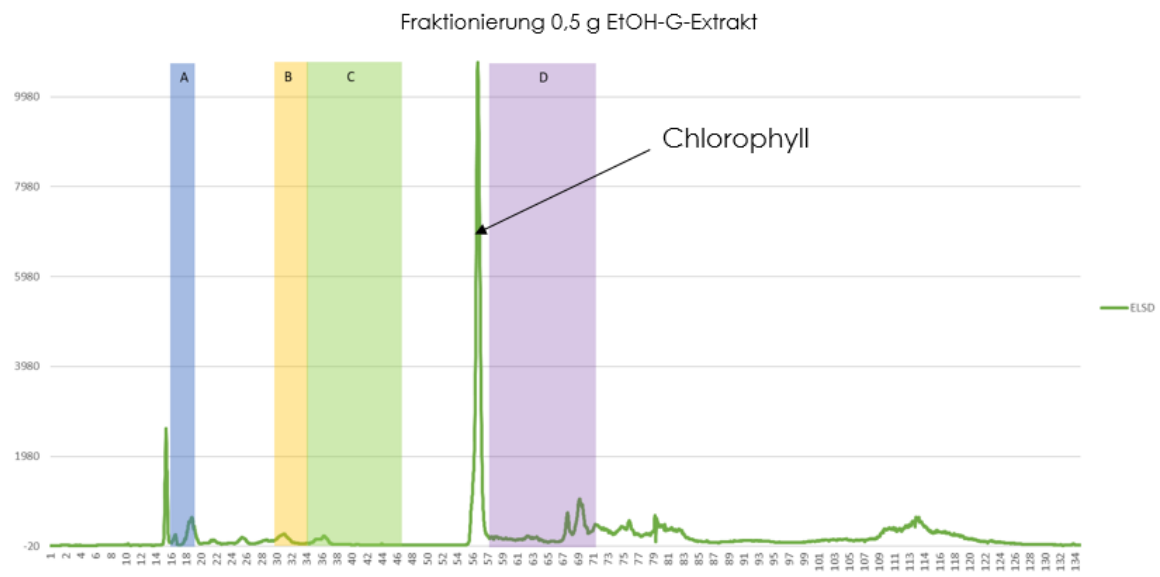


Abbildung 7 – Fraktionierung des EtOH-G-Extrakts im 1. Experiment

x-Achse: Fraktionen

y-Achse: Signalintensität

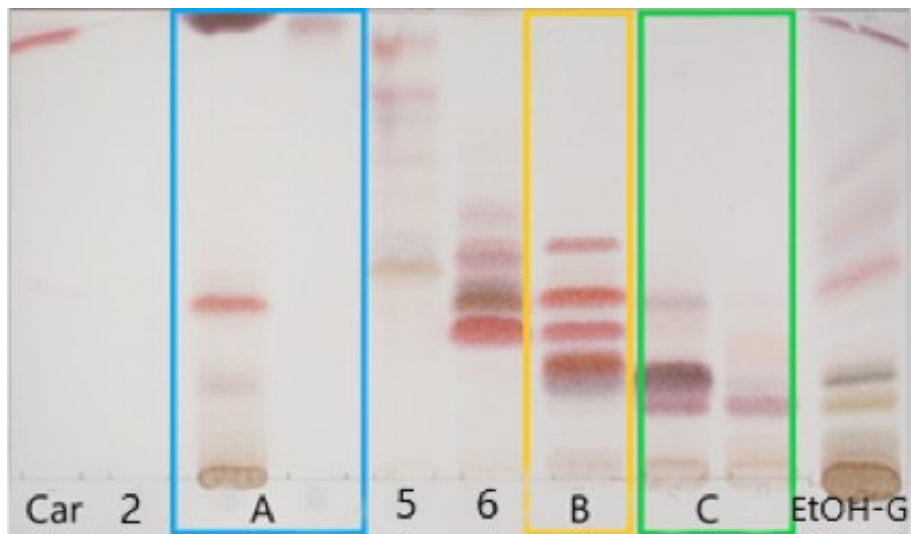


Abbildung 8 – DC der Fraktionen A-C

Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 96:4

Detektion: AAS

Car... Caryophyllen

EtOH-G... Ethanol-Extrakt

2, 5, 6... Zwischenfraktionen

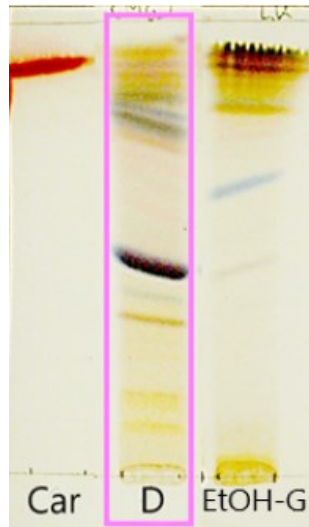


Abbildung 9 – DC der Fraktion D
 Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 85:8:0,5
 Detektion: AAS
 Car... Caryophyllen
 EtOH-G... Ethanol-Extrakt

Die einzelnen Fraktionen wurden anhand der ELSD-Detektion vereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurden die Sammelfraktionen mit Hilfe der DC kontrolliert (Abb. 8, s. S. 18 und Abb. 9). Folgende vier sollten aufgrund der deutlichen Unterschiede in ihrer Zusammensetzung im Repellent-Test untersucht werden (Tab. 10):

Tabelle 10 – Mengen der relevanten Fraktionen im 1. Experiment

Sammelfraktion	Subfraktionen	Menge
Fraktion A	16-19	37,8 mg
Fraktion B	30-34	13,2 mg
Fraktion C	35-47	10,6 mg
Fraktion D	58-72	37,1 mg

Da die Mengen der Sammelfraktionen für die Testung nicht ausreichten, wurde der Versuch mit 1 g Ethanol-Extrakt unter den in Tabelle 5 (s. S. 12) angegebenen Bedingungen wiederholt.

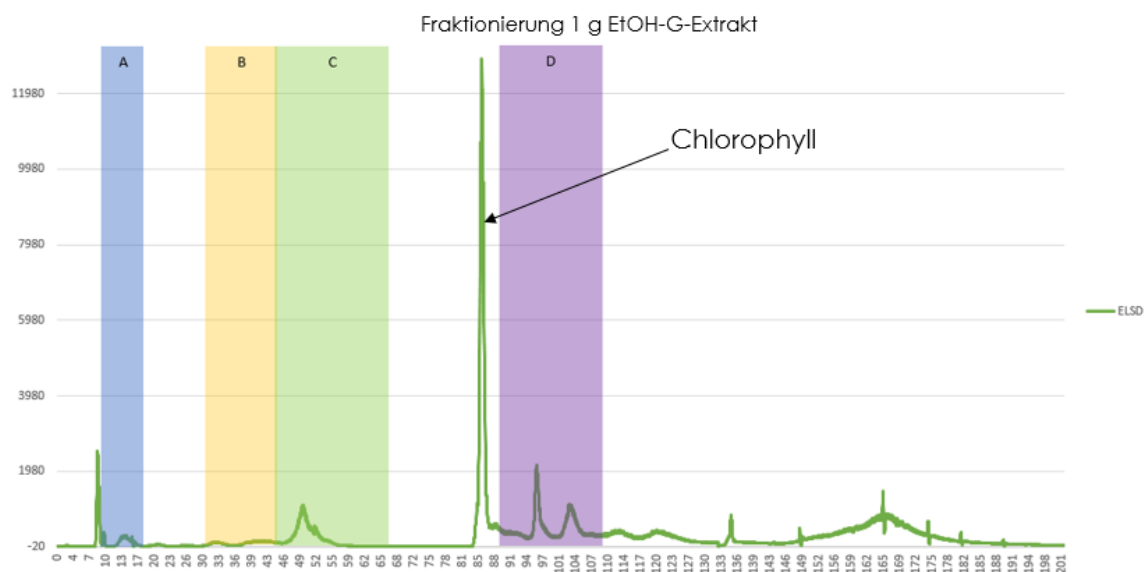


Abbildung 10 – Fraktionierung des EtOH-G-Extrakts im 2. Experiment

x-Achse: Fraktionen

y-Achse: Signalintensität

Die Trennung des Ethanol-Extrakts war weitgehend reproduzierbar (Abb. 10) und es wurden folgende Fraktionen gebildet (Tab. 11):

Tabelle 11 – Mengen der relevanten Fraktionen im 2. Experiment

Sammelfraktion	Subfraktion	Menge
Fraktion A	9-17	48,5 mg
Fraktion B	30-45	75,7 mg
Fraktion C	46-67	68,2 mg
Fraktion D	90-109	105,6 mg

Diese Fraktionen zeigten in der DC weitgehende Übereinstimmung mit den Sammel-fraktionen des ersten Experiments, so dass die jeweils gleichnamigen Fraktionen aus beiden Trennschritten kombiniert wurden. Abschließend wurden diese mittels DC (Abb. 11, s. S. 21 und Abb. 12, s. S. 21) und GC-MS untersucht.

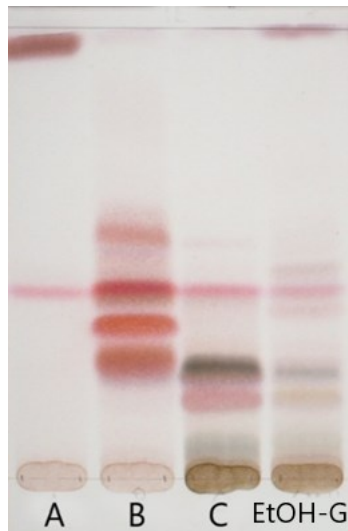


Abbildung 11 – DC vereinigte Fraktionen A-C
Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 96:4
Detektion: AAS
EtOH-G... Ethanol-Extrakt



Abbildung 12 – DC vereinigte Fraktion D
Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser 85:8:0,5
Detektion: AAS
EtOH-G... Ethanol-Extrakt

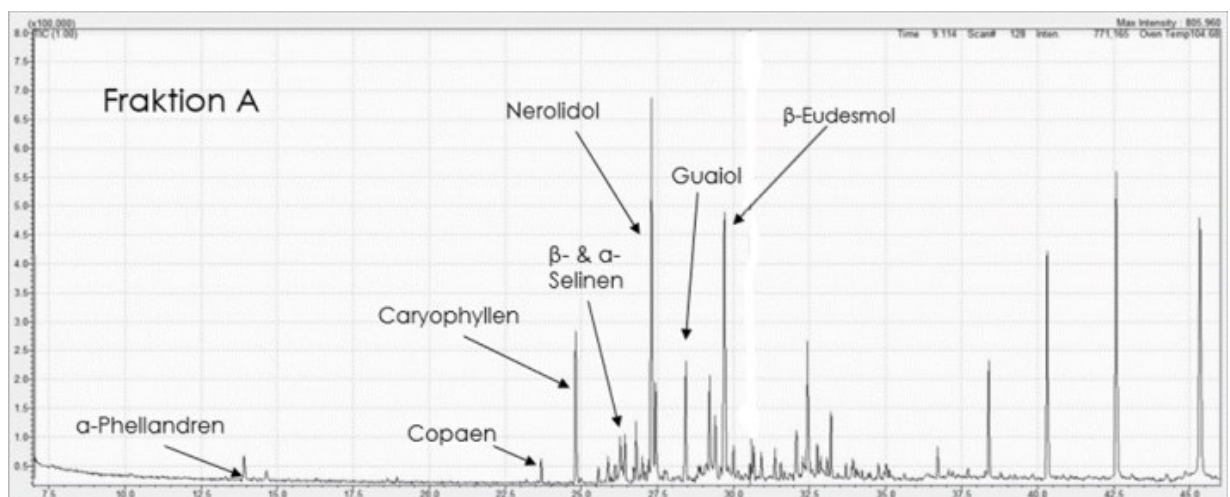


Abbildung 13 – GC-Chromatogramm der vereinigten Fraktion A, Bedingungen s. S. 13

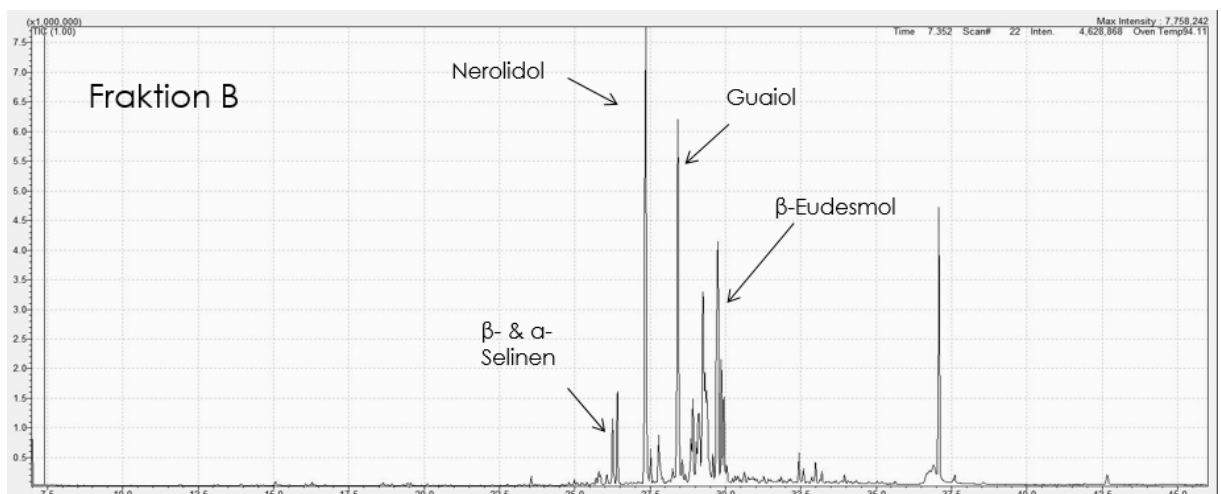


Abbildung 14 – GC-Chromatogramm der vereinigten Fraktion B, Bedingungen s. S. 13

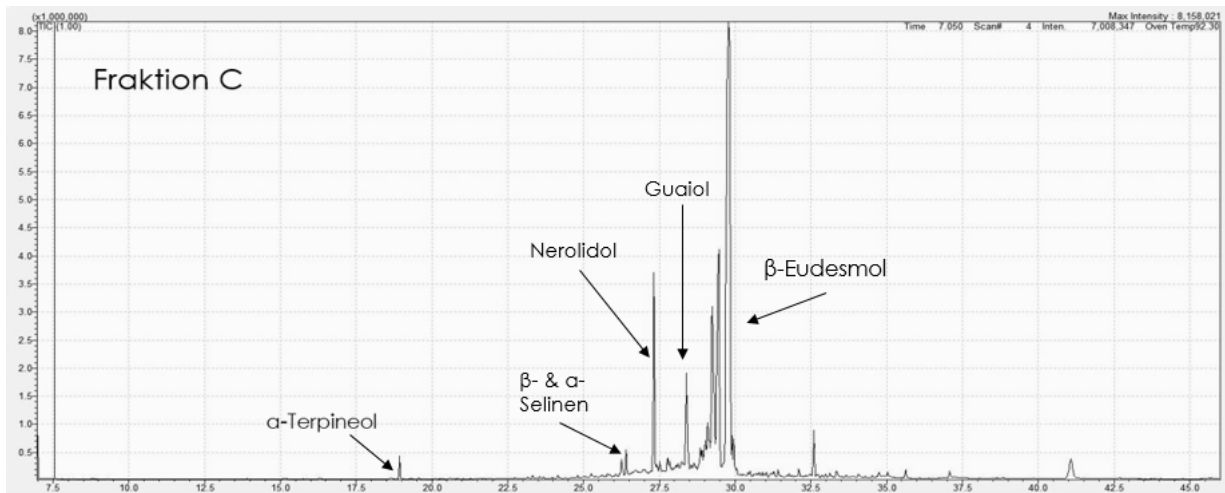


Abbildung 15 – GC-Chromatogramm der vereinigten Fraktion C, Bedingungen s. S. 13

Eine GC-MS-Analyse der Fraktion D war nicht möglich, da diese relativ polar und somit nicht ausreichend flüchtig war.

Während Fraktion A (Abb. 13, s. S. 21) neben großen Mengen an Nerolidol und β-Eudesmol auch kleine Anteile an α-Phellandren, Copaen, Caryophyllen, α-, β-Selinen und Guaiol enthielt, beschränkte sich das Inhaltsstoffspektrum der Fraktionen B (Abb. 14, s. S. 21) und C (Abb. 15) hauptsächlich auf drei Substanzen, nämlich Nerolidol, Guaiol und β-Eudesmol. Dabei enthielt Fraktion B große Mengen an Nerolidol und Guaiol. Aber auch β-Eudesmol und kleine Anteile an α- und β-Selinen wurden detektiert. Fraktion C beinhaltete hauptsächlich β-Eudesmol, während Nerolidol und Guaiol nur in kleineren Anteilen zu finden waren. Das Monoterpen α-Terpineol sowie α- und β-Selinen waren nur in Spuren enthalten.

4.1.2 Ethanol-Extrakt in der Repellentien-Testung

Das Ethanol-Extrakt wurde in zwei Konzentrationen (25 mg/ml und 50 mg/ml) gegen die Mosquitos getestet (Abb. 16, s. S. 23). Dabei konnte bei beiden Verdünnungen eine sehr gute Wirksamkeit ohne signifikanten Unterschied festgestellt werden.

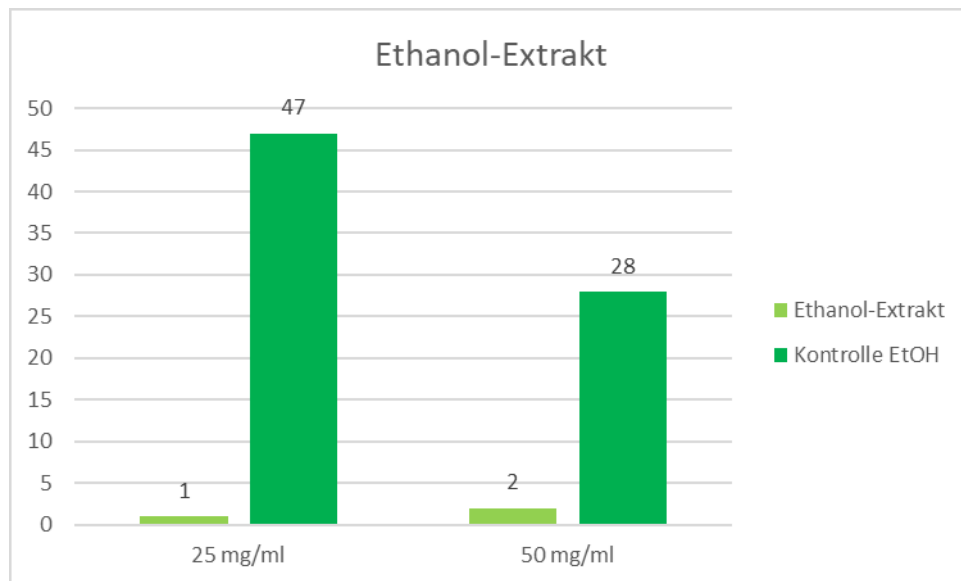


Abbildung 16 – Ergebnisse der Testung des Ethanol-Extrakts

Im nächsten Schritt wurden die Fraktionen A, B, C und D in einer Konzentration von ungefähr 26 mg/ml getestet (Abb. 17).

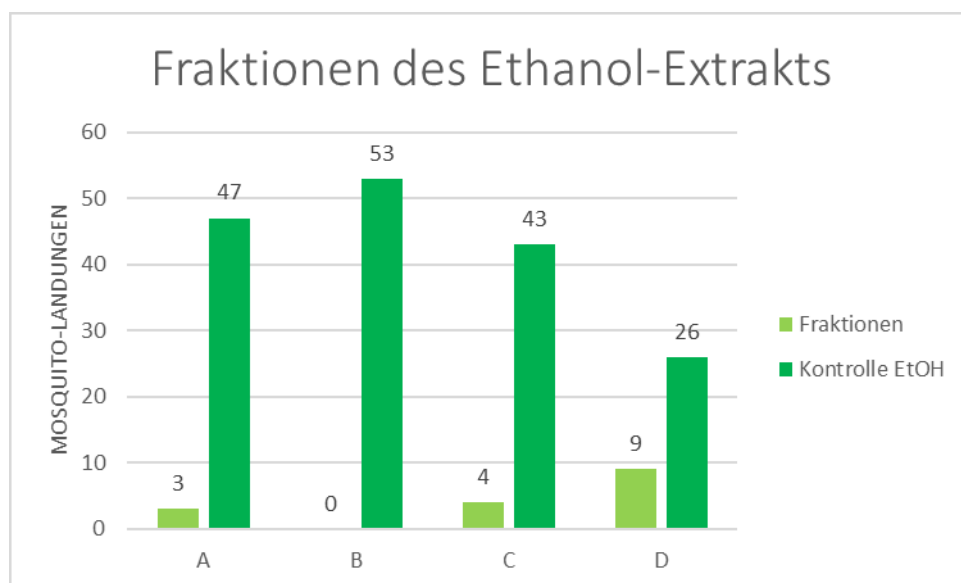


Abbildung 17 – Ergebnisse der Testung der Fraktionen A-D des Ethanol-Extrakts

A-26,7mg/ml

B-25,7mg/ml

C-26,3mg/ml

D-26,7mg/ml

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass Fraktion B mit einer Wirksamkeit von 100% am effektivsten war. In dieser Fraktion finden sich hauptsächlich die Sesquiterpene Nerolidol, Guaiol und β -Eudesmol. Alle anderen Untersuchungslösungen wirkten auf die Insekten zwar auch abstoßend, aber nicht im Ausmaß von Fraktion B.

Aufgrund der guten Wirksamkeit von Fraktion B wurde diese auf 0,5 mg/ml verdünnt und nochmals getestet. Da die Fraktion B 33,6% Nerolidol, 25,7% Guaiol und 21,1% β -Eudesmol enthielt, sollte ermittelt werden, ob die Wirkung ausschließlich auf diese drei Komponenten zurückzuführen war. Dazu wurde eine Mischung aus den drei Sesquiterpenen im Verhältnis 1:1:1 – d.h. 0,17 mg/ml pro Substanz – hergestellt und in der gleichen Konzentration wie die Fraktion selbst (0,5 mg/ml) getestet (Abb. 18).

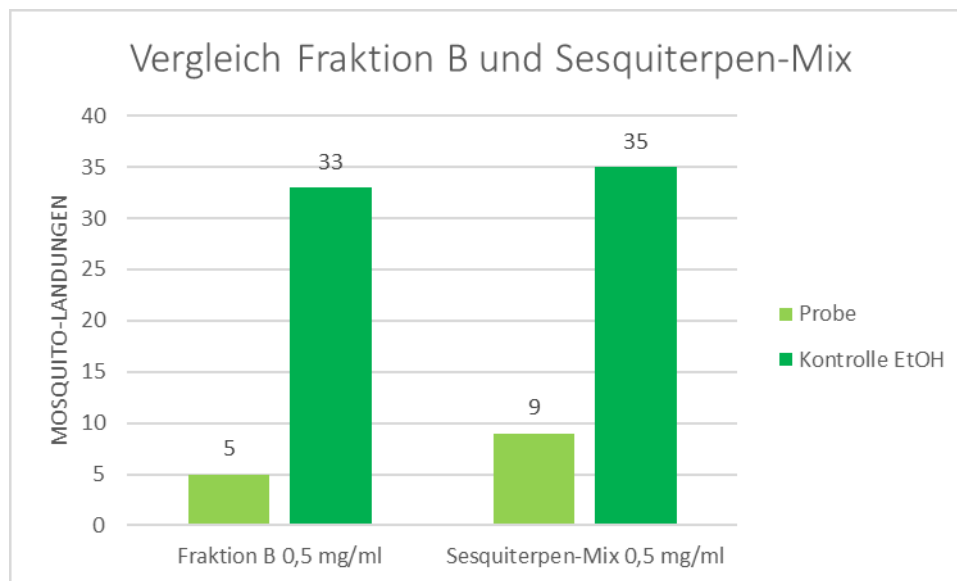


Abbildung 18 – Ergebnisse der Testung der Fraktion B und des Sesquiterpen-Mix

Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich, dass Fraktion B eine etwas bessere Wirksamkeit als die Sesquiterpen-Mischung aufwies. Möglicherweise lag dies an den Mengenverhältnissen in Fraktion B, da die drei Hauptinhaltsstoffe nicht im Verhältnis 1:1:1 vorhanden waren und durch die höheren Anteile an Nerolidol eine bessere Wirksamkeit zustande kam. Eine weitere Erklärung für diesen Unterschied könnte die Wirksamkeit von Nebenkomponten in Fraktion B sein.

4.1.3 Vereinfachte Herstellung und Testung eines der Fraktion B ähnlichen Gemisches

Da die technische Ausstattung im Labor auf den Galapagos-Inseln keine Fraktionierung mittels Flash-Chromatographie zulässt, bestand großes Interesse an der Etablierung einer einfachen Methode, die ein Produkt liefert, dass vergleichbar mit der stark wirksamen Fraktion B ist.

Dazu wurde erneut ein Ethanol-Extrakt durch Ultraschallextraktion hergestellt (s. Kapitel 3.3.4, S. 10). Dieses Extrakt wird in weiterer Folge als EtOH-W bezeichnet. Nach

Entfernung des Lösungsmittels wurden 5 g des gewonnenen Extrakts mit 500 ml Wasser versetzt und 1,5 h einer vereinfachten Wasserdampfdestillation unterzogen. Als Vorlage dienten 40 ml DCM, welches nach mehrmaligem Ausschütteln abgedampft wurde. Die Ausbeute des Destillats betrug 91,6 mg.

Anhand der Analyse mittels Dünnschichtchromatographie erkannte man, dass der aus den gepulverten Blättern hergestellte Ethanol-Extrakt im Inhaltsstoffmuster der apolaren Komponenten gut vergleichbar mit jenem, welcher auf den Galapagos-Inseln produziert worden war, war (Abb. 19).



Abbildung 19 – DC Vergleich Ethanol-Extrakte, ÄÖ und Destillat
Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 96:4
Detektion: AAS
EtOH-G... Ethanol-Extrakt-Galapagos
EtOH-W... Ethanol-Extrakt-Wien
Ner... Nerolidol

Bei der Analyse mit der GC-MS (Abb. 20, s. S. 26) fiel auf, dass im Extrakt EtOH-W keine Monoterpene mit Retentionszeiten von 10-20 min detektiert wurden. Gründe dafür könnten im Zuge des Herstellungsprozesses die Trocknung, die thermische Belastung während der Zerkleinerung sowie die Lagerung im Zusammenhang mit der leichten Flüchtigkeit dieser Verbindungen sein.

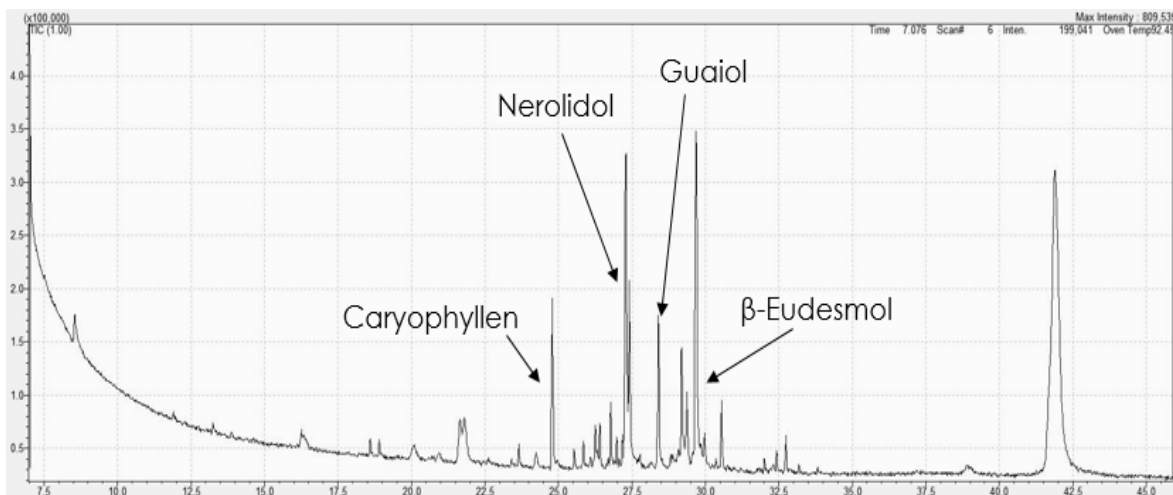


Abbildung 20 – GC-Chromatogramm des EtOH-W-Extrakts, Bedingungen s. S. 13

Nach der Destillation dieses Extrakts wurden ebenfalls chromatographische Analysen durchgeführt. Durch die Destillation konnten Chlorophyll und andere polare Begleitstoffe abgetrennt werden. Das Destillat war leicht gelblich und in seiner Konsistenz ölig. Geruch und Aussehen ähnelten stark dem ätherischen Öl. Anhand der DC (Abb. 19, s. S. 25) erkannte man, dass das Destillat in seiner qualitativen Zusammensetzung dem Öl sehr ähnlich war. Bei R_f 0,4 zeigte das Öl eine pinke Bande, während die des Destillats schwächer und leicht bräunlich war. Die rötlich-pinke Bande bei R_f 0,3 war beim Destillat intensiver ausgeprägt. Zwischen dem Start und R_f 0,2 wurden beim Destillat mehr polare Substanzen, welche als bräunlich-grüne Banden erschienen, detektiert.

Das GC-Chromatogramm (Abb. 21, s. S. 27) zeigte, dass die Sesquiterpene im Destillat angereichert waren. Nerolidol, Guaiol und β-Eudesmol, welche die Hauptkomponenten in Fraktion B darstellten, waren auch in diesem Destillat in größeren Mengen enthalten. Lediglich das Mengenverhältnis zwischen Guaiol und β-Eudesmol hatte sich umgekehrt. Zusätzlich fand man auch Caryophyllen.

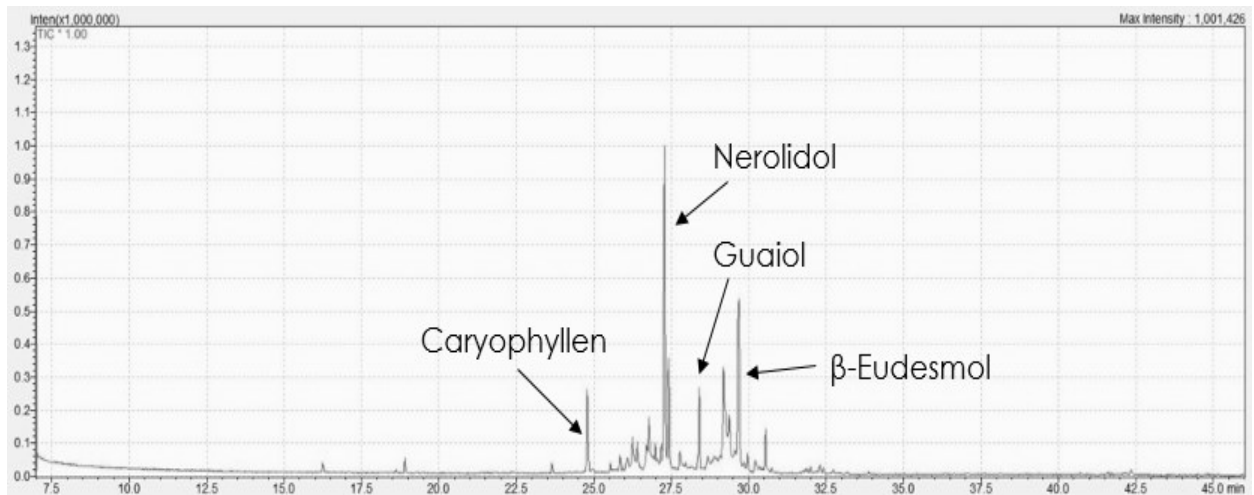


Abbildung 21 – GC-Chromatogramm des Destillats, Bedingungen s. S. 13

In der Repellentien-Testung zeichnete sich das Destillat in einer Konzentration von 6,25 mg/ml durch eine Wirksamkeit von 100% aus (Abb. 22).

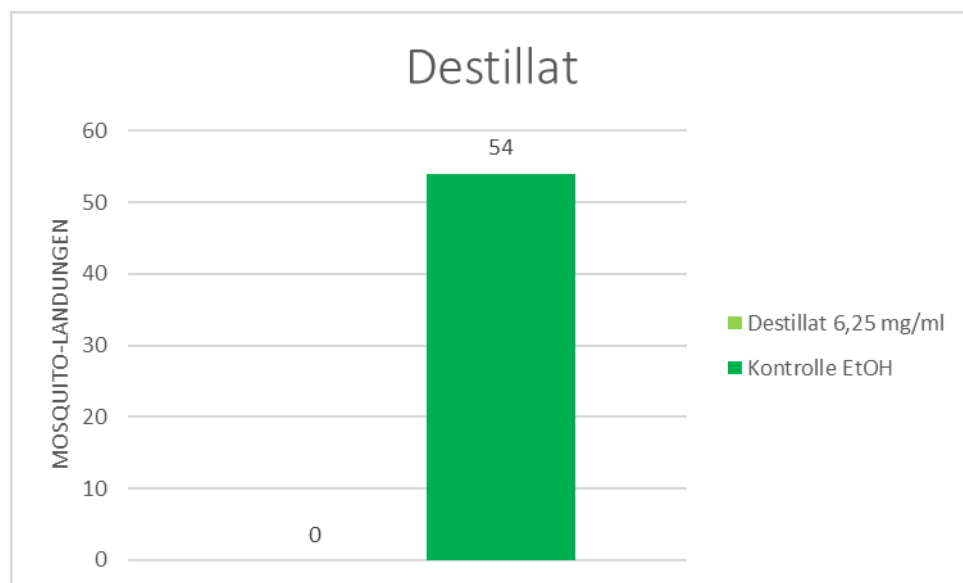


Abbildung 22 – Ergebnisse der Testung des Destillats

4.2 ÄTHERISCHES ÖL

Im Vergleich zum Ethanol-Extrakt enthielt das ätherische Öl ein wesentlich breiteres Spektrum an Monoterpenen (Abb. 23). Unabhängig von der Gewinnung des Öls mittels Wasserdampfdestillation nach EuAB oder der vereinfachten Methode wurde ein übereinstimmendes Inhaltsstoffmuster nachgewiesen. Der Bereich der Sesquiterpene war beim Vergleich von Öl und Extrakt nahezu deckungsgleich. Mit einem Anteil von 12,8% wurde Nerolidol als Hauptkomponente bestimmt.

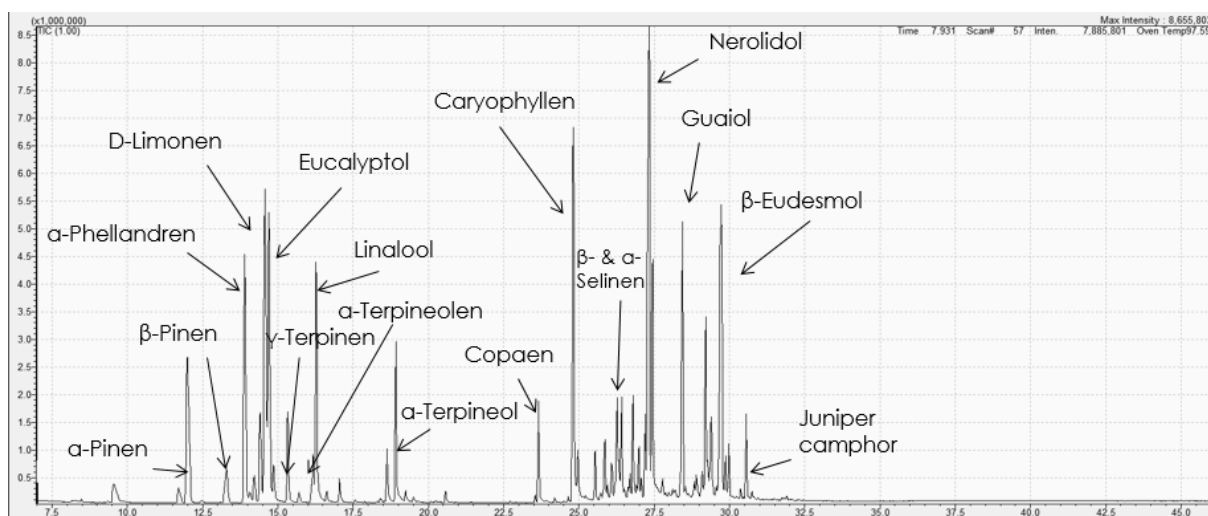


Abbildung 23 – GC-Chromatogramm ätherisches Öl, Bedingungen s. S. 13

Auch dieses komplexe Inhaltsstoffgemisch wurde mit Hilfe der Flash-Chromatographie aufgetrennt.

4.2.1 Fraktionierung

Zur Fraktionierung wurde 1 g des ätherischen Öls eingesetzt. Als mobile Phase dienten n-Hexan und DCM. Die genaue Methode ist aus Tabelle 6 (s. S. 12) entnehmbar.

Anhand der folgenden Auftrennung wurden die Fraktionen kombiniert (Abb. 24):

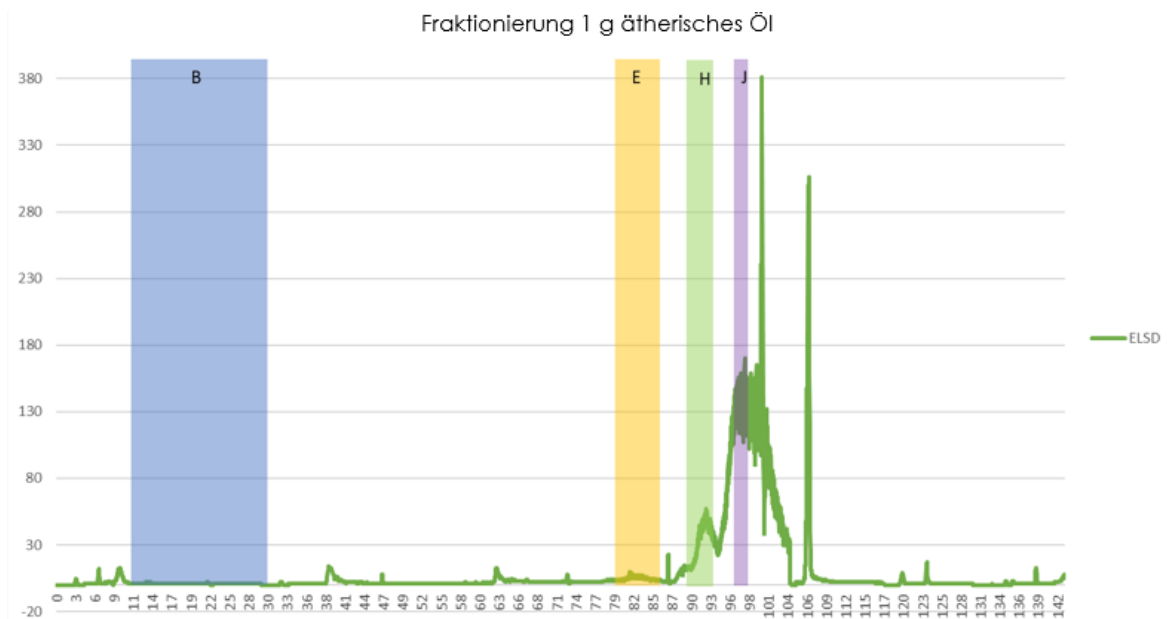


Abbildung 24 – Fraktionierung des ätherischen Öls

x-Achse: Fraktionen

y-Achse: Signalintensität

Nach der DC-Kontrolle (Abb. 25 und 26, s. S. 30) resultierten 13 Sammelfraktionen, die jeweils mit der GC-MS untersucht wurden. Aus den Sammelfraktionen wurden vier Fraktionen, die sich signifikant in ihrer Zusammensetzung unterschieden, ausgewählt (Tab. 12):

Tabelle 12 – Mengen der relevanten Fraktionen des ätherischen Öls

Sammelfraktion	Subfraktion	Menge
Fraktion B	9-21	116,7 mg
Fraktion E	80-86	93,4 mg
Fraktion H	91-94	37,9 mg
Fraktion J	97-99	48,2 mg

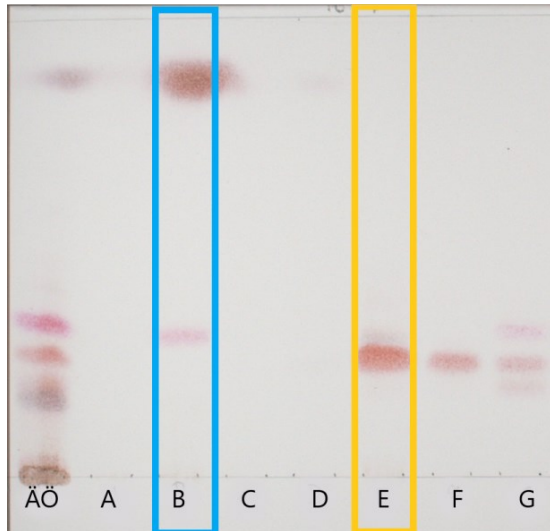


Abbildung 25 – DC der Fraktionen A-G
Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 96:4
Detektion: AAS



Abbildung 26 – DC der Fraktionen H-O
Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 90:10
Detektion: AAS

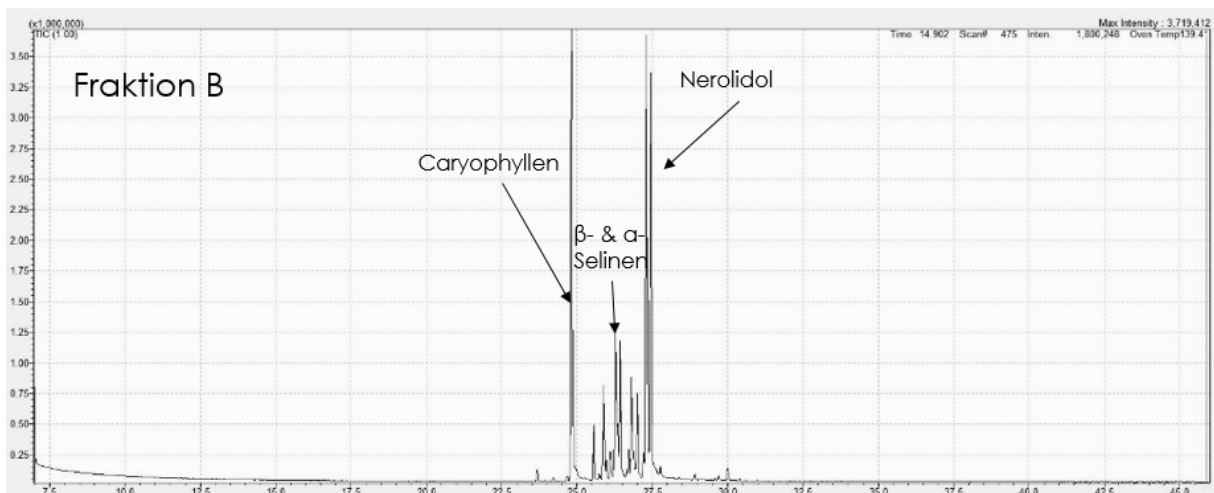


Abbildung 27 – GC-Chromatogramm der Fraktion B, Bedingungen s. S. 13

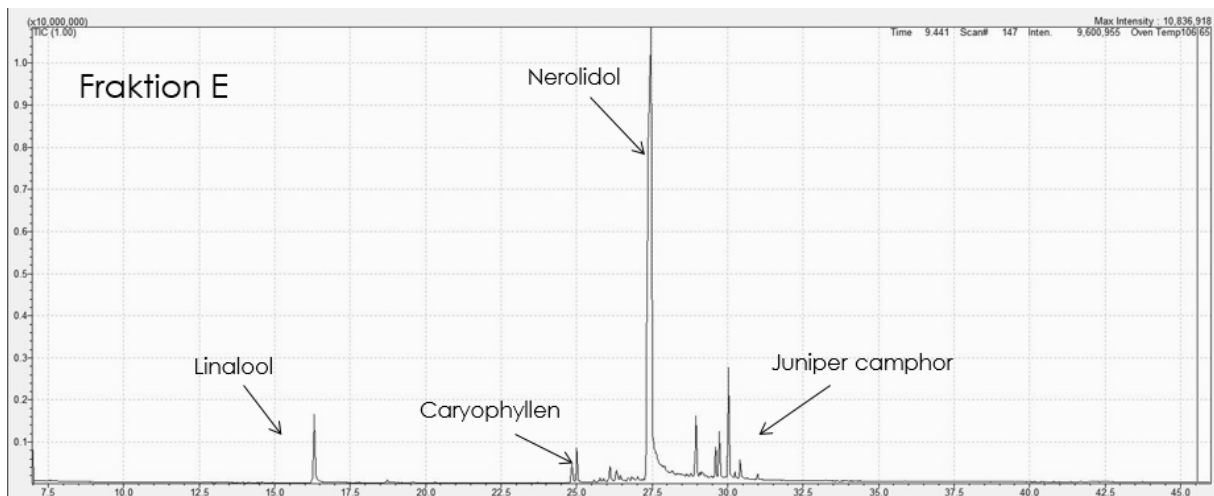


Abbildung 28 – GC-Chromatogramm der Fraktion E, Bedingungen s. S. 13

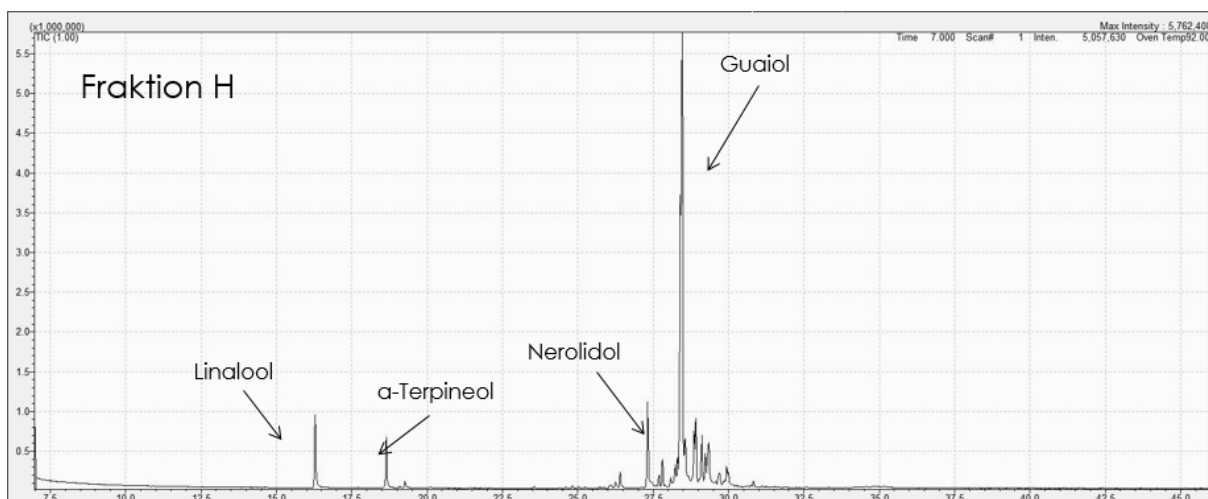


Abbildung 29 – GC-Chromatogramm der Fraktion H, Bedingungen s. S. 13

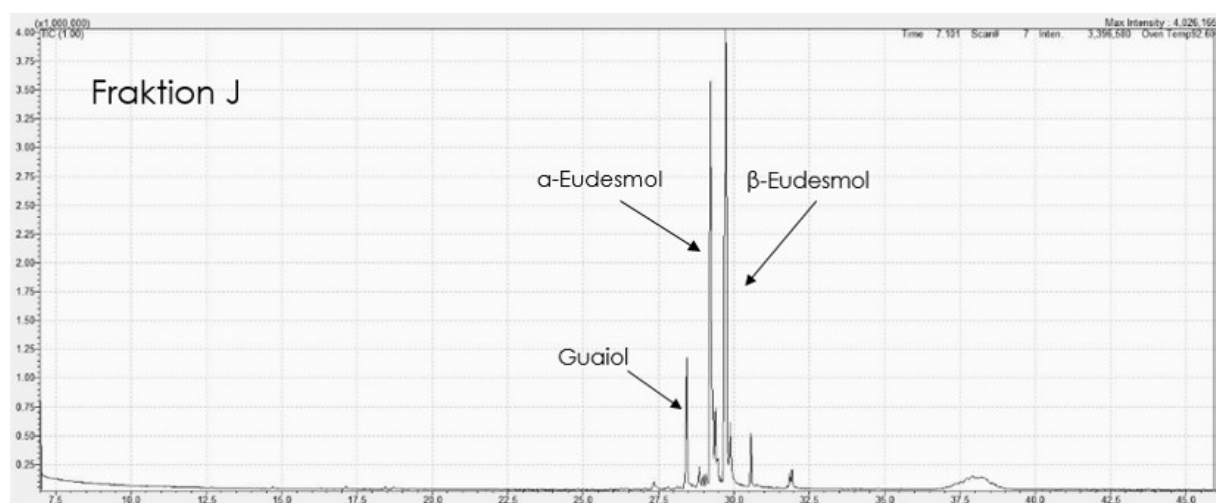


Abbildung 30 – GC-Chromatogramm der Fraktion J, Bedingungen s. S. 13

Während Fraktion B (Abb. 27, s. S. 30) noch große Mengen an Caryophyllen und Nerolidol sowie kleinere Anteile an α - und β -Selinen enthielt, beinhalteten die anderen Fraktionen jeweils eine Hauptkomponente. In Fraktion E (Abb. 28, s. S. 30) war neben kleinen Mengen an Linalool, Caryophyllen und Juniper camphor hauptsächlich Nerolidol enthalten. Fraktion H (Abb. 29) bestand größtenteils aus Guaiol und enthielt nur kleine Anteile an Linalool, α -Terpineol und Nerolidol, während in Fraktion J (Abb. 30) β -Eudesmol sowie dessen Strukturisomer α -Eudesmol den Hauptanteil ausmachten. In dieser Fraktion fand man auch kleine Mengen an Guaiol.

4.2.2 Ätherisches Öl in der Repellentien-Testung

Das ätherische Öl wurde in einem ersten orientierenden Versuch aufgrund der guten Wirksamkeit in drei unterschiedlichen Verdünnungen – 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml und 50 mg/ml – getestet (Abb. 31, s. S. 32).

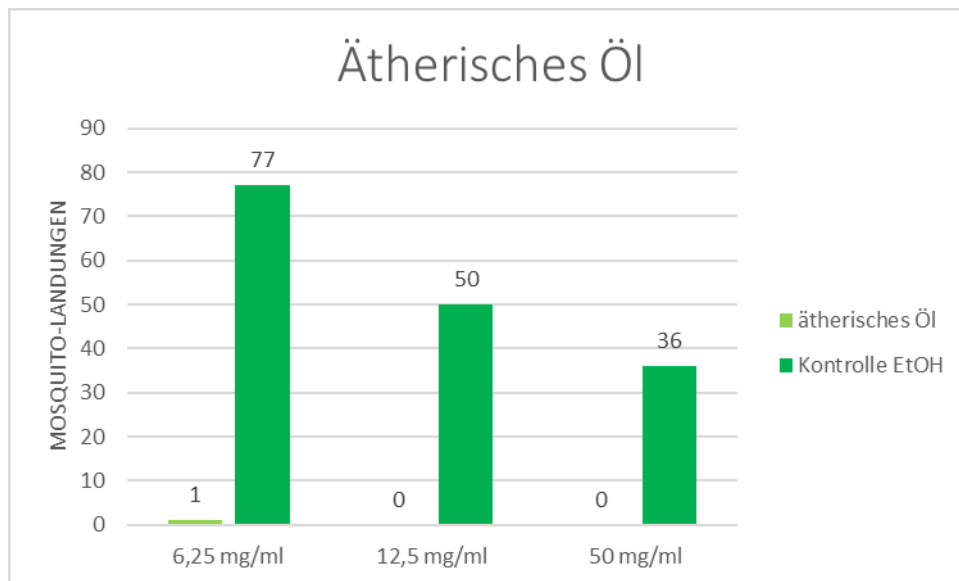


Abbildung 31 – Ergebnisse der Testung des ätherischen Öls

Im Vergleich zu den Ergebnissen des Ethanol-Extrakts zeigte sich, dass das ätherische Öl in Konzentration von 6,25 mg/ml dieselbe Wirksamkeit wie der Extrakt in einer Konzentration von 25 mg/ml hatte. Die Wirksamkeit von Dosierungen $\geq 12,5$ mg/ml lag bei 100%.

Die Ergebnisse der Testung der Fraktionen B, E, H und J zeigten Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit. Jede Fraktion wurde zuerst in einer Konzentration von 6,25 mg/ml getestet (Abb. 32).

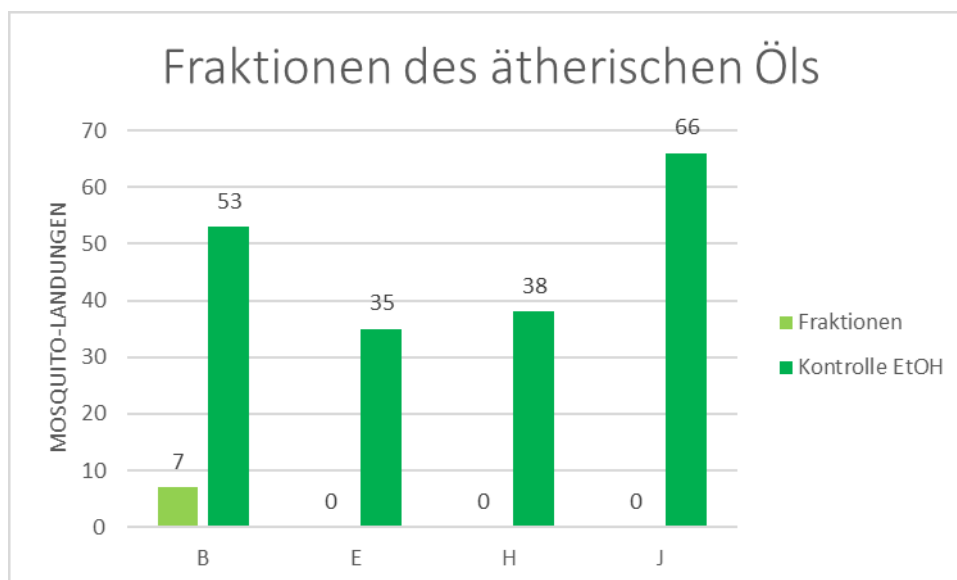


Abbildung 32 – Ergebnisse der Testung der Fraktionen des ätherischen Öls

Jene Fraktionen, die eine Hauptkomponente enthielten, zeigten eine Wirksamkeit von 100%, während die „Mischfraktion“ B eine weniger starke Effektivität aufwies.

Die Fraktionen E, H und J wurden im nächsten Versuch in einer Konzentration von 0,5 mg/ml getestet, um Unterschiede zwischen den Fraktionen detektieren zu können (Abb. 33). Fraktion E, welche hauptsächlich Nerolidol enthielt, zeigt die beste Wirksamkeit im Vergleich zu den anderen Fraktionen.

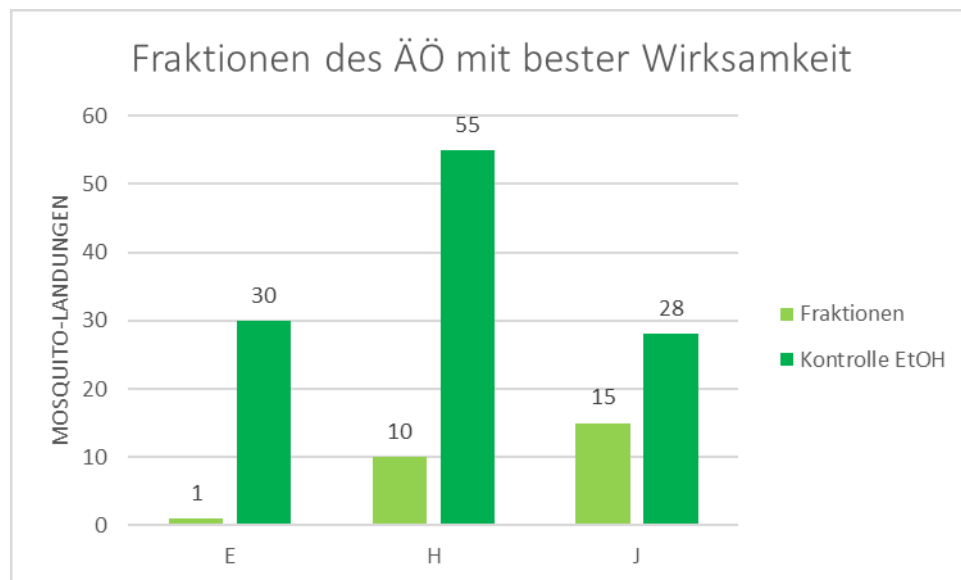


Abbildung 33 – Ergebnisse der ÄÖ-Fraktionen E, H und J bei 0,5 mg/ml

4.2.3 Testung von Reinsubstanzen

Weil die Fraktionen E, H und J jeweils nur eine Hauptkomponente enthielten, wurden auch die drei Reinsubstanzen Nerolidol, Guaiol und β -Eudesmol in der Repellentien-Testung untersucht. Wie die drei Fraktionen wurden auch die Reinsubstanzen in einer Konzentration von jeweils 0,5 mg/ml getestet. Nerolidol wurde der Fraktion E, Guaiol der Fraktion H und β -Eudesmol der Fraktion J gegenübergestellt.

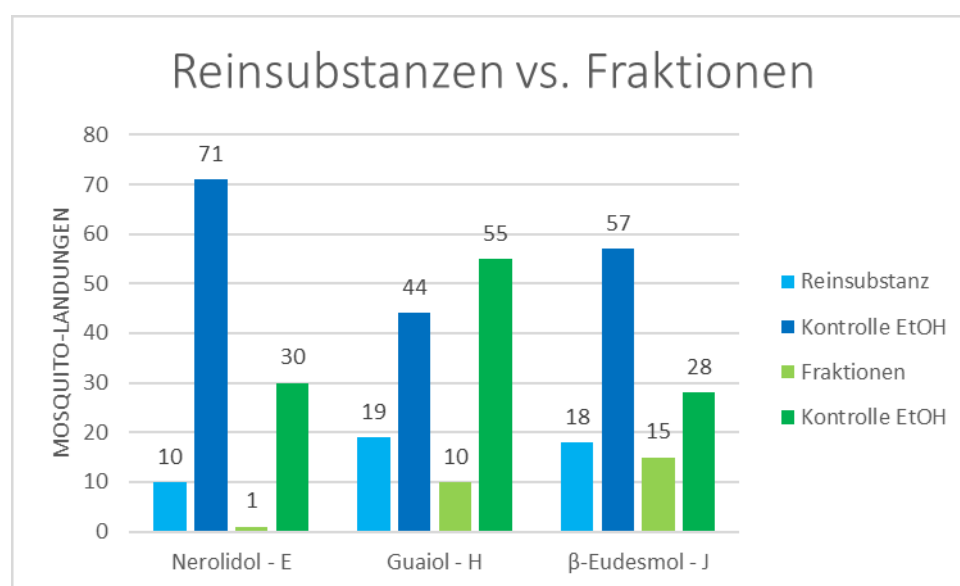


Abbildung 34 – Ergebnisse der Reinsubstanzen-Testung in Gegenüberstellung mit den dazugehörigen Fraktionen des ätherischen Öls

Nerolidol wies die beste Wirksamkeit unter den Reinsubstanzen auf (Abb. 34, s. S. 33). Auffallend war auch, dass die Fraktionen jeweils besser wirksam waren als die entsprechenden Reinsubstanzen. Durch den Vergleich der Reinsubstanzen mit den Fraktionen konnte festgestellt werden, dass jene Testlösungen, die hauptsächlich Nerolidol enthielten, die beste Wirksamkeit zeigten und Fraktionen bzw. Lösungen mit großen Mengen an Guaiol oder β -Eudesmol schwächer wirksam waren.

4.2.4 Testung eines Monoterpen-Gemisches

In der GC-MS-Analyse des ätherischen Öls wurden auch leicht flüchtige Monoterpene identifiziert. Diese waren aber aufgrund ihrer Flüchtigkeit nach der Fraktionierung mit der Flash-Chromatographie in den erhaltenen Sammelfractionen kaum zu detektieren. Um auszuschließen, dass diese Verbindungen für die Wirkung hauptverantwortlich waren, wurde eine Mischung aus Reinsubstanzen entsprechend der Mengenverhältnisse im ätherischen Öl hergestellt. Darin enthalten waren α -Pinen (10,6%), β -Pinen (2,5%), α -Phellandren (13,2%), D-Limonen (17,0%), Eucalyptol (12,7%), γ -Terpinen (3,7%), Linalool (8,0%) und α -Terpineol (5,7%). Wie die anderen Fraktionen wurde auch diese Mischung in einer Konzentration von 6,25 mg/ml getestet.

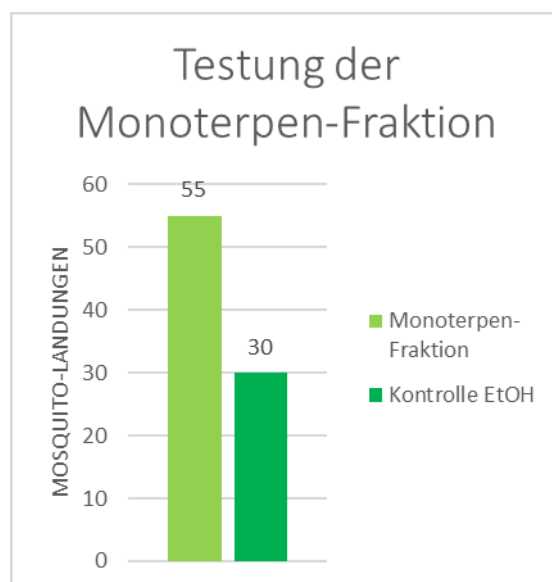


Abbildung 35 – Ergebnisse der Testung der Monoterpen-Fraktion

Wie man in Abbildung 35 erkennen kann, wirkte die Mischung aus den Monoterpenen nicht als Repellent auf die Mosquitos. Der Grund dafür liegt möglicherweise in der leichten Flüchtigkeit dieser Verbindungen. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte

ausgeschlossen werden, dass die Monoterpene für die Wirkung notwendig sind. Sie könnten nur wirksamkeitsmitbestimmend sein.

4.3 VERSUCHE ZUR GEWINNUNG DER AKTIVEN KOMPONENTEN MITHILFE UNTERSCHIEDLICHER LÖSUNGSMITTEL

Da die Herstellung des ätherischen Öls eher aufwendig und die Ausbeute gering war, bestand Interesse an der Ausarbeitung einer alternativen Methode zur Gewinnung eines Wirkstoffgemisches, das im Vergleich zum Ethanol-Extrakt kein Chlorophyll enthält und dem Öl somit näherkommt. Dabei wurden die drei apolaren Lösungsmittel CO₂, Dichlormethan und n-Hexan in Erwägung gezogen.

4.3.1 CO₂-Extrakt

Mithilfe der SFE wurde ein CO₂-Extrakt aus 2 g des gepulverten Blattmaterials hergestellt. Dabei diente Ethanol als Co-Solvent und Make-Up-Flüssigkeit. Die exakte Methode ist aus Tabelle 2 (s. S. 9) entnehmbar. Das Material wurde in vier Schritten extrahiert und jede Fraktion einzeln zur Trockene gebracht und nach dem Entfernen des Lösungsmittels mithilfe der DC untersucht. Die DC (Abb. 36, s. S. 36) zeigte, dass die erste Fraktion, die mit reinem CO₂ extrahiert worden war, in ihrer Zusammensetzung mit dem ätherischen Öl am besten übereinstimmte. Polare Begleitstoffe wie in der Fraktion 2 und 3 wurden in Fraktion 1 nicht erfasst. Die schwachen Banden von Fraktion 4 zeigten, dass das Pflanzenmaterial erschöpfend extrahiert worden war. Fraktion 1 lieferte eine Ausbeute von 36,1 mg.

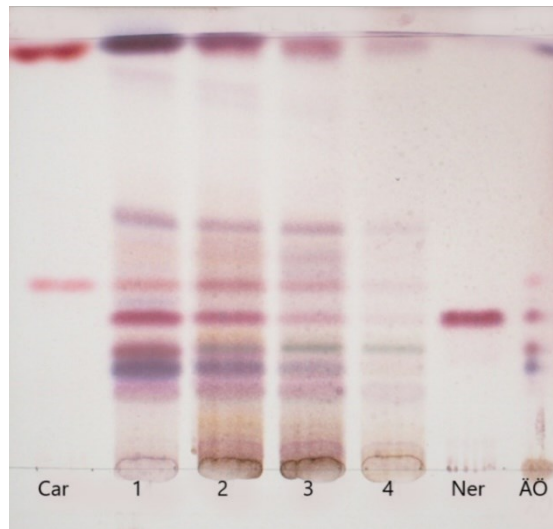


Abbildung 36 – DC der Fraktionen des 1. SFE-Experiments
 Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 96:4
 Detektion: AAS
 Car... Caryophyllen
 Ner... Nerolidol
 1-4... SFE-Fractionen

Daher wurde in einem zweiten Versuch auf ein Co-Solvent verzichtet und nur mit CO₂ extrahiert. Hier wurde Methanol als Make-Up-Flüssigkeit verwendet, da es leichter zu entfernen ist als Ethanol. Die genauen Bedingungen dieser Methode sind aus Tabelle 3 (s. S. 10) entnehmbar. Aber auch hier zeigte die Auswertung des Chromatogramms (Abb. 37, s. S. 37), dass nur die erste Fraktion in ihrer Zusammensetzung dem ätherischen Öl ähnelte. Alle weiteren Fraktionen enthielten deutliche Mengen an Chlorophyll, während Sesquiterpene kaum zu detektieren waren. Für die Extraktion dieser Wirkkomponenten war der erste Extraktionsschritt ausreichend. In dieser Weise konnten 48,8 mg von Fraktion 1 erhalten werden. Die Banden aller weiteren Fraktionen erschienen auf der DC deutlich schwächer, was auf eine erschöpfende Extraktion hindeute.

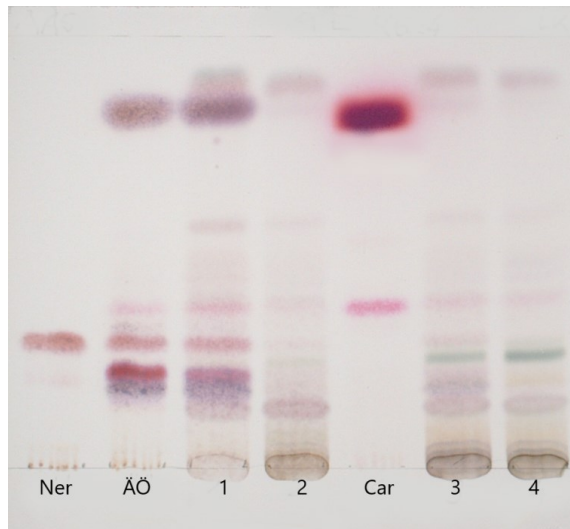


Abbildung 37 – DC der Fraktionen des 2. SFE-Experiments
 Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 96:4
 Detektion: AAS
 Ner... Nerolidol
 Car... Caryophyllen
 1-4... SFE-Fraktionen

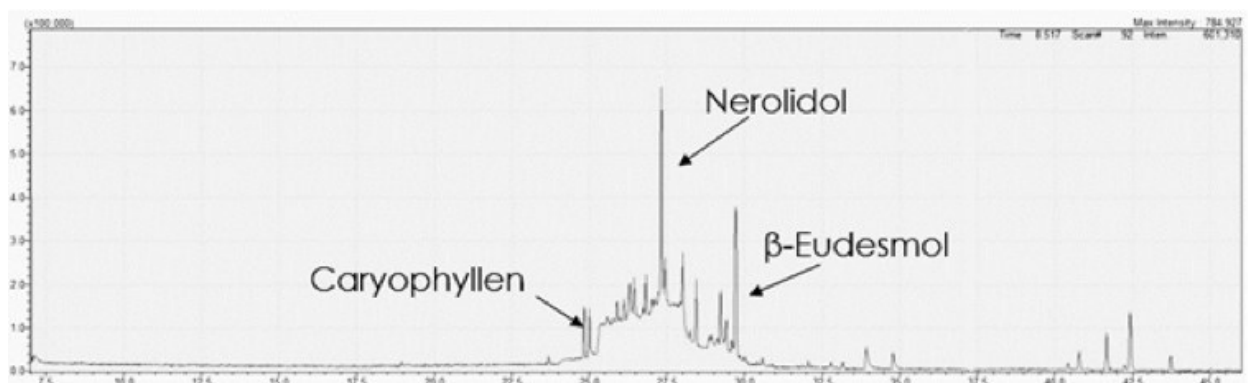


Abbildung 38 – GC-Chromatogramm der SFE-Fraktion 2_1, Bedingungen s. S. 13

Da die erste Fraktion kaum Chlorophyll enthielt, konnte man eine Analyse mit der GC-MS durchführen (Abb. 38). Dabei stellte sich heraus, dass nur Nerolidol und β -Eudesmol in nennenswerten Mengen neben kleinen Anteilen an Caryophyllen in diesem Extrakt enthalten waren. Zusätzlich wurden hohe Anteile an Begleitsubstanzen, die zwischen Minute 24 und 31 mit den Sesquiterpenen eluierten, nachgewiesen.

4.3.2 DCM-Extrakt

Das DCM-Extrakt wurde mit Hilfe der Ultraschallextraktion wie in Kapitel 3.3.4 (s. S. 10) hergestellt. Die erhaltene Ausbeute betrug 194,3 mg, wobei man anhand der DC (Abb. 39, s. S. 38) sofort erkennen konnte, dass hohe Mengen an polaren

Begleitstoffen im Extrakt enthalten waren, weshalb eine GC-MS-Analyse aufgrund der zu geringen Flüchtigkeit ausgeschlossen wurde.

4.3.3 Hexan-Extrakt

Das Hexan-Extrakt wurde ebenfalls mittels Ultraschallextraktion (s. Kapitel 3.3.4, S. 10) gewonnen. Die Ausbeute betrug dabei 41,5 mg. Aufgrund der Farbe des Extraktes wurde angenommen, dass kein Chlorophyll enthalten war, was durch eine dünn-schichtchromatographische Analyse bestätigt werden konnte (Abb. 39). Im Bereich von R_f 0,2-0,4 gab es große Übereinstimmungen mit dem ätherischen Öl.

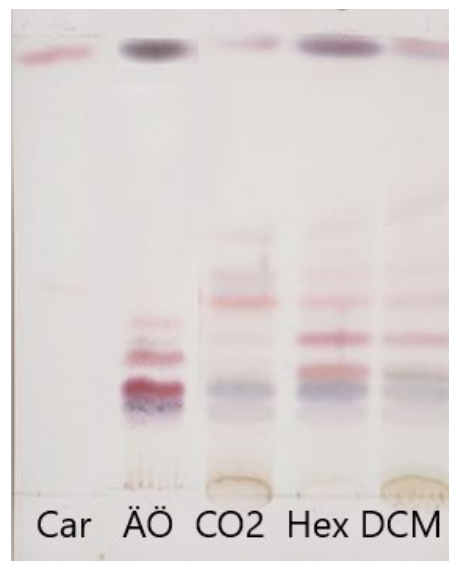


Abbildung 39 – DC alternative Lösungsmittel
Fließmittel: Toluol-Ethylacetat 96:4
Detektion: AAS
Car... Caryophyllen
ÄÖ... ätherisches Öl
CO₂... CO₂-Extrakt
Hex... Hexan-Extrakt
DCM... DCM-Extrakt

Da durch das Fehlen von Chlorophyll und anderen Ballaststoffen eine ausreichende Flüchtigkeit gegeben war, war eine Analyse mit der GC-MS möglich. Das Chromatogramm (Abb. 40, s. S. 39) ließ auf eine deutlich geringere Konzentration der Komponenten im Vergleich zum Ethanol-Extrakt oder zum ätherischen Öl schließen. Nur geringe Anteile an Nerolidol und β -Eudesmol wurden detektiert. β -Eudesmol machte den Hauptanteil aus, während Nerolidol, welches im ätherischen Öl die Hauptkomponente war, nur in geringerer Menge vorhanden war. Zusätzlich wurden auch kleine Mengen an Copaen, Caryophyllen sowie α - und β -Selinen nachgewiesen.

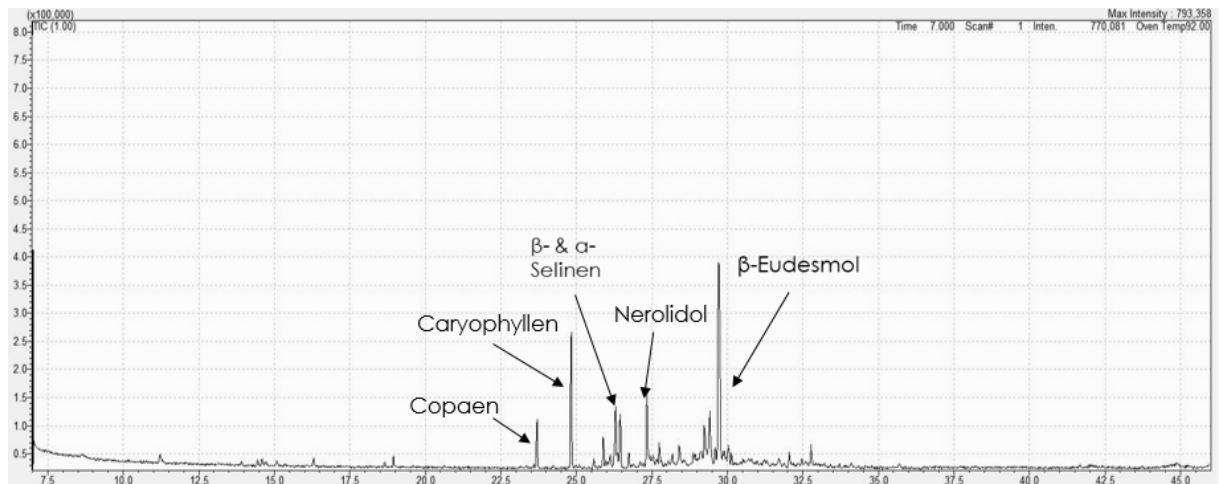


Abbildung 40 – GC-Chromatogramm des Hexan-Extrakts, Bedingungen s. S. 13

Das Hexan-Extrakt erwies sich im Vergleich zum CO₂- und DCM-Extrakt dem ätherischen Öl dennoch als am ähnlichsten, weshalb es auch in einem Repellentien-Test in einer Konzentration von 25 mg/ml untersucht wurde.

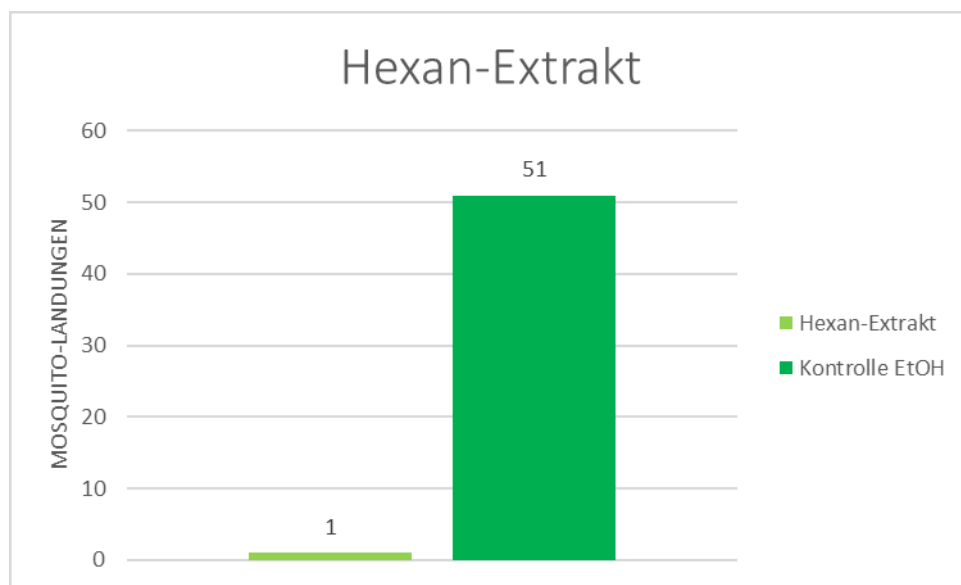


Abbildung 41 – Ergebnisse der Testung des Hexan-Extrakts

Im Vergleich mit den Ergebnissen des ätherischen Öls zeigte sich, dass das Hexan-Extrakt in einer Konzentration von 25 mg/ml dieselbe Wirksamkeit wie das Öl in einer Konzentration von 6,25 mg/ml aufwies (Abb. 41). Deshalb wurden keine weiteren Fraktionierungen sowie Repellentien-Tests mit diesem Extrakt durchgeführt.

5 SCHLUSSFOLGERUNG

5.1 DIE WIRKSAMSTE FRAKTION

Die Ergebnisse der Testung der Fraktionen des ätherischen Öls zeigten, dass vor allem Nerolidol, Guaiol und β -Eudesmol für die Wirkung als Repellent verantwortlich waren. Die Testung dieser Reinsubstanzen zeigte, dass Nerolidol in seiner Wirkung den beiden anderen Substanzen deutlich überlegen war.

Die Testung der Fraktionen des Ethanol-Extrakts hatte gezeigt, dass Fraktion B, welche diese drei Sesquiterpene enthielt, am aktivsten war. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Kombination dieser drei Substanzen am effektivsten gegen Mosquitos wirken müsste. Fraktion B war in einer Konzentration von 0,5 mg/ml wirksamer als die drei einzelnen Reinsubstanzen (Abb. 42).

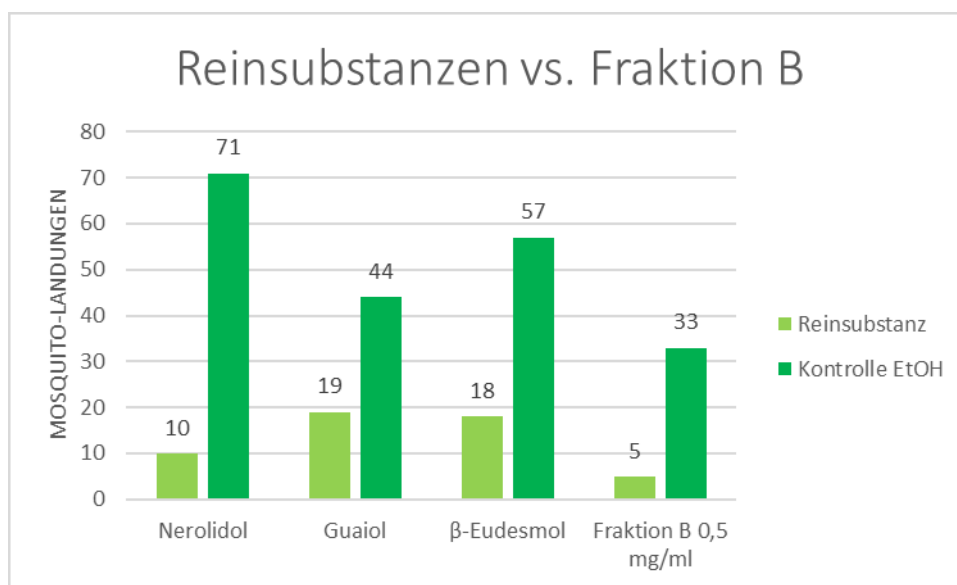


Abbildung 42 – Vergleich der Ergebnisse der Reinsubstanzen und der Fraktion B des EtOH-G-Extrakts in einer Konzentration von jeweils 0,5 mg/ml

Daher wurde eine Mischung aus Nerolidol, Guaiol und β -Eudesmol zu je 0,17 mg/ml sowie das Destillat, das der Fraktion B in der Zusammensetzung stark ähnelte, in einer Konzentration von 0,5 mg/ml jeweils gegen Nerolidol ebenfalls in einer Konzentration von 0,5 mg/ml als Kontrolle getestet, um festzustellen, ob die Gemische im Vergleich zu Nerolidol besser wirkten.

Dabei stellte sich heraus, dass der Sesquiterpen-Mix im direkten Vergleich zu Nerolidol eine stärkere Wirksamkeit zeigte. Aber auch die Kontrolle Nerolidol hatte eine

starke repellierende Wirkung auf die Mosquitos. Im Vergleich zum Destillat wirkte Nerolidol deutlich besser (Abb. 43).

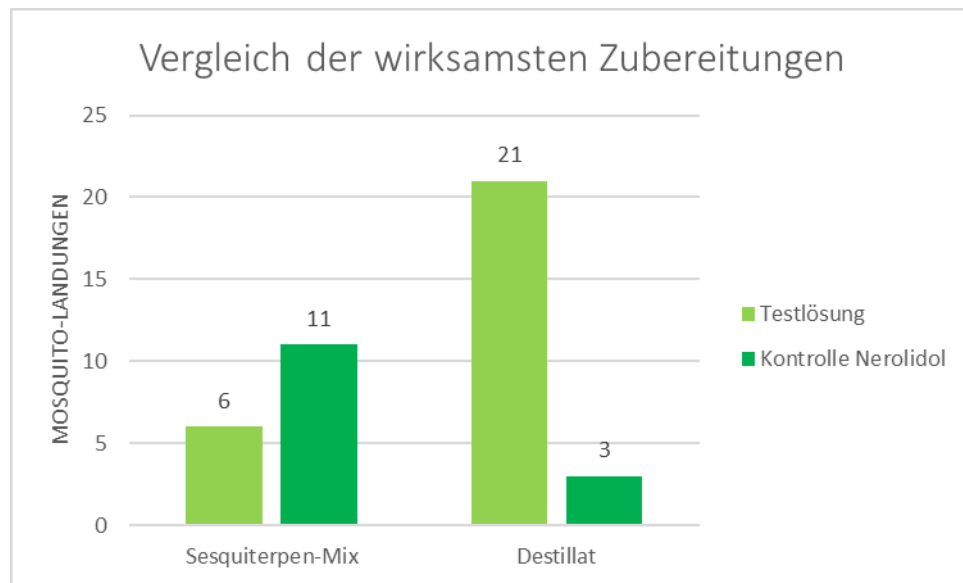


Abbildung 43 – Vergleich der wirksamsten Zubereitungen

Im direkten Vergleich erzielten sowohl der Sesquiterpen-Mix als auch Nerolidol sehr gute Ergebnisse in der Repellentien-Testung. Das Destillat war erst in höheren Konzentrationen von 6,25 mg/ml ähnlich wirksam.

5.2 AUSBLICK: EINE MÖGLICHKEIT FÜR DEN SCHUTZ DER DARWIN-FINKEN

Da drei Zubereitungen bzw. Testlösungen gute Ergebnisse in der Repellentien-Testung lieferten, wären folgenden Vorgangsweisen für eine umweltfreundliche und auch kostengünstige Lösung zum Schutz der Darwinfinken auf den Galapagos-Inseln möglich:

Nerolidol ist kommerziell günstig zu erwerben und die Herstellung einer Repellentien-Lösung ist einfach. Allerdings zeigte es im Vergleich zum Sesquiterpen-Mix eine etwas schwächere Wirksamkeit. Dabei sollte das Kosten-Nutzen-Verhältnis abgewogen werden, da Guaiol und β -Eudesmol hohe Kosten verursachen würden. Für den flächendeckenden Schutz der Vögel stellt sich die Frage, ob es nicht am sinnvollsten wäre das Destillat einzusetzen. Dieses wäre einfach herzustellen und verursacht keine allzu hohen Kosten, da es aus dem vor Ort verfügbaren Pflanzenmaterial gewonnen werden kann. Allerdings sind für die optimale Wirksamkeit höhere Konzentrationen ($> 6,25$ mg/ml) im Vergleich zum Sesquiterpen-Mix oder zu Nerolidol notwendig.

Eine weitere Alternative stellt das ätherische Öl dar, welches in einer Konzentration von 6,25 mg/ml ebenfalls gute Ergebnisse lieferte. Durch den Vergleich der vereinfachten Wasserdampfdestillation, welche auf den Galapagos Inseln durchgeführt worden war, und der Wasserdampfdestillation nach EuAB konnte gezeigt werden, dass beide Methoden dasselbe Inhaltsstoffmuster liefern. Die Wasserdampfdestillation lieferte zwar eine höhere Ausbeute, allerdings wäre Xylol als Hilfsphase zu toxisch (GESTIS-Stoffdatenbank, 2019) und daher nicht einsetzbar. Da man mit der vereinfachten Methode eine geringere Ausbeute erhalten hat, ist auch in diesem Punkt die Herstellung eines Destillats zu bevorzugen. Dabei wären im Endprodukt keine toxischen Lösungsmittel enthalten, was von Vorteil wäre, wenn man das Destillat in der Natur ausbringen möchte.

Ein weiterer Aspekt, der für das Destillat spricht, ist, dass aus grob zerkleinertem möglichst frischem Pflanzenmaterial auch vermehrt Monoterpene extrahiert werden würden und im Destillat enthalten wären. Orientierende Versuche an *A. aegypti* und *A. albopictus* (Alvarez Costa et al., 2017; Ma et al., 2018) ließen darauf schließen, dass die Monoterpene an der larviciden Wirkung maßgeblich beteiligt sein könnten.

Im nächsten Schritt ist geplant, dass sowohl das Destillat als auch Nerolidol auf den Galapagos-Inseln gegen die Larven von *P. downsi*, welche die größte Bedrohung für die Küken der Darwin-Finken darstellen, getestet werden. In der dortigen Untersuchungsstation steht ein Gaschromatograph, der an ein Olfaktometer gekoppelt ist, zur Verfügung. Damit kann die Reaktion der Fliegen auf die flüchtigen Komponenten gemessen werden.

Wenn auch in diesen Untersuchungen positive Ergebnisse erhalten werden, wird man im nächsten Schritt eine geeignete Formulierung bzw. Methode suchen, um diese Lösung in den Nestern der Darwin-Finken auszubringen und die Vögel damit langfristig vor den Parasiten zu schützen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alvarez Costa A., Naspi C. V., Lucia A., Masuh H. M. (2017) Repellent and Larvicidal Activity of the Essential Oil From *Eucalyptus nitens* Against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 54 (3), 670-676.
- Cimadom A., Causton C., Cha D. H., Daniebs D., Fessl B., Hood-Nowotny R., Lincango P., Mieles A. E., Nemeth E., Semler E. M., Teale S. A., Tebbich S. (2016) Darwin's finches treat their feathers with a natural repellent. *Scientific Reports* 6, 34559; doi: 10.1038/srep34559.
- Europäisches Arzneibuch 9. Ausgabe Band 2 Kapitel 8.12.* (2017).
- GESTIS-Stoffdatenbank.* (2019) Von [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$vid=gestisdeu:sdbdeu\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates$fn=default.htm$vid=gestisdeu:sdbdeu$3.0) abgerufen am 02.09.2019.
- inaturalist.* (2019) Von <https://www.inaturalist.org/taxa/62856-Psidium-galapageium> abgerufen am 08.06.2019.
- Kronberg I. (2015) Darwinfinken: Wie ihnen der Schnabel gewachsen ist. *Biologie in unserer Zeit* 45 (3), 139.
- Ma Y., Li M., Zhang H., Sun H., Su H., Wang Y., Du Z. (2018) Bioassay-guided isolation of active compounds from *Adenosma buchneroides* essential oil as mosquito repellent against *Aedes albopictus*. *Journal of Ethnopharmacology* 231, 386-393.
- McHugh M., Krukonis V. (2013) *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*. 2. Auflage, Elsevier, Amsterdam, S. 1-16.
- Neige P. (2015) The Phenomenon of Evolutionary Radiation. In P. Neige, *Events of Increased Biodiversity*. 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam, S. 47-64.
- Porter D. M. (1968) *Psidium* (Myrtaceae) in the Galapagos Islands. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 55 (3), 368-371.
- Wikipedia.* (2019) Von <https://de.wikipedia.org/wiki/Retentionsindex> abgerufen am 13.07.2019.

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 – Taxonomie <i>Psidium galapageium</i>	2
Tabelle 2 - Geräteeinstellungen während des 1. Versuchs	9
Tabelle 3 - Geräteeinstellungen während des 2. Versuchs	10
Tabelle 4 - Lösungsmittelgradient für die Auftrennung von 0,5 g Ethanol-Extrakt.....	12
Tabelle 5 - Lösungsmittelgradient für die Auftrennung von 1 g Ethanol-Extrakt.....	12
Tabelle 6 - Lösungsmittelgradient für die Auftrennung von 1 g ätherischen	12
Tabelle 7 - GC-MS-Hardware und Einstellungen.....	13
Tabelle 8 - Vergleich der Kovats-Indices.....	14
Tabelle 9 - Reinsubstanzen.....	16
Tabelle 10 - Mengen der relevanten Fraktionen im 1. Experiment.....	19
Tabelle 11 - Mengen der relevanten Fraktionen im 2. Experiment.....	20
Tabelle 12 - Mengen der relevanten Fraktionen des ätherischen Öls.....	29

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

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

Abbildung 1 – getrocknete Blätter von <i>P. galapageium</i>	3
Abbildung 2 – Apparatur zur Wasserdampfdestillation nach EuAB (Europäisches Arzneibuch 9. Ausgabe Band 2 Kapitel 8.12, 2017).....	7
Abbildung 3 – Aufbau der Destillationsapparatur.....	8
Abbildung 4 – Schematische Darstellung eines SFE-Apparats (McHugh, Krukonis, 2013).....	9
Abbildung 5 – Versuchsaufbau Repellentien-Testung ©Claudia Martina, PhD.....	15
Abbildung 6 – GC-Chromatogramm Ethanol-Extrakt.....	17
Abbildung 7 – Fraktionierung des EtOH-G-Extrakts im 1. Experiment	18
Abbildung 8 – DC der Fraktionen A-C.....	18
Abbildung 9 – DC der Fraktion D.....	19
Abbildung 10 – Fraktionierung des EtOH-G-Extrakts im 2. Experiment	20
Abbildung 11 – DC vereinigte Fraktionen A-C.....	21
Abbildung 12 – DC vereinigte Fraktion D.....	21
Abbildung 13 – GC-Chromatogramm der vereinigten Fraktion A.....	21
Abbildung 14 – GC-Chromatogramm der vereinigten Fraktion B.....	21
Abbildung 15 – GC-Chromatogramm der vereinigten Fraktion C.....	22
Abbildung 16 – Ergebnisse der Testung des Ethanol-Extrakts.....	23
Abbildung 17 – Ergebnisse der Testung der Fraktionen A-D des Ethanol-Extrakts	23
Abbildung 18 – Ergebnisse der Testung der Fraktion B und des Sesquiterpen-Mix....	24
Abbildung 19 – DC EtOH-W und Destillat.....	25
Abbildung 20 – GC-Chromatogramm des EtOH-W-Extrakts.....	26
Abbildung 21 – GC-Chromatogramm des Destillats.....	27
Abbildung 22 – Ergebnisse der Testung des Destillats.....	27

Abbildung 23 – GC-Chromatogramm ätherisches Öl.....	28
Abbildung 24 – Fraktionierung des ätherischen Öls.....	29
Abbildung 25 – DC der Fraktionen A-G.....	30
Abbildung 26 – DC der Fraktionen H-O.....	30
Abbildung 27 – GC-Chromatogramm der Fraktion B.....	30
Abbildung 28 – GC-Chromatogramm der Fraktion E.....	30
Abbildung 29 – GC-Chromatogramm der Fraktion H.....	31
Abbildung 30 – GC-Chromatogramm der Fraktion J.....	31
Abbildung 31 – Ergebnisse der Testung des ätherischen Öls.....	32
Abbildung 32 – Ergebnisse der Testung der Fraktionen des ätherischen Öls.....	32
Abbildung 33 – Ergebnisse der ÄÖ-Fraktionen E, H und J bei 0,5 mg/ml.....	33
Abbildung 34 – Ergebnisse der Reinsubstanzen-Testung in Gegenüberstellung mit den dazugehörigen Fraktionen des ätherischen Öls.....	33
Abbildung 35 – Ergebnisse der Testung der Monoterpen-Fraktion.....	34
Abbildung 36 – DC der Fraktionen des 1.SFE-Experiments.....	36
Abbildung 37 – DC der Fraktionen des 2.SFE-Experiments.....	37
Abbildung 38 – GC-Chromatogramm der SFE-Fraktion 2_1.....	37
Abbildung 39 – DC alternative Lösungsmittel.....	38
Abbildung 40 – GC-Chromatogramm des Hexan-Extrakts.....	39
Abbildung 41 – Ergebnisse der Testung des Hexan-Extrakts.....	39
Abbildung 42 – Vergleich der Ergebnisse der Reinsubstanzen und der Fraktion B des EtOH-G-Extrakts in einer Konzentration von jeweils 0,5 mg/ml.....	40
Abbildung 43 – Vergleich der wirksamsten Zubereitungen.....	41