

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Phytochemische Untersuchungen der Blätter von
Metaxya rostrata“

verfasst von / submitted by

Andrea Pichler

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 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

Herzlichen Dank an den Vorstand des Departments für Pharmakognosie, Univ.- Prof. Dr. Verena M. Dirsch, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ich bedanke mich sehr bei meiner Betreuerin ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn und bei Mag. Eva Mittermair für die Betreuung während der gesamten Diplomarbeitszeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für den finanziellen Beistand und die aufmunternden Worte. Weiters möchte ich mich bei Freunden und Kollegen für die enorme Motivation und Unterstützung während der gesamten Studienzeit bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2. MATERIAL UND METHODEN	3
2.1. Material.....	3
2.2. Methoden	4
2.2.1. Extraktionsmethoden.....	4
2.2.1.1. Extraktion des Blattmaterials.....	4
2.2.1.2. Extraktion der Blätter und Wurzeln für den Lifespan- Assay an <i>Caenorhabditis elegans</i>	4
2.2.2. Dünnschichtchromatographie (DC)	5
2.2.3. Säulenchromatographie (SC).....	6
3. ERGEBNISSE	7
3.1. Auftrennung der Wasserfraktion	7
3.1.1. SC1	7
3.1.2. DC Vergleiche mit Chlorogensäure und Kaffeesäure.....	11
3.1.3. DC- Vergleiche mit Proanthocyanidinen.....	12
3.1.4. DC- Vergleiche mit Flavonoiden.....	13
3.2. Auftrennung der Chloroform/Isopropanolfraktion	15
3.2.1. SC2	16
3.2.2. Auftrennung der Sammelfraktion 1 von SC2	19
3.2.3. Auftrennung der Sammelfraktion 13 von SC2	20
3.2.4. Auftrennung der Fraktion 13 von SC4	22
3.2.5. Strukturaufklärung von Substanz AP1.....	24
3.2.6. Auftrennung der Sammelfraktion 14 von SC2	25
3.2.7. Auftrennung der Fraktionen 14 und 15 von SC6	26
3.2.8. DC-Vergleich ausgewählter Sammelfraktionen mit Xanthonen.....	28

3.2.9. DC-Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Flavonoiden.....	29
4. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG	33
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	35
6. SUMMARY	35
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	36
8. TABELLENVERZEICHNIS.....	37
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	38

Abkürzungsverzeichnis

AASS	Anisaldehyd- Schwefelsäure
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
conc.	konzentriert
DC	Dünnschichtchromatographie
EtAc	Ethylacetat
FM	Fließmittel
MeOH	Methanol
NA	Naturstoffreagenz A
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
PEG	Polyethylenglykol
SC	Säulenchromatographie
SPE	Solid-Phase Extraction

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Metaxya rostrata (Kunth) C. Presl (Metaxyaceae) ist ein Baumfarn und in Zentral- und Südamerika (Costa Rica, Brasilien, Mexiko) beheimatet. Traditionelle Anwendung findet die Suspension der Wurzeln in Wasser bei gastrointestinalen Beschwerden wie Ulcera und Tumoren, im Süden Costa Ricas (Virtbauer J. et al., 2008).

In vorangegangenen Diplomarbeiten und Dissertationen an der Universität Wien war die phytochemische Zusammensetzung der unterirdischen Teile von *Metaxya rostrata* bereits untersucht worden. Zu den Inhaltsstoffen in den Blättern gab es bis jetzt wenig Information.

Ziel dieser Arbeit war es, die getrockneten Blätter von *Metaxya rostrata* phytochemisch zu untersuchen und ein mögliches Vorliegen von Xanthonen nachzuweisen, da diese, aufgrund der nachgewiesenen zytotoxischen Wirkung auf Dickdarmkrebszellen, von Interesse sind (Kainz K. et al., 2013; Mittermair E. et al., 2019). Weiters wurde auf das Vorliegen von Flavonoiden und anderer Verbindungen untersucht.

Tabelle 1: Bekannte Verbindungen aus *Metaxya rostrata*

Proanthocyanidine • Cinnamtannin B-1 (Virtbauer J. et al., 2008) • Aesculitannin B (Virtbauer J. et al., 2008) • Proanthocyanidin A2 (Pemmer T., 2011)
Xanthone • 2-Deprenyl-rheediaxanthon B (XB) (Kainz K. et al., 2013) • 2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (OH-XB) (Kainz K. et al., 2014) • Mischung (SR1): 2-Deprenyl-7-methoxy-rheediaxanthon und 2-Deprenyl-6-O-methyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (Rindler S., 2019) • 2-Deprenyl-5,7-dimethoxy-rheediaxanthon B (Mittermair E., 2020)

• 2-Deprenyl-6-O-methyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (Mittermair E., 2020)
Sterole (Virtbauer J. et al., 2008) • Sitosterol • Stigmasterol • Campesterol
Säuren • Kaffeesäure (Virtbauer J. et al., 2008) • Chlorogensäure (Virtbauer J. et al., 2008) • Chlorogensäurederivate (Schmidt N., 2012) • Betulinsäure (Kainz K., 2011)
Glykoside von Phenolsäuren (Kainz K. et al., 2012)
Zucker (Fruktose, ...) (Virtbauer J. et al., 2008) (Kainz K. et al., 2012) (Pemmer T., 2011)
Methylencyclopropylglykoside (Kainz K. et al., 2012)
Triterpene (Merkinger B., 2010)
Glucosecerebrosid (Schmidt N., 2012)
Flavonoide (Kainz K. et al., 2014) • Flavonglykoside des Quercetintyps • Diglykoside des Kämpferols



Abbildung 1: *Metaxya rostrata* (C. Presl)

www.plantsystematics.org, abgerufen am 23.01.2019

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Zur Verfügung stand 1 kg getrocknetes und pulverisiertes Blattmaterial, welches 2008 in der Umgebung von La Gamba (Costa Rica) gesammelt und authentifiziert worden war (Virtbauer J. et al., 2008).



Abbildung 2: Getrocknete Blätter der *Metaxya rostrata* (Kainz K., 2011)

2.2. Methoden

2.2.1. Extraktionsmethoden

2.2.1.1. Extraktion des Blattmaterials

Für die Extraktion wurden 200 g Blattmaterial in zwei Portionen mit jeweils 1000 ml Dichlormethan im Ultraschallbad bei Raumtemperatur 30 Minuten extrahiert, die Droge abfiltriert und getrocknet. Dadurch konnte Chlorophyll weitgehend abgetrennt werden. Die extrahierte Droge wurde zweimal mit jeweils 1000 ml einer Mischung aus EtAc/MeOH (1:1) für 20 Minuten im Ultraschallbad bei einer Temperatur von 50°C extrahiert und filtriert. Das Extrakt wurde am Rotationsverdampfer unter verminderten Druck zur Trockene gebracht. Anschließend wurde das Extrakt mit 160 ml einer Mischung aus MeOH/Hexan (1:1) 30 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt und anschließend in einen Scheidetrichter überführt. Die Hexanphase wurde aufgrund des hohen Chlorophyllanteils verworfen und die Methanolphase entnommen und mit 100 ml einer Mischung aus Chloroform/Isopropanol (1:1) und 100 ml Wasser für 20 Minuten im Ultraschallbad bei Raumtemperatur behandelt und ebenfalls in einen Scheidetrichter überführt. Daraus resultierten nach Phasentrennung eine Wasserfraktion und eine Chloroform/Isopropanolfraktion, die jeweils zur Trockene gebracht wurden. Es resultierten 5,5 g Wasserfraktion und 2,28 g Chloroform/Isopropanolfraktion.

2.2.1.2. Extraktion der Blätter und Wurzeln für den Lifespan-Assay an *Caenorhabditis elegans*

Jeweils 300 mg der getrockneten und pulverisierten Blätter bzw. der Wurzeln wurden zweimal mit jeweils 5 ml Hexan durch Schütteln entfettet und zentrifugiert (10 min., 3.500 rpm). Anschließend erfolgte eine Extraktion des Drogenmaterials im Ultraschallbad bei Raumtemperatur mit jeweils 7 ml Dichlormethan für 15 Minuten und eine anschließende Filtration durch einen Wattebausch. Eine zweite Extraktion erfolgte mit jeweils 13 ml Methanol im Ultraschallbad bei Raumtemperatur und anschließend

wieder eine Zentrifugation (10 min., 3.500 rpm). Alle Extrakte wurden vereinigt und zur Entfernung der Gerbstoffe einer Solid – Phase Extraction (SPE) unterzogen. Die aufgereinigten Extrakte wurden unter verminderten Druck am Rotationsverdampfer zur Trockenen eingedampft (Camp D. et al., 2012).

Für die Solid-Phase Extraction wurden 3 ml SPE Kartuschen und Fritten mit 20 µm Porengröße verwendet. Als stationäre Phase diente Polyamidgel (Phenomenex® AH0-7001; CC-6; 900 mg).

2.2.2. Dünnschichtchromatographie (DC)

Stationäre Phase

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fertigplatten Firma Merck; Größe 20x20 cm). Schichtdicke 0,25 mm.

Mobile Phasen

Als mobile Phasen dienten folgende Systeme (Tab. 2), welche immer an die Polarität der jeweiligen Substanzgemische angepasst wurden.

Tabelle 2: Mobile Phasen für DC

System A	EtAc-conc. Ameisensäure-Methanol (70:8:4)
System B	EtAc-conc. Ameisensäure-Eisessig-Ethylmethylether-Wasser (50:7:3:30:10)
System C	Dichlormethan-Cyclohexan-conc. Ameisensäure-Ethylformiat (30:35:5:30)
System D	Toluol-Ethylformiat-conc. Ameisensäure-MeOH (5:4:1:1)

Detektionsmethoden

Naturstoffreagenz A und Polyethylenglycol 400 (NA/PEG)

Die Platten wurden mit einer 1%igen methanolischen Lösung aus Diphenylboryloxyethylamin (Naturstoffreagenz A) und anschließend mit 5%iger ethanolischer PEG 400-Lösung besprüht. Nach dem Besprühen wurde bei einer Wellenlänge von UV₃₆₆ ausgewertet (Wagner H. et al., 1983).

Anisaldehyd–Schwefelsäure–Reagenz (AASS)

0,5 ml Anisaldehyd wurden mit 10 ml Eisessig, 85 ml MeOH und 5 ml conc. Schwefelsäure in dieser Reihenfolge gemischt. Nach dem Besprühen wurde die DC – Platte für 5-10 Minuten auf 110 °C erhitzt. Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht (Wagner H. et al., 1983).

2.2.3. Säulenchromatographie (SC)

Stationäre Phase:

Sephadex® LH-20 (Firma Sigma LifeScience).

Mobile Phase:

Wasser und MeOH-Wasser-Gemische in verschiedenen Zusammensetzungen. Jede fünfte bzw. jede zehnte Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch untersucht. Ähnliche Fraktionen wurden zu SF vereinigt. Die unterschiedlichen Säulendimensionen werden im jeweiligen Kapitel angeführt.

3. ERGEBNISSE

Die aus dem Extrakt erhaltene Wasser- und die Chloroform/Isopropanolfraktion (Kap. 2.2.1.1, S.4) wurden jeweils mit einer SC weiter aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen chromatographisch untersucht. Im Anschluss wurden die Fraktionen mittels DC zur Identifikation mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen herangezogen.

3.1. Auftrennung der Wasserfraktion

Die Wasserfraktion (Kap. 2.2.1.1, S. 4), in der polare Komponenten des EtAc-MeOH-Extraktes angereichert waren, wurde einer Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 unterzogen (Abb. 3).

3.1.1. SC1

Auftragsmenge: 5,5 g Wasserfraktion

Säulendimension: Länge: 40 cm, Durchmesser: 4,5 cm

Stationäre Phase: Sephadex® LH-20

Mobile Phase: Wasser, ab Fraktion 164 MeOH/Wasser (50:50), ab Fraktion 240 MeOH/Wasser (70:30) und ab Fraktion 304 MeOH



Abbildung 3: Säulenchromatographie der Wasserfraktion

Es wurden 340 Fraktionen gesammelt, jede fünfte Fraktion mittels DC kontrolliert und die Fraktionen aufgrund ihrer Zusammensetzung vereinigt. Es entstanden 28 SF (Abb. 4+5, S. 8+9; Tab. 3, S. 10).

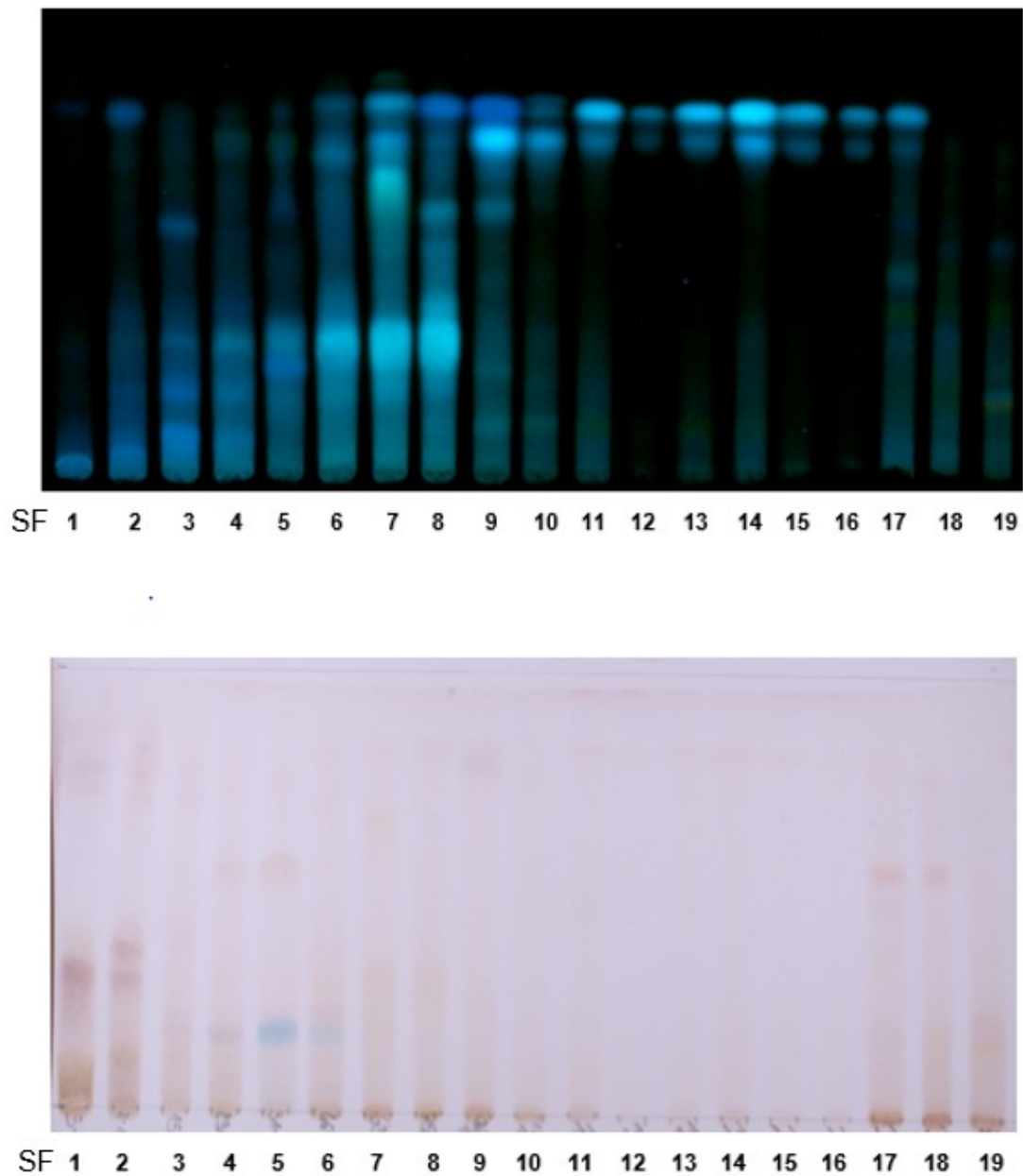


Abbildung 4: DC der Sammelfractionen 1-19 von SC1

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG (oben), AASS (unten)

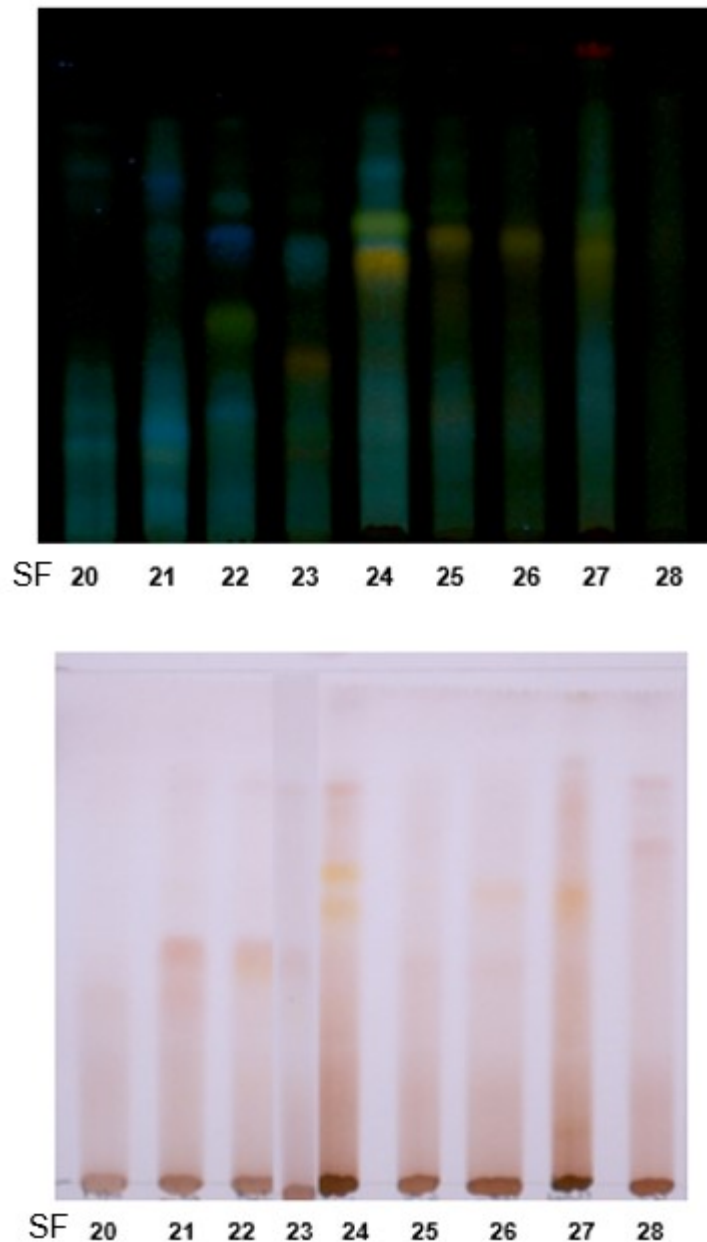


Abbildung 5: DC der Sammelfractionen 20-28 von SC1

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG (oben), AASS (unten)

In SF 2-17 zeigten sich bei Detektion mit NA/PEG blau fluoreszierende Komponenten, die Phenolcarbonsäuren und Caffeoylchinasäuren vermuten ließen. In SF 24-27 waren Flavonoide angereichert, die aufgrund ihrer Fluoreszenzfarbe auf Apigenin- und Luteolinglykoside hindeuteten. Die orange-bräunliche Färbung der Banden in den SF

17-22 nach Detektion mittels AASS ließ Proanthocyanidine vermuten (Abb. 4+5, S. 8+9).

Tabelle 3: Sammelfractionen von SC1

Sammelfractionen	Einzelfractionen	Menge in mg
1	1-6	2678,0
2	7-14	185,0
3	15-22	29,0
4	23-30	19,0
5	31-45	76,0
6	46-62	53,0
7	63-74	24,0
8	75-95	15,0
9	96-120	8,0
10	121-137	3,0
11	138-144	1,0
12	145-146	2,0
13	147-152	<1,0
14	153-168	1,7
15	169-174	<1,0
16	175-180	8,0
17	181-195	9,0
18	196-220	4,0
19	221-230	2,0
20	231-243	6,0
21	244-260	7,0
22	261-283	12,0
23	284-305	6,0
24	306-325	26,0
25	326-330	6,0
26	331-335	37,0
27	336-339	21,0
28	340 (Nachlauf)	15,0

3.1.2. DC Vergleiche mit Chlorogensäure und Kaffeesäure

Aufgrund ähnlicher Fluoreszenz und Rf-Werte wurden die SF 6, 7 und 8 mit Chlorogensäure verglichen. Die kräftig blau fluoreszierende Bande bei Rf 0,4 bzw. 0,6 in den verwendeten DC-Systemen wies nach Detektion mit NA/PEG auf das Vorliegen von Chlorogensäure in Blättern der *Metaxya rostrata* hin. Die Identifizierung erfolgte mittels DC mit der authentischen Substanz in zwei Fließmittelsystemen (Abb. 6).

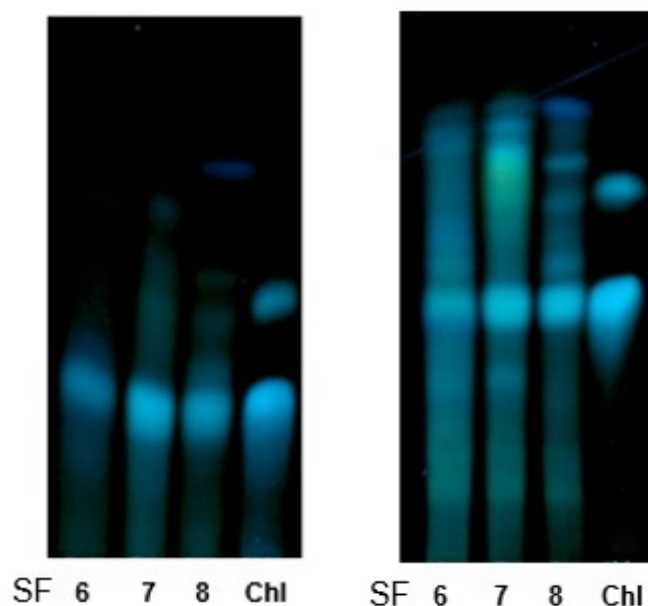


Abbildung 6: Vergleich der Sammelfractionen 6-8 von SC1 mit Chlorogensäure (Chl)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: links: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4),
rechts: EtAc- conc. Ameisensäure- Eisessig- Ethylmethyleton- Wasser (50:7:3:30:10)

Detektion: NA/PEG

SF 10 bis 16 der SC 1 wurden aufgrund ihrer Ähnlichkeit im Bandenmuster vereinigt (Abb. 4, S. 8).

Die charakteristischen blau fluoreszierenden Doppelbanden bei Rf-Wert 0,8 bzw. 0,3 ließen vermuten, dass Kaffeesäure in den Blättern enthalten ist. Diese Säure spaltet

bei der DC in Methanol-hältigen Fließmitteln durch Esterbildung in zwei Banden auf (Wagner H. et al., 1983).

Dass Kaffeesäure in den Blättern von *Metaxya rostrata* enthalten ist, konnte mittels DC in zwei Fließmittelsystemen (Abb. 7) eindeutig verifiziert werden.

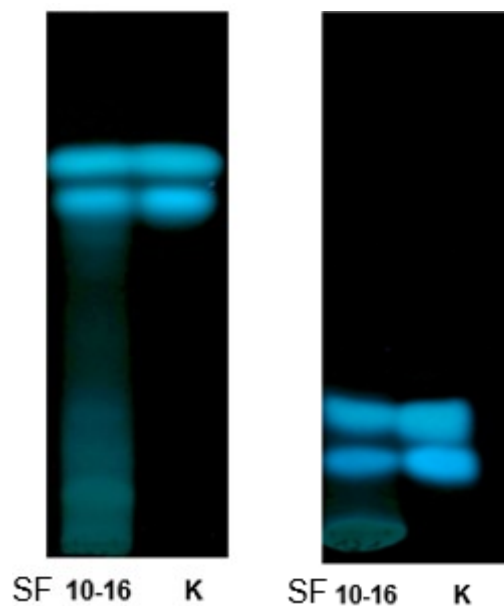


Abbildung 7: Vergleich der Sammelfractionen 10-16 von SC1 mit Kaffeesäure (K)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: links: EtAc-conc.Ameisensäure-MeOH (70:8:4),

rechts: Dichlormethan-Cyclohexan-conc. Ameisensäure-Ethylformiat (30:35:5:30)

Detektion: NA/PEG

3.1.3. DC- Vergleiche mit Proanthocyanidinen

Da die Banden der SF 17, 21 und 22 von SC1 aufgrund der orange-braunen Färbung im R_f-Wert-Bereich von ca. 0,6-0,8 mit AASS das Vorliegen von Proanthocyanidinen vermuten ließen, wurde ein Vergleich mit einer Mischung aus Cinnamtannin B1/Aesculitannin B (KK4) und mit Procyanidin A2 (Pro) durchgeführt (Abb. 8, S. 13). Die Komponenten in den SF zeigten polarere Eigenschaften auf als die Vergleichssubstanzen und somit war keine Identifizierung dieser Komponenten möglich.

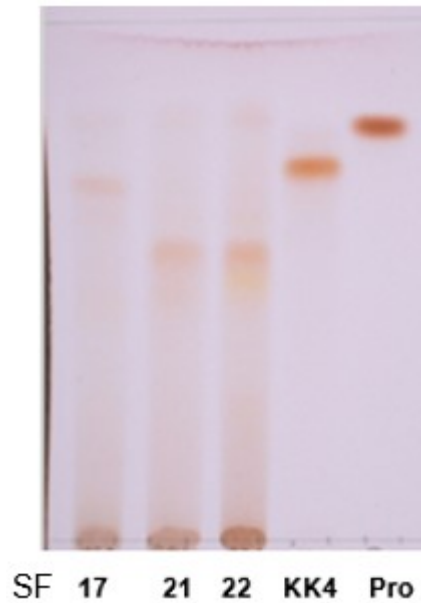


Abbildung 8: Vergleich der Sammelfractionen 17, 21 und 22 von SC1 mit Proanthocyanidinen

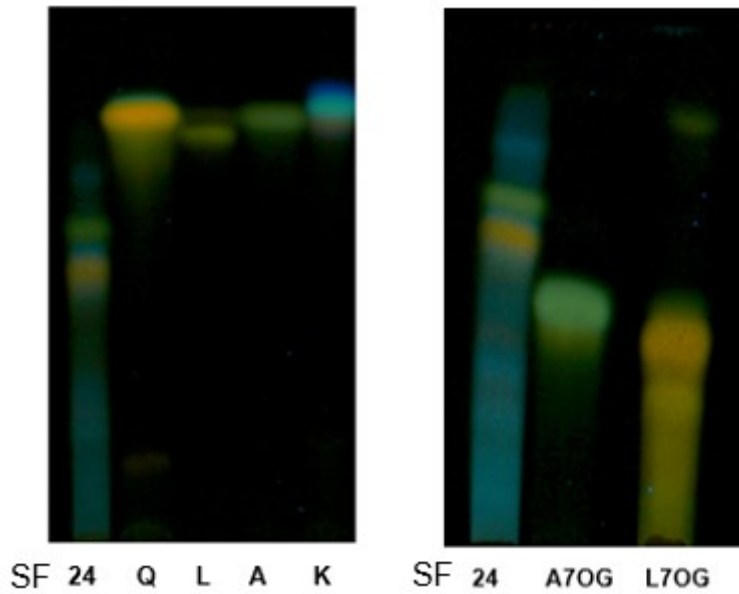
Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

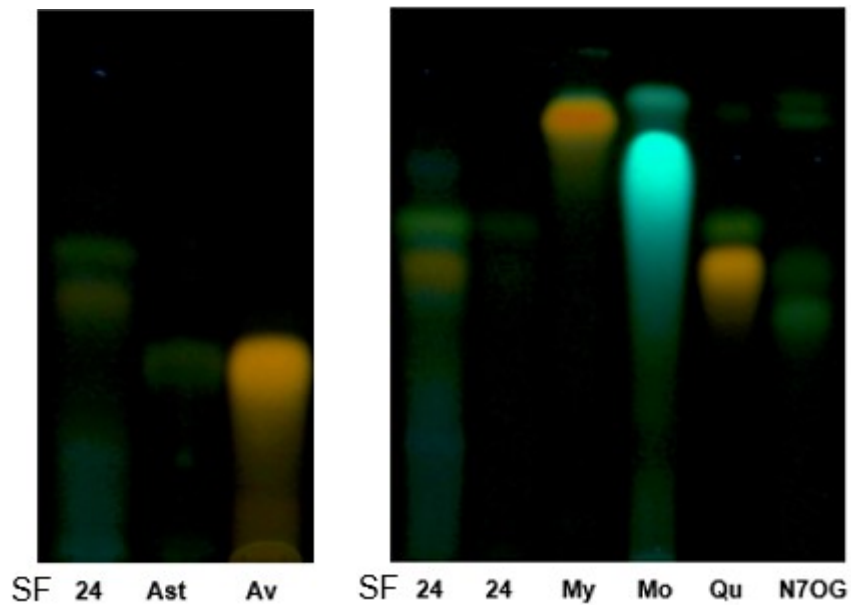
Detektion: AASS

3.1.4. DC- Vergleiche mit Flavonoiden

In SF 24 von SC1 wurde eine gelb-orange Bande bei R_f-Wert 0,6 und eine grünlich fluoreszierende Bande bei R_f-Wert 0,7 mittels NA/PEG detektiert, die auf das Vorliegen von Flavonoiden schließen ließ. Deshalb wurde ein entsprechender Vergleich mit verschiedenen Flavonoiden durchgeführt (Abb. 9+10, S. 14+15).



Quercetin (Q), Luteolin (L), Apigenin (A), Kämpferol (K), Apigenin-7-O-glucosid (A7OG),
Luteolin-7-O-glucosid (L7OG)



Astragalin (Ast), Avicularin (Av), Myricetin (My), Morin (Mo), Quercitrin (Qu), Naringenin-7-O-glucosid (N7OG)

Abbildung 9: Vergleich von Sammelfraktion 24 von SC1 mit Flavonoiden

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG

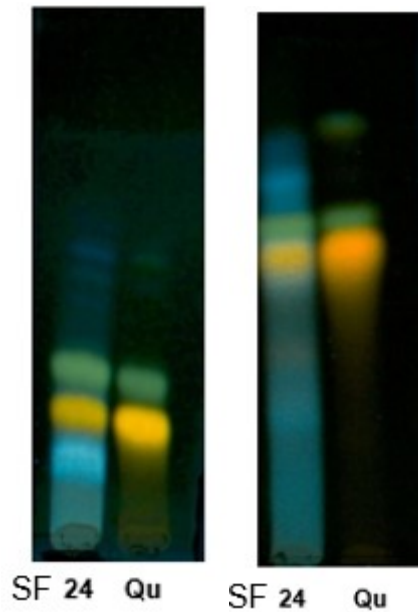


Abbildung 10: Vergleich von Sammelfraktion 24 von SC1 mit Quercitrin (Qu)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: links: Toluol-Ethylformiat-conc. Ameisensäure-MeOH (5:4:1:1),
rechts: EtAc- conc. Ameisensäure- MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG

In den chromatographischen Vergleichen von SF 24 von SC1 mit verschiedenen Flavonoiden zeigte nur die Bande mit gelb-oranger Fluoreszenz im Bereich von ca. 0,4 bzw. 0,7 Übereinstimmung mit Quercitrin (Abb. 10).

Weitere Übereinstimmungen waren nicht zu detektieren, da sich die Banden in SF 24 in der Fluoreszenz unterschieden oder andere R_f-Werte als die Vergleichssubstanzen aufwiesen.

3.2. Auftrennung der Chloroform/Isopropanolfraktion

Die Chloroform/Isopropanolfraktion (Kap. 2.2.1.1., S. 4), in der die apolaren Komponenten des EtAc-MeOH-Extraktes angereichert waren, wurde ebenfalls einer SC unterzogen.

3.2.1. SC2

Auftragsmenge: 2,28 g Chloroform/Isopropanolfraktion

Säulendimension: Länge: 55 cm, Durchmesser: 3 cm

Stationäre Phase: Sephadex® LH-20

Mobile Phase: MeOH/Wasser (80:20), ab Fraktion 250 MeOH

Es wurden 286 Fraktionen gesammelt, jede fünfte Fraktion mittels DC kontrolliert und die Fraktionen aufgrund ihrer Zusammensetzung vereinigt. Es entstanden 19 SF (Abb. 11, S. 17; Tab. 4, S. 18).

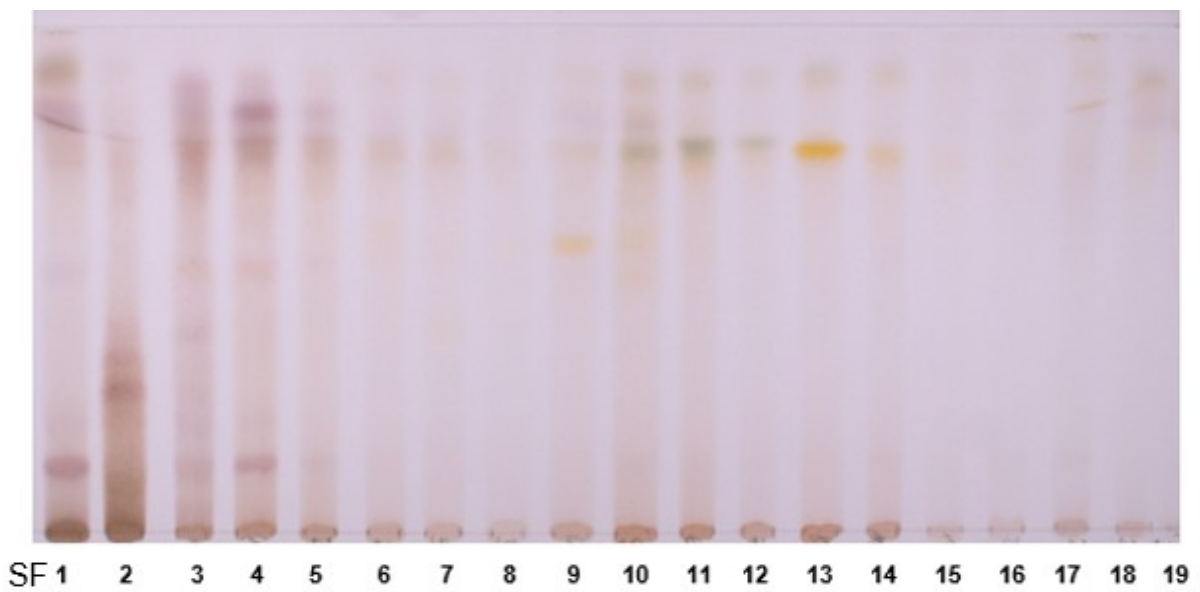
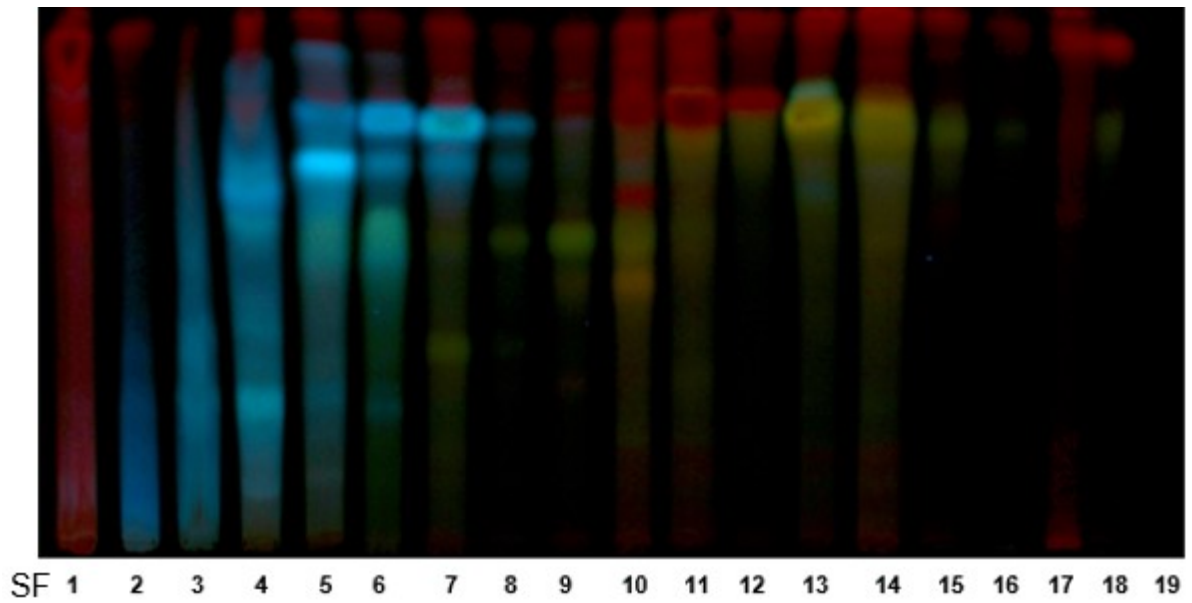


Abbildung 11: DC der Sammelfractionen von SC2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG (oben), AASS (unten)

Tabelle 4: Sammelfractionen von SC2

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge in mg
1	1-7	415,0
2	8-12	205,0
3	13-17	325,0
4	18-22	65,0
5	23-27	16,0
6	28-31	13,0
7	32-38	8,0
8	39-41	1,0
9	42-55	3,0
10	56-64	10,0
11	65-78	9,0
12	79-86	3,0
13	87-108	10,0
14	109-197	21,0
15	198-224	3,0
16	225-250	1,0
17	251-257	3,0
18	258-285	3,0
19	286 (Nachlauf)	31,0

SF 2-8 zeigten bei Detektion mit NA/PEG blau fluoreszierende Banden, die auf das Vorhandensein von Phenolcarbonsäuren schließen ließen. In SF 9-15 deuteten gelb-orange fluoreszierende Banden auf Flavonoide als Komponenten hin. Die SF 1, 13 und 14 der SC2 wurden aufgrund ausreichender Mengen zu weiterer säulenchromatographischer Auftrennung herangezogen, um möglichst reine Verbindungen ohne Begleitstoffe zu erhalten.

3.2.2. Auftrennung der Sammelfraktion 1 von SC2

Aufgrund des hohen Anteils an Chlorophyll in der Sammelfraktion 1 von SC2 (Abb. 11, S. 17) wurde eine säulenchromatographische Auftrennung durchgeführt, um enthaltene Sekundärstoffe detektieren zu können und aufzureinigen.

SC3:

Auftragsmenge: 451 mg

Säulendimension: Länge: 56 cm; Durchmesser: 3 cm

Stationäre Phase: Sephadex® LH-20

Mobile Phase: MeOH/Wasser (60:40); ab Fraktion 100 MeOH/Wasser (80:20); ab Fraktion 220 MeOH

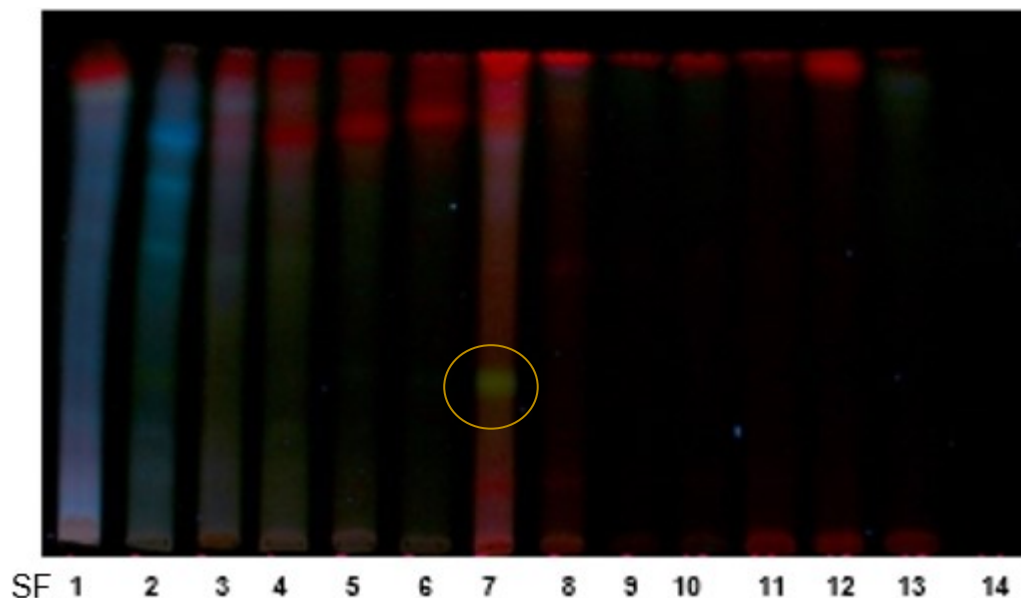


Abbildung 12: DC der Sammelfractionen von SC3

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG (oben)

Es wurden 240 Fraktionen gesammelt, jede fünfte Fraktion mittels DC kontrolliert und die Fraktionen aufgrund ihrer Zusammensetzung vereinigt. Es entstanden 14 SF (Abb. 12; Tab. 5, S. 20).

Tabelle 5: Mengen der Sammelfractionen von SC3

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Mengen in mg
1	0-10	12,0
2	11-17	10,0
3	18-35	7,0
4	36-55	5,0
5	56-75	4,0
6	76-100	3,0
7	101-155	45,0
8	156-195	5,0
9	196-215	<1,0
10	216-219	<1,0
11	220-222	<1,0
12	223-228	1,0
13	229-239	1,0
14	240	<1,0

Bei der Detektion mit NA/PEG zeigte sich in der SF 7 bei Rf-Wert 0,35 eine gelb-orange fluoreszierende Komponente und eine beträchtliche Menge an Chlorophyll. Eine weitere Auftrennung schien aufgrund der großen Menge an Begleitstoffen der SF 7 nicht zielführend.

3.2.3. Auftrennung der Sammelfraktion 13 von SC2

Die SF 13 von SC2 wurde in SC4 weiter aufgetrennt, mit dem Ziel Chlorophyll abzutrennen und die gelbfluoreszierende Komponente bei Rf-Wert 0,8 zu isolieren (Abb. 11, S. 17).

SC4:

Auftragsmenge: 10 mg

Säulendimension: Länge: 32 cm; Durchmesser: 1,2 cm

Stationäre Phase: Sephadex® LH-20

Mobile Phase: 70:30 (MeOH/Wasser); ab Fraktion 8 MeOH

Es wurden 15 Fraktionen gesammelt und jede Fraktion chromatographisch untersucht (Abb. 13; Tab. 6, S. 22).

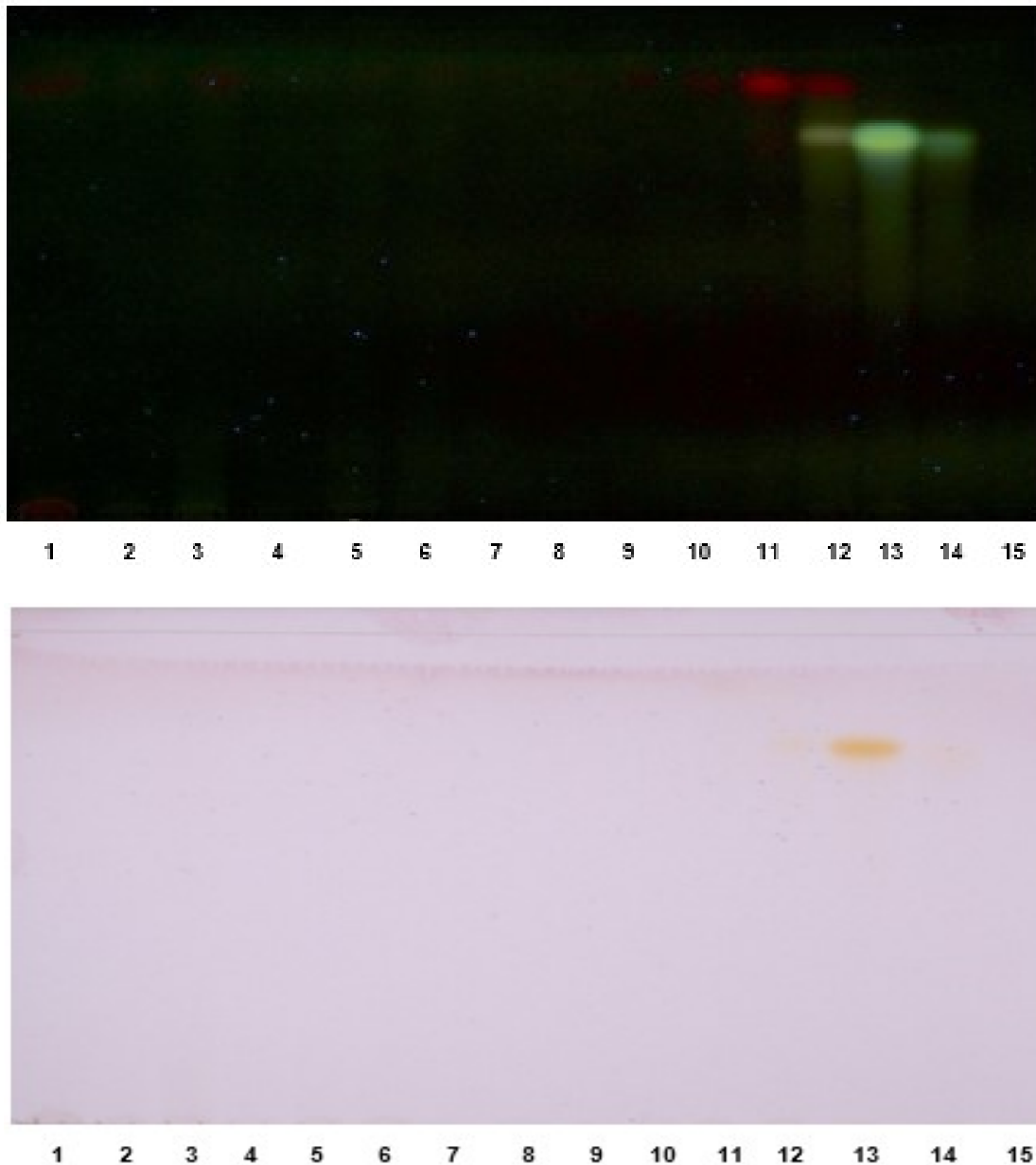


Abbildung 13: DC der Fraktionen von SC4

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG (oben), AASS (unten)

Tabelle 6: Fraktionen von SC4

Fraktion	Menge in mg
1	0,6
2	0,3
3	1,5
4	<1,0
5	0,4
6	0,4
7	0,2
8	0,4
9	2,5
10	<1,0
11	0,7
12	0,4
13	4,0
14	1,1
15	0,6

Die Fraktionen 12, 13 und 14 wiesen jeweils eine intensiv gelb-grün fluoreszierende Komponente bei Rf-Wert 0,9 auf (Abb. 13, S. 21).

3.2.4. Auftrennung der Fraktion 13 von SC4

In Fraktion 13 von SC4 war eine gelb-grün fluoreszierende Bande bei Rf 0,9 nahezu chromatographisch einheitlich angereichert (Abb. 13, S. 21). Zur Abtrennung von Spuren an Begleitstoffen wurde SF 13 einer weiteren SC unterzogen (SC5).

SC5:

Auftragsmenge: 4 mg

Säulendimension: Länge: 32 cm; Durchmesser: 1,2 cm

Stationäre Phase: Sephadex® LH-20

Mobile Phase: MeOH/Wasser (70/30)

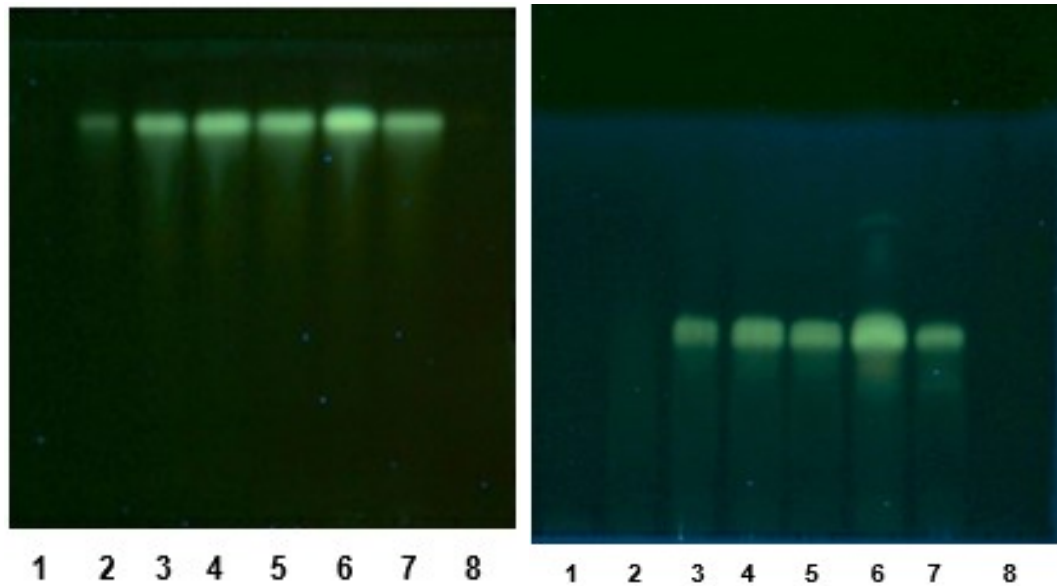


Abbildung 14: DC der Fraktionen von SC5

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: links: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:80:4),
rechts: Toluol- Ethylformiat-conc. Ameisensäure-MeOH (5:4:1:1)

Detektion: NA/PEG

Es wurden acht Fraktionen gesammelt und mittels DC kontrolliert (Abb. 14, Tab. 7).

Tabelle 7: Fraktionen von SC5

Fraktion	Menge in mg
1	1,0
2	0,6
3	0,7
4	0,6
5	0,7
6	1,0
7	0,7
8	0,7

Da die intensiv gelb-grün fluoreszierenden Banden bei Rf-Wert 0,8 bzw. 0,5 Xanthone oder strukturell verwandte Verbindungen vermuten ließen und chromatographisch weitgehend rein erschienen, wurden die Fraktionen 3, 4 und 5 vereinigt (=Substanz AP1) und zur weiteren Untersuchung einer NMR-Analyse unterzogen, um die Struktur aufzuklären (Kap. 3.2.5.). Die Fraktionen 6 und 7 enthielten Begleitstoffe und wurden daher nicht für die NMR-Analyse herangezogen.

3.2.5. Strukturaufklärung von Substanz AP1

In den NMR- und LC/MS-Analysen zeigte sich, dass sich Fraktion AP-1 aus einem Gemisch aus verschiedenen lipidartigen Komponenten mit äußerst geringen Anteilen an einem Xanthon zusammensetzte¹. Eine Strukturaufklärung war daher nicht möglich (Abb. 15).

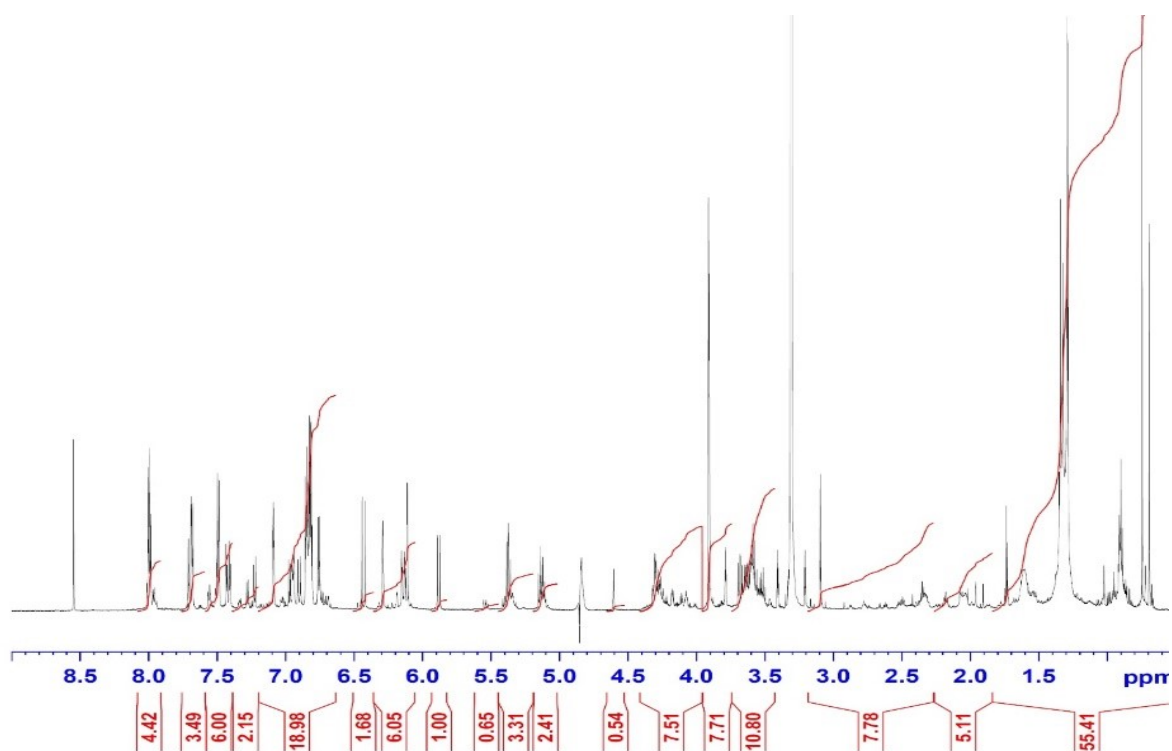


Abbildung 15: ¹H-NMR-Spektrum von AP-1

¹ Danke an Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für Organische Chemie der Universität Wien, für die Durchführung der NMR-Messung.

3.2.6. Auftrennung der Sammelfraktion 14 von SC2

In der SF 14 von SC2 (Abb. 11, S. 17) wurden Flavonoide vermutet (gelbe Fluoreszenz bei Rf-Wert 0,8) und die Fraktion deshalb weiter aufgetrennt (SC6).

SC6:

Auftragemenge: 21 mg

Säulendimension: Länge: 32 cm; Durchmesser: 1,2 cm

Stationäre Phase: Sephadex[®] LH-20

Mobile Phase: MeOH/Wasser (50:50); ab Fraktion 5 MeOH/Wasser (60:40) ab Fraktion 6 MeOH/Wasser (80:20); ab Fraktion 7 MeOH

Es wurden 17 Fraktionen gesammelt und mittels DC kontrolliert (Abb. 16; Tab. 8, S. 26).

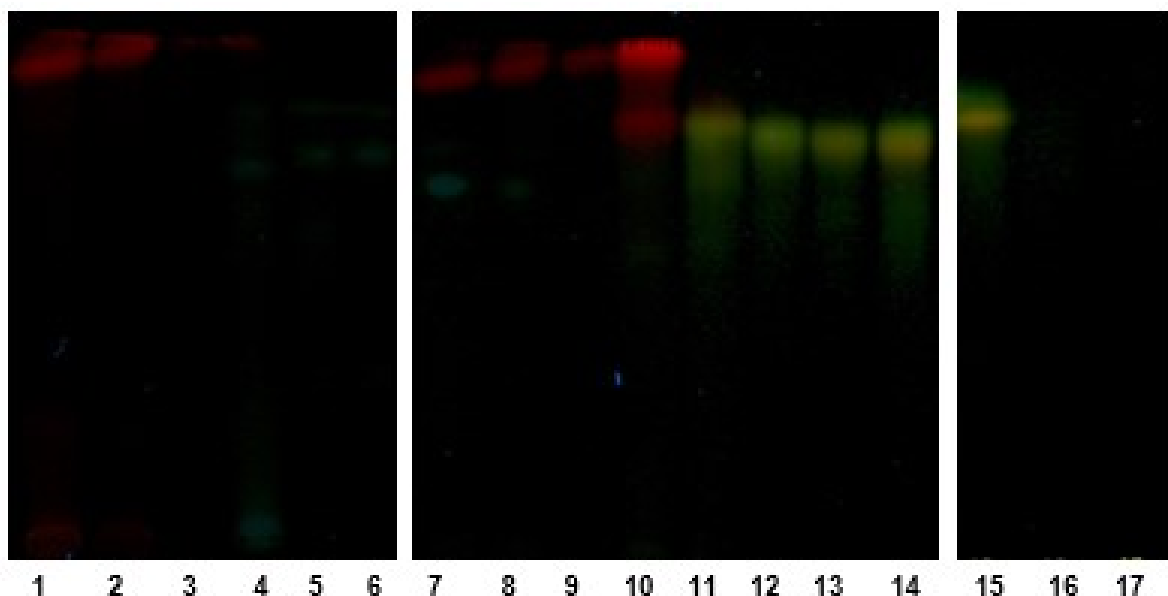


Abbildung 16: DC der Fraktionen von SC6

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG

Tabelle 8: Fraktionen von SC6

Fraktion	Menge in mg	Fraktion	Menge in mg
1	1,0	10	2,0
2	0,9	11	0,8
3	<0,1	12	1,0
4	4,0	13	0,8
5	0,6	14	3,0
6	0,7	15	<1,0
7	1,0	16	<1,0
8	0,9	17	<1,0
9	<1,0		

Die Fraktionen 1-10 enthielten fast ausschließlich Chlorophyll und wurden daher nicht weiter analysiert. In den Fraktionen 11-15 waren die Flavonoide angereichert. die Fraktionen 14 und 15 enthielten ein Gemisch aus einer orange und einer türkis fluoreszierenden Komponente und wurden aufgrund der Ähnlichkeit der Banden vereinigt und mittels SC weiter aufgetrennt (Kap. 3.2.7).

3.2.7. Auftrennung der Fraktionen 14 und 15 von SC6

Die Fraktionen 14 und 15 von SC 6 wurden mittels SC 7 weiter fraktioniert. Ziel war es, die orangefarbene und die türkis fluoreszierende Bande mit Rf-Wert 0,85 bzw. 0,9 zu isolieren (Abb. 16, S. 25).

SC7:

Auftragsmenge: 3 mg

Säulendimension: Länge: 32 cm; Durchmesser: 1,2 cm

Stationäre Phase: Sephadex[®] LH-20

Mobile Phase: MeOH/Wasser (70:30); ab Fraktion 7 MeOH

Es wurden 12 Fraktionen gesammelt und mittels DC kontrolliert (Abb. 17 und Tab. 9, S. 27).

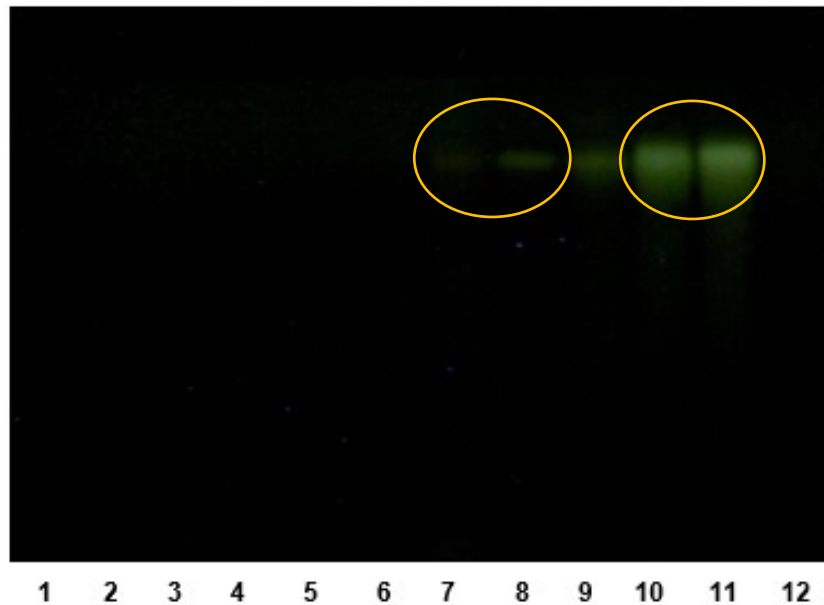


Abbildung 17: DC der Fraktionen von SC7

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: EtAc-conc. Ameisensäure-MeOH (70:8:4)

Detektion: NA/PEG

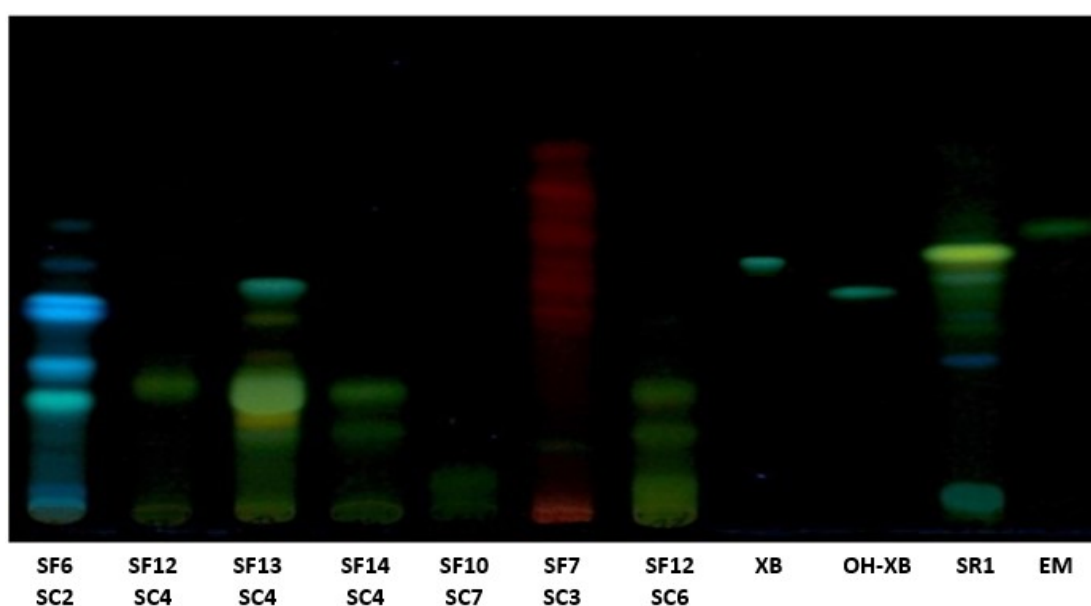
Tabelle 9: Fraktionen von SC7

Fraktion	Menge in mg	Fraktion	Menge in mg
1	0,3	7	0,3
2	0,3	8	0,9
3	0,1	9	0,2
4	0,2	10	1,0
5	<1,0	11	0,5
6	0,2	12	0,6

In den Fraktionen 7 und 8 war die orange fluoreszierende Bande und in den Fraktionen 10 und 11 die türkis fluoreszierende Bande angereichert. Allerdings waren die isolierten Mengen zu gering für eine Strukturaufklärung (Abb. 17).

3.2.8. DC-Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Xanthonen

Da gelb- bis türkis fluoreszierende Banden in mehreren SF aus den verschiedenen säulenchromatographischen Trennungen auf das Vorliegen von Xanthonen schließen ließen, erfolgte der DC-Vergleich mit Substanzen dieser Stoffklasse, die bereits aus *Metaxya rostrata* isoliert worden waren (Tab.1, S. 1),



2-Deprenyl-rheediaxanthon B (XB), 2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (OH-XB), Mischung aus 2-Deprenyl-7-methoxy-rheediaxanthon und 2-Deprenyl-6-O-methyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (SR1) und Dimethoxy-rheediaxanthon B (EM)

Abbildung 18: DC-Vergleich ausgewählter Sammelfractionen der Chloroform/Isopropanolfraction mit bekannten Xanthonen

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: Toluol-Ethylformiat-conc. Ameisensäure (5:4:1)

Detektion: NA/PEG

In Fraktion 13/SC4 wies die türkis fluoreszierende Bande bei R_f 0,5 Ähnlichkeit im R_f-Wert und der Fluoreszenzfarbe mit OH-XB auf und wurde deshalb in einem weiteren Chromatogramm analysiert. Zwar stimmte die Bande in ihrer türkis-farbenen Fluoreszenz mit OH-XB überein, jedoch war der R_f-Wert etwas höher als jener von OH-XB (Abb. 19, S. 29).

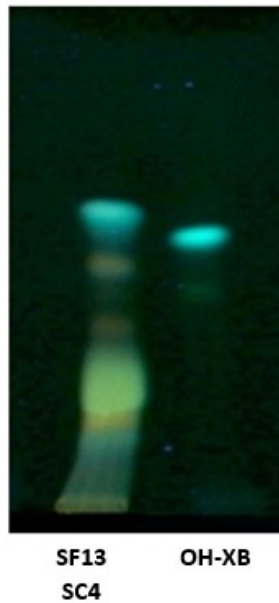


Abbildung 19: DC-Vergleich der Sammelfraktion 13 von SC4 mit OH-XB

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: Toluol-Ethylformiat-conc. Ameisensäure (5:4:1)

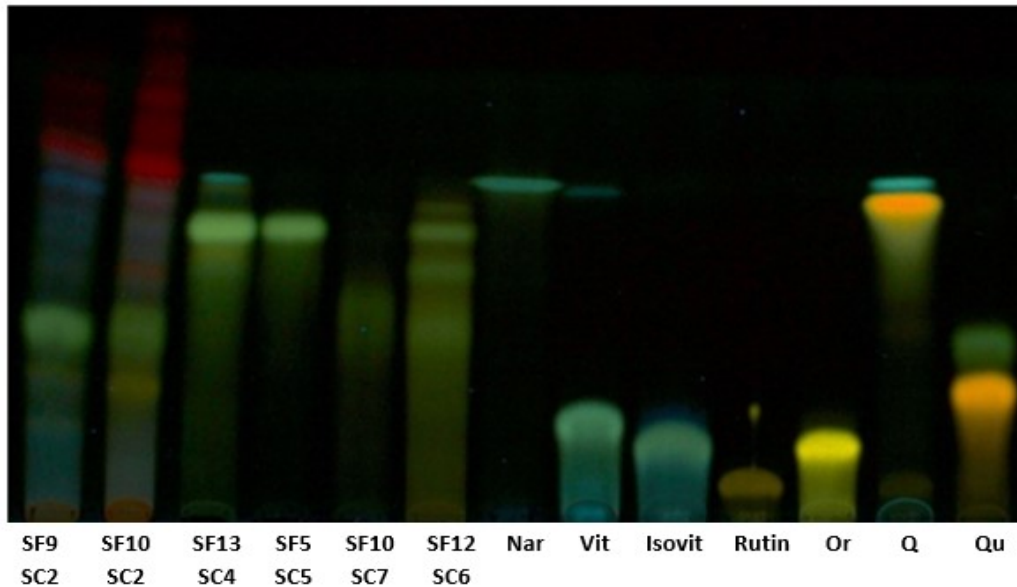
Detektion: NA/PEG

3.2.9. DC-Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Flavonoiden

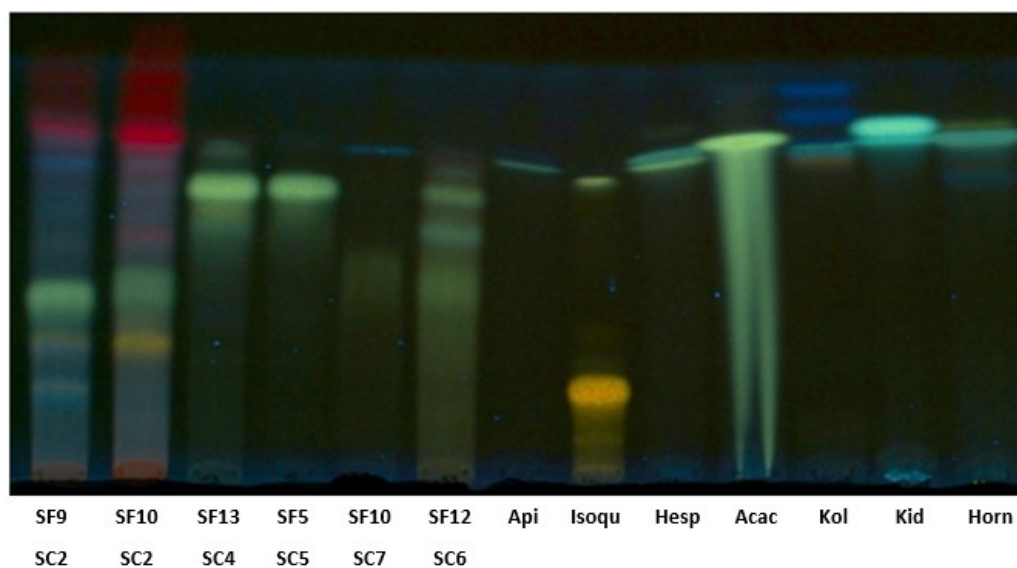
Aufgrund der gelb-orange fluoreszierenden Banden nach Detektion mit NA/PEG wurden in einigen SF nach Auftrennung der Wasserfraktion und der Chloroform/Iso-propanolfraction Flavonoide vermutet.

Daher wurden mehrere Fraktionen mit verschiedenen Flavonoiden verglichen (Abb. 20+21, S. 30+31):

„



Naringenin (Nar), Vitexin (Vit), Isovitexin (Isovit), Rutin, Orientin (Or), Quercetin (Q) und Quercitrin (Qu)



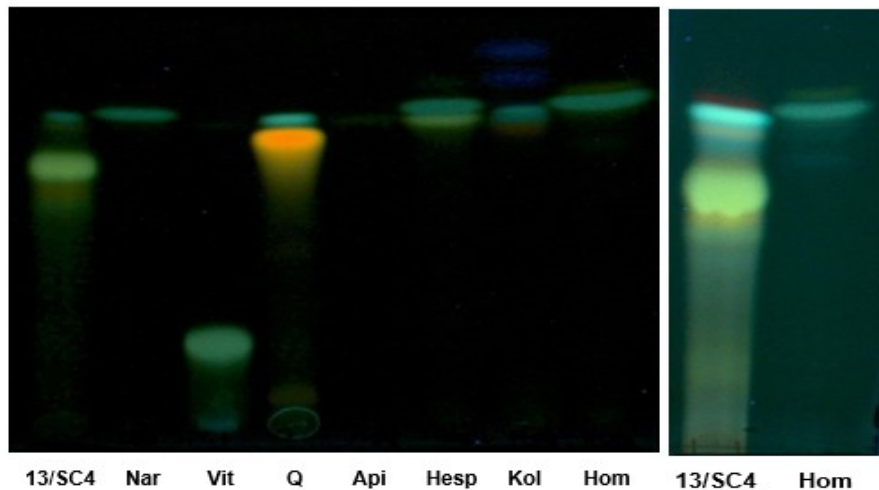
Apigenin (Api), Isoquercitrin (Isoqu), Hesperetin (Hesp), Acacetin (Acac), Kämpferol (Kol), Kämpferid (Kid), Homoeriodictyol (Hom)

Abbildung 20: Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Flavonoiden

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: Toluol- Ethylformiat- conc. Ameisensäure- MeOH (5:4:1:1)

Detektion: NA/PEG



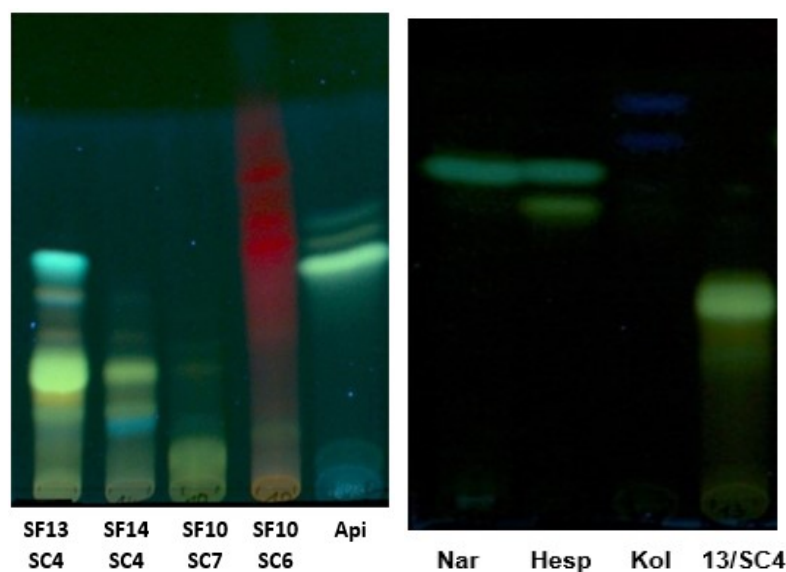
Naringenin (Nar), Vitexin (Vit), Quercetin (Q), Apigenin (Api), Hesperetin (Hesp) Kämpferol (Kol), Homoeriodictyol (Hom)

Abbildung 21: Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Flavonoiden

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: Toluol- Ethylformiat- conc. Ameisensäure- MeOH (5:4:1:1)

Detektion: NA/PEG



Apigenin (Api), Naringenin (Nar), Hesperetin (Hesp) Kämpferol (Kol)

Abbildung 21: Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Flavonoiden

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Mobile Phase: Toluol- Ethylformiat- conc. Ameisensäure (5:4:1)

Detektion: NA/PEG

Die authentischen Flavonoide stimmten entweder in ihrer Fluoreszenzfarbe oder ihrem Rf-Wert nicht mit Komponenten in den ausgewählten Fraktionen überein. Weitere Analysen erschienen aufgrund der geringen vorhandenen Mengen bzw. beträchtlicher Mengen an Begleitstoffen nicht zielführend.

4. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG

Zielsetzung dieser Diplomarbeit war die phytochemische Untersuchung der Blätter von *Metaxya rostrata*. Ausgehend von einem EtAc-MeOH-Extrakt wurden eine Wasserfraktion und eine Chloroform/Isopropanolfraction (Kap. 2.2.1.1., S. 4) hergestellt und mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 weiter aufgetrennt. Sammelfractionen, die Komponenten mit intensiver Fluoreszenzfärbung (Detektion mit NA/PEG) enthielten, wurden mit entsprechenden Vergleichssubstanzen chromatographisch untersucht. Verglichen wurde u.a. mit Flavonoiden unterschiedlicher Polarität (Kap. 3.1.4., S.13, 14, 15 und Kap. 3.2.9, S. 29, 30, 31), mit Proanthocyanidinen (Kap. 3.1.3., S. 12+13) (Cinnamtannin B1, Aesculitannin B, Procyanidin) und mit Xanthonen (Kap. 3.2.8., S. 28+29). Um Substanzen rein darzustellen, erfolgten bei ausreichenden Mengen einzelner Sammelfractionen weitere säulenchromatographische Auftrennungsschritte und anschließend Vergleiche mittels DC. Die Detektion erfolgte mit NA/PEG und AASS (Kap. 2.2.2., S. 5+6).

Nach Auftrennung der Wasserfraktion (Kap. 3.1.1., S. 7, 8, 9, 10), zeigten sich in den Sammelfractionen 2-17 blau fluoreszierende Komponenten, die das Vorliegen von Phenolcarbonsäuren und Caffeoyleichinasäuren vermuten ließen (Abb. 4, S. 8), die identifiziert werden konnten (Kap. 3.1.2, S. 11+12). In den Sammelfractionen 24-27 waren Flavonoide angereichert, die aufgrund ihrer Fluoreszenzfarbe auf Apigenin- und Luteolinglykoside hindeuteten (Abb.5, S.10). Die orange-bräunliche Färbung der Banden in den SF 17-22 ließ Proanthocyanidine vermuten (Abb.8, S.13).

SF 2-8 der Chloroform/Isopropanolfraction (Kap. 3.2.1., S. 16+17) zeigten blau fluoreszierende Banden, die ebenfalls das Vorhandensein von Phenolcarbonsäuren bestätigten. SF 9-15 ließen durch gelb-orange gefärbte Fluoreszenz verschiedener Banden in der DC Flavonoide als Komponenten vermuten. SF 1 (Kap. 3.2.2., S. 19), 13 (Kap. 3.2.3., S. 20+21) und 14 (Kap. 3.2.6., S. 25) von SC2 wurden aufgrund ausreichender Mengen zu weiteren säulenchromatographischen Auftrennungen herangezogen. Es konnten nur Einzelkomponenten angereichert werden, eine Strukturaufklärung war jedoch aufgrund der geringen Mengen nicht möglich.

In den Blättern des Baumfarnes *Metaxya rostrata* konnte erstmals Quercitrin (=Quercetin-3-rhamnosid) nachgewiesen werden (Kap. 3.1.4., S. 15). In der

Wasserfraktion wurden Kaffeesäure und Chlorogensäure identifiziert, die bis jetzt nur von den unterirdischen Teilen der Pflanze bekannt waren (Kap. 3.1.2., S. 11+12).

Für eine Untersuchung der Extrakte aus den Blättern bzw. Wurzeln des Baumbarns in einem Lifespan-Assay am Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* wurden die Versuchsextrakte hergestellt (Kap. 2.2.1.2., S. 4+5). Die Durchführung dieser Untersuchungen erfolgte jedoch nicht im Rahmen dieser Diplomarbeit.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Baumfarn *Metaxya rostrata* wird als traditionelles Heilmittel zur Behandlung von Darmerkrankungen verwendet. In vorangegangenen Dissertationen und Diplomarbeiten waren bereits Inhaltsstoffe aus den unterirdischen Teilen dieser Pflanze isoliert worden. Da es bisher noch wenig Information über die phytochemische Zusammensetzung der Blätter des Baumfarns gab, war die Zielsetzung dieser Diplomarbeit die Analytik eines Blattextraktes.

Aus einem mittelpolaren Extrakt wurden eine Wasserfraktion und eine Chloroform/Isopropanolfraktion gewonnen. Zu weiteren Auftrennungen wurde die Säulenchromatographie verwendet. Die resultierenden Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht und die Sammelfractionen zum Vergleich mit bereits bekannten Substanzen herangezogen. Dabei konnte Quercitrin erstmals in *Metaxya rostrata* identifiziert werden. Weiters kam es zur Bestätigung des Vorliegens von Chlorogensäure und Kaffeesäure auch in den oberirdischen Anteilen der Pflanze.

6. SUMMARY

The tree fern *Metaxya rostrata* is used in ethnomedicine against gastrointestinal diseases. In previous Ph.D. and diploma theses, several compounds have been isolated from the rhizomes of this plant. Since only little information on the phytochemical composition of the leaves of the tree fern was available, the aim of this thesis was to analyse a leaf extract.

A water- and a chloroform-/isopropanol-fraction were prepared from a medium polar extract and separated by size exclusion chromatography. The resulting fractions were examined by TLC and compared with authentic substances. Quercitrin was identified in *Metaxya rostrata* for the first time. Furthermore, the presence of chlorogenic acid and caffeic acid in the leaves was confirmed. These compounds were known only from the underground parts of the plant until now.

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: <i>Metaxya rostrata</i> (C. Presl)	3
Abbildung 3: Säulenchromatographie der Wasserfraktion	7
Abbildung 4: DC der Sammelfractionen 1-19 von SC1	8
Abbildung 5: DC der Sammelfractionen 20-28 von SC1	9
Abbildung 6: Vergleich der Sammelfractionen 6-8 von SC1 mit Chlorogensäure (Chl)	11
Abbildung 7: Vergleich der Sammelfractionen 10-16 von SC1 mit Kaffeesäure (K)	12
Abbildung 8: Vergleich der Sammelfractionen 17, 21 und 22 von SC1 mit Proanthocyanidinen	13
Abbildung 9: Vergleich von Sammelfraction 24 von SC1 mit Flavonoiden	14
Abbildung 10: Vergleich von Sammelfraction 24 von SC1 mit Quercitrin (Qu)	15
Abbildung 11: DC der Sammelfractionen von SC2	17
Abbildung 12: DC der Sammelfractionen von SC3	19
Abbildung 13: DC der Fractionen von SC4	21
Abbildung 14: DC der Fractionen von SC5	23
Abbildung 15: ¹ H-NMR-Spektrum von AP-1	24
Abbildung 16: DC der Fractionen von SC6	254
Abbildung 17: DC der Fractionen von SC7	27
Abbildung 18: DC-Vergleich ausgewählter Sammelfractionen der Chloroform/Isopropanolfraction mit bekannten Xanthonen	28
Abbildung 19: DC-Vergleich der Sammelfraction 13 von SC4 mit OH-XB	29
Abbildung 20: Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Flavonoiden	30
Abbildung 21: Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Flavonoiden	31
Abbildung 22: Vergleich ausgewählter Sammelfractionen mit Flavonoiden	31

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Bekannte Verbindungen aus <i>Metaxya rostrata</i>	1
Tabelle 2: Mobile Phasen für DC.....	5
Tabelle 3: Sammelfraktionen von SC1	10
Tabelle 4: Sammelfraktionen von SC2	18
Tabelle 5: Mengen der Sammelfraktionen von SC3	20
Tabelle 6: Fraktionen von SC4	22
Tabelle 8: Fraktionen von SC6	26
Tabelle 9: Fraktionen von SC7	27

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Bleier J. (2012) Isolierung von Inhaltsstoffen mittlerer Polarität aus *Metaxya rostrata*. Diplomarbeit, Univ. Wien.
- Camp D., Davis R., Campitelli M., Ebdon J., Quinn R. (2012) Drug-like Properties: Guiding Principles for the Design of Natural Product Libraries. J. Nat. Prod. 75, 72-81.
- Kainz K. (2011) Phytochemical Investigation and Bioactivity-guided Isolation of Cytotoxic Compounds from *Metaxya rostrata*, Dissertation, Univ. Wien.
- Kainz K., Virtbauer J., Kählig H., Arion V., Donath O., Reznicek G., Huber W., Marian B., Krenn L. (2012) Two Unusual Methylidenecyclopropane Glucosides from *Metaxya rostrata*. Helv. Chim. Acta 95, 1531-1537.
- Kainz K., Krenn L., Erdem Z., Kählig H., Zehl M., Bursch W., Berger W., Marian B. (2013) 2-Deprenyl-rheediaxanthone B isolated from *Metaxya rostrata* induces active cell death in colorectal tumor cells. Plos One 8, e65745.
- Kainz K., Zehl M., Bleier J., Merkinger B., Pemmer T., Schmidt N., Winkler J., Kählig H., Krenn L. (2014) New Compounds from the Tree Fern *Metaxya rostrata*. Rec. Nat. Prod. 8, 348-353.
- Merkinger B. (2010) Phytochemische Untersuchungen am Baumfarn *Metaxya rostrata*, Diplomarbeit, Univ. Wien.
- Mittermair E., Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung.
- Mittermair E., Krenn L., Marian B. (2019) Prenylated xanthenes from *Metaxya rostrata* suppress FOXM1 and induce active cell death by distinct mechanisms. Phytomedicine 60: 152912.
- Pemmer T. (2011) Phytochemische Untersuchungen der Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata*. Diplomarbeit, Univ. Wien.
- Rindler S. (2019) Isolierung neuer Xantheme aus *Metaxya rostrata*. Diplomarbeit, Univ. Wien.

- Schmidt N. (2012) Phyto-chemische Untersuchung der Sekundärstoffe in Wurzeln von *Metaxya rostrata*. Diplomarbeit, Univ. Wien.
- Virtbauer J., Krenn L., Kählig H., Hüfner A., Donath O., Marian B. (2008) Chemical and pharmacological investigations of *Metaxya rostrata*. Z. Naturforsch. 63c, 469-475.
- Wagner H., Bladt S., Zgainski EM. (1983) Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer-Verlag Berlin.

