



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Isolierung von Scillirosid aus Drogenextrakten
mittels γ - Cyclodextrin

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Sylvia Pollany
Matrikel-Nummer:	8901736
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuer:	o. Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Wien, am 31. Juli 2008

Mein Dank gilt besonders Herrn o. Univ. Prof. Dr. Helmut Viernstein, Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Wien, für die wissenschaftliche Betreuung und die Beratung beim Verfassen dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich für seine wertvolle Hilfe während der praktischen Arbeiten und seine langjährige Geduld.

Frau Univ. Prof. Dr. Brigitte Kopp und Frau Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn danke ich herzlich für die Unterstützung und Zusammenarbeit während der praktischen Arbeiten zur vorliegenden Diplomarbeit.

Weiters danke ich der Firma F. Joh. KWIZDA für die Förderung dieses Projektes.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	5
2. Material	7
2.1. Scillirosid	7
2.1.1. Vorkommen	7
2.1.2. Toxizität	8
2.1.3. Ausgangsmaterial	10
2.1.4. Chemische und physikalische Eigenschaften	10
2.2. Cyclodextrine	12
2.2.1. Allgemeines	12
2.2.2. Aufbau der Cyclodextrine	13
2.2.3. Ausgangsmaterial	14
2.2.4. Chemische und physikalische Eigenschaften	15
3. Methoden	16
3.1. Isolierungsverfahren	16
3.1.1. Allgemeine Übersicht	16
3.1.2. Mazeration	17
3.1.3. Extraktion	17
3.1.4. Umkristallisation	17
3.1.5. Aufreinigung mit Aktivkohle	18
3.1.6. Säulenchromatographie	18
3.2. Analyseverfahren	19
3.2.1. Dünnschichtchromatographie	19

3.2.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	19
4. Isolierung von Scillirosid aus Rohextrakten	25
4.1. Vorversuche mit 34,1% igem Scillirosid-Rohextrakt	25
4.1.1. Allgemeine Übersicht der Arbeitsschritte	25
4.1.2. Kleinansätze	26
4.1.3. Kristallisationsversuch direkt aus dem Rohextrakt	30
4.2. Vorversuche mit 20,2% igem Scillirosid-Rohextrakt	31
4.2.1. Allgemeine Übersicht der Arbeitsschritte	31
4.2.2. Laktoseabtrennung	32
4.2.3. Kleinansätze	32
4.3. Großansatz	34
4.3.1. Mazeration	34
4.3.2. Extraktion	34
4.3.3. Umkristallisation	36
4.3.4. Aufreinigung mit Aktivkohle	36
4.3.5. Säulenchromatographie	38
4.3.6. Ergebnisse	41
5. Zusammenfassung	42
6. Abbildungsverzeichnis	44
7. Tabellenverzeichnis	45
8. Literaturverzeichnis	46

1. EINLEITUNG

Die Meerzwiebel, *Urginea maritima L.*, gehört zur Familie der Liliaceae und zählt zu den ältesten in der Heilkunde verwendeten Pflanzen. Bereits 3500 v. Chr. war den Ägyptern diese Pflanze bekannt (1). Auch im antiken Griechenland wurde sie als Heilmittel verwendet (2). *Hippokrates* empfahl *Bulbus Scillae* zur äußerlichen und innerlichen Anwendung (3). Ca. 1500 v. Chr. wurde die rote Meerzwiebel im Ebers Papyrus erwähnt und der Historiker *Theophrastus* schrieb ca. 300 v. Chr. darüber. Im Mittelalter wurde die Meerzwiebel von westeuropäischen Ärzten verwendet und in der *Materia Medica*, ca. 1304 -1306, beschrieben (4).

Die toxischen Eigenschaften der Meerzwiebel waren allgemein bekannt und bereits *Konrad von Megenberg* schreibt in seinem "Buch der Natur", dass *Scilla* Mäuse tötet.¹ Verantwortlich für die toxische Wirkung auf Mäuse und Ratten ist der Inhaltsstoff Scillirosid. Es ist unbekannt, wann die Zwiebel erstmals als Rattenvernichtungsmittel verwendet wurde; berichtet wird, dass sie im späten 19. Jahrhundert in England als Rattizid eingesetzt wurde. Ab 1944 wurden große Mengen von Meerzwiebelpulver in die U.S.A. importiert. In den darauf folgenden Jahren übernahmen Warfarin und andere Rodentizide des Antigerinnungstyps, die den Tod der Tiere erst nach einigen Tagen durch Verbluten herbeiführen, die Rolle des Scillirosid.

Mittlerweile ist erwiesen, dass Nagetiere binnen mehrerer Jahre Resistenzen gegen die im Handel befindlichen Cumarinderivate entwickeln (5). Es ist daher zu erwarten, dass Scillirosid wieder zunehmend an Bedeutung gewinnen wird.

¹ Informationsschrift der Firma F. Joh. KWIZDA Ges. m. b. H., Dr. Karl Lueger-Ring 6, 1010 Wien

Da das früher verwendete Meerzwiebelpulver größtenteils aus wilden Zwiebeln stammte, war die Toxizität der Chargen sehr unterschiedlich und es wurden oft zu geringe Dosen des Giftes eingesetzt, die letztlich keine tödliche Wirkung zeigten.

Um Scillirosid möglichst quantitativ aus Extrakten der roten Meerzwiebel zu gewinnen, bietet der Einsatz von Cyclodextrinen (CDs) neue Möglichkeiten. CDs sind kristalline, homogene, wenig hygroskopische Substanzen, die aus Glucopyranoseeinheiten aufgebaut sind. Je nach Anzahl der verknüpften Moleküle werden sie als α -, β - oder γ -Cyclodextrin bezeichnet. Aufgrund ihrer hohlkegelstumpfförmigen Gestalt können feste oder flüssige Moleküle oder Moleküle mit hohem Dampfdruck in den Hohlraum des Cyclodextrin-Makromoleküls eingebaut werden (6). Die Komplexbildung mit γ -Cyclodextrin erweist sich als besonders günstig, weil die Hohlraumgröße von γ -Cyclodextrin am ehesten mit Scillirosid korreliert und darüber hinaus γ -Cyclodextrin großtechnisch preislich günstig hergestellt werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollte ein schnelles und effizientes Isolierungsverfahren für Scillirosid aus vorhandenen Rohextrakten entwickelt werden, das im Gegensatz zu bereits bekannten säulenchromatographischen Methoden den Lösungsmittelverbrauch gering hält und die Arbeitszeit verkürzt. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Optimierung der Aufreinigung von Scillirosid sowie der notwendigen Analytik für dieses neue Verfahren.

2. MATERIAL

2.1. Scillirosid

2.1.1. Vorkommen

Scillirosid ist ein herzwirksames Glykosid, ein Bufadienolid. Diesen Inhaltsstoff der roten Meerzwiebel *Urginea maritima* L. findet man in allen Pflanzenteilen. Frische Blätter, Schale und Blütenstengel zeigen einen geringeren Anteil als Mark und Wurzel. Der höchste Scillirosidgehalt wurde während der Blütezeit im August und September nachgewiesen, dagegen lag er im Blattstadium und in der Ruhezeit deutlich niedriger (7).



Abb. 1: Muster der Roten Meerzwiebel *Urginea maritima* L. mit Blütenstand

2.1.2. Toxizität

Scillirosid ist eines der stärksten Herzgifte und zugleich Träger der spezifisch toxischen Wirkung der Droge gegen Nagetiere. Die Substanz kann nur aus der roten Varietät der Meerzwiebel gewonnen werden. Die erste Isolierung in kristalliner Form gelang den beiden Schweizer Chemikern A. Stoll und J. Renz 1942 (8).

Wirkungsweise:

Scillirosid wirkt direkt auf den Herzmuskel von Nagetieren und ruft je nach Menge des aufgenommenen Köders und dem Körpergewicht der Maus oder Ratte innerhalb von 6 - 12 Stunden eine Herzmuskellähmung hervor. Diese rasche Wirkung ist ein Vorteil gegenüber Antikoagulantien, welche den Tod durch Verbluten des Nagers erst nach einigen Tagen hervorrufen. Auf Grund der hohen Toxizität ist bei scillirosidhaltigen Ködern keine wiederholte Aufnahme von Köderzubereitungen erforderlich. Die der jeweiligen Schadnagerart angepasste Köderformulierung sichert eine effiziente Bekämpfung.

Die orale Toxizität für Nagetiere angegeben in LD 50 in mg Scillirosid pro kg Lebendgewicht ist in Tabelle 1 wiedergegeben:

			männlich	weiblich
Hausmaus	-	Mus musculus domesticus	0,17mg	0,17 mg
Feldmaus	-	Microtus arvalis	4,40 mg	4,20 mg
Wühlmaus	-	Arvicola terrestris	2,40 mg	2,40 mg
Rötelmaus	-	Clethrionomys glareolus	6,00 mg	6,30 mg
Waldmaus	-	Apodemus sylvaticus	37,00 mg	37,00 mg
Hausratte	-	Rattus rattus	2,15 mg	0,43 mg
Wanderratte	-	Rattus norvegicus	2,15 mg	0,43 mg
Bisamratte	-	Ondatra zibethicus	1,50 mg	1,50 mg
Biberratte	-	Myocastor coypus	1,50 mg	1,50 mg

Tab. 1: LD 50 in mg Scillirosid /kg Körpergewicht

Auf Grund der außergewöhnlichen Wirkungsweise sind gegenüber dem Wirkstoff Scillirosid bisher keine Resistenzerscheinungen beobachtet worden. Ein Warnverhalten, wie es bei Ratten üblicherweise auftritt, ist wegen der zeitlichen Verschiebung des Auftretens erster Vergiftungssymptome nach Köderannahme nicht zu erwarten.

Umwelttoxizität:

Die Toxizität von scillirosidhaltigen Ködern gegenüber verschiedenen Haus - und Wildtieren ist gering. Die Köder werden von den Tieren nicht freiwillig aufgenommen. Sollte doch etwas gefressen werden, löst das bei Hunden und Katzen Erbrechen aus. Pferde, Rinder, Schweine und Schafe macht das große Körpergewicht unempfindlich. Auch Tauben und Fasane würgen das Gift wieder aus dem Kropf.

Vor Nagern, die nicht Zielobjekte einer Bekämpfungsmaßnahme sind, wie Eichhörnchen, Otter und Hamster, muss der Köder geschützt ausgelegt werden, denn Nagetiere sind die einzigen Tiere, die nicht erbrechen können. Diese Tatsache macht Scillirosid zu einem sehr spezifisch wirkenden Rodentizid (9).

Sekundärtoxizität:

Von der Versuchsstation für Phytopharmazie der INRA in Versailles durchgeführte Sekundärtoxizitätsversuche zeigten, dass auch bei Bussarden nach dem Verzehr von mit Scillirosid vergifteten Nagetieren keine Toxizitätserscheinungen aufgetreten sind. Jeder Bussard verzehrte eine frisch vergiftete Wanderratte pro Tag, während vier Tagen ohne tödlichen Ausgang; es wurde auch kein spezifischer Gewichtsverlust festgestellt. Auch an Katzen, die mit Scillirosid vergiftete Mäuse fraßen, wurden keine Vergiftungssymptome beobachtet.

2.1.3. Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial für das Isolierungsverfahren stellte die Firma F. Joh. KWIZDA zwei Rohextrakte aus Bulbus Scillae mit unterschiedlichem Scillirosidgehalt zur Verfügung. Ein Extrakt enthielt 34,1% Scillirosid, der andere war mit Laktose auf einen Anteil von 20,2 % Scillirosid eingestellt.

2.1.4. Chemische und physikalische Eigenschaften von Scillirosid

6 β - (acetyloxy)- 3 β - (β - D- glucopyranosyloxy)- 8, 14- dihydroxy- bufa-
4, 20, 22- trienolid

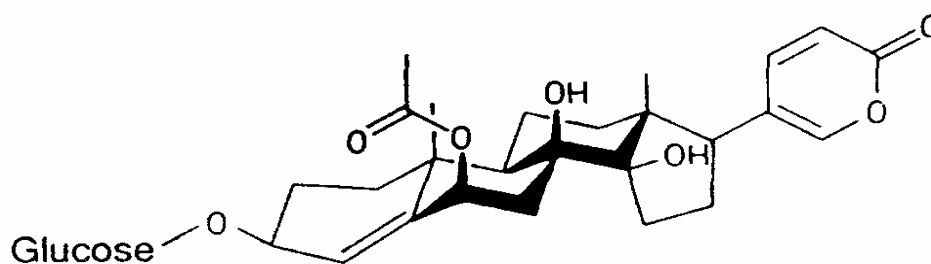


Abb. 2: Strukturformel von Scillirosid

Trivialname:	Scillirosid
Summenformel:	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₂
Molekulargewicht:	620,67
Farbe:	gelb
Zersetzungstemperatur:	168° - 170°C
Spezifische Drehung in methanolischer Lösung:	[α] ²⁰ D = - 59°

Löslichkeit:	leicht löslich in Alkohol, Ethylenglykol, Eisessig schwerer löslich in Wasser und Aceton unlöslich in Äther, Petrolether
Stabilität:	Unter Lagerbedingungen mit normaler Luftfeuchtigkeit (40 – 70% r.F.) zerfällt Scillirosid nur sehr langsam. Der Wirkstoffgehalt vermindert sich um weniger als 5% während vierjähriger Lagerung. Unter sauren Bedingungen (pH 3 und 6) findet kein signifikanter Abbau innerhalb von 14 Tagen statt. In Wasser mit pH-Wert ≥ 9 aufgelöst, wird Scillirosid zu 95% innerhalb eines Tages abgebaut (vollständig innerhalb von 4 Tagen).

2.2. Cyclodextrine

2.2.1. Allgemeines

Cyclodextrine sind ringförmige Oligosaccharide, die beim enzymatischen Abbau von Stärke durch bakterielle Transglycosylase gebildet werden. Sie sind schon lange als Hilfsstoffe bekannt. Erstmals wurden sie von A. Villiers 1891 im Zusammenhang mit Untersuchungen an *Bacillus amylobacter* in stärkehaltigen Kulturmedien erwähnt (10). Erst seit den siebziger Jahren werden Cyclodextrine infolge der enzymtechnologischen Weiterentwicklung im großtechnischen Maßstab hergestellt (11).

Heute stellen sie weit verbreitete Hilfsstoffe dar, die in verschiedenen Bereichen, wie der Nahrungsmittelindustrie, Kosmetik, Agrarindustrie sowie der Arzneimittel-Technologie Anwendung finden (12).

Cyclodextrine sind aufgrund ihrer Molekülstruktur befähigt, mit einer Vielzahl von festen und flüssigen Stoffen oder auch Molekülen mit hohem Dampfdruck Einschlussverbindungen zu bilden (13). Es ist möglich, oxidationsempfindliche Stoffe zu stabilisieren, flüchtige Substanzen vor Verdunstung zu schützen, unangenehmen Geruch oder Geschmack zu maskieren und eventuell auch Nebenwirkungen zu mindern (14).

Sie stellen aufgrund ihrer Fähigkeit, physikalisch-chemische Eigenschaften der Gastmoleküle zu verändern, wichtige Hilfsstoffe dar, die einige interessante Effekte aus pharmazeutischer Sicht erzielen können. Sie führen in vielen Fällen zu einer Verbesserung der Stabilität, einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit und einer damit verbundenen Erhöhung der Bioverfügbarkeit. Sie finden aber auch als Tablettierhilfsstoffe und in der Analytik zur Trennung von Enantiomeren sowie Positions- und Strukturisomeren verbreitet Anwendung (15,16).

2.2.2. Aufbau der Cyclodextrine

Cyclodextrine sind cyclische Oligomere, die aus einer unterschiedlichen Anzahl von $\alpha(1-4)$ verknüpften D(+) Glucopyranoseeinheiten zusammengesetzt sind. Die natürlich vorkommenden, als α , β und γ bezeichneten Cyclodextrine bestehen aus 6, 7 bzw. 8 Einheiten. Die einzelnen Glycopyranosebausteine sind so angeordnet, dass ein Cyclodextrinmolekül eine hohlkegelstumpfbartige Gestalt besitzt (17).

An der weiteren Öffnung befinden sich sekundäre OH-Gruppen, die durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken das Molekül stabilisieren, während an der gegenüberliegenden engeren Öffnung primäre OH-Gruppen liegen. Die innere Oberfläche ist durch H-Atome und glycosidische Sauerstoffbrücken leicht apolar (6).

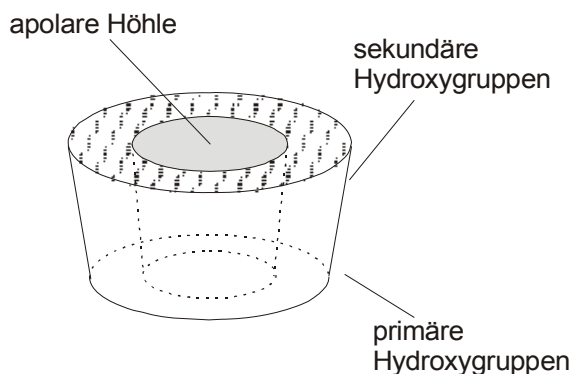


Abb.3.: Schematische Darstellung der Cyclodextrin-Geometrie

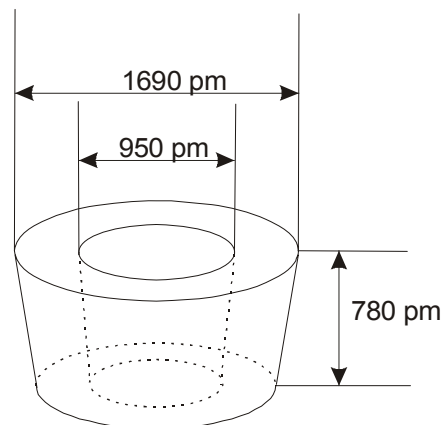


Abb.4.: Ungefähre Dimensionen von γ -Cyclodextrin

Cyclodextrine können sowohl in Lösung als auch in Form kristalliner Clathrate Inklusionsverbindungen mit einer Reihe von Molekülen bilden. Wechselwirkungen von hydrophoben Gruppen im Inneren des Cyclodextrinmoleküls und einem Gastmolekül bewirken meist eine Änderung der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der eingeschlossenen Verbindung (18).

Während im kristallinen Zustand Komplexe auch in nicht ganzzahligen Masseverhältnissen auftreten, bilden sich in Lösung bevorzugt 1:1, 1:2 oder 2:1 Komplexe zwischen Wirt- und Gastmolekül aus (19). In rein wässriger Lösung ist der apolare Innenraum von Cyclodextrinmolekülen durch Wassermoleküle besetzt. Diese energetisch ungünstige Situation einer polaren - apolaren Wechselwirkung ist die treibende Kraft, die zu einem Verdrängen der Wassermoleküle aus dem Cyclodextrin-Innenraum und einem gleichzeitigen Einbau der Gastkomponente führt. Um ein Gastmolekül einbauen zu können, muss seine Polarität geringer sein als die der Wassermoleküle, die verdrängt werden sollen.

Aus pharmazeutischer Sicht bedeutsam sind vor allem der, im Zuge einer Komplexierung beobachtbare Anstieg der Wasserlöslichkeit, sowie in einigen Fällen eine Erhöhung der chemischen Stabilität der eingeschlossenen Komponente (6).

2.2.3. Ausgangsmaterial

Für die praktischen Arbeiten wurde γ -Cyclodextrin der Fa. Wacker-Chemie GmbH., München, verwendet (GAMMA W 8; Pharm. Grade; Wassergehalt: 8,97%).

2.2.4. Chemische und physikalische Eigenschaften von γ -Cyclodextrin

Cyclomaltooctaose

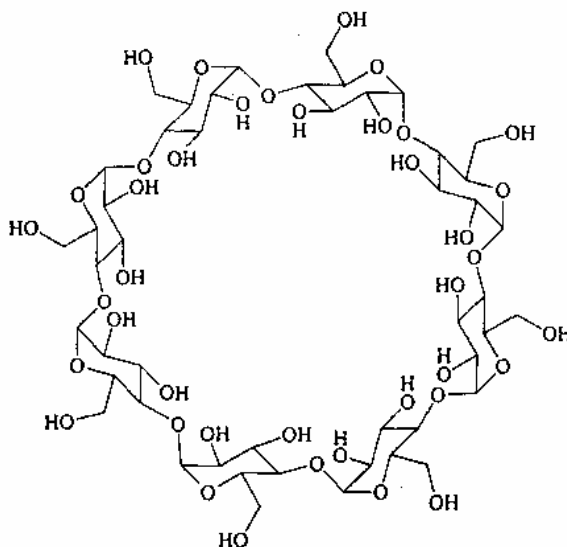


Abb. 5: Strukturformel von γ -CD

Trivialname:	γ -Cyclodextrin
Summenformel:	$(C_6H_{10}O_5)_8 \cdot H_2O$
Molmasse:	1297 g mol^{-1} (1439,7 mit 11% Kristallwasser)
Aussehen:	weiße Kristalle
Wasserlöslichkeit bei 25°C:	23,3g/100ml
Schmelzpunkt:	267°C
Spezifische Drehung in wässriger Lösung:	$[\alpha]_D^{20} = + 173^\circ \pm 4^\circ$

3. METHODEN

Im vorliegenden Kapitel 3 werden sowohl die Verfahren der Isolation von Scillirosid aus Bulbus Scillae, als auch die angeschlossenen Analysenverfahren beschrieben.

3.1. Isolierungsverfahren

3.1.1. Allgemeine Übersicht

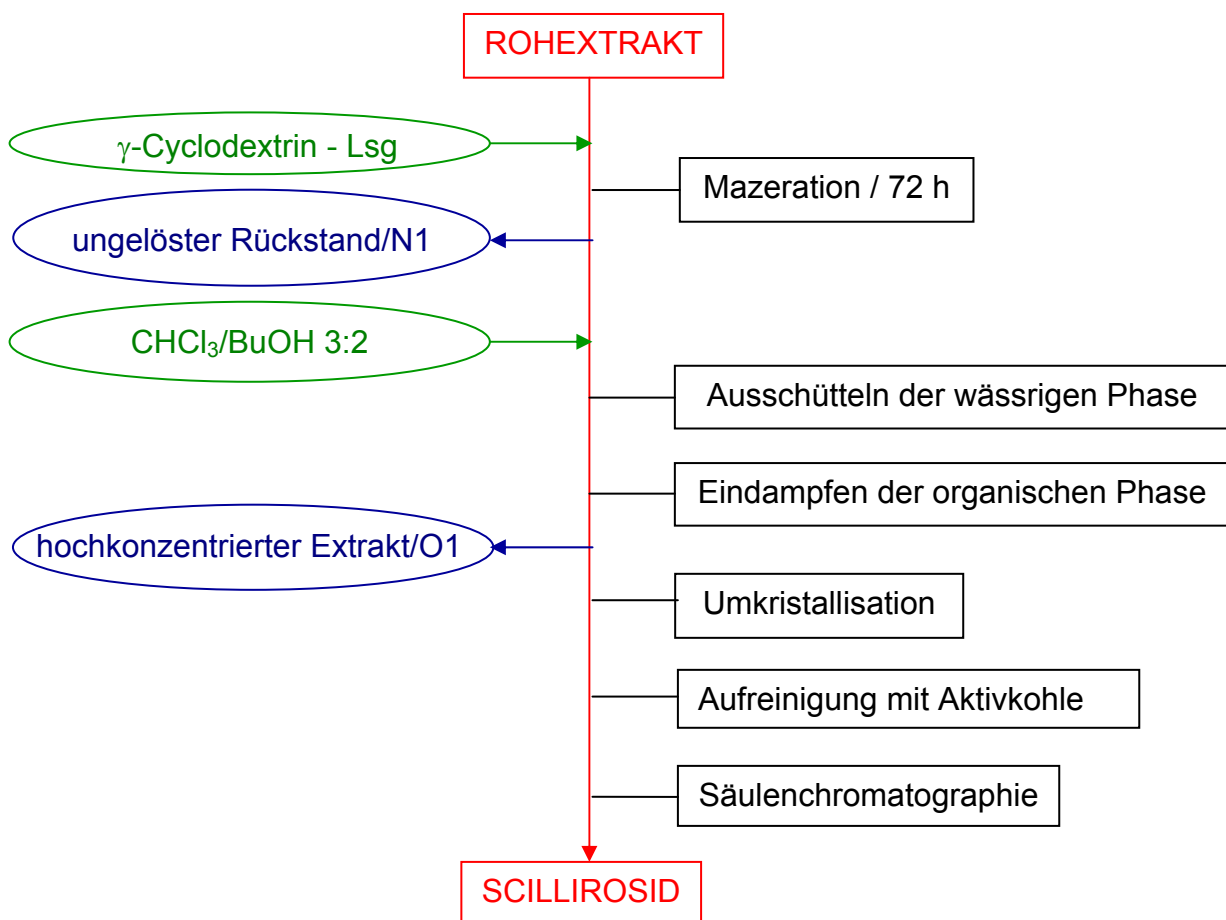


Abb. 6: Übersicht der Arbeitsschritte des Isolierungsverfahrens von Scillirosid aus Bulbus Scillae Rohextrakten

Die detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte erfolgt in den folgenden Kapiteln 3.1.2 bis 3.1.6

3.1.2. Mazeration

Zu Beginn wurde der Rohextrakt mit einer wässrigen γ -Cyclodextrin-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur 72 Stunden in einem verschlossenen Kolben gerührt. Die Abtrennung des Feststoffanteils (N1) erfolgte mittels Zentrifugieren bei einer Temperatur von 25-30°C und 10 000 U/min (RC5C Sorvall instruments, DuPont). Die überständige Lösung (W1) wurde mittels Vakuumpumpe von den Rückstandresten getrennt.

3.1.3. Extraktion

Die erhaltene Lösung wurde dreimal mit der gleichen Menge Chloroform-Butanol im Verhältnis 3:2 im Scheidetrichter ausgeschüttelt. In der wässrigen Phase (W2) fiel überschüssiges γ -Cyclodextrin (N2) aus, das mittels Vakuumfiltration abgetrennt wurde. Die mit Scillirosid angereicherte organische Phase (O1) wurde am Rotavapor (70°C Wasserbad, 30mbar Druck) zur Trockene gebracht.

3.1.4. Umkristallisation

Der trockene Scillirosid-hältige Rückstand wurde in möglichst kleinen Mengen Methanol gelöst, so dass eine hochkonzentrierte Lösung entstand. Diese wurde auf -20°C gekühlt und anschließend bis zum Auftreten einer Trübung tropfenweise mit bidestilliertem Wasser versetzt. Der Kristallisationsansatz wurde drei Tage bei 4°C gelagert. Die Kristalle wurden gesammelt, mittels Vakuumfiltration abgetrennt und mit auf ca. 8-15°C abgekühltem Aqua bidestillata gewaschen.

3.1.5. Aufreinigung mit Aktivkohle

Die gelblich gefärbten Kristalle wurden in Methanol gelöst und mit der gleichen Menge Aqua bidestillata versetzt. Nach Zusatz von Aktivkohle wurde die Lösung am Wasserbad aufgeköcht. Anschließend wurde die Aktivkohle über ein Blauband-Filter abfiltriert und das Filtrat am Rotavapor zur Trockene gebracht. Der trockene Rückstand wurde ein zweites Mal - wie oben beschrieben - umkristallisiert, das Produkt im Vakuumexsiccator getrocknet und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Konzentration des gewonnenen Stoffes wurde mittels HPLC bestimmt.

3.1.6. Säulenchromatographie

Die Reinigung von Scillirosid erfolgte mittels Säulenchromatographie (SC) über Kieselgel. Die Ermittlung der optimalen mobilen Phase erfolgte mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie (DC). Die Säule wurde 70 - 80cm lang mit 5cm Durchmesser gewählt und mit Kieselgel 60, Merck (Korngröße 0,063-0,2mm) selbst befüllt (Kap. 4.3.5). Als Laufmittel wurde Chloroform-Methanol-Wasser (75+15+2) verwendet. Fraktionen von je 15ml wurden alle 30 Minuten gesammelt und jede zehnte Fraktion mittels DC kontrolliert (Kap. 3.2.1). Die Fraktionen mit dem höchsten Substanzgehalt wurden vereinigt, eingeeengt und das so gewonnene Scillirosid durch erneute Umkristallisation (Kap. 3.1.4) gereinigt.

3.2. Analyseverfahren

3.2.1. Dünnschichtchromatographie

DC-Bedingungen:

<i>Stationäre Phase:</i>	Kieselgel 60 F ₂₅₄ -HPTLC-Fertigplatten für die NANO-DC, Merck mit 0,2mm Schichtdicke
<i>Mobile Phasen:</i>	A: Chloroform-Methanol-Wasser (80+18+2), Kammersättigung B: Ethylacetat-Methanol-Wasser (81+11+8), Kammersättigung
<i>Temperatur:</i>	21°C
<i>Auftragslösung:</i>	20mg Extrakt, gelöst in 1ml Chloroform – Methanol (1+1)
<i>Vergleichslösung:</i>	1mg Scillirosid, gelöst in 100µl Chloroform – Methanol (1+1)
<i>Auftragsmenge:</i>	40µl
<i>Laufhöhe:</i>	18cm
<i>Detektion:</i>	Besprühen der 10 min bei 105-110°C erhitzten Platte mit 50%iger ethanolischer Schwefelsäure

3.2.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Quantifizierung von Scillirosid mittels HPLC unter Verwendung eines internen Standards:

HPLC-Bedingungen:

<i>Gerät:</i>	Perkin Elmer Series 200 LC Pump
<i>Detektor:</i>	Perkin Elmer 235C Diode Array Detector
<i>Vorsäule:</i>	Lichrosorb RP 2, 10µm, 4 x 40mm, Fa. Pannosch, Wien
<i>Säule:</i>	Hypersil ODS, 3µm, 4 x 125mm, ÖFZ Seibersdorf
<i>Mobile Phase:</i>	Acetonitril + Wasser (20 + 80)
<i>Gradient:</i>	0,4%/min 10 min Purge mit 100% Acetonitril 15 min Equilibrierzeit

Durchflußrate: 1,0ml/min
Detektion: 300nm
Temperatur: Raumtemperatur

Da die qualitative Überprüfung mittels HPLC und DC ergab, dass beide Rohextrakte kein Proscillaridin A enthielten, konnte diese Substanz als interner Standard verwendet werden.

Die Reinheitsprüfung der Standardsubstanz mittels HPLC, bei der 10µl einer Lösung von 2mg Proscillaridin A in 500µl Methanol analysiert wurden, ergab eine Reinheit von 98%.

Bestimmung des Korrekturfaktors für Scillirosid:

Ausgehend von Stammlösungen mit 8mg/ml Scillirosid in Methanol bzw. 20mg/ml Proscillaridin A in Methanol wurden drei Eichlösungen hergestellt, die jeweils 3,33mg/ml Proscillaridin A als Standard und 1,33, 2,66 bzw. 3,99mg/ml Scillirosid enthielten. Aus den Chromatogrammen der Eichlösungen wurde der Korrekturfaktor (KF) für Scillirosid nach folgender Formel berechnet:

$$KF = \frac{EW_{Scr} * FI_{Stand}}{EW_{Stand} * FI_{Scr}}$$

FI.....bezeichnet die Peakflächen von Standard bzw. Scillirosid

EW.....bezeichnet die entsprechenden Einwaagen in mg/ml

Jede Eichlösung wurde zweimal analysiert.

Der mittlere Korrekturfaktor (KF) ergab 1,134.

Bestimmung des Scillirosid–Gehalts:

Probelösungen:

5,00mg des jeweiligen Extraktes wurden in 1,00ml Methanol gelöst und mit 100µl Proscillaridin–Stammlösung versetzt.

Von den Kristallisaten wurde jeweils 1mg in 200µl Methanol gelöst und 100µl Proscillaridin–Stammlösung zugefügt (Eichlösung: 200µl Scillirosid/100µl Proscillaridin).

Die Eichlösung wurde 1:20 verdünnt

Jeweils 10µl der Extraktionslösungen und 5µl der Kristallisationslösungen dienten zur HPLC-Analyse. Jede der Lösungen wurde zweimal analysiert.

Der Gehalt an Scillirosid (Scr %) berechnet sich nach:

$$Scr (\%) = \frac{EW_{Stand} * FI_{Scr} * KF}{EW_{Probe} * FI_{Stand}} * 100$$

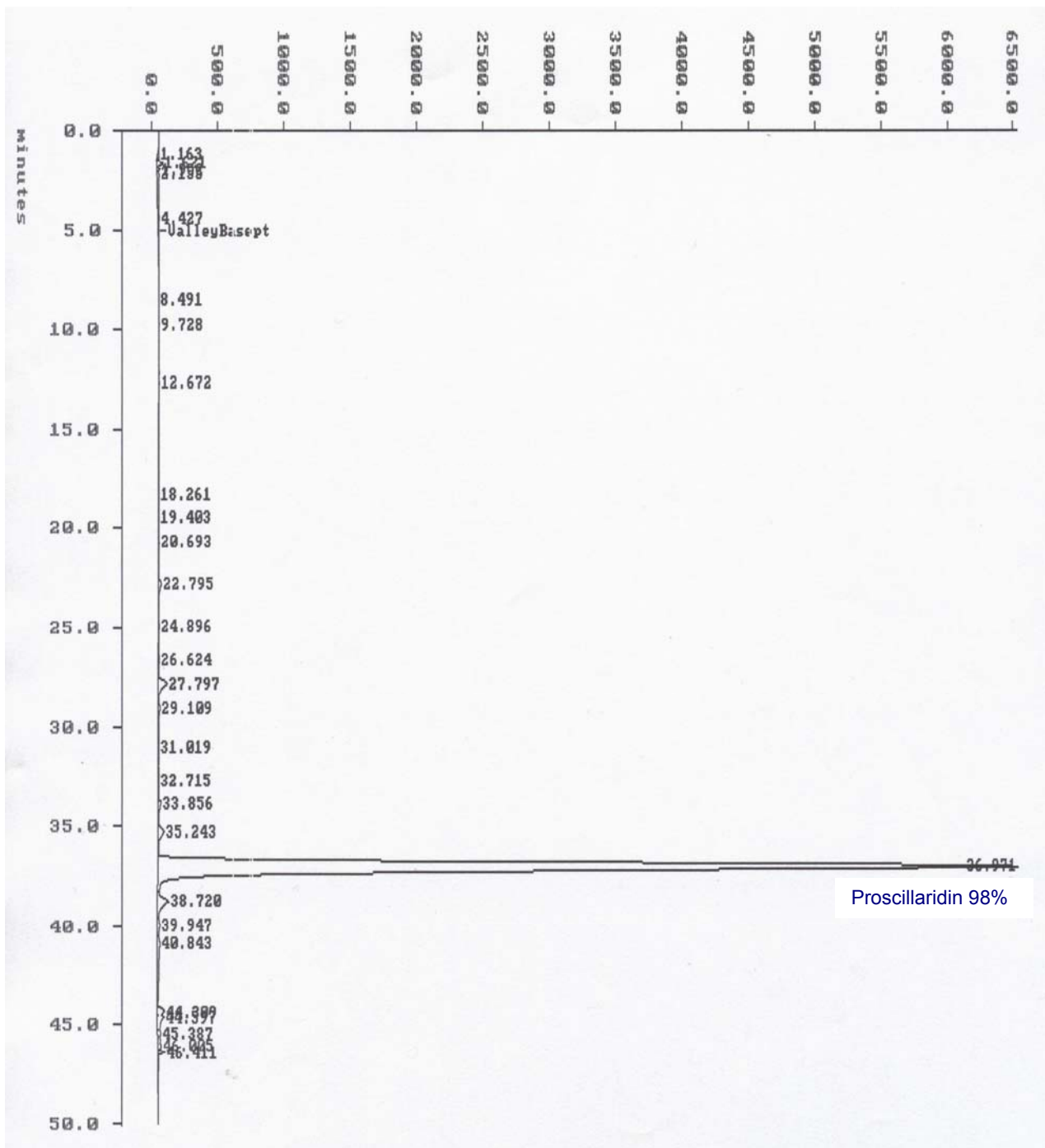


Abb. 7: Chromatogramm von Proscillaridin 98% (interner Standard)

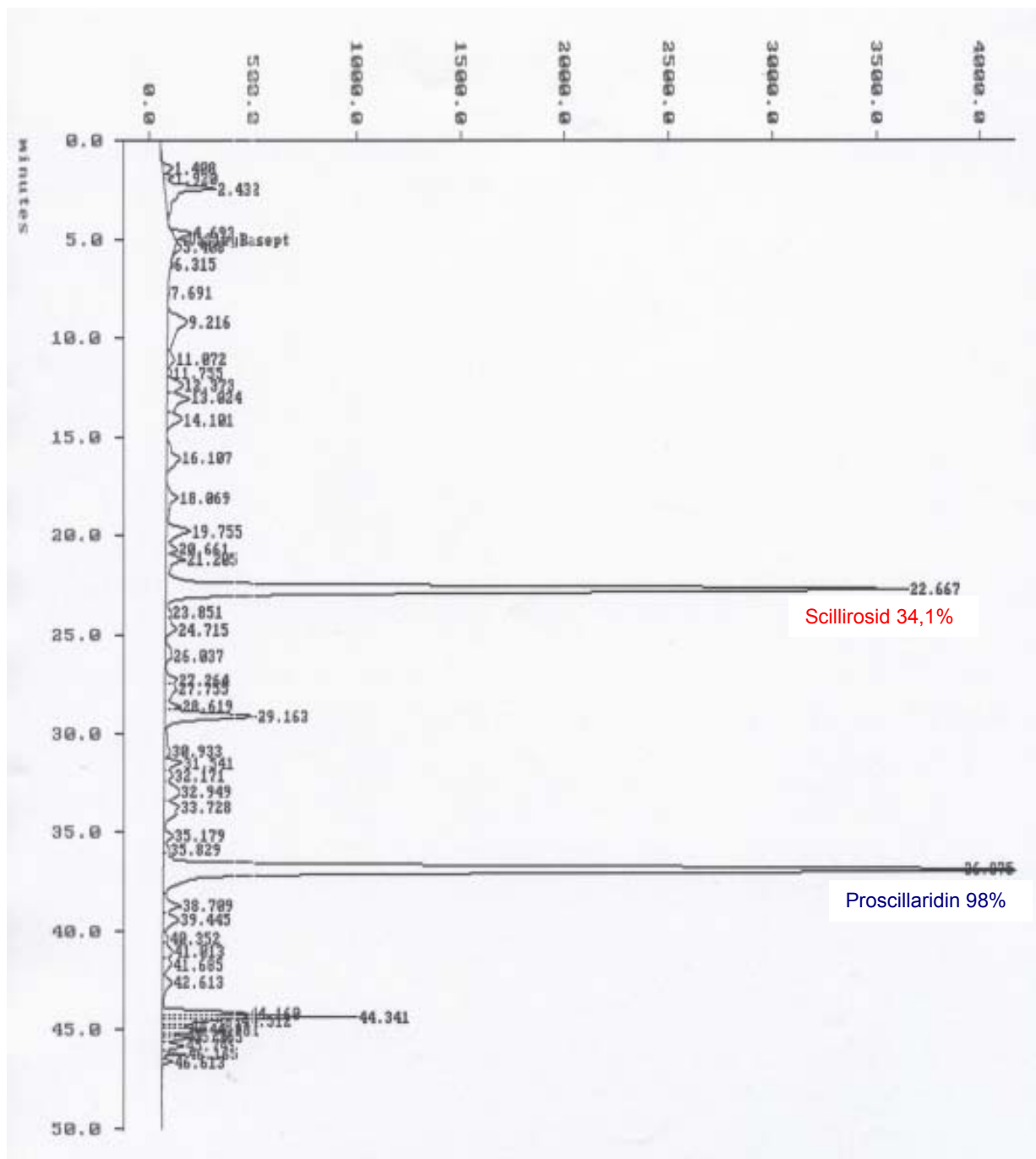


Abb. 8: Chromatogramm von Scillirosid-Rohextrakt 34,1% mit internem Standard

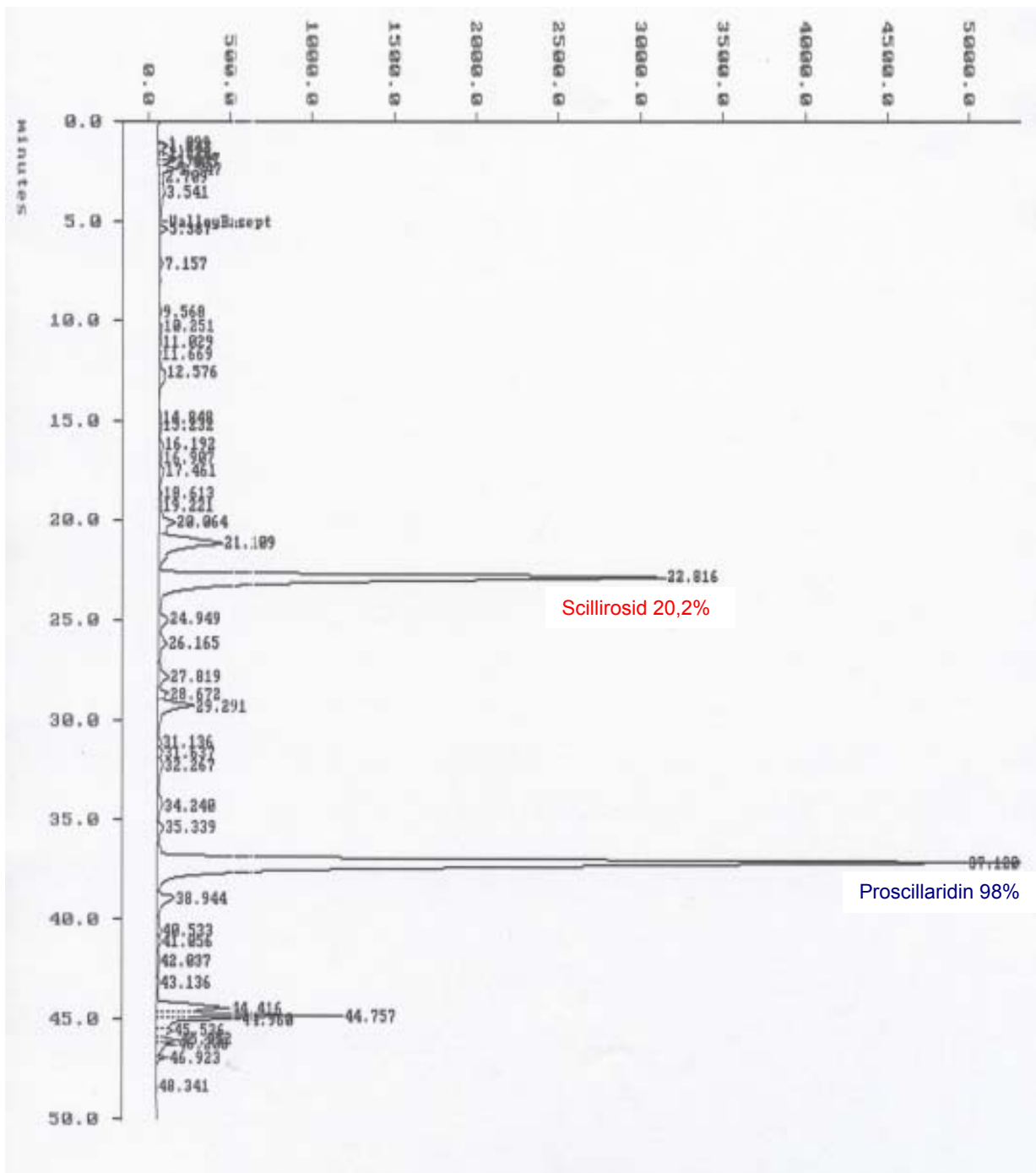


Abb. 9: Chromatogramm von Scillirosid-Rohextrakt 20,2% mit internem Standard

4. ISOLIERUNG VON SCILLIROSID AUS ROHEXTRAKTEN

4.1. Vorversuche mit 34,1% igem Scillirosid-Rohextrakt

4.1.1 Allgemeine Übersicht der Arbeitsschritte

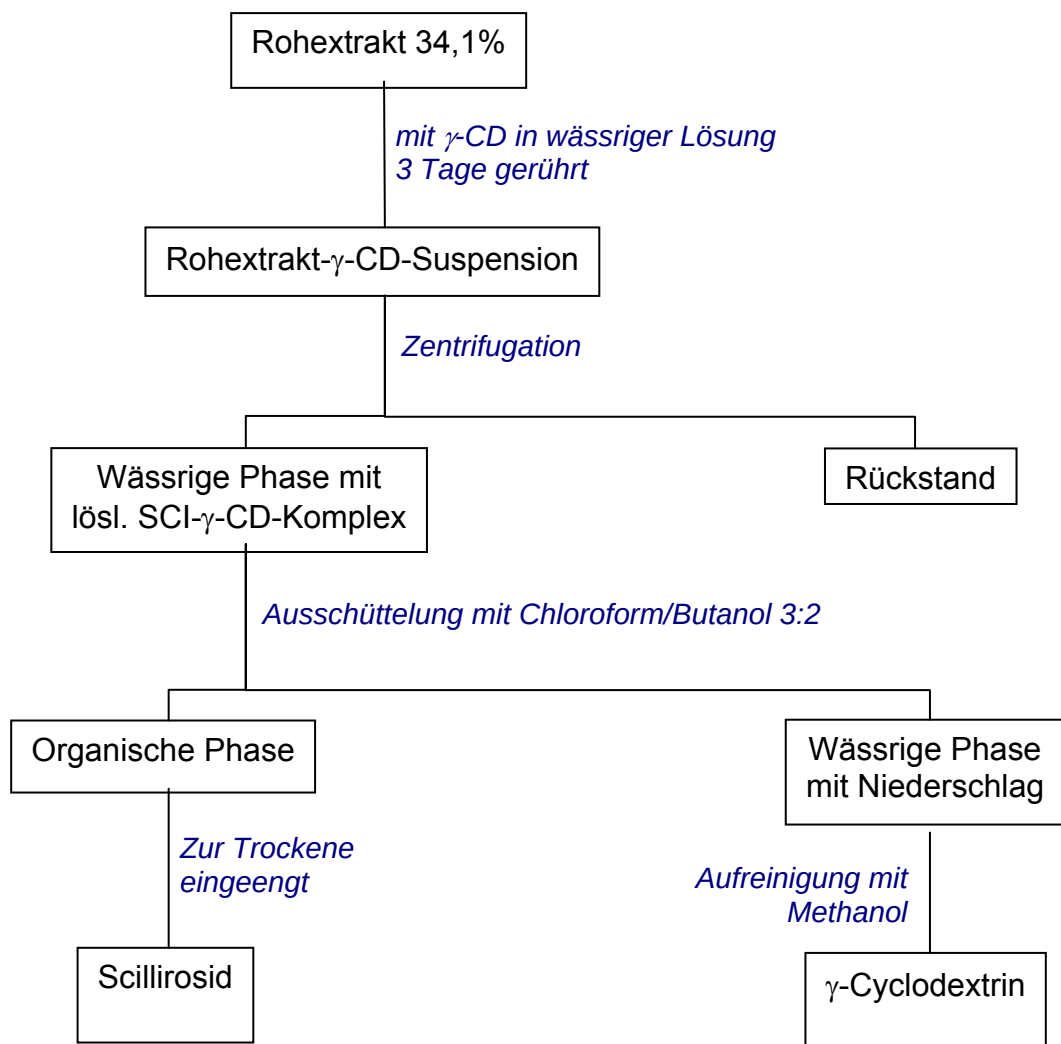


Abb. 10: Allgemeine Übersicht des Isolierungsverfahrens von Scillirosid aus 34,1%igem Rohextrakt mittels γ -Cyclodextrin

4.1.2. Kleinansätze

Um das optimale Verhältnis von Scillirosid-Rohextrakt zu γ -Cyclodextrin für das Isolierungsverfahren zu ermitteln, wurden fünf Probenansätze (I, II, III, IV, V) hergestellt. Sie unterschieden sich in der Molarität der wässrigen Lösung von γ -Cyclodextrin.

Probe	Scillirosid	γ -CD-Lösung	Molarität	γ -CD/50ml H ₂ O
I	1,82g	40,0ml	50mmol	3,418g
II	1,82g	40,0ml	75mmol	5,127g
III	1,82g	40,0ml	100mmol	6,836g
IV	1,82g	40,0ml	125mmol	8,545g
V	1,82g	40,0ml	150mmol	10,254g

Tab.2: Probenansätze

Mazeration:

Es wurden je 1,82g Scillirosid-Rohextrakt in einem 100ml Schliffenmeyerkolben mit 40,0ml unterschiedlich konzentrierter γ -Cyclodextrin Lösungen versetzt und 72 Stunden lang bei Raumtemperatur (21°C) mit einem Magnetrührer (250rpm) mazeriert. Durch Vakuumfiltration über ein Blaubandfilter (Schleicher & Schuell 589) wurde der unlösliche Rückstand (N1) abgetrennt und anschließend im Vakuumexsiccator getrocknet. Mit dem Mazerationsfiltrat (W1) wurde weitergearbeitet.

Extraktion:

20,0ml des Filtrats wurden in einem Scheidetrichter mit 40ml eines Gemisches aus Chloroform/1-Butanol (3+2) versetzt und kräftig ausgeschüttelt. Da ein Niederschlag entstand, wurde die organische Phase vorsichtig über ein Filter (S&S 595) aus dem Scheidetrichter abgelassen, wobei darauf geachtet wurde, dass der Niederschlag im Scheidetrichter blieb. In gleicher Weise wurde noch zweimal ausgeschüttelt.

Die vereinigte organische Phase (O1) wurde am Rotavapor (60°C Wasserbad, zuerst 300mbar, dann 30mbar Druck) zur Trockene gebracht und im Vakuumexsiccator über Nacht getrocknet. Der Niederschlag (N2) wurde aus der wässrigen Phase abfiltriert und im Vakuumexsiccator getrocknet. Die wässrige Phase (W2) wurde ebenfalls am Rotavapor (70°C Wasserbad, 30mbar) zur Trockene gebracht.

DC-Analytik der Produkte

Die gewonnenen Stoffe wurden, wie in Kap. 3.2.1 beschrieben, mittels Dünnschichtchromatographie charakterisiert.

Zuerst musste jedoch die Löslichkeit des Scillirosid-Rohextrakts in den verschiedenen Lösungsmitteln (LM) festgestellt werden. Es wurde jeweils ein 1mg Scillirosid-Rohextrakt in 1,0ml Lösungsmittel gelöst.

Lösungsversuche mit Scillirosid-Rohextrakt:

LM 1:	Chloroform	nicht löslich
LM 2:	Chloroform/Methanol (1+1)	gut löslich
LM 3:	Ether	nicht löslich
LM 4:	Ether/Isopropanol (1+1)	sehr schlecht löslich
LM 5:	Chloroform/1-Butanol (1+1)	löslich

Daraus ergab sich, dass das Lösungsmittel LM 2 die geeignete DC-Auftragslösung für den Scillirosid-Rohextrakt war.

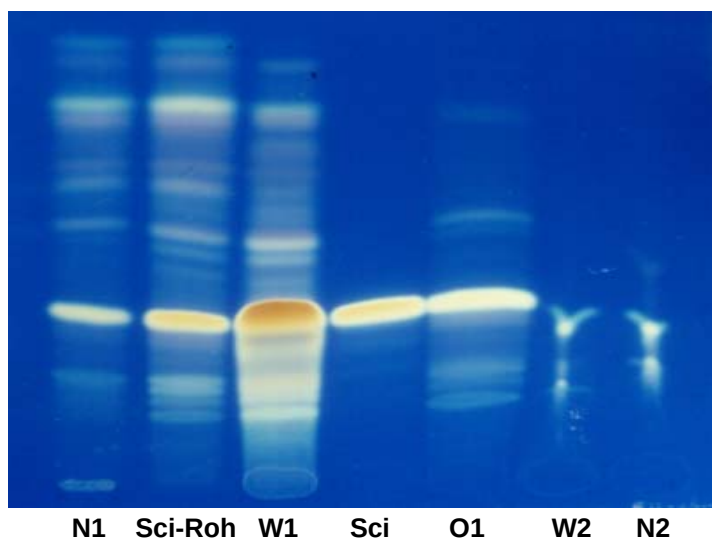
Die einzelnen Komponenten wurden laut Tabelle 3 gelöst:

Substanz	Menge	Lösungsmittel	Volumen
Scillirosid	1,3mg	Methanol	1,0ml
Scillirosid-Rohextrakt	3,6mg	Chloroform/Methanol (1+1)	1,0ml
wässrige Phase (W2)	1,3mg	Aqua destillata	1,0ml
organische Phase (O1)	1,3mg	Methanol	1,0ml
unlöslicher Rückstand (N1)	10,2mg	Chloroform/Methanol (1+1)	1,0ml
Niederschlag (N2)	10,2mg	Aqua destillata	1,0ml

Tab.3: Herstellung der DC-Auftragslösungen

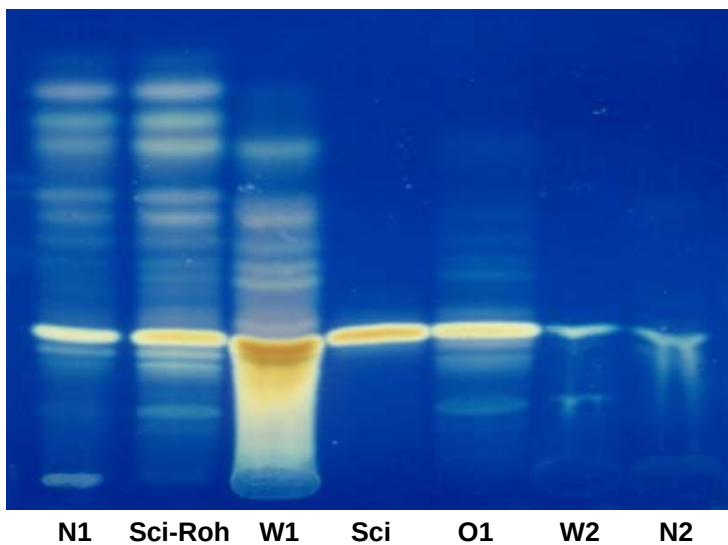
Das Mazerationsfiltrat (W1) wurde ebenfalls aufgetragen.

Beide Dünnschichtchromatogramme wurden bei Raumtemperatur und Kammer-sättigung durchgeführt. Die Auftragsmenge betrug 60µl (von W1 nur 30µl).



N1.....unlöslicher Rückstand
 Sci-Roh...Scillirosid Rohextrakt
 W1.....Mazerationsfiltrat
 Sci.....Scillirosid
 O1.....organische Phase
 W2.....wässrige Phase
 N2.....Niederschlag (ev. γ -CD)

Abb.11: DC Laufmittel A
 Chloroform-Methanol-Wasser (80+18+2)



N1.....unlöslicher Rückstand
 Sci-Roh...Scillirosid Rohextrakt
 W1.....Mazerationsfiltrat
 Sci.....Scillirosid
 O1.....organische Phase
 W2.....wässrige Phase
 N2.....Niederschlag (ev. γ -CD)

Abb.12: DC Laufmittel B
Ethylacetat-Methanol-Wasser (81+11+8)

DC-Auswertung:

Laufmittel B erwies sich aufgrund der besseren Auftrennung als vorteilhafter und wurde daher für alle folgenden Dünnschichtchromatogramme verwendet.

Ergebnisse der Kleinansätze:

Probe	N1	N2	O1	Scillirosid- gehalt in O1	Molverhältnis
I	1,9094g	0,4587g	0,4833g	45,53%	1 : 2,11
II	3,1039g	0,6747g	0,5823g	44,84%	1 : 3,16
III	4,5561g	0,9456g	0,5340g	50,10%	1 : 4,22
IV	5,2762g	1,2343g	0,4871g	54,27%	1 : 5,27
V	6,1899g	1,5990g	0,4206g	52,10%	1 : 6,33

Tab.4: Evaluierung der Vorversuche aus 34,1%igem Scillirosid-Rohextrakt

Der Scillirosidgehalt in O1 wurde mittels HPLC bestimmt (Kap. 3.2.2).

Ansatz III, bei dem das Molverhältnis Scillirosid-Rohextrakt: γ -Cyclodextrin 1:4 betrug, lieferte das beste Ergebnis bezogen auf Ausbeute und Reinheit und wurde daher bei allen weiteren Ansätzen verwendet.

4.1.3. Kristallisationsversuch direkt aus dem Rohextrakt

Scillirosid sollte kristallin gewonnen werden. In diesem Ansatz sollte ermittelt werden, ob sich das Scillirosid sofort nach Aufreinigung des Rohextrakts mit Aktivkohle kristallisieren lässt.

Dazu wurden 5,015g Scillirosid–Rohextrakt in 50ml Methanol gelöst, ebenso viel Aqua destillata hinzugefügt und anschließend mit Methanol p.A. auf 300ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde mit drei gehäuften Löffeln Aktivkohle versetzt, aufgeköcht und schließlich abfiltriert. Das daraus resultierende Filtrat wurde am Rotavapor zur Trockene gebracht.

Der trockene Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen und so eine hochkonzentrierte Lösung hergestellt. Anschließend wurde der auf – 20°C gekühlten Lösung tropfenweise destilliertes Wasser zugesetzt und der Kristallisationsansatz über Nacht bei 4°C gelagert.

Es bildeten sich keine Kristalle aber ein leichter grüner Niederschlag. Nun wurde der grünliche Anteil mittels Filtration abgetrennt. Nach neuerlichem Erwärmen entstand eine trübe weiß-gelbe Lösung.

Eine weitere Lagerung im Kühlschrank brachte keine Veränderung, daher wurde die Lösung am Rotavapor zur Trockene gebracht. Der nun entstandene Rückstand wurde in 100ml Methanol aufgenommen und anschließend dreimal mit einem Gemisch aus Chloroform/n-Butanol (3+2) ausgeschüttelt. Da sich eine Emulsion gebildet hatte, musste zentrifugiert und die organische Phase anschließend eingedampft werden. Der trockene Rückstand wurde wieder in möglichst wenig Methanol gelöst, tropfenweise mit destilliertem Wasser versetzt und über Nacht bei 4°C gelagert. Aber auch diesmal scheiterte der Kristallisierungsversuch.

Ergebnis dieser Untersuchung:

Der Versuch, Scillirosid nach Aufreinigung des Rohextrakts mit Aktivkohle zu kristallisieren, war nicht erfolgreich.

4.2. Vorversuche mit 20,2% igem Scillirosid-Rohextrakt

4.2.1. Allgemeine Übersicht der Arbeitsschritte

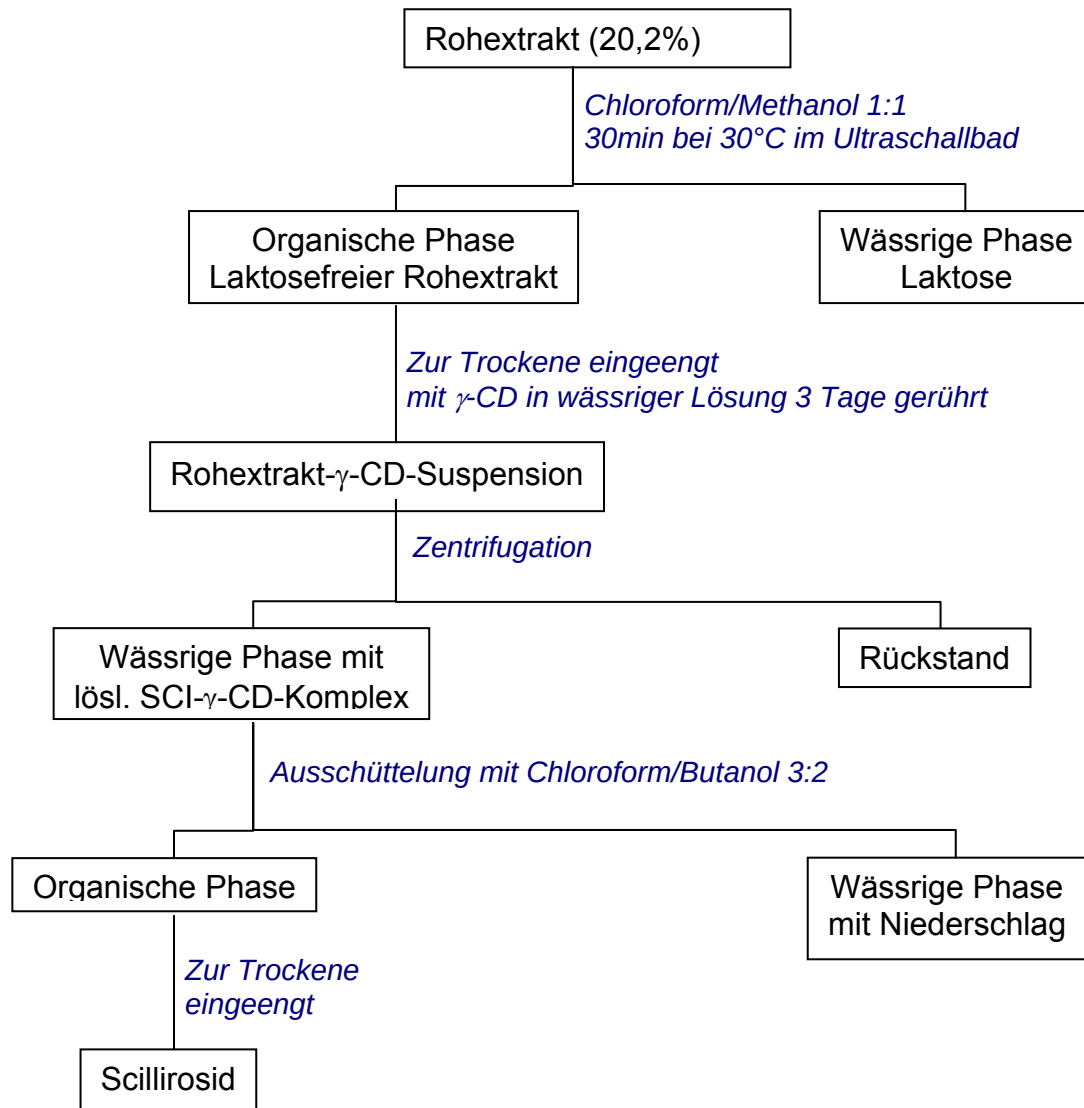


Abb.13: Allgemeine Übersicht des Isolierungsverfahrens von Scillirosid aus 20,2%igem Rohextrakt mittels γ -Cyclodextrin

4.2.2. Laktoseabtrennung

Um Laktose aus einem 20,2%igen Scillirosidextrakt abzutrennen, wurden 100ml Chloroform/Methanol (1+1) zugesetzt. Danach wurde 30 Minuten lang bei einer Temperatur von 30°C am Ultraschallbad homogenisiert und anschließend der unlösliche Anteil (brauner Schlamm), der unter anderem auch die Lactose enthielt, über ein Blaubandfilter abfiltriert.

Die klare organische Phase wurde am Rotavapor zur Trockene gebracht. Der dunkelbraune, trockene Rückstand wurde vorsichtig aus dem Kolben gekratzt und pulverisiert.

4.2.3. Kleinansätze

Nachdem der Probenansatz, bei dem das Molverhältnis Scillirosid-Rohextrakt: γ -Cyclodextrin 1:4 betrug, die beste Ausbeute an Scillirosid lieferte (Kap. 4.1.2., Tab. 4), wurden hier drei Probenansätze nach diesem Verhältnis berechnet.

Außerdem wurde die Überlegung berücksichtigt, dass der während der Mazeration gebildete Scillirosid-Rohextrakt - γ -Cyclodextrin - Komplex in größeren Mengen Wasser besser löslich sein könnte. Daher wurde bei Probe B die 2,5 fache und bei Probe C die 5 fache Menge Wasser verwendet.

Probenansätze:

Probe A	10g Scillirosid-Rohextrakt 20,2% mit 17,8g γ -Cyclodextrin/130,2ml Wasser
Probe B	10g Scillirosid-Rohextrakt 20,2% mit 17,8g γ -Cyclodextrin/325,5ml Wasser
Probe C	10g Scillirosid-Rohextrakt 20,2% mit 17,8g γ -Cyclodextrin/651ml Wasser

Das nach der Laktoseabtrennung erhaltene Pulver wurde mit der berechneten Menge wässriger γ -Cyclodextrin Lösung versetzt und die in Kap. 3.1. beschriebenen Arbeitsschritte des Isolierungsverfahrens wurden ausgeführt.

Außerdem wurde untersucht, ob ein Reinigungsschritt mit Aktivkohle noch vor Zugabe von γ -Cyclodextrin einen Vorteil bringt.

Probe D Reinigung mit Aktivkohle noch vor Zugabe von γ -Cyclodextrin
 10g Scillirosid-Rohextrakt 20,2% mit 17,8g γ -Cyclodextrin/130,2ml Wasser

Die organische Phase wurde nach Abtrennung der Laktose mit Aktivkohle versetzt, aufgekocht und abfiltriert. Die danach deutlich hellere Lösung wurde einrotiert, aus dem Kolben gekratzt, pulverisiert und dann wie die Ansätze A, B und C weiterverarbeitet.

Ergebnisse der Kleinansätze:

Probe	O1	Scillirosidgehalt in O1
A	2,734g	45,4%
B	3,780g	42,6%
C	4,185g	40,4%
D	1,351g	47,1%

Tab.5: Evaluierung der Vorversuche aus 20,2%igem Scillirosid-Rohextrakt

Der Komplezierungsansatz in einer größeren Menge wässriger CD-Lösung führte zu einer deutlich höheren Ausbeute, allerdings auf Kosten der Reinheit.

Im Gegensatz dazu erhielt man durch frühzeitigen Einsatz von Aktivkohle ein besonders reines Zwischenprodukt, es ging dabei aber eine große Menge Scillirosid verloren.

4.3. Großansatz

4.3.1. Mazeration

450g eines 34,1%igen Scillirosid-Rohextraktes wurden einer wässrigen γ -Cyclodextrin Lösung (1,98l einer 100mmolaren γ -CD Lösung) zugesetzt und bei Raumtemperatur 72 Stunden lang in einem verschlossenen Kolben gerührt. Anschließend wurde der unlösliche Rückstand in Plastikzentrifugenbechern 10 Minuten lang bei 25-30°C und 10 000 U/min abzentrifugiert (RC5C Sorvall instruments, DuPont). Die überständige Lösung wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt.

4.3.2. Extraktion

Die derart erhaltene Lösung wurde dreimal mit der gleichen Menge Chloroform/Butanol (3+2) ausgeschüttelt. In der wässrigen Phase fiel überschüssiges γ -Cyclodextrin aus, das mittels Vakuumfiltration abgetrennt wurde. Die mit Scillirosid angereicherte organische Phase wurde am Rotavapor zur Trockene gebracht.

Anschließend wurde eine Gehaltsbestimmung mittels HPLC durchgeführt (Abb. 14).

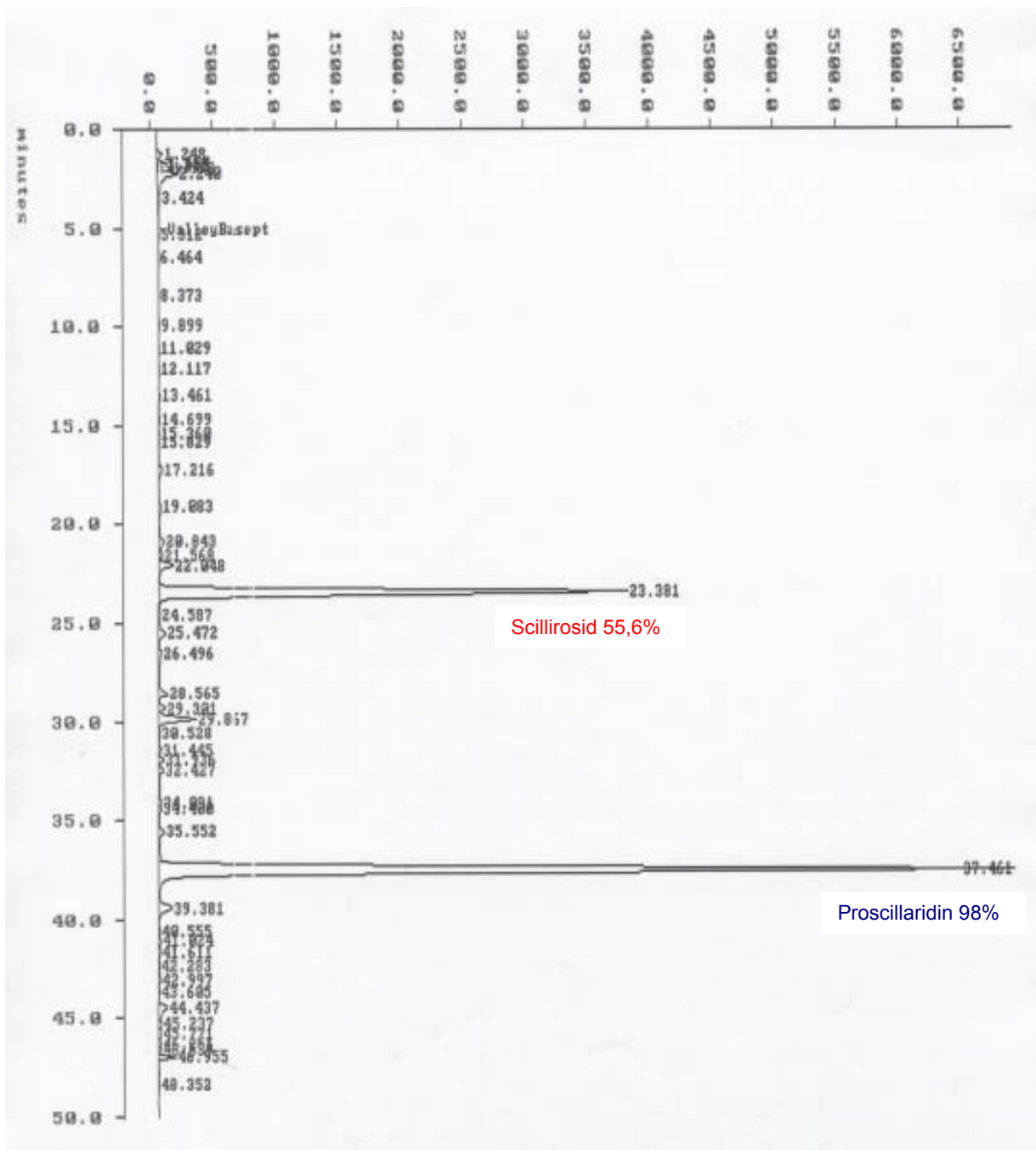


Abb.14: Chromatogramm zur Bestimmung der Scillirosidkonzentration des nach Extraktion entstandenen Zwischenproduktes mit internem Standard

4.3.3. Umkristallisation

Der trockene Rückstand wurde in möglichst kleinen Mengen Methanol gelöst, so dass eine hochkonzentrierte Lösung entstand und auf -20°C gekühlt wurde. Anschließend wurde bis zum Auftreten einer Trübung tropfenweise bidestilliertes Wasser zugesetzt und der Kristallisationsansatz drei Tage bei 4°C gelagert. Die Kristalle wurden gesammelt, mittels Vakuumfiltration abgetrennt und mit auf ca. 8-15°C abgekühltem Aqua bidestillata gewaschen.

4.3.4. Aufreinigung mit Aktivkohle

Die gelblich gefärbten Kristalle wurden in ca. 100ml Methanol gelöst und mit der gleichen Menge Aqua bidestillata versetzt. Nach Zusatz von Aktivkohle wurde die Lösung am Wasserbad aufgeköcht. Anschließend wurde die Aktivkohle über ein Blauband-Filter abfiltriert und das Filtrat am Rotavapor zur Trockene eingeeengt.

Der trockene Rückstand wurde ein zweites Mal - wie oben beschrieben - umkristallisiert, und das Produkt im Vakuumexsiccator getrocknet. Die Konzentration des gewonnenen Stoffes wurde mittels HPLC bestimmt.

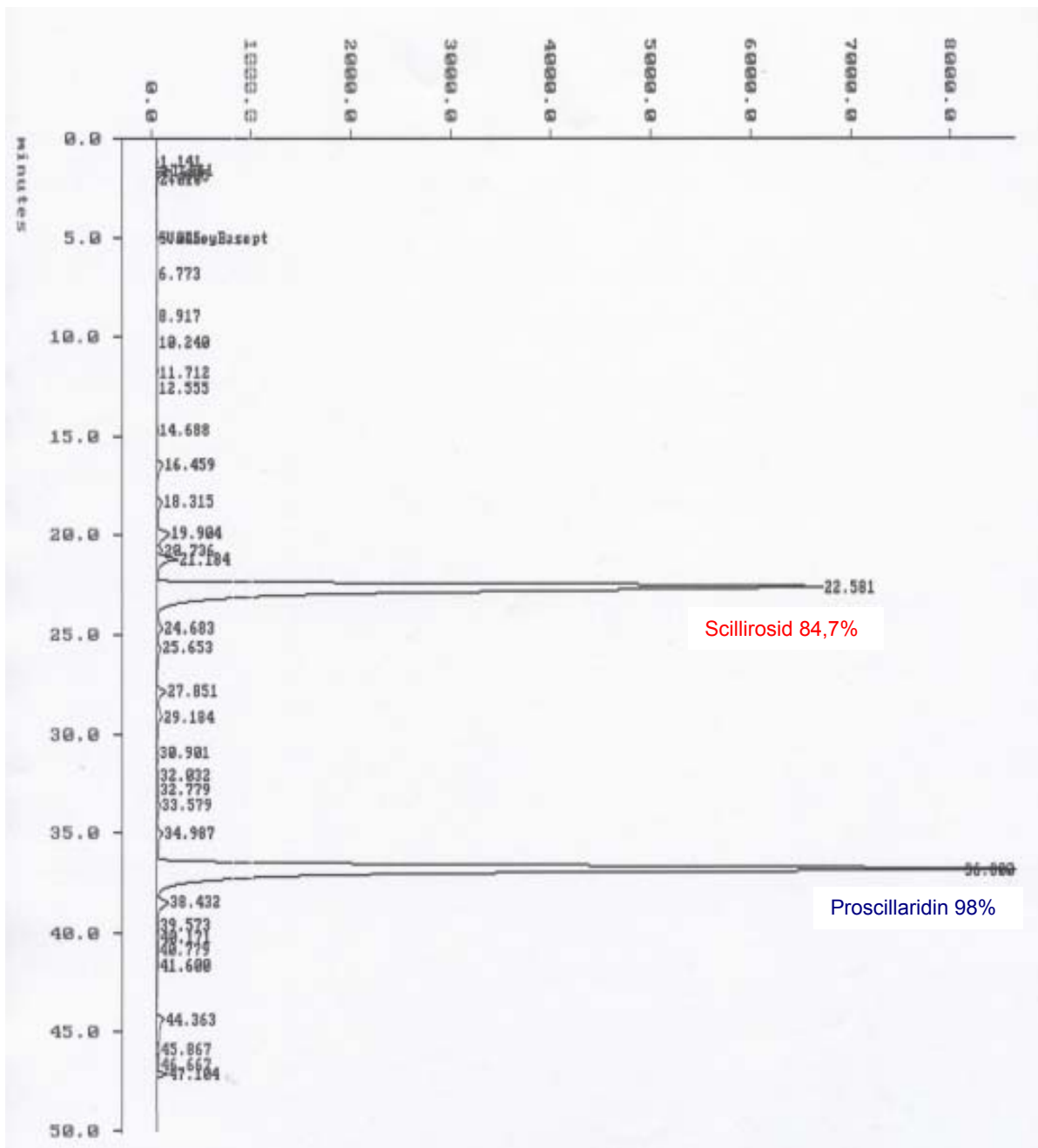


Abb.15: Chromatogramm zur Bestimmung der Scillirosidkonzentration des nach Aufreinigung mit Aktivkohle entstandenen Zwischenproduktes mit internem Standard

4.3.5. Säulenchromatographie

Für die endgültige Reinigung von Scillirosid bot sich die Säulenchromatographie (SC) über Kieselgel an. Die Ermittlung der optimalen mobilen Phase erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC).

Aufgrund der besseren Abtrennung der Begleitstoffe in Fließmittel A (siehe Kap. 3.2.1) wurde eine Chloroform-Methanol-Wasser-Mischung als mobile Phase für die Säulenchromatographie gewählt.

<i>Säule:</i>	70 - 80cm lang, 5cm Durchmesser
<i>Säulenfüllung:</i>	Kieselgel 60, Merck (Korngröße 0,063-0,2mm)
<i>Laufmittel:</i>	Chloroform-Methanol-Wasser (75+15+2), 2-3l
<i>Tropfgeschwindigkeit:</i>	15ml/30 min

Packen der Säule:

Für das Füllen der Säule wurden etwa 550g Kieselgel verwendet. Das Kieselgel wurde portionsweise im Laufmittel suspendiert und zügig in die Säule geleert. Um das Trockenlaufen zu vermeiden, wurde sie in mehreren Schritten befüllt und gepackt.

Vorbereiten und Auftragen der Probe:

10,0g des nach Aufreinigung mit Aktivkohle erhaltenen 84,7%igen Scillirosid-Zwischenproduktes wurden in 30ml Chloroform/Methanol (1+1) gelöst. Diese klare Lösung wurde tropfenweise mit einer Pasteurpipette auf 10g Kieselgel in einer Kristallisierschale aufgetropft, getrocknet und auf den Säulenkopf aufgetragen.

Fraktionierung:

Es wurden Fraktionen zu je 15ml alle 30 Minuten gesammelt und jede zehnte mittels DC kontrolliert (DC-Bedingungen siehe Kap. 3.2.1.; Laufmittel B). Die Sammelfraktionen wurden einrotiert und gewogen.

Die Sammelfraktionen waren wie folgt zusammengesetzt:

	Fraktionen	Ausbeute
Sammelfraktion 1	1-31	0,13g
Sammelfraktion 2	32-35	0,83g
Sammelfraktion 3	36-45	6,04g
Sammelfraktion 4	46-50	0,75g
Sammelfraktion 5	51-65	0,81g
Sammelfraktion 6	66-240	0,48g

Tab.6: Scillirosid-Sammelfraktionen und Ausbeuten

Reindarstellung von Scillirosid:

Das in den vereinigten Fraktionen 36-65 enthaltene Scillirosid wurde durch Umkristallisation aufgereinigt.

Die Sammelfraktionen 3, 4 und 5 wurden in wenig Methanol gelöst und am Wasserbad eingeeengt. Anschließend wurde portionsweise gekühltes, bidestilliertes Wasser bis zur leichten Trübung der Lösung zugegeben. Nach zweistündigem Kühlen wurden die Kristalle von der Mutterlauge über ein Schwarzbandfilter abgenutscht.

Es konnten 7,75g reines Scillirosid gewonnen werden.

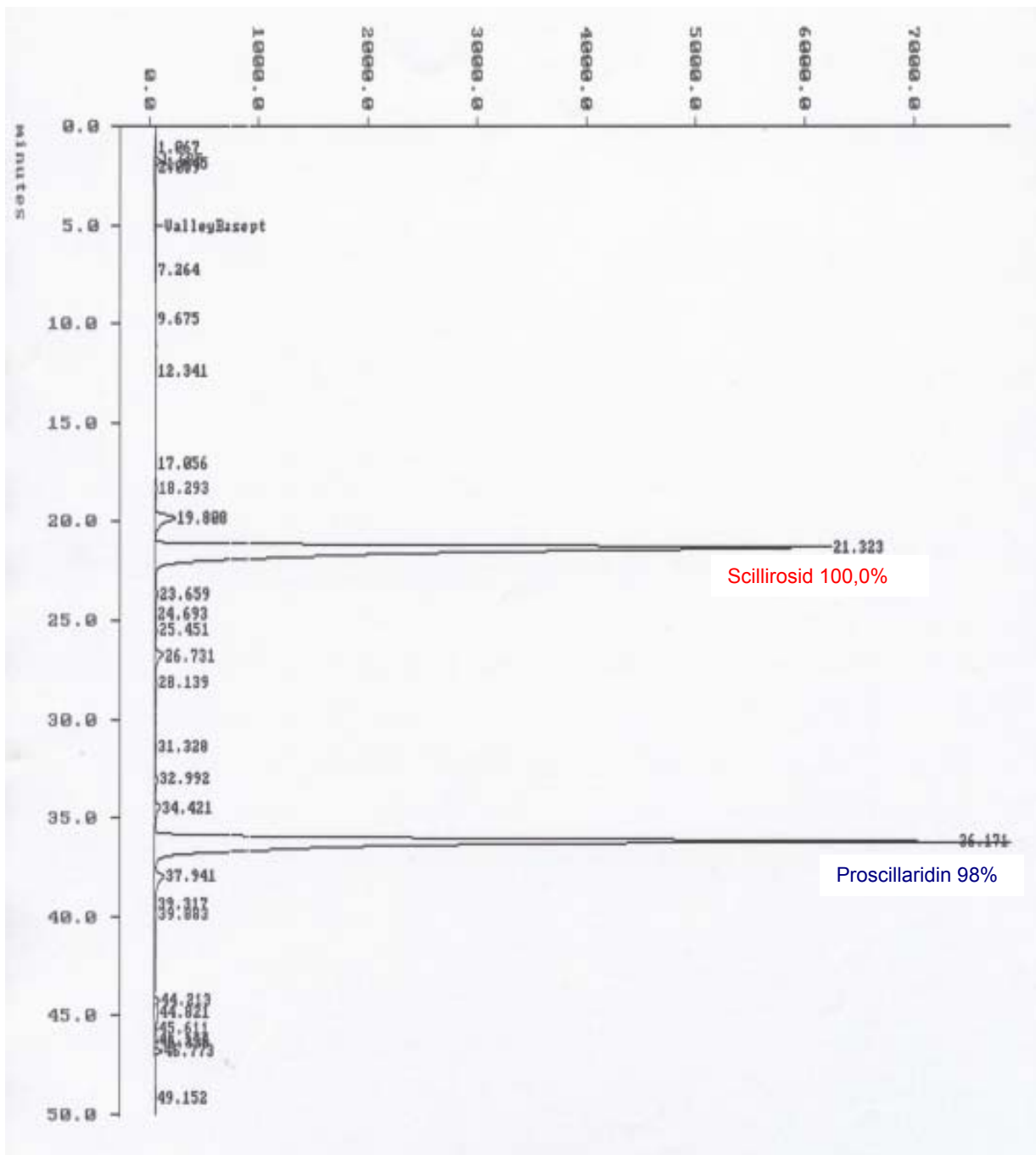


Abb.16: Chromatogramm zur Bestimmung der Scillirosidkonzentration des nach Säulen- chromatographie entstandenen Endproduktes mit internem Standard

4.3.6. Ergebnisse

Die Isolierung und Aufreinigung des Großansatzes brachte 84,3g eines 85%igen Scillirosids (46% der theoretischen Ausbeute). Nach Säulenchromatographie konnte eine Reinheit von 100% bei immerhin noch 36% Ausbeute erzielt werden.

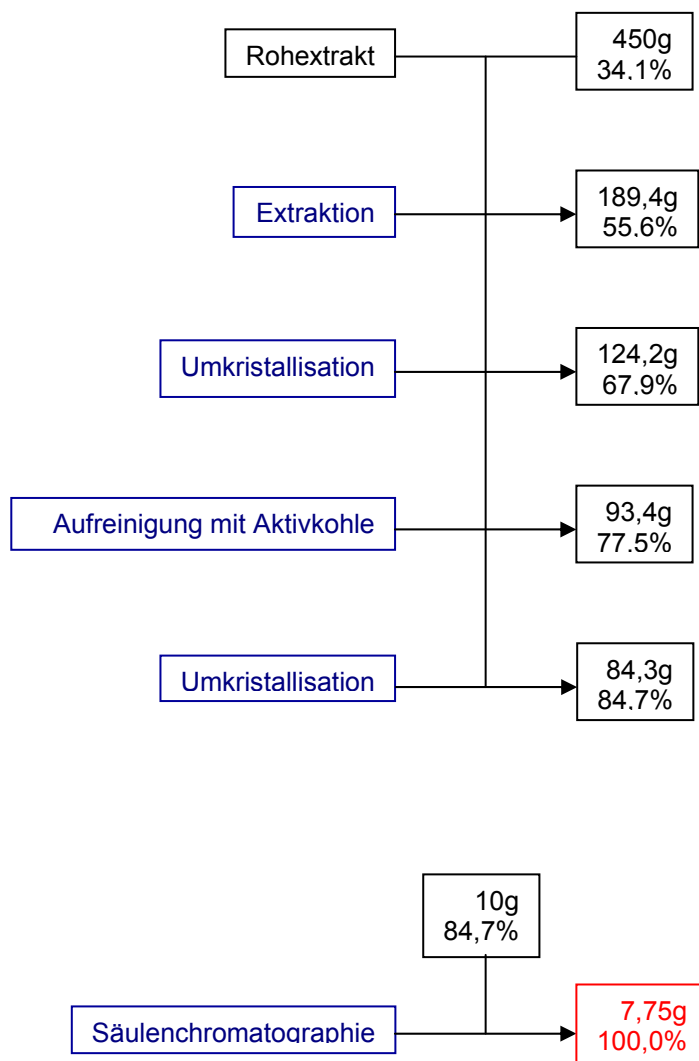


Abb.17: Schematische Darstellung der Ergebnisse des Großansatzes
%-Angaben beziehen sich auf Scillirosidkonzentration im Zwischenprodukt bzw. Endprodukt

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Diplomarbeit hatte zum Ziel, ein Isolierungsverfahren für möglichst reines, kristallines Scillirosid aus den vorhandenen Rohextrakten von *Bulbus Scillae* (34,1% bzw. 20,2%) zu entwickeln. Der Lösungsmittelverbrauch sollte im Unterschied zu bereits bekannten säulenchromatographischen Methoden geringer gehalten werden und mit einer Verkürzung der Arbeitszeit einhergehen.

Für diesen Zweck erschien der Einsatz von Cyclodextrinen viel versprechend. Es handelt sich dabei um Hilfsstoffe, die in den letzten Jahren aufgrund ihrer clathratbildenden Eigenschaften mit schlecht wasserlöslichen Substanzen zunehmend an Bedeutung gewannen. Die Komplexierung mit γ -Cyclodextrin erwies sich als besonders günstig, da die Hohlraumgröße dieses zyklischen Oligomers am ehesten mit Scillirosid korreliert und darüber hinaus γ -Cyclodextrin großtechnisch preislich günstig hergestellt werden kann.

In einem Vorversuch (Kap. 4.1.) zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von Scillirosid-Rohextrakt 34,1% zu γ -Cyclodextrin wurden fünf Probenansätze mit wässrigen γ -Cyclodextrin Lösungen verschiedener Molaritäten hergestellt. Der Ansatz, bei dem das Molverhältnis von Scillirosid-Rohextrakt zu γ -Cyclodextrin 1:4 betrug, lieferte das beste Ergebnis, wenn man Ausbeute und Reinheit als Kriterien heranzog. Ferner wurde versucht, Scillirosid-Rohextrakt sofort nach Aufreinigung mit Aktivkohle zu kristallisieren, was aber nicht möglich war.

In einem weiteren Vorversuch (Kap. 4.2.) wurde untersucht, ob der während der Mazeration gebildete Komplex aus Scillirosid-Rohextrakt 20,2% und γ -Cyclodextrin in größeren Mengen Wasser besser löslich sein könnte. Dieser Ansatz führte zu deutlich höheren Ausbeuten mit etwas geringerer Reinheit.

Außerdem wurde überprüft, ob ein Reinigungsschritt des Scillirosid-Rohextrakts 20,2% unter Verwendung von Aktivkohle noch vor Zugabe von γ -Cyclodextrin einen Vorteil bringt. Dieser Arbeitsschritt brachte ein besonders reines Zwischenprodukt (47,1% vs. maximal 45,4%), allerdings auf Kosten der Ausbeute (1,35g vs. mindestens 2,73g).

Ein großtechnischer Ansatz zur Gewinnung von reinem Scillirosid wurde mit 34,1%igem Scillirosid-Rohextrakt durchgeführt.

Der prozentuelle Scillirosid-Gehalt der Zwischen- und Endprodukte wurde mittels HPLC bestimmt.

Der Scillirosid-Rohextrakt wurde in einer γ -Cyclodextrin Lösung mazeriert, in einer Chloroform-Butanol-Lösung ausgeschüttelt und eingedampft. Nach der Extraktion betrug der Scillirosidgehalt 56%. Zur weiteren Aufreinigung wurde mit Methanol umkristallisiert, woraus eine 68%ige Scillirosidkonzentration resultierte, was einer theoretischen Ausbeute von 55% entsprach. Die anschließende Reinigung mit Aktivkohle und neuerliche Umkristallisation führte zu 85%igem Scillirosid (46% der theoretischen Ausbeute). Anschließend wurde das 85%ige Zwischenprodukt über eine Kieselgelsäule chromatographiert. Die Fraktionen mit der Hauptmenge Scillirosid wurden erneut umkristallisiert. Das Endprodukt erzielte eine Reinheit von 100% bei immerhin noch 36% Ausbeute.

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Muster der Roten Meerzwiebel <i>Urginea maritima</i> L. mit Blütenstand	7
Abb. 2: Strukturformel von Scillirosid	10
Abb. 3: Schematische Darstellung der Cyclodextrin-Geometrie	13
Abb. 4: Ungefähre Dimension von γ -Cyclodextrin	13
Abb. 5: Strukturformel von γ -CD	15
Abb. 6: Übersicht der Arbeitsschritte des Isolierungsverfahrens von Scillirosid aus Bulbus Scillae Rohextrakten	16
Abb. 7: Chromatogramm von Proscillaridin 98%(interner Standard)	22
Abb. 8: Chromatogramm von Scillirosid-Rohextrakt 34,1% mit internem Standard	23
Abb. 9: Chromatogramm von Scillirosid-Rohextrakt 20,2% mit internem Standard	24
Abb. 10: Allgemeine Übersicht des Isolierungsverfahrens von Scillirosid aus 34,1%igen Rohextrakt mittels γ -Cyclodextrin	25
Abb. 11: DC Laufmittel A	28
Abb. 12: DC Laufmittel B	29
Abb. 13: Allgemeine Übersicht des Isolierungsverfahrens von Scillirosid aus 20,2%igen Rohextrakt mittels γ -Cyclodextrin	31
Abb. 14: Chromatogramm zur Bestimmung der Scillirosidkonzentration des nach Extraktion entstandenen Zwischenproduktes mit internem Standard.....	35
Abb. 15: Chromatogramm zur Bestimmung der Scillirosidkonzentration des nach Auf- reinigung mit Aktivkohle entstandenen Zwischenproduktes mit internem Standard	37
Abb. 16: Chromatogramm zur Bestimmung der Scillirosidkonzentration des nach Säulenchromatographie entstandenen Endproduktes mit internem Standard ..	40
Abb. 17: Schematische Darstellung der Ergebnisse des Großansatzes	41

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: LD 50 in mg Scillirosid /kg Körpergewicht	8
Tab. 2: Probenansätze	26
Tab. 3: Herstellung der DC- Auftragslösungen	28
Tab. 4: Evaluierung der Vorversuche aus 34,1%igem Scillirosid-Rohextrakt	29
Tab. 5: Evaluierung der Vorversuche aus 20,2 %igem Scillirosid-Rohextrakt	33
Tab. 6: Scillirosid – Sammelfractionen und Ausbeuten	39

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 A. STOLL, *Experientia*, **10**, 282 (1954)
- 2 H. KIRCHNER, Über die herzwirksamen Inhaltsstoffe von *Urginea maritima* (L.) *Baker*, Dissertation, Wien 1978
- 3 G. BAUMGARTEN, Die herzwirksamen Glykoside, S. 70, Georg Thieme-Verlag, Leipzig 1963
- 4 H. S. GENTRY, A. J. VERBISCAR und T.F. BANIGAN, Red Squill (*Urginea maritima*, Liliaceae), *Economic Botany*, **41**, 2 (1987)
- 5 A. J. VERBISCAR, J. PATEL, T. F. BANIGAN und R. A. SCHATZ, Scilliroside and other Scilla Compounds in Red Squill, *J. Agric. Food. Chem.* , **34**, 6 (1986)
- 6 J. SZEJTLI, Cyclodextrines and their industrial uses, *Chemical Structure of Cyclodextrines*, **2**, 6, Editor Dominique Duchene, Editions de Sante, Paris 1987
- 7 L. KRENN, B. KOPP, M. FERNANDEZ, A. MACAL, U. MACHHERNDL, A. STEINLECHNER, E. A. ABOUTABL und W. KUBELKA, Bufadienolidgehalt und –zusammensetzung verschiedener Arten des *Urginea maritima* Aggregates: Änderungen während der Vegetationsperiode, *Sci. Pharm.* **64**, 511 (1996)
- 8 A. STOLL und J: RENZ, Über Scillirosid, ein gegen Nager spezifisch wirksames Gift der roten Meerzwiebel, *Helv. Chim. Acta* **25**, 43 (1942)
- 9 D. CHITTY, Control of rats and mice, Clarendon Press vol.**1**, p. 62-100, Oxford 1954

- 10 A. VILLIERS, Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique, *Compt. Rend. Acad. Sci.* **112**, 536 (1981)
- 11 J. SZEJTLI, T. Osa, *Comprehensive supramolecular chemistry*, Volume 3; Kap. **1**, 2-3, Cyclodextrins, 1st Edition, Exeter, UK 1996
- 12 W. SAENGER, *Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19**, 344 (1980)
- 13 J. SZEJTLI, T. Osa, *Comprehensive supramolecular chemistry*, Volume 3; Kap. **7**, 243, Cyclodextrins, 1st Edition, Exeter, UK 1996
- 14 K. FREUDENBERG, F. CRAMER, H. PLIENINGER, Inclusion Compounds of physiologically active organic compounds, *Ger. Pat.* 895, 769 (1953)
- 15 J. SZEJTLI, T. OSA, *Comprehensive supramolecular chemistry*, Volume 3; Kap. **14**, Cyclodextrins, 1st Edition, Exeter, UK 1996
- 16 J. SZEJTLI, E. BOLLA, *Die Stärke*, **32**, 386 (1980)
- 17 K. K. CHACKO, W. SAENGER, Topography of cyclodextrin inclusion complexes. 15. Crystal and molecular structure of the cyclohexaamylose-7.57 water complex, form III. Four- and six- membered circular hydrogen bonds, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1708 (1981)
- 18 K. H. FRÖMMING, *ÖAZ* **38**, 758 (1987)
- 19 W. L. HINZE, Applications of cyclodextrins in chromatographic separations and purification methods, *Sep. Purif. Meth.* **10**, 159 (1981)

LEBENS LAUF

Sylvia Christine Pollany (*geb. Seipelt*)

1.12.1971	geboren in Wien
1977 bis 1981	Besuch der Volksschule in Wien 18, Lacknergasse
1981 bis 1989	Besuch des BG 18, Klostergasse
Juni 1989	Maturaabschluss mit "Gutem Erfolg"
ab 10/1989	Beginn des Studiums der Pharmazie an der Universität Wien
11/1993 bis 12/1997	Teilzeitbeschäftigung als Pharmazeutische Helferin in der Friedrichsapotheke, Wien 17
Mai 1994	1. Diplomprüfung
3/1996 bis 6/1996	Praktische Arbeiten zur Diplomarbeit
3/1997 bis 9/1998	Tutoriumsauftrag am Institut für Pharmazeutische Technologie, <i>Übungen aus Galenik</i>
10/1998 bis 2/1999	Tutoriumsauftrag am Institut für Pharmazeutische Technologie, <i>Übungen aus Rezeptur</i>
1/1999 bis 12/2002	Außendiensttätigkeit bei Merck Sharp & Dohme GesmbH
1/2003 bis 8/2004	Produktmanagement bei Merck Sharp & Dohme GesmbH
Seit 9/2006	Außendiensttätigkeit bei UCB Pharma GesmbH