



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Analyse phenolischer Inhaltsstoffe von Drosera-
Arten mittels narrow bore HPLC

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag^a.pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Marija Crnogorac

Matrikel-Nummer: 0500142

Studienrichtung (lt. Studienblatt): Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: ao. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn

Wien, am 23.06.2010

Danksagung

Frau Univ. Prof. Verena Dirsch, dem Vorstand des Departments für Pharmakognosie, danke ich vielmals für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Bei Frau ao. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn möchte ich mich herzlich für die überaus nette Zusammenarbeit, die sehr gute Betreuung bei allen Problemstellungen und Fragen, wie auch für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Weiters danke ich Frau DI. Stanimira Krasteva, die mir mit fachlichen und anderen Ratschlägen immer hilfreich zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Janja und Ljubo Crnogorac, die mir das Studium ermöglichten. Für die liebevolle Unterstützung während aller Hochs und Tiefs möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Verlobten Goran bedanken.

Kurzfassung

Das Ziel der Diplomarbeit war es, die Flavonoidmuster der medizinisch verwendeten Drosera-Arten zu charakterisieren und zu vergleichen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine RP-HPLC-Methode für die Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe entwickelt. Als stationäre Phase wurde eine C18 Säule verwendet (150 mm x 2,1 mm, 3 µm Partikelgröße), um Zeit und Lösungsmittel einzusparen zu können. Die mobile Phase setzte sich aus Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) zusammen. Essigsäure diente als Modifier.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde Drogenmaterial von *Drosera rotundifolia*, *Drosera intermedia*, *Drosera anglica*, *Drosera madagascariensis* und *Drosera peltata* einer methanolischen Extraktion unterzogen. Die phenolischen Inhaltsstoffe konnten mittels Gradientenelution gut getrennt werden und wurden mittels internen Standards quantifiziert.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit der Methode und der Extraktion überprüft. Ebenso wurde die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit, wie auch das Quantifizierungs- und Detektionslimit der Flavonoide bestimmt.

Mit der entwickelten und optimierten HPLC-Methode können die phenolischen Inhaltsstoffe der medizinisch verwendeten Drosera-Arten sehr gut getrennt werden. Das System zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit aus. Analysezeit, Lösungsmittelverbrauch und Probenverbrauch konnten im Vergleich zu früheren HPLC-Methoden deutlich reduziert werden.

Abstract

The target of this thesis was the characterization and comparison of the flavonoids in therapeutically used *Drosera* species.

In the first part an RP-HPLC method for the analysis of the phenolic compounds has been developed. The analyses were performed on a C18 column (150 mm x 2,1 mm, 3 µm particle size) to reduce analyses time and amounts of solvent. The mobile phase consisted of water (eluent A) and acetonitrile (eluent B). Acetic acid was used as a modifier.

In the second part drug material of *Drosera rotundifolia*, *Drosera intermedia*, *Drosera anglica*, *Drosera madagascariensis* and *Drosera peltata* was extracted with methanol. A good separation of the phenolic compounds was achieved by gradient elution and the analytes were quantified by internal standardization.

In the last part the reproducibility of the method and extraction was determined. Furthermore the reproducibility of retention time as well as the limits of quantification and detection were determined.

The developed and optimized HPLC-method enables an excellent separation of the phenolic compounds in therapeutically used *Drosera* species. The system is characterized by high sensitivity and reproducibility. In comparison to previous HPLC-methods analyses time, amounts of solvent and sample could be reduced.

Abkürzungsverzeichnis

2-GH	2-Galloylhyperosid
A	Peakfläche
AcCN	Acetonitril
AT	Astragalin
D	Droge
DME.....	dimethylierte Ellagsäure
E.....	Ellagsäure
EW	Einwaage
Fl.....	Flavonoid
F _k	Standardkorrekturfaktor
GPE	Gossypetin
GPI	Gossipitrin
H	Hyperosid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IQ.....	Isoquercitrin
K.....	Kämpferol
M	Myricetin
M-3-O-G	Myricetin-3-O-galaktosid
MeOH	Methanol
MG.....	Molekulargewicht
MW.....	Mittelwert
Q.....	Quercetin
RSD	relative Standard Deviation
S.....	Saponarin
St.....	Standard
STABW.....	Standardabweichung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden.....	4
2.1 Pflanzenmaterial	4
2.2 Extraktion der Droge	4
2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie.....	6
3. Ergebnisse und Diskussion	7
3.1 Optimierung der HPLC-Methode	7
3.2 Bestimmung der Korrekturfaktoren.....	14
3.3 Flavonoidmuster und –gehalt der medizinisch verwendeten Drosera Arten.....	30
3.3.1 Flavonoide in <i>Drosera rotundifolia</i> L.....	30
3.3.2 Flavonoide in <i>Drosera intermedia</i> HAYNE	33
3.3.3 Flavonoide in <i>Drosera anglica</i> HUDSON	35
3.3.4 Flavonoide in <i>Drosera madagascariensis</i> DC.....	37
3.3.5 Flavonoide in <i>Drosera peltata</i> SMITH	39
3.3.6 Zusammenfassung	41
3.4 Reproduzierbarkeit der Methode	43
4. Zusammenfassung	49
5. Quellenangabe	53
6. Tabellen- und Abbildungsübersicht	55
6.1 Tabellenübersicht.....	55
6.2 Abbildungsübersicht.....	57
ANHANG: UV-Spektren der Phenole.....	59

1. Einleitung und Problemstellung

Die Gattung *Drosera* (dt. Sonnentau) gehört zu der Familie der Droseraceae und stellt mit ihren ca. 160 verschiedenen Arten die zweitgrößte Gruppe der karnivoren Pflanzen dar [1]. Ein charakteristisches morphologisches Merkmal der Gattung sind die langen, roten, sich bei Berührung einkrümmenden Stieldrüsen, die sich auf der Spreite der Laubblätter befinden. Diese scheiden ein klebriges Sekret ab und dienen zum Fang von Insekten [2].

Abbildung 1: *Drosera intermedia* [3]



Außer in den arktischen Gebieten und in der Wüste kommt die Pflanze kosmopolitisch vor, wobei in Australien die größte Artenvielfalt zu finden ist [4].

Die Gattung wird in die drei Untergattungen *Drosera*, *Ergaleium* und *Regiae* und in sieben Sektionen eingeteilt [1].

Früher wurde vorwiegend der rundblättrige Sonnentau *Drosera rotundifolia* L. arzneilich verwendet. Heute sind die einheimischen Arten *D. rotundifolia* L., *D. intermedia* HAYNE und *D. anglica* HUDSON unter strengen Naturschutz gestellt, da sie in Folge einer zunehmenden Einschränkung des Lebensraumes durch Trockenlegung von Moorlandschaften vom Aussterben bedroht sind [4]. Die

damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Drogenbeschaffung führten dazu, dass als Ersatzdroge unter der Bezeichnung „Herba Droserae longifoliae“ Pflanzenmaterial aus Afrika eingeführt wurde, welches überwiegend von *Drosera madagascariensis* DC. stammt; ein kleiner Teil stammt von *Drosera peltata* SMITH [5].

Lange Zeit wurde angenommen, dass 1,4-Naphthochinone, vorwiegend 7-Methyljuglon und Plumbagin für die Wirkung der Droge verantwortlich sind, da sie antiviral, antifungal und antibakteriell wirken [6]. Jedoch zeigten mehrere Studien, dass in Handelsmustern der Gehalt an 1,4-Naphthochinonen sehr gering ist [7].

Daneben enthalten viele Drosera-Arten Flavonoide, die pharmakologisch aktiv sind. In vitro Studien konnten einen antiinflammatorischen und spasmolytischen Effekt ethanolischer Extrakte von *D. madagascariensis* zeigen [6, 8]. Ebenso stellte sich die von Krahel [9] isolierte Verbindung CON, die lange Zeit aufgrund der spasmolytischen Wirkung als besonders therapierelevant angesehen wurde, als Quercetin heraus [10]. Dieses wirkt vor allem antitussiv und spasmolytisch. Weiters sind Anthocyanglykoside mit den Geninen Cyanidin und Pelargonidin und Ellagsäure in der Gattung zu finden [4].

Die Droge wird bei Erkrankungen der Atemwege, insbesondere bei Bronchitis und bei Krampf- und Reizhusten angewendet. Hierfür werden die getrockneten, im Blühstadium geernteten oberirdischen Teile verschiedener Sonnentau-Arten verarbeitet. In der Volksmedizin wird die Pflanze auch als Spasmolytikum, Diuretikum und bei Arteriosklerose angewendet [11].

Für die Gehaltsbestimmung der verschiedenen Drosera-Arten erwies sich neben der GC die HPLC als sehr gut geeignet [7]. Bereits in vorherigen Diplomarbeiten [12, 13] waren verschiedene HPLC-Methoden zur Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe der Pflanze entwickelt worden.

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es eine geeignete HPLC-Methode zu entwickeln, die eine Trennung der Flavonoide an einer kurzen Säule mit dem Vorteil Lösungsmittel einzusparen und die Analysezeit zu verkürzen, erlaubt.

Um eine exakte Quantifizierung des Flavonoidgehalts durchführen zu können, musste eine Kalibrierung für die wichtigsten Inhaltsstoffe erfolgen. Im Anschluss sollte die Reproduzierbarkeit der Methode und der Extraktion für die medizinisch verwendeten Arten *D. rotundifolia* L., *D. intermedia* HAYNE, *D. anglica* HUDSON, *D. madagascariensis* DC. und *D. peltata* SMITH geprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgendes Drogenmaterial aus dem Handel für die Untersuchungen verwendet:

- *Drosera madagascariensis* (D.mad.): Mag. Pharm.R.Kottas, Heldenberg&Sohn, Wien, KL-6906
- *Drosera peltata* (D.pelt.): Paul Müggenberg GmbH&Co, Alveslohe, Erntejahr 1994
- *Drosera intermedia* (D.int.): Alfred Galke GmbH, Gittelde, 0452/01
- *Drosera rotundifolia* (D.rotund.): Dr. B. Galambosi – Forschungszentrum Mikkeli, Erntejahr 2000 (Anbauversuch Finnland)
- *Drosera anglica* (D.angl.): Dr. B. Galambosi – Forschungszentrum Mikkeli, Erntejahr 2000

2.2 Extraktion der Droge

Die Extraktion der Droge wurde folgendermaßen durchgeführt:

0,200g der getrockneten oberirdischen Teile der Pflanze werden pulverisiert (Sieb Nr.4) und mit 40ml MeOH in einem Rundkolben unter Rückfluss bei 70°C am Wasserbad für 30 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wird in einen 50ml Messkolben filtriert, 3 mal mit je 3ml MeOH nachgespült und anschließend auf 50ml mit MeOH aufgefüllt.

Als interner Standard wurde vor den Analysen Saponarin in einer Konzentration von 0,218 mg/ml zugesetzt.

Für die Analyse der Extrakte wurden in Abhängigkeit vom Gehalt an phenolischen Komponenten folgende Analyselösungen hergestellt:

<i>Drosera madagascariensis</i> :	480µl Extrakt + 20µl Saponarinlösung
<i>Drosera peltata</i> :	350µl Extrakt + 50µl Saponarinlösung
<i>Drosera intermedia</i> :	300µl Extrakt + 100µl Saponarinlösung
<i>Drosera rotundifolia</i> :	200µl Extrakt + 100µl Saponarinlösung
<i>Drosera anglica</i> :	200µl Extrakt + 100µl Saponarinlösung

Zur Untersuchung mittels HPLC wurden pro Lauf 3µl injiziert.

Für die Methodenentwicklung wurden folgende Konzentrationen der Extraktlösungen verwendet:

<i>Drosera madagascariensis</i> :	0,60 mg/ml MeOH
<i>Drosera peltata</i> :	0,57 mg/ml MeOH
<i>Drosera intermedia</i> :	0,50 mg/ml MeOH
<i>Drosera rotundifolia</i> :	0,60 mg/ml MeOH
<i>Drosera anglica</i> :	0,53 mg/ml MeOH

Pro Lauf wurden 3µl in das System injiziert.

2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

<u>System:</u>	SHIMADZU
<u>Pumpe:</u>	LC-20AD
<u>Detektor:</u>	SPD M20A diode array detector, Wavelength: 220-500 nm
<u>Column oven:</u>	CTO-20AC
<u>Auto injector:</u>	SIL-20AC
<u>Stationäre Phase:</u>	Dionex Acclaim® 120 C18, 150 mm × 2,1 mm × 3 µm
<u>Mobile Phase:</u>	A) H ₂ O mit CH ₃ COOH auf pH 2,8 eingestellt B) Acetonitril (AcCN) mit 8ml CH ₃ COOH/l
<u>Gradient:</u>	Beginn mit 12% Phase B und 88% Phase A für 8 Minuten bis zur Minute 15,1 Steigerung auf 20,5% B bis zur Minute 32 Steigerung auf 43,9% B
<u>Purge:</u>	5 Minuten mit 100% B
<u>Equilibrierung:</u>	5 Minuten mit 12% B
<u>Flussrate:</u>	0,45 ml/min
<u>Injektionsvolumen:</u>	3µl
<u>Temperatur:</u>	25°C
<u>Detektion:</u>	360 nm
<u>Interner Standard:</u>	Saponarin

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Optimierung der HPLC-Methode

In einer Diplomarbeit [12] war bereits ein HPLC-Verfahren für die Analyse und Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe aus *Drosera*-Arten entwickelt worden. Dabei war eine Hypersil BDS – C18 Säule (4 x 250 mm, 5 µm) als stationäre Phase verwendet worden.

Ausgehend von dieser Methode sollte eine HPLC – Methode für eine 150 mm lange Säule mit 3 µm Partikelgröße entwickelt werden, um die Analysezeit zu verkürzen und Lösungsmittel und Kosten einzusparen. Ebenso sollte eine schnelle und präzise Analyse der Flavonoide erfolgen.

Als stationäre Phase wurde eine Dionex C18 Säule (2,1 x 150 mm, 3 µm) verwendet. Die mobile Phase setzte sich aus zwei Komponenten zusammen, wobei Eluent A aus Wasser bestand, welches mit Essigsäure auf einen pH - Wert von 2,8 eingestellt wurde. Als Eluent B wurde AcCN verwendet, welches mit 8ml Essigsäure/l angesäuert wurde.

Ein Trockenextrakt von *Drosera rotundifolia* diene als Probe zur Methodenentwicklung (siehe Kap. 2.2, Seite 5), da es die wichtigsten Phenole medizinisch verwendeter Arten enthielt. Es sollte sichergestellt werden, dass Komponenten mit ähnlicher Polarität (Flavonoidgenine) nicht koeluieren und phenolische Inhaltsstoffe mit geringer Polarität mit dem System erfasst werden können, ohne eine erhebliche Verlängerung der Analysedauer in Kauf nehmen zu müssen.

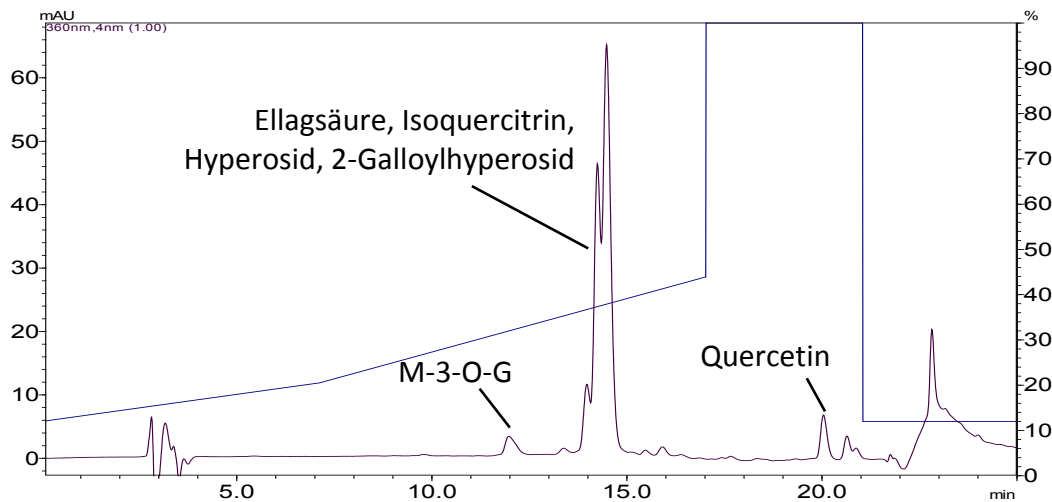
Ausgehend vom ursprünglichen HPLC-Verfahren wurden das Gradientenprofil und die Flussrate an die kurze Säule angepasst. Daraus ergab sich folgender Gradientenverlauf: 0-7,1 Minuten von 12% auf 20,5% B, innerhalb der nächsten 10 Minuten eine weitere Steigerung auf 43,9% B. Die Analyse wurde bei 30°C mit

einer Flussrate von 0,35 ml/min durchgeführt und es wurden 5 µl Analyselösung in das System injiziert.

Abbildung 2: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von *Drosera rotundifolia*

Mobile Phase: A) Wasser mit Essigsäure auf pH 2,8; B) AcCN mit 8 ml Essigsäure/l

Gradient: Beginn bei 12% B, in 7,1 min auf 20,5% B, in 10 min auf 43,9% B



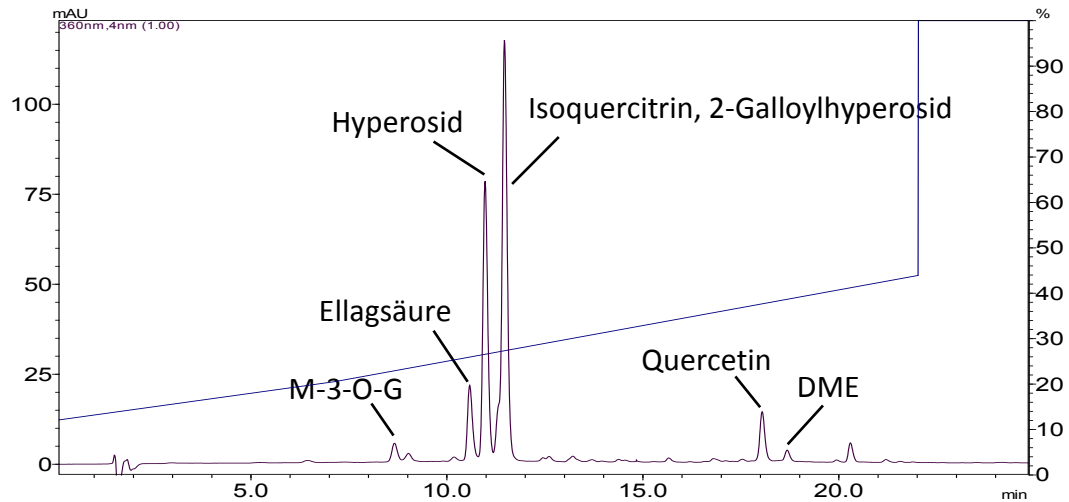
Der verwendete Gradient brachte nicht den gewünschten Erfolg, da sich die Peaks von Ellagsäure, Isoquercitrin, Hyperosid und 2-Galloylhyperosid überlagerten (siehe Abb. 2, Seite 8).

Durch eine langsamere Steigerung der organischen Fließmittelkomponente sollten die Peaks voneinander getrennt werden. Daher wurde der zweite Teil des Gradienten um 5 Minuten verlängert. Ebenso konnte das Injektionsvolumen auf 3 µl reduziert werden, da das System über eine hohe Empfindlichkeit verfügte. Mit der Veränderung der Parameter konnte eine bessere Auftrennung der einzelnen Komponenten erzielt werden, jedoch eluierten 2-Galloylhyperosid und Isoquercitrin gemeinsamen (siehe Abb. 3, Seite 9).

Abbildung 3: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von *Drosera rotundifolia*

Mobile Phase: A) Wasser mit Essigsäure auf pH 2,8; B) AcCN mit 8 ml Essigsäure/l

Gradient: Beginn bei 12% B, in 7,1 min auf 20,5% B, in 15 min auf 43,9% B



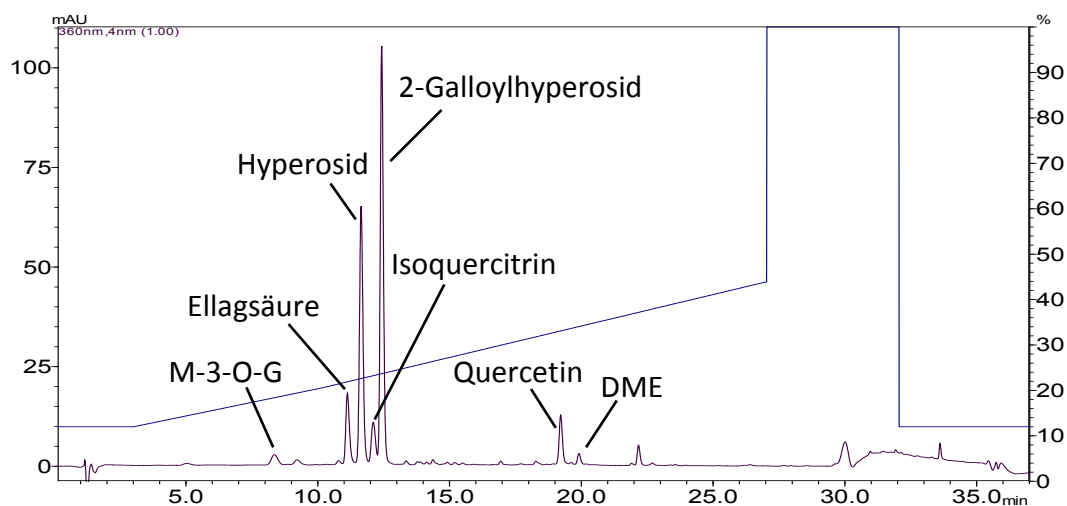
Die Elutionsgeschwindigkeit ist in der HPLC für die Qualität der Trennung von großer Bedeutung [14]. Daher wurde für eine weitere Optimierung der Trennleistung, und um den Peak von 2-Galloylhyperosid und Isoquercitrin trennen zu können, die Flussrate auf 0,45 ml/min erhöht. Zusätzlich wurde zu Beginn ein isokratischer Schritt von 3 Minuten eingefügt und der zweite Teil des Gradienten um weitere 2 Minuten verlängert. Daraus ergab sich folgender Gradient: Beginn bei 12% B für 3 Minuten, innerhalb von 7,1 Minuten auf 20,5 % B, innerhalb von 17 Minuten auf 43,9 % B.

Somit konnte die Trennung der phenolischen Inhaltsstoffe weiter verbessert werden, jedoch waren Isoquercitrin und 2-Galloylhyperosid nicht optimal voneinander getrennt (siehe Abb. 4, Seite 10).

Abbildung 4: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von *Drosera rotundifolia*

Mobile Phase: A) Wasser mit Essigsäure auf pH 2,8; B) AcCN mit 8 ml Essigsäure/l

Gradient: Beginn bei 12% B für 3 min, innerhalb von 7,1 min auf 20,5% B, in 17 min auf 43,9% B



Da eine Temperaturerhöhung der stationären Phase vielfach zu einer Verbesserung der Trennung und einer Verkürzung der Retentionszeiten führt [14], wurde die Analyse bei 35°C durchgeführt. Jedoch kam es dabei zu einer Verschlechterung der Trennleistung.

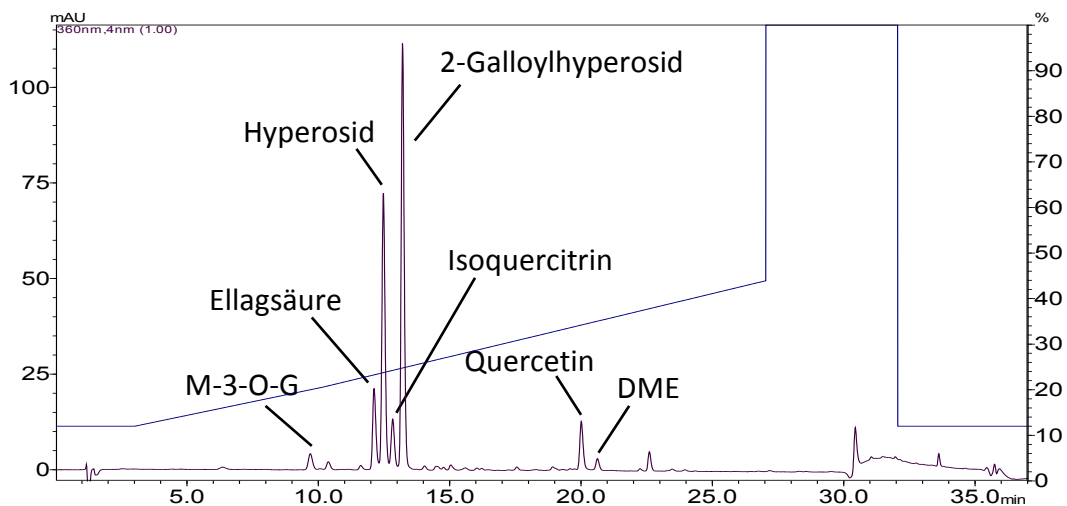
Deshalb wurde die Säule auf 25°C temperiert, um so eine Optimierung der Methode erzielen zu können. Das Ergebnis der Analyse zeigte eine Verbesserung der Trennleistung (siehe Abb. 5, Seite 11). Eine weitere Reduktion der Temperatur auf 22°C brachte jedoch keinen Erfolg. Daher erfolgten alle weiteren Analysen bei 25°C.

Abbildung 5: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von *Drosera rotundifolia*

Mobile Phase: A) Wasser mit Essigsäure auf pH 2,8; B) AcCN mit 8 ml Essigsäure/l

Gradient: Beginn mit 12% B für 3 min, innerhalb von 7,1 min auf 20,5% B, in 17 min auf 43,9% B

Temperatur: 25°C



Um eine weitere Verbesserung der Trennung erreichen zu können, wurde der isokratische Schritt zu Beginn der Methode auf 8 Minuten verlängert. Hieraus ergab sich folgender Gradientenverlauf: 8 Minuten bei 12% B, innerhalb von 7,1 Minuten auf 20,5% B, innerhalb von 17 Minuten auf 43,9% B.

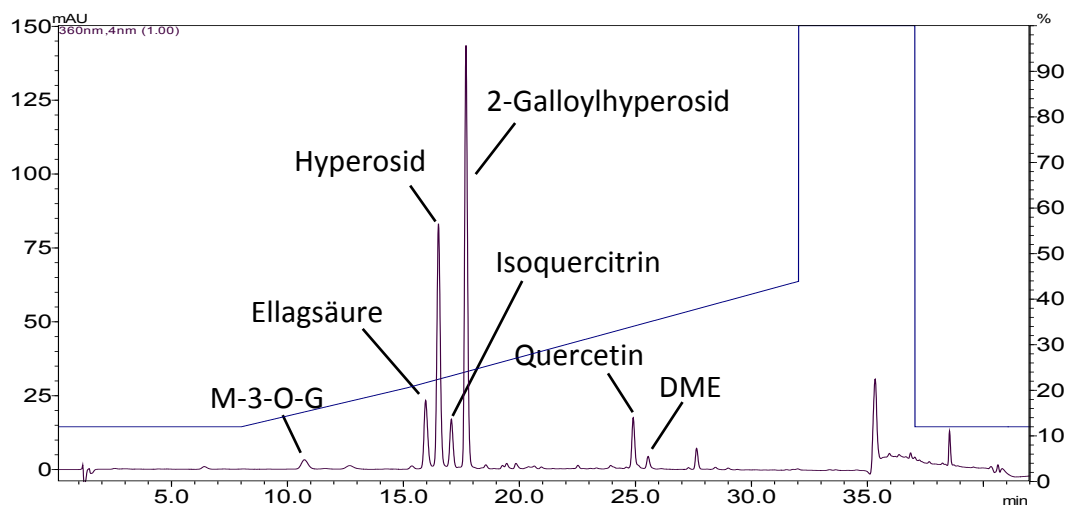
Diese Methode stellte sich als optimal für die Trennung der phenolischen Inhaltsstoffe von *Drosera rotundifolia* (siehe Abb. 6, Seite 12) heraus. Für alle Komponenten konnte eine sehr zufriedenstellende Auflösung erreicht werden.

Abbildung 6: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von *Drosera rotundifolia*

Mobile Phase: A) Wasser mit Essigsäure auf pH 2,8; B) AcCN mit 8 ml Essigsäure/l

Gradient: Beginn mit 12% B für 8 min, innerhalb von 7,1 min auf 20,5% B, in 17 min auf 43,9% B

Temperatur: 25°C



Mit Hilfe der neu entwickelten und optimierten HPLC-Methode wurden ethanolische Trockenextrakte (siehe Kap. 2.2, Seite 5) der anderen medizinischen verwendeten *Drosera*-Arten untersucht. Da die Ergebnisse der Analysen zeigten, dass auch die phenolischen Komponenten von *Drosera madagascariensis*, *Drosera peltata*, *Drosera anglica* und *Drosera intermedia* für eine präzise Quantifizierung ausreichend getrennt erfasst wurden, konnte die Methode beibehalten werden.

Die Quantifizierung sollte mittels internen Standards erfolgen. Saponarin, welches nicht genuin in der Pflanze vorkommt, wurde auf seine Eignung getestet. Da es mit keinem der Flavonoide zu einer Überlagerung kam und die Analysezeit nicht verlängert wurde, konnte es als interner Standard verwendet werden. Weitere Vorteile dieser Substanz sind die mit dem Analyten vergleichbaren

physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie seine kommerzielle Verfügbarkeit.

Mit dem adaptierten System konnte die Analysezeit im Vergleich zur früheren Methode [12] um circa 15 Minuten verkürzt werden. Es kam zu einer Lösungsmittelersparnis von 66% und der Probenverbrauch konnte um 70% reduziert werden.

3.2 Bestimmung der Korrekturfaktoren

Zur Gehaltsbestimmung der phenolischen Inhaltsstoffe der Drosera-Arten musste eine Kalibrierung für die Phenole durchgeführt werden.

Hierfür wurden von den in Herba Droserae bereits bekannten wichtigsten Substanzen Myricitrin, Hyperosid, Gossypetin, Quercetin, Myricetin, Gossipitrin, Kämpferol, Isoquercitrin, Ellagsäure und Astragalin Stammlösungen hergestellt, mit deren Hilfe Eichlösungen unterschiedlicher Konzentrationen zusammengestellt werden konnten.

Als interner Standard wurde Saponarin verwendet, welches sich bereits in einer vorherigen Diplomarbeit als geeignet erwiesen hatte [12]. Diese Substanz wurde allen Eichlösungen in gleicher Konzentration zugegeben.

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden die Substanzen mit 1 ml DMSO angelöst und anschließend mit MeOH auf 5 ml aufgefüllt.

Ellagsäure wurde in 5 ml DMSO gelöst.

Tabelle 1: Konzentrationen der Stammlösungen in mg/ml

Phenol	EW in mg/ml
Saponarin	0,218
Myricitrin	0,214
Hyperosid	0,184
Gossypetin	0,212
Quercetin	0,204
Myricetin	0,210
Gossipitrin	0,230
Kämpferol	0,224
Isoquercitrin	0,232
Ellagsäure	0,202
Astragalin	0,212

Für die Bestimmung der jeweiligen Korrekturfaktoren wurden 3 Serien (Serie A, Serie B und Serie C) von Eichlösungen zusammengestellt (siehe Tabelle 2, Tabelle 4 und Tabelle 6, Seite 15f).

Zur Dosierung der niedrigsten Konzentrationen der Phenole war es notwendig, die Stammlösungen 1:10 bzw. 1:20 (Kämpferol) zu verdünnen, um die Zugabe sehr kleiner Volumina zu vermeiden.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Eichlösungen der Serie A in µl

	1	2	3	4	5	6
Saponarin	150	150	150	150	150	150
Myricitrin	100	50	100(1:10)	50(1:10)	25	25
Hyperosid	50	50(1:10)	100(1:10)	25	100	150
Gossypetin	25	100(1:10)	100	50	50(1:10)	50
Quercetin	50(1:10)	50	25	20(1:10)	100(1:10)	100(1:10)
MeOH	125	100	25	205	75	25
Gesamt	500	500	500	500	500	500

Hieraus ergaben sich folgende Konzentrationen der Flavonoide in den Eichlösungen pro 0,5ml:

Tabelle 3: Konzentrationen der Eichlösungen der Serie A in µg/0,5ml

	1	2	3	4	5	6
Saponarin	65,40	65,40	65,40	65,40	65,40	65,40
Myricitrin	42,80	21,40	4,28	2,14	10,70	10,70
Hyperosid	18,40	1,84	3,68	9,20	36,80	55,20
Gossypetin	10,60	4,24	42,40	21,20	2,21	21,20
Quercetin	2,04	20,40	10,20	0,82	4,08	4,08

Tabelle 4: Zusammensetzung der Eichlösungen der Serie B in µl

	1	2	3	4	5
Saponarin	150	150	150	150	150
Myricetin	100	50	25	50(1:10)	100(1:10)
Isoquercitrin	25	60(1:10)	120(1:10)	50	100
Gossipitrin	60(1:10)	50	100	25	125(1:10)
Kämpferol	100(1:20)	25	50(1:20)	225(1:20)	25(1:20)
MeOH	65	165	55	-	-
Gesamt	500	500	500	500	500

Tabelle 5: Konzentrationen der Eichlösungen der Serie B in µg/0,5ml

	1	2	3	4	5
Saponarin	65,40	65,40	65,40	65,40	65,40
Myricetin	49,35	24,68	12,34	2,47	4,94
Isoquercitrin	12,64	3,03	6,07	25,29	50,58
Gossipitrin	3,31	27,51	55,02	13,75	6,88
Kämpferol	2,28	11,42	1,14	5,14	0,57

Tabelle 6: Zusammensetzung der Eichlösungen der Serie C in µl

	1	2	3	4	5
Saponarin	150	150	150	150	150
Ellagsäure	25	50	100	100(1:10)	75
Astragalin	100	80(1:10)	25	50	120(1:10)
MeOH	225	220	225	200	155
Gesamt	500	500	500	500	500

Tabelle 7: Konzentrationen der Eichlösungen der Serie C in µg/0,5ml

	1	2	3	4	5
Saponarin	65,40	65,40	65,40	65,40	65,40
Ellagsäure	10,10	20,20	40,40	4,04	30,30
Astragalin	42,40	3,39	10,60	21,20	5,09

Von jeder Eichlösung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und pro Lauf 3µl analysiert.

Zur Berechnung des Standardkorrekturfaktors F_k wurde folgende Formel verwendet:

$$F_k = \frac{EW_{Fl} \cdot A_{St}}{EW_{St} \cdot A_{Fl}}$$

EW_{Fl} ...Einwaage des Flavonoids

EW_{St} ...Einwaage des Standards (Saponarin)

A_{Fl} ...Peakfläche des Flavonoids

A_{St} ...Peakfläche des Standards

Berechnung des Korrekturfaktors für Myricitrin

Tabelle 8: Korrekturfaktoren für Myricitrin

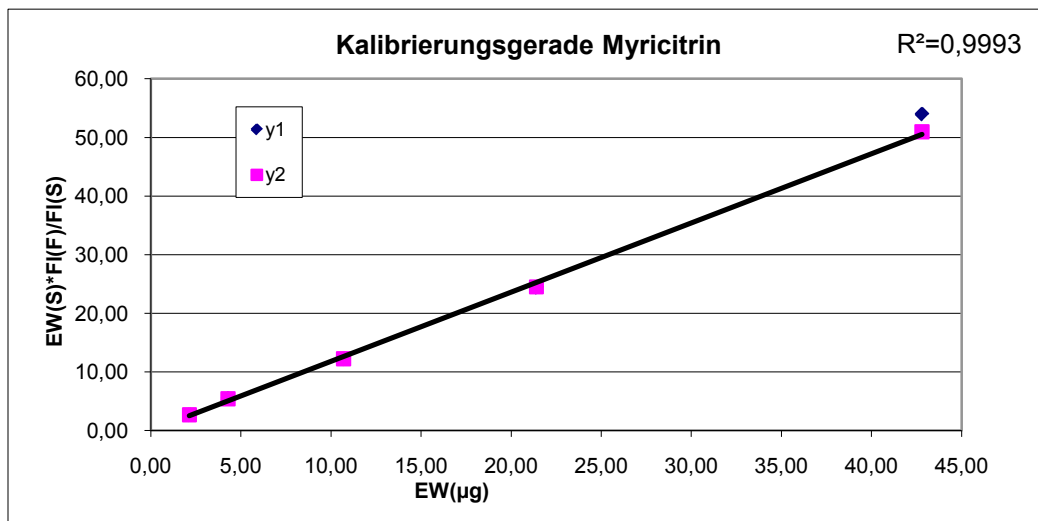
	50 µl (1:10) EL A4	100 µl (1:10) EL A3	25 µl EL A5	50 µl EL A2	100 µl EL A1	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,806	0,787	0,876	0,877	0,790	0,827	±0,046	5,52
Fk2	0,795	0,790	0,873	0,873	0,840	0,834	±0,041	4,87

Der Korrekturfaktor für Myricitrin betrug 0,831.

Tabelle 9: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Myricitrin

EW in µg	42,80	21,14	10,70	4,28	2,14
y1	53,99	24,41	12,21	5,44	2,66
y2	50,97	24,51	12,25	5,42	2,69

Abbildung 7: Kalibrierungsgerade für Myricitrin



Berechnung des Korrekturfaktors für Hyperosid

Tabelle 10: Korrekturfaktoren für Hyperosid

	50 µl (1:10) EL A2	100 µl (1:10) EL A3	25 µl EL A4	50 µl EL A1	100 µl EL A5*	150 µl EL A6	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,545	0,541	0,606	0,567	0,619	0,590	0,570	±0,028	4,92
Fk2	0,553	0,541	0,602	0,575	0,643	0,598	0,574	±0,027	4,71

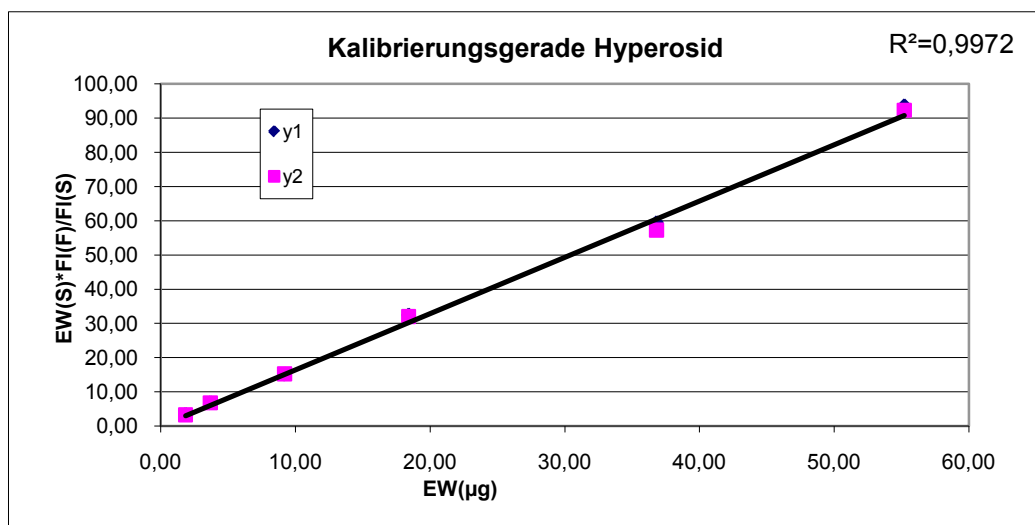
Als Standardkorrekturfaktor für Hyperosid konnte 0,572 berechnet werden.

* Die F_k -Werte der EL A5 unterschieden sich deutlich von denen der anderen Eichlösungen und wurden daher nicht für die Berechnung des Korrekturfaktors herangezogen.

Tabelle 11: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Hyperosid

EW in µg	55,20	36,80	18,40	9,20	3,68	1,84
y1	93,57	59,41	32,44	15,19	6,80	3,38
y2	92,28	57,24	32,02	15,27	6,80	3,33

Abbildung 8: Kalibrierungsgerade für Hyperosid



Berechnung des Korrekturfaktors für Gossypetin

Tabelle 12: Korrekturfaktoren für Gossypetin

	100 µl (1:10) EL A2	25 µl EL A1	50 µl EL A4	50 µl EL A6	100 µl EL A3	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,752	0,798	0,809	0,832	0,775	0,793	±0,031	3,88
Fk2	0,804	0,809	0,832	0,883*	0,797	0,810	±0,015	1,84

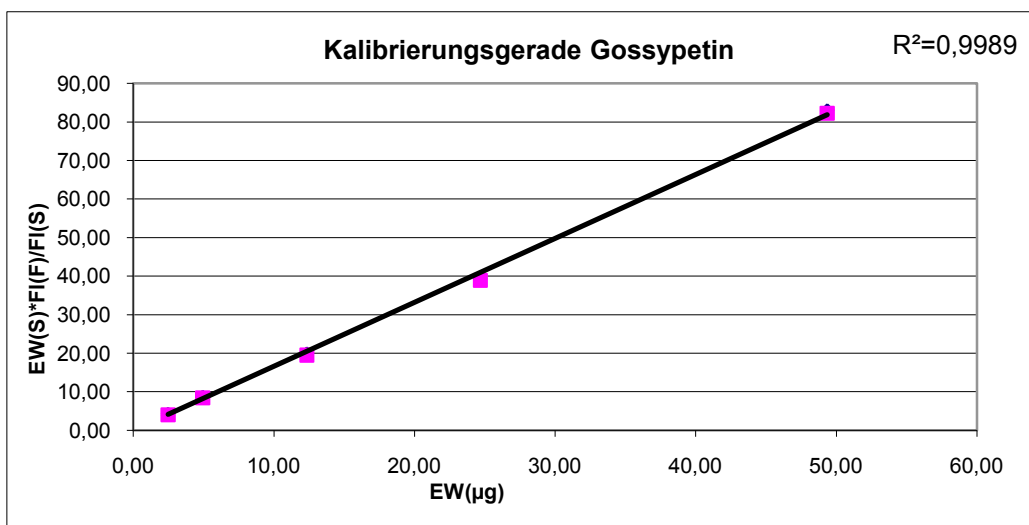
Somit wurde für Gossypetin 0,802 als Standardkorrekturfaktor ermittelt.

*Da dieser Wert deutlich von den anderen abwich, wurde er nicht in die Berechnung des Korrekturfaktors miteinbezogen.

Tabelle 13: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Gossypetin

EW in µg	45,68	22,84	11,42	4,57	2,28
y1	58,95	28,22	14,31	6,07	2,32
y2	57,30	27,47	14,12	5,68	1,84

Abbildung 9: Kalibrierungsgerade für Gossypetin



Berechnung des Korrekturfaktors für Quercetin

Tabelle 14: Korrekturfaktoren für Quercetin

	20 µl (1:10) EL A4	50 µl (1:10) EL A1	100 µl (1:10) EL A6	100 µl (1:10) EL A5	50 µl EL A2	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,389*	0,358	0,347	0,350	0,350	0,351	±0,005	1,44
Fk2	0,381	0,354	0,346	0,358	0,399*	0,360	±0,015	4,19

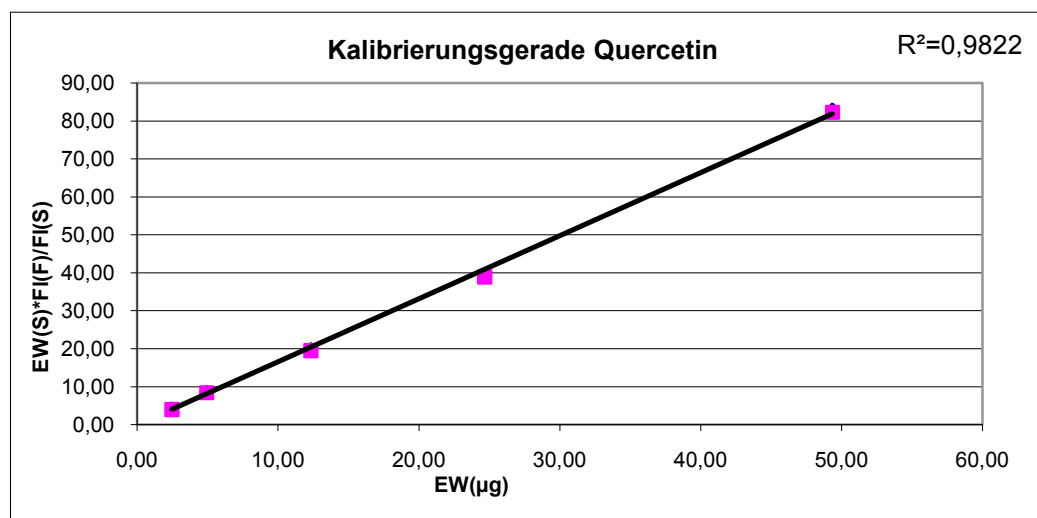
Der Korrekturfaktor für Quercetin betrug 0,355.

*Diese F_k -Werte unterschieden sich deutlich von den übrigen Werten und wurden daher nicht in der Berechnung des Mittelwertes berücksichtigt.

Tabelle 15: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Quercetin

EW in µg	21,17	10,58	4,23	2,11	0,85
y1	60,52	35,34	12,10	5,90	2,18
y2	60,75	37,71	11,82	5,98	2,22

Abbildung 10: Kalibrierungsgerade für Quercetin



Berechnung des Korrekturfaktors für Myricetin

Tabelle 16: Korrekturfaktoren für Myricetin

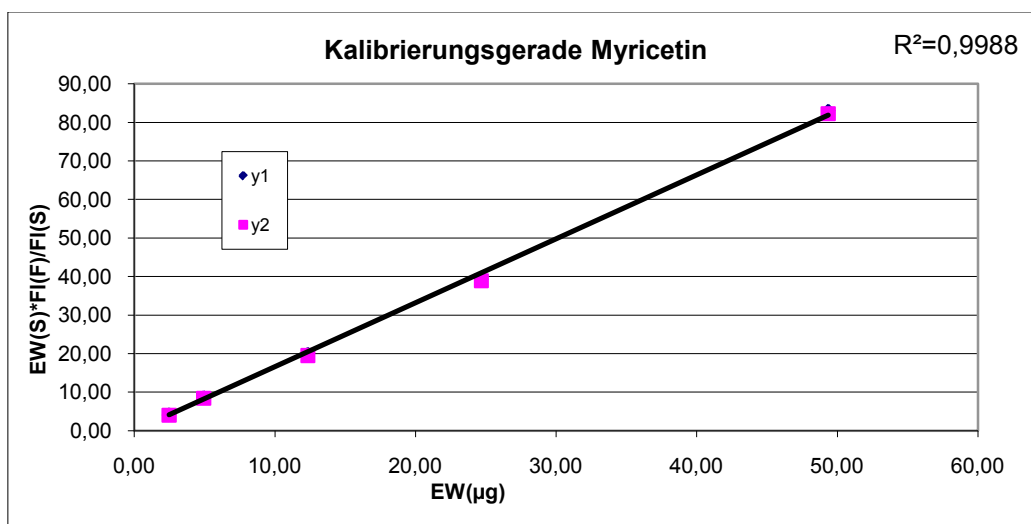
	50 µl (1:10) EL B4	100 µl (1:10) EL B5	25 µl EL B3	50 µl EL B2	100 µl EL B1	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,597	0,576	0,623	0,631	0,595	0,604	±0,022	3,67
Fk2	0,617	0,587	0,633	0,635	0,600	0,614	±0,021	3,39

Als Korrekturfaktor für Myricetin wurde 0,609 bestimmt.

Tabelle 17: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Myricetin

EW in µg	49,35	24,66	12,34	4,96	2,47
y1	82,90	39,12	19,81	8,56	4,13
y2	82,28	38,88	19,49	8,41	3,99

Abbildung 11: Kalibrierungsgerade für Myricetin



Berechnung des Korrekturfaktors für Gossipitrin

Tabelle 18: Korrekturfaktoren für Gossipitrin

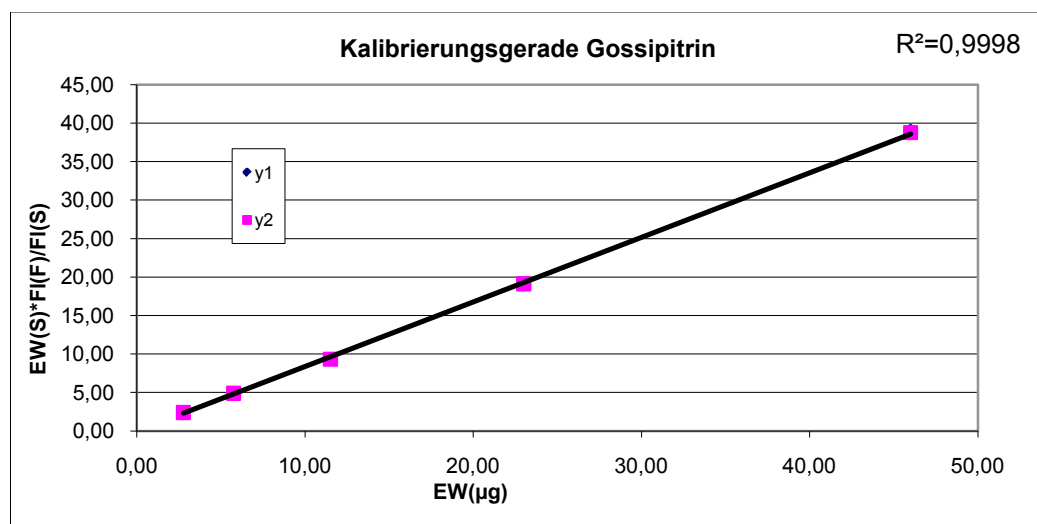
	60 µl (1:10) EL B1	125 µl (1:10) EL B5	25 µl EL B4	50 µl EL B2	100 µl EL B3	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	1,193	1,176	1,230	1,207	1,180	1,197	±0,022	1,845
Fk2	1,153	1,174	1,234	1,203	1,187	1,190	±0,030	2,544

Für Gossipitrin wurde ein Standardkorrekturfaktor von 1,194 berechnet.

Tabelle 19: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Gossipitrin

EW in µg	46,00	23,00	11,50	5,75	2,76
y1	38,98	19,05	9,35	4,89	2,31
y2	38,76	19,11	9,32	4,90	2,39

Abbildung 12: Kalibrierungsgerade für Gossipitrin



Berechnung des Korrekturfaktors für Kämpferol

Tabelle 20: Korrekturfaktoren für Kämpferol

	25 µl (1:20) EL B5	50 µl (1:20) EL B3	100 µl (1:20) EL B1*	225 µl (1:20) EL B4	25 µl EL B2	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,360	0,352	0,337	0,368	0,364	0,361	±0,007	1,86
Fk2	0,352	0,350	0,336	0,369	0,365	0,359	±0,010	2,65

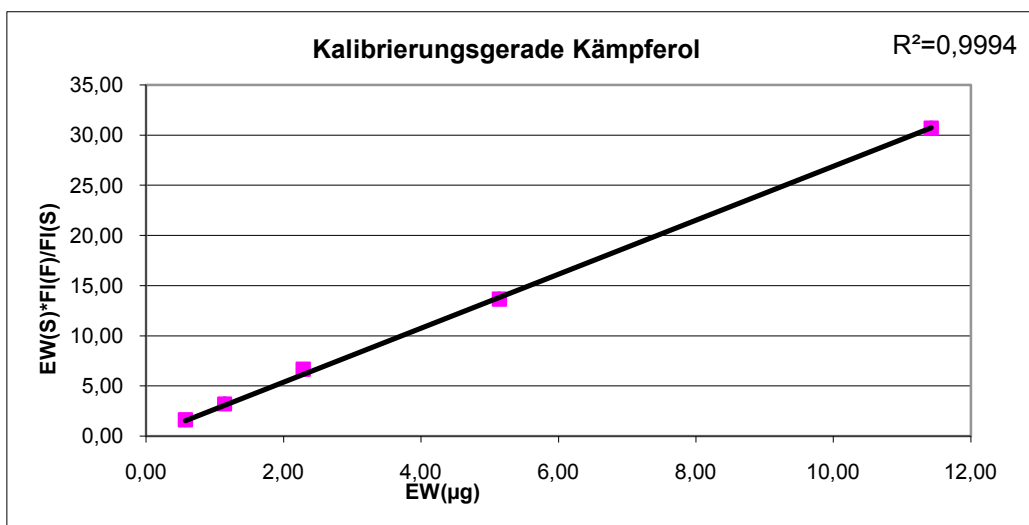
Als Standardkorrekturfaktor wurde 0,360 für Kämpferol ermittelt.

*Die F_k -Werte der EL B1 wichen deutlich von den anderen Werten ab und sind deshalb nicht in die Berechnung des Standardkorrekturfaktors miteinbezogen worden.

Tabelle 21: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Kämpferol

EW in µg	11,42	5,14	2,28	1,14	0,57
y1	30,74	13,70	6,65	3,24	1,59
y2	30,70	13,64	6,67	3,20	1,62

Abbildung 13: Kalibrierungsgerade für Kämpferol



Berechnung des Korrekturfaktors für Isoquercitrin

Tabelle 22: Korrekturfaktoren für Isoquercitrin

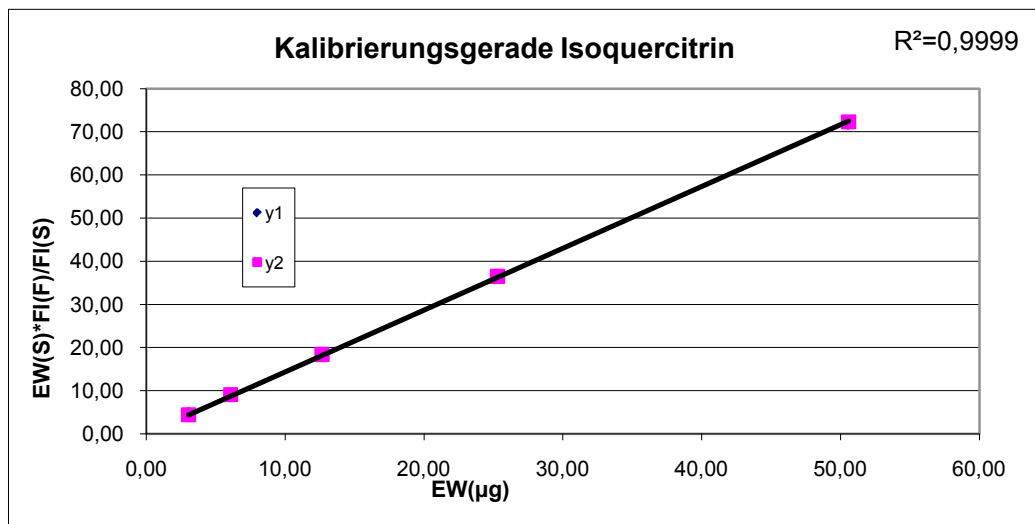
	60 µl (1:10) EL B2	120 µl (1:10) EL B3	25 µl EL B1	50 µl EL B4	100 µl EL B5	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,669	0,666	0,693	0,691	0,701	0,684	±0,016	2,27
Fk2	0,689	0,668	0,687	0,693	0,700	0,687	±0,012	1,74

Der daraus errechnete Korrekturfaktor für Isoquercitrin war 0,686.

Tabelle 23: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Isoquercitrin

EW in µg	50,58	25,29	12,64	6,07	3,03
y1	72,14	36,62	18,23	9,12	4,53
y2	72,29	36,50	18,40	9,09	4,40

Abbildung 14: Kalibrierungsgerade für Isoquercitrin



Berechnung des Korrekturfaktors für Ellagsäure

Tabelle 24: Korrekturfaktoren für Ellagsäure

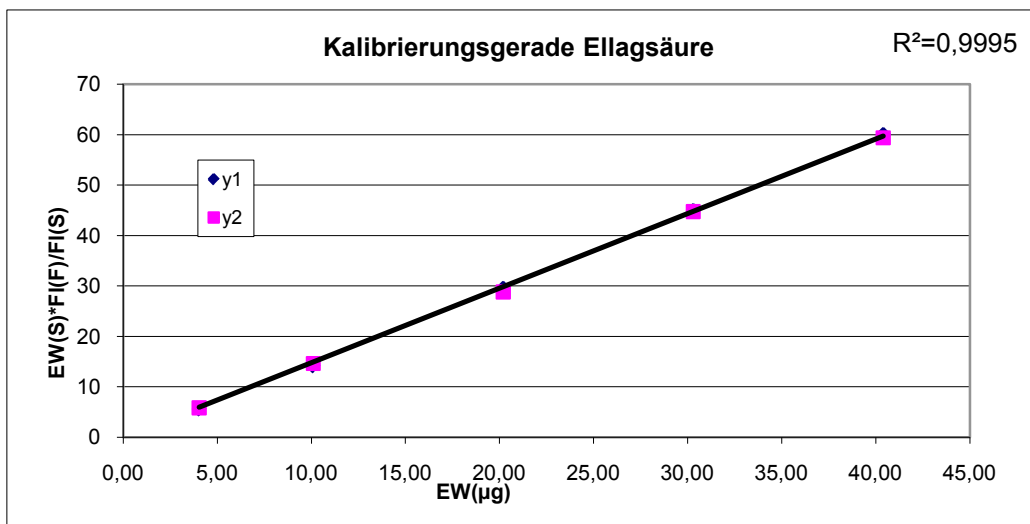
	100 µl (1:10) ELC4	25 µl ELC1	50 µl ELC2	75 µl ELC5	100 µl ELC3	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,693	0,691	0,684	0,674	0,673	0,683	±0,009	1,371
Fk2	0,726	0,716	0,702	0,677	0,681	0,700	±0,021	3,043

Für Ellagsäure konnte ein Standardkorrekturfaktor von 0,692 bestimmt werden.

Tabelle 25: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Ellagsäure

EW in µg	40,40	30,30	20,20	10,10	4,04
y1	60,02	44,95	29,54	14,10	5,57
y2	59,36	44,73	28,79	14,61	5,83

Abbildung 15: Kalibrierungsgerade für Ellagsäure



Berechnung des Korrekturfaktors für Astragalin

Tabelle 26: Korrekturfaktoren für Astragalin

	80 µl (1:10) ELC2*	120 µl (1:10) ELC5	25 µl ELC3	50 µl ELC4	100 µl ELC1	MW	STABW	RSD [%]
Fk1	0,711	0,726	0,778	0,745	0,770	0,755	±0,024	3,14
Fk2	0,710	0,725	0,780	0,761	0,789	0,755	±0,028	3,74

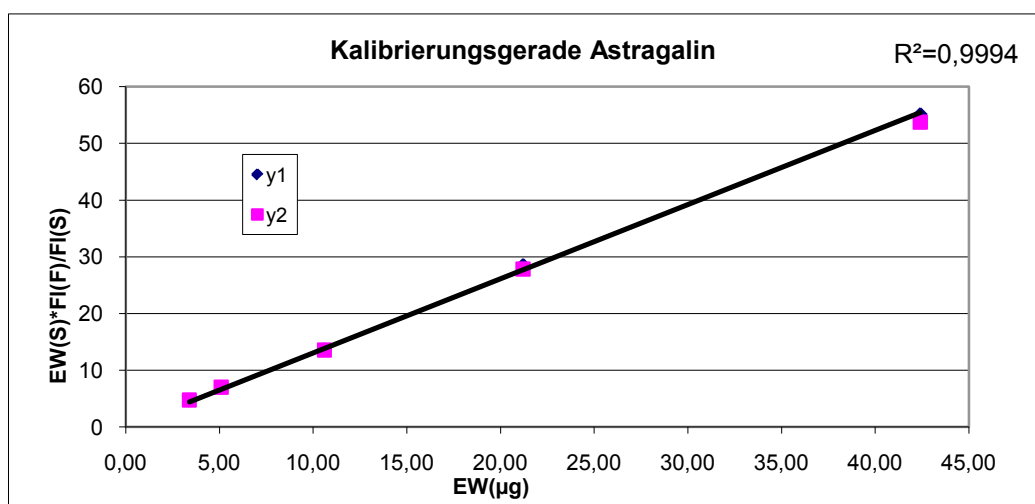
Der Korrekturfaktor für Astragalin betrug 0,755.

*Die F_k -Werte in EL C2, jener mit der geringsten Flavonoidkonzentration, unterschieden sich von den übrigen Werten. Daher ist anzunehmen, dass diese Konzentration nicht mehr im linearen Bereich der Eichgerade liegt. Die Werte wurden aufgrund dessen nicht in der Berechnung des Mittelwertes berücksichtigt.

Tabelle 27: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Astragalin

EW in µg	42,40	21,20	10,60	5,09	3,39
y1	55,05	28,47	13,62	7,00	4,77
y2	53,74	27,85	13,59	7,01	4,78

Abbildung 16: Kalibrierungsgerade für Astragalin



Die Kalibrierungsgeraden verliefen alle annähernd linear und durch den Nullpunkt. Daher konnten die Korrekturfaktoren für die Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe von Herba Drosera verwendet werden.

Berechnung des Korrekturfaktors für Myricetin-3-O-galaktosid

Da das Myricetinglykosid Myricetin-3-O-galaktosid in nicht ausreichender Menge als Reinsubstanz zur Verfügung stand, wurde für Myricetin geeicht. Mit Hilfe dessen Korrekturfaktors konnte jener für Myricetin-3-O-galaktosid berechnet werden, weil Flavonoide mit demselben Aglykon dem Molekulargewicht proportionale Korrekturfaktoren aufweisen [15].

Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$F_k = \frac{MG_{M3OG} \cdot F_{kM}}{MG_M}$$

MG_M ... MG Myricetin = 318,23

MG_{M3OG} ... MG Myricetin-3-O-galaktosid = 480,374

F_{kM} ...Korrekturfaktor für Myricetin = 0,609

Somit konnte ein Standardkorrekturfaktor von 0,919 für Myricetin-3-O-galaktosid ermittelt werden.

Berechnung des Korrekturfaktors für 2-Galloylhyperosid

Bei 2-Galloylhyperosid handelte es sich um eine bisher unbekannte Komponente in Herba Droserae. Zur Bestimmung des Standardkorrekturfaktors wurde jener von Hyperosid und folgende Formel herangezogen:

$$F_k = \frac{MG_{2-GH} \cdot F_{kH}}{MG_H}$$

MG_H...MG Hyperosid = 464,38

MG_{2-GH}...MG 2-Galloylhyperosid = 633,35

F_{kH}...Korrekturfaktor für Hyperosid = 0,572

Der daraus errechnete Standardkorrekturfaktor war 0,780.

Berechnung des Korrekturfaktors für dimethylierte Ellagsäure

Die unbekannte Komponente mit einer Retentionszeit von 25,4 Minuten konnte als dimethylierte Ellagsäure identifiziert werden.

Da keine nennenswerten Mengen an dimethylierter Ellagsäure vorhanden waren, wurde für Ellagsäure kalibriert und anschließend mit dieser Formel der Korrekturfaktor für dimethylierte Ellagsäure berechnet:

$$F_k = \frac{MG_{DME} \cdot F_{kE}}{MG_E}$$

MG_E...MG Ellagsäure = 302,2

MG_{DME}...MG dimethylierte Ellagsäure = 330,2

F_{kE}...Korrekturfaktor für Ellagsäure = 0,692

Daraus ergab sich ein Standardkorrekturfaktor von 0,756.

3.3 Flavonoidmuster und –gehalt der medizinisch verwendeten Drosera-Arten

Mit Hilfe der optimierten HPLC-Methode sollten die medizinisch verwendeten Drosera-Arten auf ihr Flavonoidmuster untersucht werden, da bereits in mehreren Untersuchungen eine Beteiligung dieser Komponenten an der Wirkung von Herba Droserae gezeigt worden war [6,8].

Für die Analyse wurden die Arten *Drosera rotundifolia* L., *Drosera madagascariensis* DC., *Drosera intermedia* HAYNE, *Drosera anglica* HUDSON und *Drosera peltata* SMITH verwendet.

Alle wurden einer Extraktion mit Methanol (siehe Kap. 2.2, Seite 4) unterzogen und anschließend mittels HPLC untersucht. Hierfür wurden verschiedene Analyselösungen (siehe Kap. 2.2, Seite 5) hergestellt und je 3µl in die HPLC eingespritzt.

3.3.1 Flavonoide in *Drosera rotundifolia* L.

Drosera rotundifolia L. gehört neben *Drosera intermedia* und *Drosera anglica* zu den europäischen Arten. Sie werden auch als winterharte Formen bezeichnet, da sie am Ende der Vegetationsperiode Endknospen bilden, die von Hüllblättern umschlossen sind und im Frühjahr wieder austreiben [16]. Diese werden auch als Hibernakel bezeichnet.

Bisher konnten in dieser Art Quercetin, Hyperosid, Quercetingalaktosid, Myricetin, Kämpferol, Astragalin und Myricetin-3-O-galaktosid, wie auch Isoquercitrin, Gossypetin und Gossipitrin als phenolische Inhaltsstoffe nachgewiesen werden [17, 18].

Die unbekannten Komponenten X3 und X4, die entsprechend einer älteren Diplomarbeit [19] so bezeichnet wurden, konnten mittels LC-MS, Dank Dr. J. Conrad, als dimethylierte Ellagsäure und 2-Galloylhyperosid identifiziert werden. Somit konnte eine Quantifizierung dieser erfolgen.

Für die Untersuchung des Flavonoidmusters wurden ein Handelsmuster (siehe Kap. 2.1, Seite 4) und ein Trockenextrakt [20] von *Drosera rotundifolia* verwendet.

Tabelle 28: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in *Drosera rotundifolia*

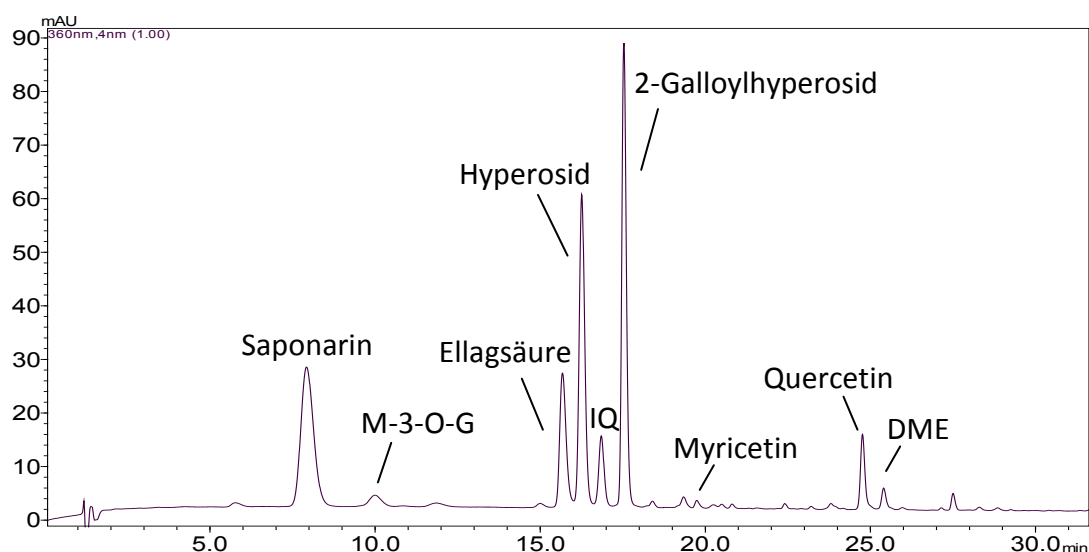
Phenol	D. rotund. (n=5)
Myricetin-3-O-galaktosid	0,198 ± 0,006
Ellagsäure	0,910 ± 0,009
Hyperosid	1,530 ± 0,024
Isoquercitrin	0,421 ± 0,009
2-Galloylhyperosid	2,515 ± 0,027
Myricetin	0,017 ± 0,001
Quercetin	0,187 ± 0,003
dimethylierte Ellagsäure	0,121 ± 0,001
Gesamt	5,900 ± 0,056

Wie aus Tabelle 28 ersichtlich stellte 2-Galloylhyperosid die Hauptkomponente des Handelsmusters von *Drosera rotundifolia* dar. Dieses war im Vergleich zu den anderen enthaltenen phenolischen Inhaltsstoffen in relativ hoher Menge nachweisbar. Daneben waren auch Hyperosid und Ellagsäure in höheren Konzentrationen enthalten. Während Myricetin nur in Spuren vorhanden war, konnten Myricetin-3-O-galaktosid, Isoquercitrin, Quercetin und dimethylierte Ellagsäure in mittleren Mengen detektiert werden.

Gossypetin und Gossipitrin, welche in anderen Untersuchungen nachgewiesen wurden [17, 18], waren in diesem Handelsmuster nicht detektierbar.

Abbildung 17: Chromatogramm von *Drosera rotundifolia*

(Bedingungen siehe Kap. 2.3, Seite 6)



Außerdem wurde ein Trockenextrakt von *Drosera rotundifolia* untersucht, das im Rahmen einer früheren Diplomarbeit [20] hergestellt worden war.

Hierfür wurden ca. 2 mg des alkoholischen Extraktes genau eingewogen und in 3,00 ml MeOH gelöst. Davon wurden 350 µl mit 150 µl Saponarinlösung (0,218 mg/ml Saponarin) versetzt. Für die Analyse wurden 3 µl der Lösung in die HPLC eingespritzt und es erfolgte eine Doppelbestimmung.

Tabelle 29: Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe im Trockenextrakt von *Drosera rotundifolia* im Vergleich zu einer früheren Analyse [12]

Trockenextrakt	%Flavonoide n=2	%Flavonoide [12]
Myricetin-3-O-galaktosid	0,775 ± 0,021	0,761
Ellagsäure	2,030 ± 0,042	2,400
Hyperosid	5,334 ± 0,048	5,878
Isoquercitrin	1,339 ± 0,055	1,836
2-Galloylhyperosid	10,551 ± 0,074	n.q.
Myricetin	0,047 ± 0,016	0,081
Quercetin	0,615 ± 0,003	0,720
Gesamt	20,691 ± 0,211	11,676

Während die Werte von Myricetin-3-O-galaktosid sehr gut mit der früheren Analyse des Trockenextraktes übereinstimmten, zeigte sich bei allen anderen Komponenten eine Abnahme von bis zu 30% des ursprünglichen Gehaltes, die darauf zurückzuführen sein könnte, dass das Extrakt bereits mehrere Jahre gelagert worden war.

3.3.2 Flavonoide in *Drosera intermedia* HAYNE

Drosera intermedia HAYNE gehört zu den am weitesten verbreiteten *Drosera*-Arten. Sie kommt in den gemäßigten Zonen Nordeuropas, im östlichen Nordamerika und in den tropischen Gebieten Südamerikas vor. Die im tropischen Klima vorkommenden Arten bilden im Gegensatz zu den europäischen keine Hibernakel aus [22].

Als phenolische Inhaltsstoffe wurden bisher Myricetin-3-O-rhamnosid, Quercetin-3-O-rhamnosid, Isoquercitrin, Hyperosid, Astragalin und Kämpferol-3-O-galaktosid nachgewiesen [23]. Weiters wurden dimethylierte Ellagsäure und 2-Galloylhyperosid identifiziert und erstmals quantifiziert.

Zur Untersuchung der Inhaltsstoffe wurde ein Handelsmuster aus dem Jahr 1997 verwendet (siehe Kap.2.1, Seite 4).

Tabelle 30: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in *Drosera intermedia*

Phenol	D. int. (n=5)
Myricetin-3-O-galaktosid	0,144 ± 0,002
Ellagsäure	1,107 ± 0,029
Hyperosid	0,152 ± 0,004
Isoquercitrin	0,142 ± 0,006
2-Galloylhyperosid	0,134 ± 0,004
Myricetin	0,097 ± 0,003
Quercetin	0,057 ± 0,002
dimethylierte Ellagsäure	0,143 ± 0,003
Gesamt	1,976 ± 0,048

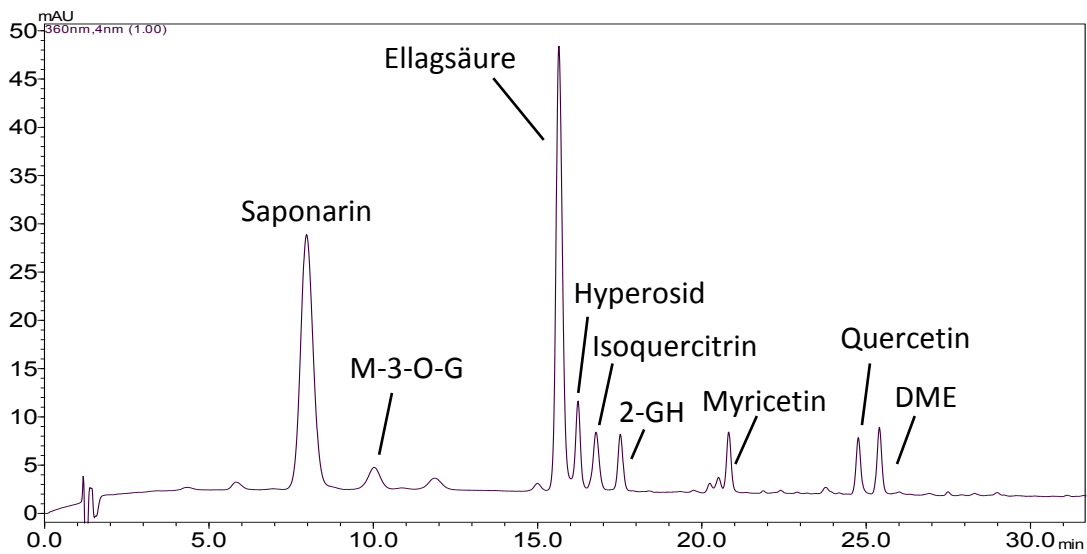
Die Flavonoidmuster von *Drosera intermedia* und *Drosera rotundifolia* stimmten überein, unterschieden sich aber in quantitativer Hinsicht.

Als Hauptkomponente wurde Ellagsäure detektiert, die im Vergleich zu den anderen enthaltenen Flavonoiden in sehr hoher Konzentration zu finden war.

2-Galloylhyperosid, konnte nur in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden. Myricetin und Quercetin wurden nur in Spuren detektiert.

Abbildung 18: Chromatogramm von *Drosera intermedia*

(Bedingungen siehe Kap. 2.3, Seite 6)



3.3.3 Flavonoide in *Drosera anglica* HUDSON

Drosera anglica HUDSON, deren Synonym *Drosera longifolia* L. ist, kommt in den gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre vor. Da der langblättrige Sonnentau Standorte besiedelt, an denen auch *Drosera rotundifolia* zu finden ist, kann es bei den beiden Arten zu einer Hybridisierung zu *Drosera x obovata* kommen [24].

Neben Quercetin und Kämpferol [25] konnten Hyperosid, Myricetin, Isoquercitrin, Myricetin-3-O-galaktosid und Ellagsäure sowie dimethylierte Ellagsäure und 2-Galloylhyperosid als phenolische Inhaltsstoffe nachgewiesen werden [12].

Für die Analyse stand ein Handelsmuster zur Verfügung (siehe Kap. 2.1, Seite 4).

Tabelle 31: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in *Drosera anglica*

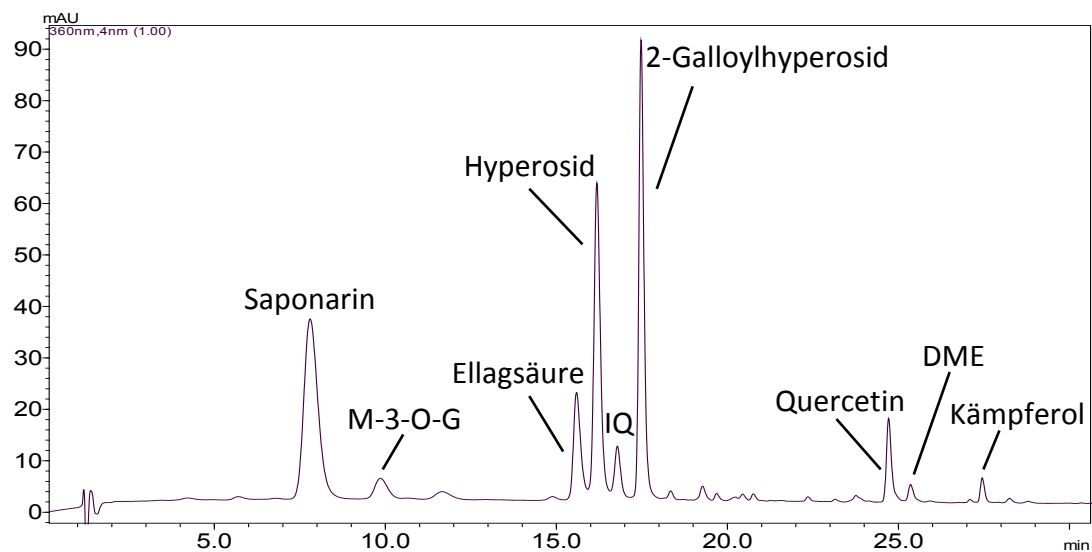
Phenol	D. angl. (n=4)
Myricetin-3-O-galaktosid	0,275 ± 0,002
Ellagsäure	0,607 ± 0,015
Hyperosid	1,303 ± 0,024
Isoquercitrin	0,298 ± 0,006
2-Galloylhyperosid	2,049 ± 0,041
Myricetin	0,023 ± 0,000
Quercetin	0,173 ± 0,004
dimethylierte Ellagsäure	0,084 ± 0,002
Kämpferol	0,044 ± 0,001
Gesamt	4,856 ± 0,079

Die Flavonoide von *Drosera anglica* stimmten qualitativ weitgehend mit denen der anderen europäischen Arten überein. Ferner konnte Kämpferol als Inhaltsstoff nachgewiesen werden.

Die Hauptkomponenten waren 2-Galloylhyperosid, Hyperosid und Ellagsäure. Quercetin und dimethylierte Ellagsäure waren in sehr geringen Konzentrationen enthalten.

Abbildung 19: Chromatogramm von *Drosera anglica*

(Bedingungen siehe Kap. 2.3, Seite 6)



3.3.4 Flavonoide in *Drosera madagascariensis* DC.

Heutzutage stammt der überwiegende Teil von Herba Droserae von *Drosera madagascariensis* DC, die auch unter dem Synonym *Drosera ramentacea* OLIV. bekannt ist. Sie wird als Ersatzdroge für *Drosera rotundifolia* verwendet, da diese unter Naturschutz steht. Jedoch könnte es aufgrund der sehr hohen Erntemengen in absehbarer Zeit zu Problemen in der Drogenbeschaffung kommen [5].

Die Pflanze ist vor allem im östlichen Teil der Insel Madagaskar beheimatet, wo sie in Sümpfen und Torfmoosmooren zu finden ist [26].

Die Flavonoide Hyperosid, Isoquercitrin, Quercetin, Myricetin und Myricetin-3-O-galaktosid sowie Ellagsäure und dimethylierte Ellagsäure wurden bisher nachgewiesen [12, 27].

Für die Analyse wurden ein Handelsmuster (siehe Kap.2.1, Seite 4) und ein ethanolisches Trockenextrakt, welches bereits in einer früheren Diplomarbeit [20] für pharmakologische Tests hergestellt worden war, verwendet.

Tabelle 32: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in *Drosera madagascariensis*

Phenol	D. mad. (n=5)
Myricetin-3-O-galaktosid	0,038 ± 0,001
Ellagsäure	0,137 ± 0,004
Hyperosid	0,048 ± 0,003
Isoquercitrin	0,032 ± 0,002
Myricetin	0,015 ± 0,001
Quercetin	0,056 ± 0,001
dimethylierte Ellagsäure	0,098 ± 0,002
Gesamt	0,423 ± 0,009

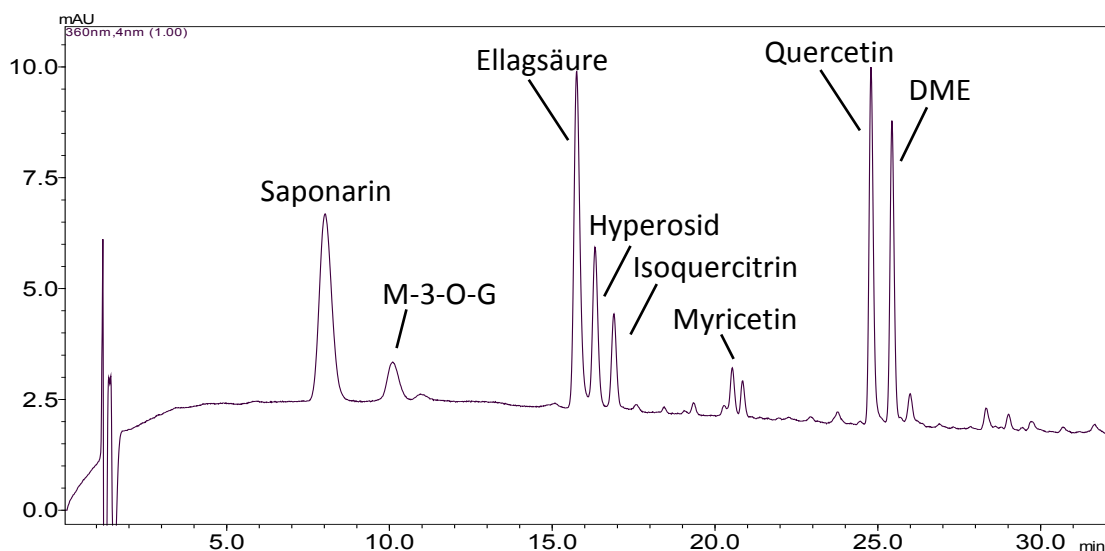
Aus Tabelle 32 ist ersichtlich, dass das Flavonoidmuster qualitativ weitgehend mit dem der europäischen Arten übereinstimmt.

Wie bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist der Gehalt an Naphthochinonen in *Drosera madagascariensis* im Vergleich zu den anderen medizinisch verwendeten Arten sehr gering [7]. Die Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe zeigte ein ähnliches Bild. Diese waren nur in sehr kleinen Konzentrationen detektierbar. So ergab der Gesamtflavonoidgehalt lediglich 0,423 %.

2-Galloylhyperosid konnte in diesen Mustern nicht detektiert werden.

Abbildung 20: Chromatogramm von *Drosera madagascariensis*

(Bedingungen siehe Kap. 2.3, Seite 6)



Für die Untersuchung des alkoholischen Trockenextrakts [20] wurden ca. 2 mg in 3 ml MeOH gelöst. Davon wurden 350 µl mit 150 µl Saponarinlösung (0,218 mg/ml Saponarin) versetzt. Für die Analyse wurden 3 µl der Lösung in die HPLC eingespritzt.

Tabelle 33: Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe im Trockenextrakt von *Drosera madagascariensis* im Vergleich zu einer früheren Analyse [12]

Trockenextrakt	%Flavonoide n=2	%Flavonoide [12]
Myricetin-3-O-galaktosid	3,120 ± 0,004	2,875
Ellagsäure	0,897 ± 0,000	0,998
Hyperosid	3,069 ± 0,006	2,915
Isoquercitrin	1,247 ± 0,006	1,527
Myricetin	0,851 ± 0,003	0,835
Quercetin	1,772 ± 0,001	1,785
Gesamt	10,956 ± 0,021	10,935

Die Werte der erneuten Analyse des Trockenextraktes [20] stimmten gut mit denen der ursprünglichen überein. Lediglich für Ellagsäure und Isoquercitrin wurde eine Abnahme von etwas mehr als 10% festgestellt, die eventuell auf die Lagerung des Extraktes über mehrere Jahre zurückzuführen sein könnte. Der Gesamtflavonoidgehalt entsprach jenem der früheren Quantifizierung [12]. Damit konnte eine gute Reproduzierbarkeit der verwendeten HPLC-Methode gezeigt werden.

3.3.5 Flavonoide in *Drosera peltata* SMITH

Drosera peltata SMITH unterscheidet sich von den anderen Arten durch seine schildförmige Blätterform. Sie ist die weltweit am weitesten verbreitete knollenbildende Art mit Vorkommnissen in Asien, Australien und Japan [28].

Die bisher bekannten Flavonoide in *Drosera peltata* waren Quercetin, Gossypetin und Gossipitrin. Neben diesen Substanzen konnten Isoquercitrin, Myricetin, Ellagsäure, Myricetin-3-O-galaktosid, Kämpferol, dimethylierte Ellagsäure und Astragalin [12, 29] detektiert werden.

Von dieser Art wurde ein Handelsmuster untersucht (siehe Kap. 2.1, Seite 4).

Tabelle 34: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in *Drosera peltata*

Phenol	D. pelt. (n=5)
Gossipitrin	3,468 ± 0,105
Ellagsäure	1,684 ± 0,057
Isoquercitrin	0,907 ± 0,049
Astragalin	0,609 ± 0,028
Gossypetin	1,099 ± 0,054
Myricetin	0,090 ± 0,003
Quercetin	0,400 ± 0,016
dimethylierte Ellagsäure	0,221 ± 0,009
Kämpferol	0,205 ± 0,009
Gesamt	8,683 ± 0,229

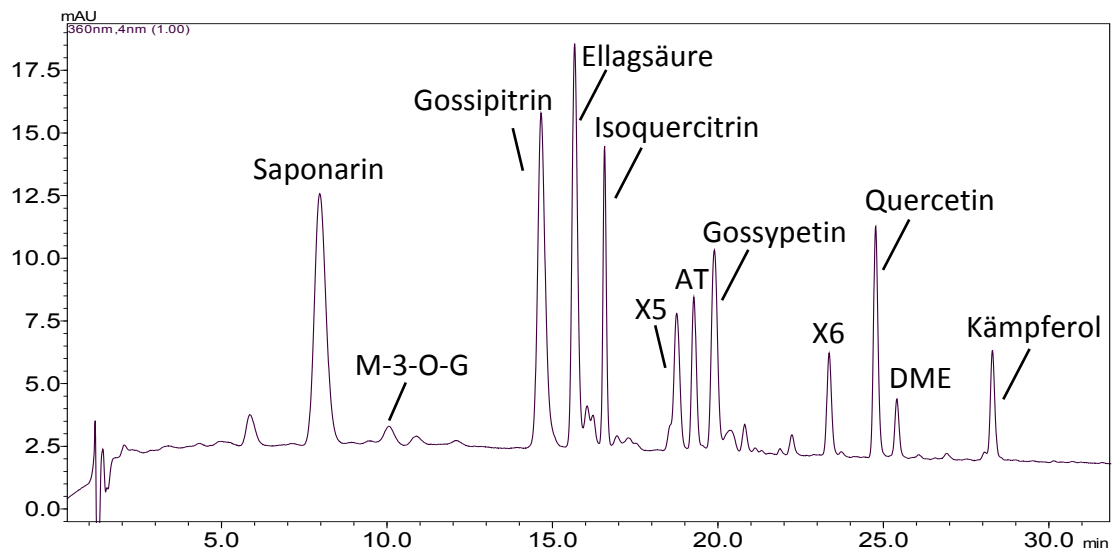
Drosera peltata wies im Unterschied zu den anderen Arten ein viel komplexeres Flavonoidmuster auf. Hier konnten zusätzliche Inhaltsstoffe detektiert werden. Neben Ellagsäure, Isoquercitrin, Myricetin, Quercetin, dimethylierter Ellagsäure und Kämpferol waren Gossipitrin, Gossypetin, Astragalin und die unbekannten Komponenten X5 und X6 nachzuweisen.

Gossipitrin war in sehr hoher Konzentration enthalten und stellte somit die Hauptkomponente dieser Art dar. Weitere dominierende Inhaltsstoffe waren Ellagsäure, Isoquercitrin, Gossypetin.

Hyperosid und 2-Galloylhyperosid konnte nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 21: Chromatogramm von *Drosera peltata*

(Bedingungen siehe Kap. 2.3, Seite 6)



3.3.6 Zusammenfassung

Mit Hilfe des optimierten HPLC-Verfahrens (siehe Kap. 2.3, Seite 6) konnten die untersuchten medizinisch verwendeten *Drosera*-Arten sehr gut analysiert werden.

Die bisher in *Drosera* nachgewiesenen phenolischen Inhaltsstoffe Myricetin-3-O-galaktosid, Ellagsäure, Hyperosid, Isoquercitrin, Myricetin und Quercetin konnten in fast allen Mustern detektiert werden. Nur *Drosera peltata* enthielt kein Hyperosid. Die bisher unbekannte Komponente X3 wurde als dimethylierte Ellagsäure identifiziert und konnten in allen untersuchten Mustern nachgewiesen

werden. X4, welches als 2-Galloylhyperosid charakterisiert wurde, war in *Drosera rotundifolia*, *Drosera intermedia* und *Drosera anglica* detektierbar. Kämpferol konnte in *Drosera anglica* und *Drosera peltata* nachgewiesen werden.

Mit Ausnahme von *Drosera peltata* stimmten die Flavonoidmuster der medizinisch verwendeten *Drosera*-Arten qualitativ weitgehend überein. Unterschiede wurden nur in quantitativer Hinsicht gefunden.

Während in *Drosera rotundifolia* und *Drosera anglica* 2-Galloylhyperosid die Hauptkomponente darstellte, war dieses in *Drosera intermedia* und *Drosera madagascariensis* nur in sehr geringer Konzentration oder gar nicht zu quantifizieren.

In diesen beiden Arten stellte Ellagsäure den Hauptinhaltsstoff dar. Ebenso konnten in *Drosera madagascariensis* Quercetin und dimethylierte Ellagsäure in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung dieser als Ersatzdroge für Herba *Droserae* berechtigt ist. Die höhere Dosierempfehlung für *Drosera madagascariensis* hat aufgrund ihres geringen Flavonoidgehalts ebenso ihre Berechtigung [5].

Drosera peltata wies im Gegensatz zu den anderen Arten ein viel komplexeres Flavonoidmuster auf. Als Hauptkomponente konnte neben Gossipitrin, Gossypetin und Ellagsäure, auch Isoquercitrin nachgewiesen werden. Ferner waren Astragalin und die unbekannten Komponenten X5 und X6 als zusätzliche Inhaltsstoffe enthalten. 2-Galloylhyperosid konnte nicht detektiert werden. Aufgrund unterschiedlicher Flavonoidmuster ist die Anwendung von *Drosera peltata* als Ersatzdroge für *Drosera rotundifolia* zu hinterfragen.

3.4 Reproduzierbarkeit der Methode

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Extraktion und der Analysemethode wurde jede Drosera-Art 5 bzw. 4 mal mit MeOH extrahiert (siehe Kap. 2.2., Seite 4) und anschließend mittels HPLC analysiert (siehe Kap. 2.3., Seite 6). Pro Lauf wurden 3µl analysiert.

Der Gehalt der phenolischen Inhaltsstoffe der Droge in Prozent wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Gehalt [\%]} = \frac{EW(St) \cdot A(Fl)}{EW(D) \cdot A(St)} \cdot F_k \cdot 100$$

EW (St)...Einwaage des Standards

EW (D)...Einwaage der Droge

A (St)...Peakfläche des Standards

A (Fl)...Peakfläche des Flavonoids

F_k...Korrekturfaktor des jeweiligen Flavonoids

Anhand der Ergebnisse der Gehaltsbestimmung konnte mit Hilfe der Mittelwerte, der Standardabweichungen und der Variationskoeffizienten (RSD) die Reproduzierbarkeit der Methode ermittelt werden.

Da die ermittelten RSD-Werte der untersuchten Arten in einem sehr engen Bereich von 0,444% und 5,415% (siehe Tabelle 35-39, Seite 44-46) lagen, konnte eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Analysemethode und Extraktion gezeigt werden.

Tabelle 35: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für *Drosera madagascariensis*

Phenol	Mittelwert (n=5) ± STABW	RSD [%]
Myricetin-3-O-galaktosid	0,038 ± 0,001	3,84
Ellagsäure	0,137 ± 0,004	2,67
Hyperosid	0,048 ± 0,003	5,41
Isoquercitrin	0,032 ± 0,002	4,73
Myricetin	0,015 ± 0,001	4,59
Quercetin	0,056 ± 0,001	2,49
dimethylierte Ellagsäure	0,098 ± 0,002	1,94
Gesamt	0,423 ± 0,009	2,16

Tabelle 36: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für *Drosera rotundifolia*

Phenol	Mittelwert (n=5) ± STABW	RSD [%]
Myricetin-3-O-galaktosid	0,198 ± 0,006	3,00
Ellagsäure	0,91 ± 0,009	0,94
Hyperosid	1,53 ± 0,024	1,54
Isoquercitrin	0,421 ± 0,009	2,13
2-Galloylhyperosid	2,515 ± 0,027	1,06
Myricetin	0,017 ± 0,001	3,03
Quercetin	0,187 ± 0,003	1,75
dimethylierte Ellagsäure	0,121 ± 0,001	0,44
Gesamt	5,9 ± 0,056	0,95

Tabelle 37: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für *Drosera intermedia*

Phenol	Mittelwert (n=5) ± STABW	RSD [%]
Myricetin-3-O-galaktosid	0,144 ± 0,002	1,66
Ellagsäure	1,107 ± 0,029	2,62
Hyperosid	0,152 ± 0,004	2,45
Isoquercitrin	0,142 ± 0,006	3,98
2-Galloylhyperosid	0,134 ± 0,004	3,13
Myricetin	0,097 ± 0,003	3,04
Quercetin	0,057 ± 0,002	3,43
dimethylierte Ellagsäure	0,143 ± 0,003	2,30
Gesamt	1,976 ± 0,048	2,43

Tabelle 38: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für *Drosera peltata*

Phenol	Mittelwert (n=5) ± STABW	RSD [%]
Gossipitrin	3,468 ± 0,105	3,04
Ellagsäure	1,684 ± 0,057	3,39
Isoquercitrin	0,907 ± 0,049	5,42
Astragalin	0,609 ± 0,028	4,59
Gossypetin	1,099 ± 0,054	4,88
Myricetin	0,090 ± 0,003	3,28
Quercetin	0,400 ± 0,016	3,80
dimethylierte Ellagsäure	0,221 ± 0,009	4,00
Kämpferol	0,205 ± 0,009	4,51
Gesamt	8,683 ± 0,229	2,64

Tabelle 39: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für *Drosera anglica*

Phenol	Mittelwert (n=4) ± STABW	RSD [%]
Myricetin-3-O-galaktosid	0,275 ± 0,002	0,76
Ellagsäure	0,607 ± 0,015	2,49
Hyperosid	1,303 ± 0,024	1,85
Isoquercitrin	0,298 ± 0,006	1,93
2-Galloylhyperosid	2,049 ± 0,041	2,01
Myricetin	0,023 ± 0,000	1,77
Quercetin	0,173 ± 0,004	2,22
dimethylierte Ellagsäure	0,084 ± 0,002	2,29
Kämpferol	0,044 ± 0,001	2,12
Gesamt	4,856 ± 0,079	1,62

Ebenso sollte die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit sowohl intra-day als auch inter-day gezeigt werden. Für die Bestimmung der intra-day Reproduzierbarkeit wurden die Retentionszeiten der wichtigsten Flavonoide von fünf Analysen von *Drosera intermedia* miteinander verglichen (siehe Tabelle 40, Seite 47). Zur Bestimmung der inter-day Reproduzierbarkeit wurden die Daten von zehn Analysen herangezogen, die innerhalb von 12 Tagen durchgeführt wurden. Als Untersuchungsmaterial wurden *Drosera intermedia* und *Drosera anglica* verwendet (siehe Tabelle 40, Seite 47). Mit der entwickelten HPLC-Methode konnte eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten erzielt werden.

Tabelle 40: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit der Phenole für intra-day und inter-day

Phenol	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=10)	
	Mittelwert	RSD	Mittelwert	RSD
Myricetin-3-O-Galaktosid	10,10 ± 0,08	0,79	10,00 ± 0,13	1,34
Ellagsäure	15,68 ± 0,03	0,22	15,66 ± 0,05	0,31
Hyperosid	16,27 ± 0,04	0,24	16,25 ± 0,05	0,29
Isoquercitrin	16,83 ± 0,05	0,28	16,82 ± 0,05	0,29
2-Galloylhyperosid	17,55 ± 0,03	0,17	17,53 ± 0,04	0,25
Myricetin	20,83 ± 0,02	0,07	20,81 ± 0,03	0,13
Quercetin	24,77 ± 0,01	0,03	24,76 ± 0,02	0,10
Dimethylierte Ellagsäure	25,41 ± 0,01	0,04	25,40 ± 0,03	0,10

Weiters wurden das Quantifizierungslimit und das Detektionslimit des Systems bestimmt. Unter dem Quantifizierungslimit versteht man ein Signal-Rausch Verhältnis von 1:10 und unter dem Detektionslimit ein Signal-Rausch Verhältnis von 1:3. Für die Bestimmung der Limits wurden die Verdünnungen der Stammlösungen verwendet und die gleichen Mischungen hergestellt wie jene, die schon bei der Kalibrierung des Systems verwendet wurden (siehe Kap. 3.2, Seite 14). Diese Mischungen wurden soweit verdünnt bis das jeweilige Limit erreicht war. Wie in Tabelle 41 zu sehen ist, lagen die Werte im 1 bzw. 2 stelligen ng Bereich. Somit konnte eine hohe Empfindlichkeit des Systems gezeigt werden.

Tabelle 41: Quantifizierungslimit und Detektionslimit der wichtigsten Flavonoide

Phenol	Quantifizierungslimit [ng]	Detektionslimit [ng]
Myricetin	52,50	17,50
Isoquercitrin	58,00	19,34
Gossipitrin	57,50	19,17
Kämpferol	14,00	4,67
Gossypetin	53,00	17,67
Hyperosid	46,00	15,34
Quercetin	17,00	5,67
Myricitrin	53,50	17,84
Ellagsäure	50,50	16,83
Astragalin	53,00	17,67

4. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, die phenolischen Inhaltsstoffe der medizinisch verwendeten Drosera-Arten mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie zu charakterisieren und miteinander zu vergleichen.

Eine bewährte HPLC-Methode [12] sollte hinsichtlich der Analysezeit und des Lösungsmittelverbrauchs optimiert werden. Dabei war als stationäre Phase eine Hypersil BDS C18-Säule verwendet worden (4 x 250 mm, 5 µm). Kürzere Säulen führen meist nicht nur zu Ersparnissen in Bezug auf Zeit und Lösungsmittelverbrauch sondern auch zu einer besseren Trennleistung und höheren Empfindlichkeit [30]. Daher wurde als stationäre Phase eine 150 mm lange Säule gewählt, an Stelle der bisher verwendeten langen Säule.

Die mobile Phase setzte sich aus Wasser (Eluent A) und AcCN (Eluent B) zusammen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 2,8 eingestellt und AcCN mit 8 ml Essigsäure/l angesäuert, wodurch eine gute Trennleistung der Flavonoide ermöglicht werden konnte. Die Auftrennung der phenolischen Inhaltsstoffe erfolgte mittels Gradientenelution, wobei es notwendig war den Gradientenverlauf an die kurze Säule anzupassen. Mit dem adaptierten System konnten die phenolischen Inhaltsstoffe der medizinisch verwendeten Drosera-Arten sehr gut voneinander getrennt werden. Die Detektion erfolgte mittels Dioden-Array im Bereich von 220-500 nm.

Die Analysezeit konnte um circa 15 Minuten verkürzt werden und es kam zu einem Lösungsmittelersparnis von 66%. Ebenso konnte der Probenverbrauch um 70% reduziert werden.

Für die Quantifizierung mittels internen Standards erwies sich Saponarin als geeignet, da es zu keiner Überlagerung mit den anderen Analyten oder Verlängerung der Analysenzeit kam und die Substanz kommerziell erhältlich ist.

Mit Hilfe der optimierten HPLC-Methode sollten Handelsmuster von *Herba Droserae* untersucht und quantifiziert werden. Das Drogenmaterial konnte aus dem Handel bzw. aus Anbauversuchen in Finnland bezogen werden.

Die Analyse von *Drosera rotundifolia*, *Drosera intermedia*, *Drosera anglica* und *Drosera madagascariensis* zeigte, dass deren Flavonoidmuster qualitativ weitgehend überein stimmten. Sie unterschieden sich lediglich in quantitativer Hinsicht. In *Drosera rotundifolia* und *Drosera anglica* stellten 2-Galloylhyperosid, Hyperosid und Ellagsäure die Hauptkomponenten dar. Hingegen konnte in *Drosera intermedia* und *Drosera madagascariensis* Ellagsäure als Hauptinhaltsstoff nachgewiesen werden. X3, welches als dimethylierte Ellagsäure identifiziert wurde, war in allen Handelsmustern zu finden. X4, das als 2-Galloylhyperosid charakterisiert wurde, war in *Drosera madagascariensis* und *Drosera peltata* nicht enthalten. Der Gesamtflavonoidgehalt von *Drosera madagascariensis* war im Vergleich zu den anderen Arten sehr gering.

Drosera peltata wies im Gegensatz zu den anderen Arten ein komplexeres Flavonoidmuster auf. Als Hauptkomponente konnte Gossipitrin detektiert werden. Daneben waren auch Ellagsäure und Gossypetin in höherer Konzentration enthalten. Während Hyperosid fehlte, konnte Astragalin im Handelsmuster nachgewiesen werden. Aufgrund der qualitativen Unterschiede im Flavonoidmuster ist zu hinterfragen, ob eine Anwendung von *Drosera peltata* für medizinische Zwecke sinnvoll ist, da vor allem die Flavonoide für die Wirkung der Extrakte wichtig sind [6, 8].

Der größte Gesamtgehalt an Flavonoiden konnten in *Drosera peltata* mit 8,683 % nachgewiesen werden. Für *Drosera rotundifolia* wurde ein Gehalt von 5,9 % ermittelt, der dem von *Drosera anglica* sehr ähnlich war. Hingegen konnte für *Drosera madagascariensis* mit 0,423 % nur eine sehr geringe Konzentration an phenolischen Inhaltsstoffen bestimmt werden. Empfehlungen bezüglich einer

höheren Dosierung aufgrund des geringen Flavonoidgehalts konnten somit bestätigt werden [5].

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Extraktion und der Methode wurden die Handelsmuster einer Mehrfachextraktion unterzogen. Jede Drosera-Art wurde 5 bzw. 4 mal mit MeOH extrahiert (siehe Kap. 2.2, Seite 4) und anschließend mittels HPLC analysiert (siehe Kap. 2.3, Seite 6). Die ermittelten RSD-Werte lagen in einem sehr engen Bereich von 0,444% und 5,415% (siehe Tabelle 35-39, Seite 44-46). Somit konnte eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit des Systems und der Extraktion gezeigt werden.

Tabelle 42: Übersicht des Gesamtflavonoidgehalts der untersuchten Drosera-Arten in %

Art	Gesamtflavonoidgehalt (%)
<i>D. anglica</i>	4,856
<i>D. rotundifolia</i>	5,900
<i>D. intermedia</i>	1,976
<i>D. madagascariensis</i>	0,429
<i>D. peltata</i>	8,712

Tabelle 43: Übersicht aller phenolischen Inhaltsstoffe in den untersuchten Drosera-Arten

Art	M3OG	E	H	IQ	GPE	2GH	X5	AT	M	GPI	X6	Q	K	DME
<i>D. anglica</i>	+	+	++	+	-	++	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>D. rotundifolia</i>	+	++	++	+	-	++	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>D. intermedia</i>	+	++	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>D. madagascariensis</i>	+	++	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	++
<i>D. peltata</i>	+	++	-	++	++	-	+	+	+	++	+	+	+	+

5. Quellenangabe

- 1) Barthlott W et al. Droseraceae Sundew Family In: Barthlott W (Herg): The curious world of Carnivorous plants. Timber Press; 2007; 94 - 97
- 2) Fischer M A, Adler W, Oswald K. Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. 2. Aufl.: Land Oberösterreich Biologiezentrum der OÖ Landesmuseen Linz; 2005; 384
- 3) <http://de.wikipedia.org/wiki/Sonnentau>, 19.03.2010, 12:32
- 4) Krenn L, Kartnig T. Sonnentau. Z Phytother 2005; 26: 197 - 202
- 5) Hiller, Loew, Wichtl M. Droserae herba. In: Wichtl M (Herg): Teedrogen und Phytopharmaka. 5.Aufl.: wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2009; 221-223
- 6) Paper DH, Karall E, Kremser M, Krenn L. Comparison of the Antiinflammatory Effects of Drosera rotundifolia and Drosera madagascariensis in the HET-CAM Assay. Phytother Res 2005; 19: 323 – 326
- 7) Krenn L, Länger R, Kopp B. Qualitätsprüfung von Sonnentaukraut. Dtsch Apoth Ztg 1995; 135: 867 – 870
- 8) Melzig MF, Pertz HH, Krenn L. Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from Droserae herba. Phythomedicine 2001; 8: 225 - 229
- 9) Krahel R. Ein wirksames Prinzip aus *Drosera rotundifolia*. Drug Res 1956; 6: 342 - 348
- 10) Kolodziej H. Vortrag auf dem Drosera Symposium in Wien. 10.11.1995
- 11) Jänicke C, Grünwald J., Brendler T. Handbuch Phytotherapie. Wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2003; 500f
- 12) Strohbach J. HPLC Analytik von phenolischen Sekundärstoffen in Drosera-Arten. Diplomarbeit Universität Wien 2008
- 13) Karall E. Chemische Analyse phenolischer Inhaltsstoffe in Drosera-Arten. Diplomarbeit Universität Wien 2003
- 14) Gottwald W. RP-HPLC für Anwender. VCH; 1993; 22f
- 15) Rahman K. Characterisation and Quantification of Flavonoids in Herba Droserae. Dissertation Universität Wien 1997

- 16) Danert S. *Urania Pflanzenreich*. 1.Aufl.: Urania Verlag Leipzig; 1993; 216f
- 17) Bienenfeld W, Katzlmeier H. Flavonoide aus *Drosera rotundifolia* L. *Arch Pharm (Weinheim)* 1966; 299: 598 - 602
- 18) Schölly T, Kapetanidis I. Flavonoide aus *Drosera rotundifolia* L. (Droseraceae). *Sci Pharm* 1993; 61: 277 – 282
- 19) Bacher B. Analytik der Inhaltsstoffe in *Herba Droserae*. Diplomarbeit Universität Wien 2002
- 20) Kremser M. Flavonoide in *Drosera*-Arten. Diplomarbeit Universität Wien 2003
- 21) Aichele D, Schwegler HW. *Die Blütenpflanzen Mitteleuropas*, Franckh-Kosmos Verlag GmbH & Co Stuttgart 1995; 258
- 22) http://en.wikipedia.org/wiki/Drosera_intermedia, 18.04.2010, 20:59
- 23) Budzianowski J, Kukulczanka K, Skrzypczak L. Phenolic Compounds of *Drosera intermedia* and *Drosera spathulata* from in-vitro cultures. *Acta Hort.* 1993; 330: 277 - 280
- 24) Hegi G. *Illustrierte Flora Mitteleuropa IV./2*. 1923; 504 – 506
- 25) Repák M, Galambosi B, Takkunen N. The production of 7-Methyljuglone, quercetin and kaempferol by *Drosera anglica* and *Drosera rotundifolia*. *Biologia (Bratislava)* 2000; 55: 429 - 433
- 26) http://de.wikipedia.org/wiki/Drosera_madagascariensis, 18.04.2010, 21:44
- 27) Kolodziej H, Pertz HH, Humke A. Main constituents of a commercial *Drosera* fluid extract and their antagonistic activity at muscarinic M₃ receptors in guinea-pig ileum. *Pharmazie* 2002; 57: 201 – 203
- 28) Pietropaolo J. Sundew Types. In: *Carnivorous plants of the World*. 3rd printing: Timber Press; 1993; 85 - 96
- 29) Ramachandran Nair AG, Shanmugasundaram P, Madhusudhanan KP. Naphthoquinones and flavonols from leaves of *Drosera peltata*. *Filoterapia* 1990; 61: 85 – 86
- 30) Rücker G, Neugebauer M, Willens G. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 3 Aufl.: wiss. Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2001

6. Tabellen- und Abbildungsübersicht

6.1 Tabellenübersicht

Tabelle 1: Konzentrationen der Stammlösungen in mg/ml	14
Tabelle 2: Zusammensetzung der Eichlösungen der Serie A in µl.....	15
Tabelle 3: Konzentrationen der Eichlösungen der Serie A in µg/0,5ml.....	15
Tabelle 4: Zusammensetzung der Eichlösungen der Serie B in µl	16
Tabelle 5: Konzentrationen der Eichlösungen der Serie B in µg/0,5ml.....	16
Tabelle 6: Zusammensetzung der Eichlösungen der Serie C in µl	16
Tabelle 7: Konzentrationen der Eichlösungen der Serie C in µg/0,5ml.....	17
Tabelle 8: Korrekturfaktoren für Myricitrin.....	18
Tabelle 9: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Myricitrin	18
Tabelle 10: Korrekturfaktoren für Hyperosid	19
Tabelle 11: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Hyperosid	19
Tabelle 12: Korrekturfaktoren für Gossypetin.....	20
Tabelle 13: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Gossypetin.....	20
Tabelle 14: Korrekturfaktoren für Quercetin	21
Tabelle 15: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Quercetin.....	21
Tabelle 16: Korrekturfaktoren für Myricetin	22
Tabelle 17: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Myricetin	22
Tabelle 18: Korrekturfaktoren für Gossipitrin	23
Tabelle 19: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Gossipitrin	23
Tabelle 20: Korrekturfaktoren für Kämpferol.....	24
Tabelle 21: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Kämpferol.....	24
Tabelle 22: Korrekturfaktoren für Isoquercitrin	25
Tabelle 23: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Isoquercitrin	25
Tabelle 24: Korrekturfaktoren für Ellagsäure	26
Tabelle 25: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Ellagsäure	26
Tabelle 26: Korrekturfaktoren für Astragalin	27

Tabelle 27: Koordinaten der Kalibrierungsgerade von Astragalin	27
Tabelle 28: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in <i>Drosera rotundifolia</i>	31
Tabelle 29: Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe im Trockenextrakt von <i>Drosera rotundifolia</i> im Vergleich zu einer früheren Analyse [12]	32
Tabelle 30: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in <i>Drosera intermedia</i>	34
Tabelle 31: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in <i>Drosera anglica</i>	36
Tabelle 32: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in <i>Drosera madagascariensis</i>	37
Tabelle 33: Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe im Trockenextrakt von <i>Drosera madagascariensis</i> im Vergleich zu einer früheren Analyse [12]	39
Tabelle 34: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in <i>Drosera peltata</i>	40
Tabelle 35: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für <i>Drosera madagascariensis</i>	44
Tabelle 36: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für <i>Drosera rotundifolia</i>	44
Tabelle 37: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für <i>Drosera intermedia</i>	45
Tabelle 38: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für <i>Drosera peltata</i>	45
Tabelle 39: Reproduzierbarkeit der Methode und Extraktion für <i>Drosera anglica</i>	46
Tabelle 40: Reproduzierbarkeit der Retentionszeit der Phenole für intra-day und inter-day	47
Tabelle 41: Quantifizierungslimit und Detektionslimit der wichtigsten Flavonoide	48
Tabelle 42: Übersicht des Gesamtflavonoidgehalts der untersuchten <i>Drosera</i> -Arten in %	51

Tabelle 43: Übersicht aller phenolischen Inhaltsstoffe in den untersuchten <i>Drosera</i> -Arten.....	52
--	----

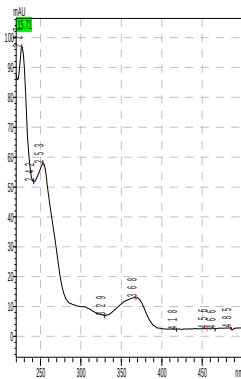
6.2 Abbildungsübersicht

Abbildung 1: <i>Drosera intermedia</i> [3]	1
Abbildung 2: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von <i>Drosera rotundifolia</i>	8
Abbildung 3: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von <i>Drosera rotundifolia</i>	9
Abbildung 4: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von <i>Drosera rotundifolia</i>	10
Abbildung 5: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von <i>Drosera rotundifolia</i>	11
Abbildung 6: Chromatogramm des ethanolischen Extraktes von <i>Drosera rotundifolia</i>	12
Abbildung 7: Kalibrierungsgerade für Myricitrin.....	18
Abbildung 8: Kalibrierungsgerade für Hyperosid	19
Abbildung 9: Kalibrierungsgerade für Gossypetin.....	20
Abbildung 10: Kalibrierungsgerade für Quercetin	21
Abbildung 11: Kalibrierungsgerade für Myricetin	22
Abbildung 12: Kalibrierungsgerade für Gossipitrin	23
Abbildung 13: Kalibrierungsgerade für Kämpferol.....	24
Abbildung 14: Kalibrierungsgerade für Isoquercitrin	25
Abbildung 15: Kalibrierungsgerade für Ellagsäure	26
Abbildung 16: Kalibrierungsgerade für Astragalin	27
Abbildung 17: Chromatogramm von <i>Drosera rotundifolia</i>	32
Abbildung 18: Chromatogramm von <i>Drosera intermedia</i>	35
Abbildung 19: Chromatogramm von <i>Drosera anglica</i>	36

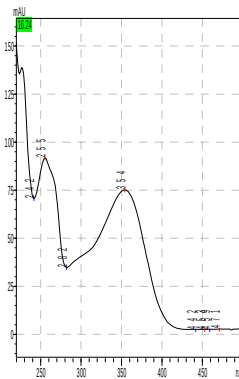
Abbildung 20: Chromatogramm von <i>Drosera madagascariensis</i>	38
Abbildung 21: Chromatogramm von <i>Drosera peltata</i>	41

ANHANG: UV-Spektren der Phenole

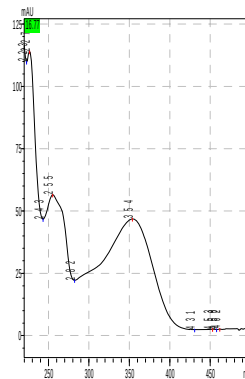
Ellagsäure



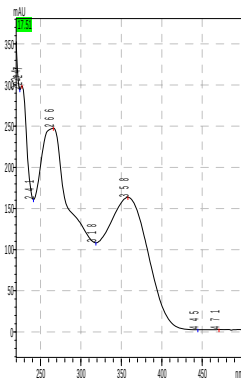
Hyperosid



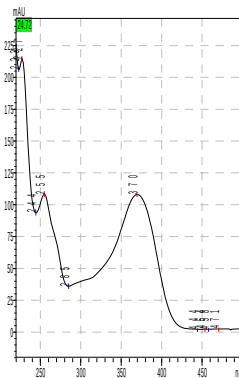
Isoquercitrin



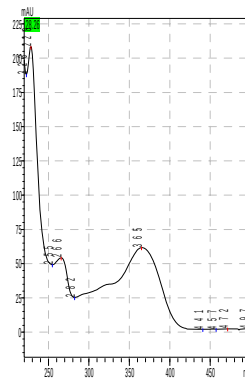
2-Galloylhyperosid



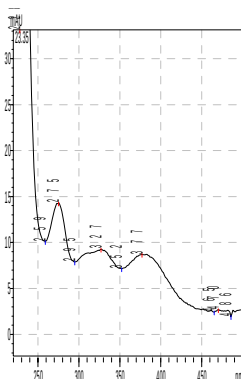
Quercetin



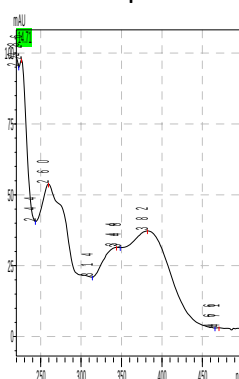
Kämpferol



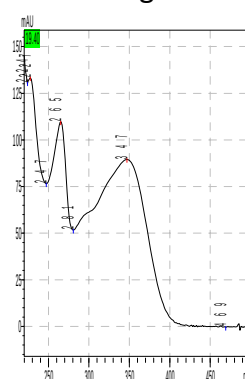
X6



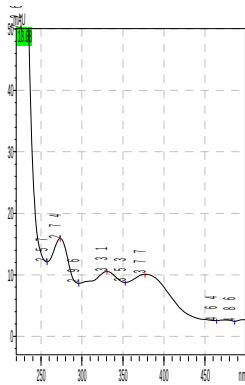
Gossipitrin



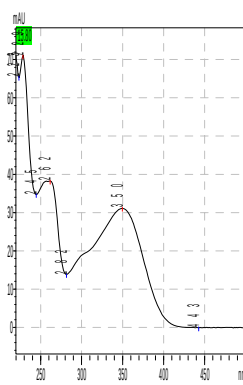
Astragalin



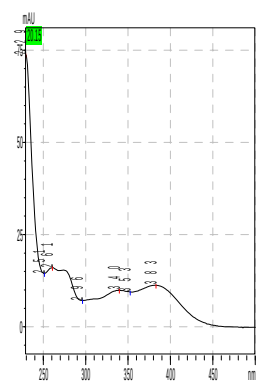
X5



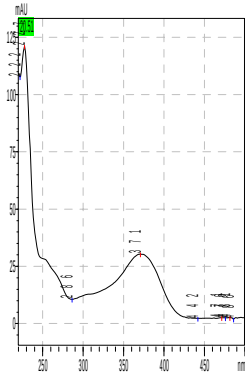
Myricitrin



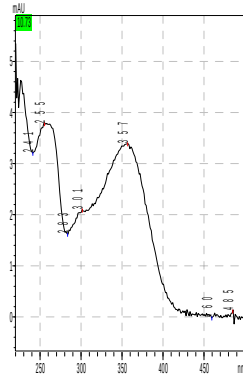
Gossypetin



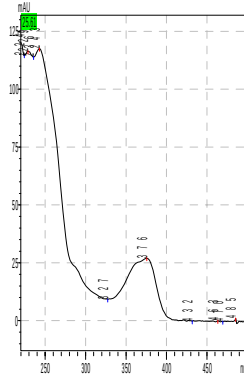
Myricetin



Myricetin-3-O-galaktosid



Dimethylierte Ellagsäure



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marija Crnogorac
Adresse: Gumpendorferstrasse 124/46, 1060 Wien
Geburt: 15. Jänner 1987 in Salzburg
Staatsbürgerschaft: Österreich
Eltern: Janja Crnogorac (geb. Tadic), Ljubo Crnogorac
Familienstand: ledig

Ausbildung

1993-1997 Volksschule Mülln, Salzburg
1997-2005 Gymnasium Zaunergasse, Salzburg
5. Juli 2005 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg abgelegt
2005-2010 Studium an der Universität Wien
Studienrichtung Pharmazie
10/09 – 01/10 praktischer Teil der Diplomarbeit am Institut für
Pharmakognosie