



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Beiträge zur phytochemischen Analyse der mongolischen
Heilpflanze *Myricaria longifolia* EHRENB.

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:

Bettina Andrea Mraz

Studienrichtung:

Pharmazie

Betreuerin:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Wien, im August 2010

Gewidmet meiner Großmutter Margarete, die mir schon als kleines Kind vermittelt hat, dass Wissen ein großer Wert ist, und dass man viel Freude am Lernen haben kann:

*“Ich will”, das Wort ist mächtig, spricht’s einer ernst und still.
Die Sterne reißt’s vom Himmel, das kleine Wort „Ich will“.*

Danksagung

Mein Dank gilt

... Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung eines Diplomarbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

... Ao. Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die Vergabe des interessanten Themas und danach für die hervorragende Betreuung der Diplomarbeit. Danke Sabine, dass du mir schon vor ‚Antritt‘ meiner Arbeit sehr entgegengekommen bist und mir ermöglicht hast das praktische Arbeiten ‚zeitlich versetzt‘ zu absolvieren.

Es war mir wirklich eine große Hilfe! Danke für dein Verständnis!!

Und natürlich danke, dass ich mich immer an dich wenden konnte, mit jedem Anliegen und jeder Frage!

... Mag. Astrid Obmann für die ausgezeichnete Betreuung, die vielen Hilfestellungen und Tipps! Immer hilfsbereit, geduldig und vor allem sehr kompetent wurden mir von dir alle Fragen beantwortet. Danke!!

... der Arbeitsgruppe Glasl/Reznicek/Krenn/Kopp für die freundliche Aufnahme ins Team und für die Hilfsbereitschaft, die mir, vor allem als ‚Neuling‘, von allen Seiten entgegengebracht wurde. Das Arbeitsklima war hervorragend und es war täglich eine Freude auf die Uni zu fahren!!

... meinen Studienkolleginnen Christa und Julia. Danke für die gemeinsame Zeit auf der Uni, die vielen gemeinsamen Labortage und die vielen - nicht nur - fachlichen Gespräche! Danke für die Motivierung. Wie hätte ich das Studium nur ohne euch schaffen sollen? Danke!!

... dem Team der Vital Apotheke und Mag. Marcel Mathà, dass ich in den letzten drei Jahren ein Mitglied des Teams geworden bin und wertvolle Erfahrungen sammeln konnte. Danke für die vielen fachlichen Informationen und die Möglichkeit zur Weiterbildung in der Apotheke. Auch das Lernen für die Prüfungen ist mir durch die Verknüpfung mit dem ‚praktischen‘ Wissen erleichtert worden.

... meinen Eltern, die mich in allen Belangen immer unterstützen und großes Verständnis aufbringen! Danke, dass ihr mir ermöglicht habt mich ganz aufs Studium zu konzentrieren und danke, dass ihr meine - oft sehr große - Nervosität vor Prüfungen ertragen habt! Danke für die vielen Hilfen – Skripten drucken, binden, ... Ihr seid die besten Eltern, die man sich nur wünschen kann! Danke!!

... meiner Schwester Barbara und meinem Bruder Bernhard, die mir immer ein Vorbild waren und sind! Danke, dass ihr mir – vor allem am Beginn des Studiums – eine große Hilfe wart. Danke, dass ihr mich motiviert habt, indem ihr mir gezeigt habt, dass Naturwissenschaften gar nicht so schwer und sehr interessant sind.

... Stephan! Danke für alles! Für dein großes Verständnis, wenn ich wochenlang hinter den Büchern versunken bin. Für deine Unterstützung und deine immerwährende Motivierung! Danke für die vielen fachlichen Diskussionen. Danke, dass du mir in Vielem ein Vorbild bist und mich immer bestärkst in dem was ich tue! Danke!!

... vielen weiteren Freunden und Verwandten.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ALLGEMEINER TEIL.....	10
1.1	EINLEITUNG	10
1.2	PROBLEMSTELLUNG	14
1.3	<i>MYRICARIA LONGIFOLIA</i> EHRENB.	16
2	MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1	MATERIAL	17
2.1.1	<i>Pflanzenmaterial</i>	17
2.1.2	<i>Vorhandene Extrakte (OWEs)</i>	18
2.1.3	<i>Ausgangsmaterial für die Säulenchromatographie</i>	18
2.1.4	<i>Vorhandene Fraktionen</i>	19
2.2	METHODEN	20
2.2.1	<i>Dünnschichtchromatographie (DC)</i>	20
2.2.2	<i>Säulenchromatographie (SC)</i>	22
2.2.3	<i>High performance liquid chromatography (HPLC)</i>	24
2.2.4	<i>Massenspektrometrie (MS)</i>	28
3	EXPERIMENTELLER TEIL.....	30
3.1	ANALYTISCHER TEIL	30
3.1.1	<i>Analyse der OWEs</i>	30
3.1.1.1	<i>Methodenoptimierung</i>	31
3.1.1.2	<i>Vergleich von OWE 48/04 mit ausgewählten Reinsubstanzen</i>	35
3.1.2	<i>Analyse vorhandener Fraktionen</i>	43
3.1.3	<i>Analyse von UC2</i>	45
3.2	PRÄPARATIVER TEIL	47
3.2.1	<i>Säulenchromatographische Trennung</i>	47
3.2.2	<i>Isolierung mittels semipräparativer HPLC</i>	57
3.3	CHARAKTERISIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG.....	60
3.3.1	<i>Rhamnetin</i>	60
3.3.2	<i>Gallussäure</i>	62
3.3.3	<i>Ellagsäure</i>	64
3.3.4	<i>Quercetinglucuronid (BM)</i>	68
3.3.5	<i>Diskussion und Ausblick</i>	70
4	ZUSAMMENFASSUNG (ABSTRACT)	71
5	LITERATURVERZEICHNIS	72
6	ANHANG	74
7	CURRICULUM VITAE.....	101

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AS	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
G.E.	Gesamtextrakt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kap.	Kapitel
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NSRA	Naturstoffreagens A
OWE	Original Water Extract
PEG	Polyethylenglycol
R _f	Retentionsfaktor (in der DC)
S.	Seite
SC	Säulenchromatographie
Tab.	Tabelle
TMM	Traditionelle mongolische Medizin
t _R	Retentionszeit
UC	Unknown compound
UV	Ultraviolette Licht
VIS	Visible (Tageslicht)

1 ALLGEMEINER TEIL

1.1 EINLEITUNG

Myricaria longifolia ist eine in der traditionellen mongolischen Medizin (TMM) angewandte Heilpflanze. Die TMM ist eine holistische Methode und deshalb sind die dort beschriebenen Krankheitsbilder nicht mit denen der westlichen Medizin vergleichbar. [1]

In der Mongolei hat die traditionelle Medizin auch heute noch einen hohen Stellenwert. Im Jahr 2006 wurden schätzungsweise 23% der mongolischen Bevölkerung nach den Lehren der TMM behandelt. [2]

Ärzte, die die TMM ausüben, werden sowohl in staatlichen als auch in privaten Universitäten ausgebildet. Das Gesundheitsministerium möchte eine „Harmonisierung“ der traditionellen mit der westlichen Medizin erreichen. Jahr für Jahr steigt in der Mongolei die Anzahl an mit traditioneller Medizin behandelten Patienten und dadurch auch die Anerkennung und Wertschätzung dieses Wissens. [2]

Aufgrund der doch sehr breiten Anwendung ist es naheliegend, die in der traditionellen mongolischen Medizin angewandten Pflanzen auch nach wissenschaftlichen Gesichtspunkten zu untersuchen. Einerseits sind Bioaktivitätsstudien von Interesse, um Wirkungen in vitro feststellen zu können. Andererseits ist danach auch die phytochemische Analyse der Pflanzen von Interesse, um die für Wirkungen verantwortlichen Substanzen zu identifizieren.

Eine Arbeitsgruppe des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien hat eine enge Zusammenarbeit mit einer Arbeitsgruppe der Health Sciences University of Mongolia aufgebaut. Forschungsreisen in das Land und die wissenschaftliche Tätigkeit mongolischer Austauschstudenten an der Universität Wien ermöglichen einen engen Kontakt zu heimischen Forschern. Innerhalb des Projektes wurden mehrere in der traditionellen mongolischen Medizin angewandte Heilpflanzen ausgewählt, die der Therapie von Lebererkrankungen dienen und in der Mongolei heimisch sind. [3] Sie sollten

in Bioaktivitätstests auf eventuelle choleretische und cytotoxische Wirkung getestet werden.

Nach genauer botanischer, morphologischer und anatomischer Untersuchung des zuvor gesammelten Pflanzenmaterials wurden die ausgewählten Pflanzen zunächst mittels Leberperfusionstests untersucht. Hierbei wird an isolierten Rattenlebern zuerst der Gallenfluss unter Perfusion mit Krebs-Henseleit Puffer bestimmt, um danach zusätzlich Pflanzenextrakte unterschiedlicher Konzentration einzusetzen und eine eventuelle Änderung des Gallenflusses nachzuweisen. [4] Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, erhöhen *Gentiana algida*, *Lilium pumilum*, *Gentiana barbata*, *Saussurea amara* und *Dianthus versicolor* den Gallenfluss. *Euphorbia pallasii* zeigt ein konzentrationsabhängiges Verhalten: Bei einer Konzentration von 200 mg/l zeigt sich eine leichte Erhöhung des Gallenflusses, bei einer Konzentration von 1000 mg/l wird der Gallenfluss erheblich gesenkt. *Myricaria longifolia* senkt in beiden getesteten Konzentrationen den Gallenfluss deutlich. [3]

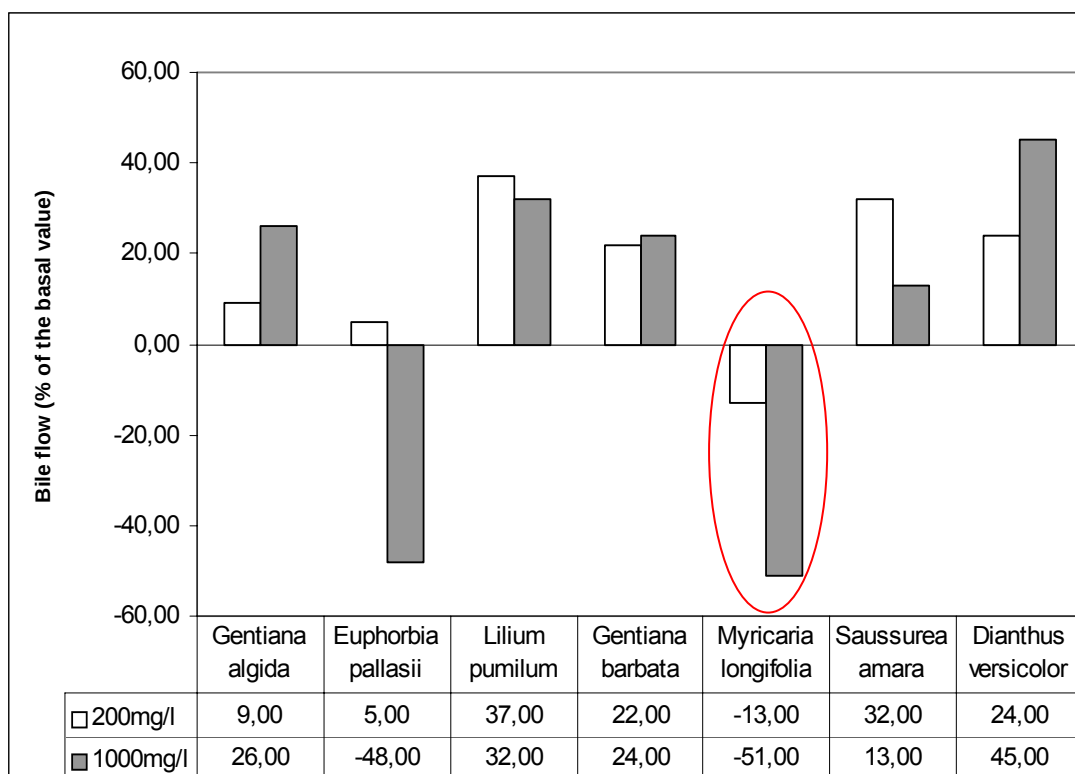


Abb. 1:
Einfluss ausgewählter Extrakte auf den Gallenfluss im Leberperfusionstest [4]

Um zu untersuchen, ob eine cytotoxische Wirkung vorliegt und die Verminderung des Gallenflusses eventuell darauf zurückzuführen ist, wurden weitere Tests durchgeführt. In einer Kooperation mit dem Department of Cell Biology der Universität Salzburg wurden die Pflanzenextrakte von *Dianthus versicolor*, *Gentiana barbata*, *Lilium pumilum* und *Myricaria longifolia* in einem in vitro-Assay an primären Rattenhepatocyten getestet. Dabei zeigte keines der Extrakte einen gentoxischen Effekt. Bei der Untersuchung eines wässrigen Extraktes von *Myricaria longifolia* konnte allerdings ein cytotoxischer Effekt nachgewiesen werden, der sich vor allem in einer nekrotischen Reaktion zeigt (siehe Abb. 2). Bei der höchsten getesteten Konzentration von 100µg/ml starben mehr als 30% der Zellen ab. Auf den apoptotischen Zelltod hatte das Extrakt keinen nachweisbaren Einfluss. [5]

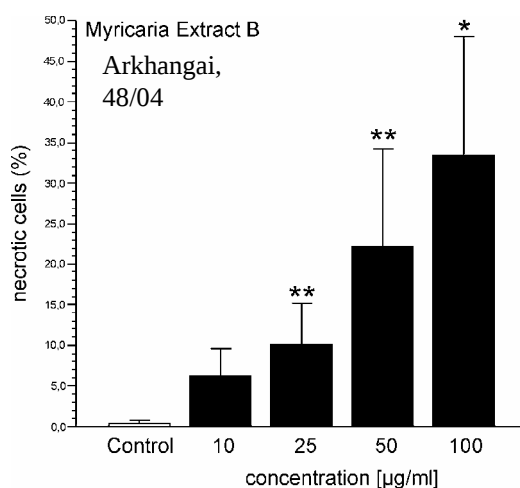


Abb. 2: Cytotoxischer Effekt des wässrigen Extraktes von *Myricaria longifolia* auf primäre Rattenhepatocyten in verschiedenen Konzentrationen [5]

Aufgrund dieses Ergebnisses waren weitere phytochemische Untersuchungen von Interesse, um die für die Wirkung verantwortlichen Substanzen zu identifizieren.

Der aus der Mongolei stammende Student Amarsanaa Badgaa führte an der Universität Wien am Department für Pharmakognosie analytische Arbeiten durch. Unter anderem wurde eine säulenchromatographische Auftrennung des Wasserextraktes an Sephadex LH-20 unternommen, um mehrere Fraktionen des Wasserextraktes zu erhalten. [6] Diese Fraktionen wurden neuerlich an primären Rattenhepatozyten auf eine cytotoxische Wirkung getestet. Wie in Abb. 3 ersichtlich ist, zeigte sich vor allem bei den Fraktionen S5-S11 eine nekrotische Aktivität. Die Zellen, die mit einer Lösung der Fraktion S9 behandelt wurden, starben zu ca. 90% ab. [7]

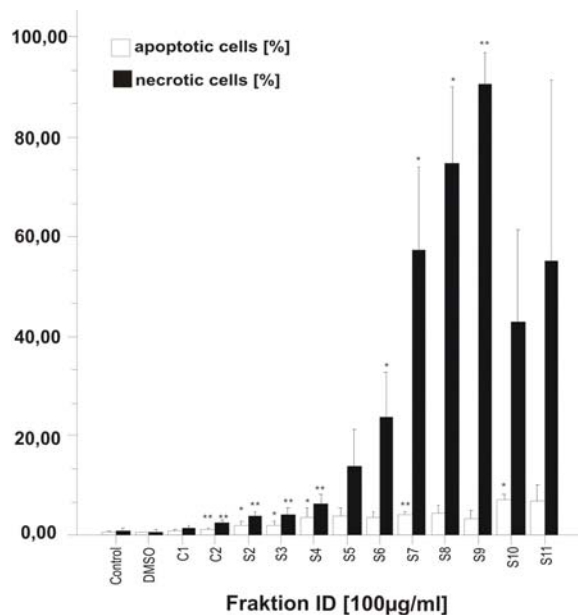


Abb. 3: Cytotoxischer Effekt der getesteten Fraktionen von *Myricaria longifolia* auf primäre Rattenhepatozyten in einer Konzentration von 100µg/ml [7]

1.2 PROBLEMSTELLUNG

Die Aufgabe der vorliegenden Diplomarbeit war eine an die Arbeit von Badgaa [6] anknüpfende phytochemische Analyse des wässrigen Extraktes von *Myricaria longifolia*, um vordergründig die für die Cytotoxizität verantwortlichen Stoffe oder Stoffgruppen zu identifizieren. Weiters ist die Charakterisierung und Identifizierung von jeglichen Inhaltsstoffen von Interesse, da über die Zusammensetzung der wässrigen Extrakte und über die Inhaltsstoffe von *Myricaria longifolia* allgemein noch wenig bekannt ist.

Zunächst wurde mit von Badgaa hergestellten Wasserextrakten und mittels Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen gearbeitet. [6] (Siehe Kap. 2.1.2, S. 18 und Kap. 2.1.4, S. 19). Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung der Fraktionen S2-S11 ergab das in Abb. 4 dargestellte Chromatogramm.

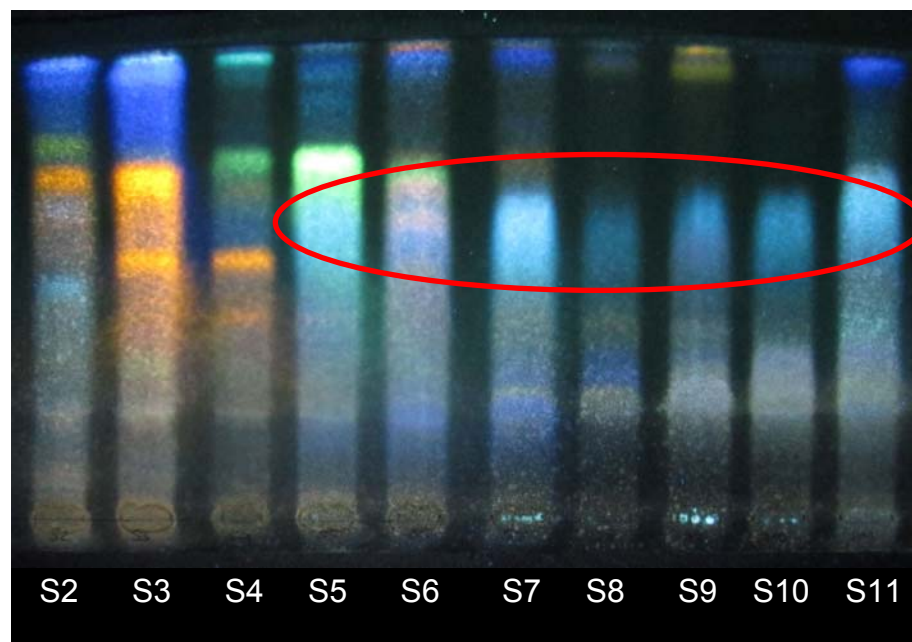


Abb. 4: Fraktionen S2-S11 eines wässrigen Extraktes von *Myricaria longifolia*, DC-System 1 (Kap. 2.2.1, Tab. 3, S. 21), Detektion nach Besprühen mit NSRA & PEG 400 bei 366nm

Nachdem die cytotoxische Wirkung am stärksten in den Fraktionen S5-S11 zu beobachten war (siehe Abb. 3, S. 13), waren die in diesen Fraktionen enthaltenen Substanzen von besonderem Interesse. Auffällig ist eine nach Besprühen mit Naturstoffreagens und Polyethylenglycol 400 unter UV 366nm blau fluoreszierende Substanz mit einem R_f -Wert von ca. 0,6 (siehe rote Markierung in Abb. 4, S. 14). Diese Substanz ist in allen wirksamen Fraktionen enthalten, weshalb eine Identifizierung erfolgen sollte.

Eine Isolierung dieser als UC2 (UC= Unknown Compound) bezeichneten Verbindung mittels semipräparativer HPLC war von Badgaa bereits durchgeführt worden, hat aber aufgrund der zu geringen Substanzmenge zu keiner eindeutigen Struktur geführt. [6] Daher waren weitere Analysen ausständig und Grundlage dieser Arbeit. Einerseits waren weitere Analysen des Wasserextraktes von Interesse, andererseits auch eine neuerliche säulenchromatographische Auftrennung des Extraktes, um aus den gewonnenen Fraktionen mehr Substanzmenge von UC2 und eventuell weitere Substanzen zu isolieren und eine Strukturaufklärung zu erreichen. Darüber hinaus sollten HPLC-Systeme entwickelt werden, um verschiedene Herkünfte qualitativ zu vergleichen.

1.3 MYRICARIA LONGIFOLIA EHRENB.

Myricaria longifolia gehört der Familie der Tamaricaceae an. Tamaricaceae sind Holzpflanzen oder perennierende Kräuter, deren Blätter und grüne Zweige nicht selten von Salzausscheidungen bedeckt sind, da sie überwiegend Xerophyten oder Halophyten sind. Sie kommen vor allem in trockenen Gebieten Europas und Zentralasiens vor. Die Tamaricaceae sind reich an Chloriden, die sich in den auffallenden Salzdrüsen befinden, und reich an Sulfaten, die als Gips in Form von drusenartigen Kristallen abgelagert sind. Diese Anreicherungen sind für die gesamte Familie charakteristisch. [8]



Abb. 5: *Myricaria longifolia* [7]

Myricaria longifolia ist eine 2-3m hohe Staudenpflanze mit einer leicht gelblichen Rinde. Die Blätter sind 0,8-1,5 cm lang, 1-1,5 mm breit, oblong oder oblong-oval geformt. Die Blüten stehen in traubigen Blütenständen.

Der mongolische Name der Pflanze *Myricaria longifolia* EHRENB. lautet „Urt navchit balgana“. Die in der traditionellen Medizin bei Fieber, Vergiftungssymptomen und Tuberkulose angewandten Pflanzenteile sind junge Zweige mit Blättern und Blüten. [9]

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Pflanzenmaterial

Das am Department für Pharmakognosie der Universität Wien vorhandene Pflanzenmaterial wurde in gemeinsamen Exkursionen mit den mongolischen universitären Partnern in verschiedenen Regionen der Mongolei gesammelt [10]. Sammelort und Sammeldatum sind aus Tab. 1 und Abb. 6 ersichtlich.

Sammelnummer	Sammel-Ort	Sammel-Datum	Extrahierte Organe	Extrakt-bezeichnung
20/03	Ulaanbataar - Tuul river	01.08.2003	Oberirdische Anteile	OWE 20/03
21/03	Ulaanbataar - Tuul river	01.08.2003	Oberirdische Anteile	OWE 21/03
48/04	Arkhangai aimag	23.08.2004	Oberirdische Anteile Blätter	OWE 48/04 Blätterextrakt 48/04

Tab. 1: Sammelnummer, -ort und -datum des verwendeten Pflanzenmaterials, sowie extrahierte Organe und Extraktbezeichnungen

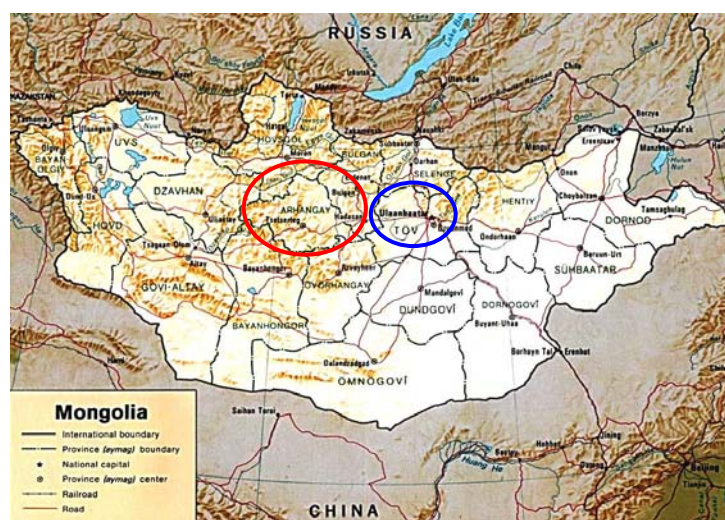


Abb. 6: Sammelorte des verwendeten Pflanzenmaterials (blau: Ulaanbataar, Sammelort von 20/03 und 21/03, rot: Provinz Arkhangai, Sammelort von 48/04) [5]

Innerhalb dieser Arbeit wurde ausschließlich mit bereits vorhandenen wässrigen Extrakten und mit daraus säulenchromatographisch gewonnen, von Badgaa hergestellten, Fraktionen gearbeitet [6].

2.1.2 Vorhandene Extrakte (OWEs)

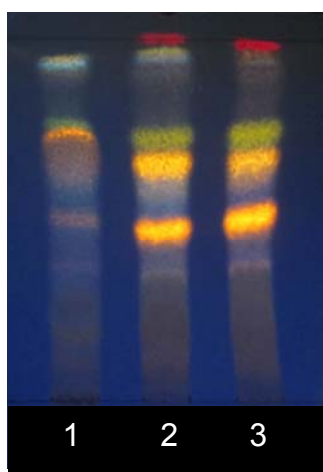
Im Laufe des Projektes zu TMM wurden von verschiedenen Studenten bereits Extrakte hergestellt, die in vorliegender Arbeit weiter analysiert wurden.

Die traditionellen Zubereitungen, die bei Lebererkrankungen in der TMM Verwendung finden, sind hauptsächlich Mischungen von gepulverten Drogen. Die Einnahme erfolgt meist durch Schlucken des Pulvers und Nachtrinken von reichlich Wasser. Um diese Einnahmeweise und das saure Magenmilieu beim Extrahievorgang zu simulieren, wurde mit auf pH 2 eingestelltem Wasser eine Stunde lang unter Schütteln bei 40°C extrahiert. In der Literatur werden diese Extrakte „Crude water extract“ oder auch „Original Water Extract“ (= OWE) genannt. Anschließend erfolgte eine Trocknung mittels Lyophilisation. [1, 7]

Die in vorliegender Arbeit bearbeiteten wässrigen Extrakte werden – bezogen auf Sammelcharge und Extrahievorgang - **OWE 20/03**, **OWE 21/03** und **OWE 48/04** bezeichnet. Bei diesen ‚Original Water Extracts‘ bestand das Drogenmaterial aus allen oberirdischen Teilen. Zusätzlich waren allerdings auch OWEs aus der reinen Blattdroge von 48/04 hergestellt worden. Diese werden als **Blätterextrakte 48/04** bezeichnet. (Siehe Tab. 1, S. 17)

2.1.3 Ausgangsmaterial für die Säulenchromatographie

Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten, musste darauf geachtet werden genügend Ausgangsmaterial zu verwenden. Deswegen wurden verschiedene vorhandene Blätterextrakte dünnschichtchromatographisch verglichen. Diese Blätterextrakte entstammen alle drei der Charge 48/04 und waren in den Jahren 2005 - 2008 von verschiedenen Studenten im Rahmen des Projektes hergestellt worden. Nach dem Vergleich der Banden konnten zwei dieser Extrakte aufgrund der ähnlichen qualitativen Zusammensetzung vereint werden. Wie aus Abb. 7 (siehe S. 19) ersichtlich wird, ähneln sich Nr. 2 und Nr. 3 sehr. Die rote Zonierung der Banden 2 und 3 an der Fließmittelfront entspricht dem in den Blätterextrakten reichlich vorhandenen Chlorophyll.



BE 48/04

Die vereinigten Blätterextrakte wurden säulenchromatographisch aufgetrennt (siehe Kap. 3.2.1, S. 47 ff) und werden im weiteren Verlauf der Arbeit als **BE 48/04** bezeichnet.

Abb. 7: Vergleich von Blätterextrakten der Charge 48/04, hergestellt in verschiedenen Jahren, mittels DC-System 1 (Kap. 2.2.1, Tab. 3, S. 21), Detektion nach Besprühen mit NSRA & PEG 400 bei 366nm

2.1.4 Vorhandene Fraktionen

Die Gewinnung der Fraktionen war im Zuge von phytochemischen Arbeiten an *Myricaria longifolia* durch Badgaa erfolgt. [6] Die Fraktionen C1, C2 und S2-S11 wurden mittels Säulenchromatographie gewonnen, als stationäre Phase diente Sephadex LH-20. Die mobile Phase wurde von einem in Tab. 2 beschriebenen Gradienten gebildet.

Elutionsmittel je 200ml pro Fraktion	Bezeichnung der Fraktion
Wasser	C1
Wasser	C2
20% Methanol	S2
20% Methanol	S3
40% Methanol	S4
40% Methanol	S5
60% Methanol	S6
60% Methanol	S7
80% Methanol	S8
80% Methanol	S9
100% Methanol	S10
100% Methanol	S11

Tab. 2: Gewinnung der Fraktionen durch säulenchromatographische Aufreinigung von OWE 48/04 an Sephadex LH-20 [6]

2.2 METHODEN

2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die DC ist - wie jedes chromatographische System - ein physikalisch-chemisches Verfahren zur Stofftrennung. Substanzgemische werden durch unterschiedliche Verteilung der Komponenten zwischen einer mobilen flüssigen und einer stationären festen Phase getrennt. Am unteren Rand der DC-Platte wird die Probenlösung mittels Mikropipette aufgetragen und nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt die Entwicklung in einer Trennkammer. Durch Kapillarkräfte steigt die mobile Phase über die Startzone nach oben auf und nimmt dabei Substanzen mit, die durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit der stationären Phase retardiert werden. Nachdem die Front des Laufmittels eine ausreichende Strecke zurückgelegt hat, wird die Platte aus der Trennkammer genommen und getrocknet. Da die aufgetrennten Substanzen die Trennstrecke nicht verlassen, erhält man bei dieser chromatographischen Methode ein inneres Chromatogramm. [11]

Die DC hat den Vorteil, dass sie eine schnelle und einfache Möglichkeit darstellt, Substanzgemische chromatographisch zu analysieren und findet daher in der Phytochemie häufig Anwendung. Sie erlaubt neben dem qualitativen Nachweis auch eine semiquantitative Aussage über die Hauptwirkstoffe einer Droge oder einer Drogenzubereitung. [12]

Die Dünnschichtchromatographie kann sowohl analytisch als auch präparativ genutzt werden. Innerhalb dieser Arbeit kam sie ausschließlich für analytisches Arbeiten zur Anwendung.

	Stationäre Phase	Mobile Phase
DC-System 1	Kieselgel 60 F ₂₅₄	Ethylacetat - Ameisensäure conc. - Essigsäure conc. - Wasser (100-11-11-26)
DC-System 2	Cellulose	Butanol - Essigsäure conc. - Wasser (4-1-5) Ausgeschüttelt → obere Phase = Fließmittel

Tab. 3: Parameter der angewandten DC-Systeme

Die Parameter der angewandten DC-Systeme sind in Tab. 3 zusammengefasst. Die Detektion erfolgte bei Tageslicht, unter UV-Licht 254nm und UV 366nm. Es kamen auch unterschiedliche Sprühreagenzien zum Einsatz, da einige Substanzen charakteristische Farbreaktionen ergeben oder erst sichtbar werden.

- **Naturstoffreagens A (NSRA) und Polyethylenglycol (PEG) 400**
NSRA ist eine 1%-ige methanolische Lösung von Diphenylborsäure-β-aminoethyl-ester. Es ist besonders geeignet, um Flavone und Pflanzensäuren sichtbar zu machen. PEG 400 erhöht die Nachweisempfindlichkeit und fixiert die Farbe auf der Platte. Die Detektion erfolgt bei UV 366nm nach dem Besprühen.
- **Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AS)**
Die Zusammensetzung des Reagens lautet wie folgt:
Anisaldehyd-Eisessig-Methanol-Schwefelsäure conc. (0,5-10-85-5)
Nach dem Besprühen wird die Platte im Trockenschrank ca. fünf Minuten bei 105°C erhitzt und anschließend erfolgt die Detektion bei Tageslicht.

2.2.2 Säulenchromatographie (SC)



Unter Säulenchromatographie versteht man die chromatographische Trennung von Substanzgemischen an in Säulen gepackten stationären Phasen. Das zu trennende Gemisch wird am Säulenkopf aufgetragen und wandert mit der mobilen Phase, die auch als Eluent bezeichnet wird, durch die Säule. Bedingt durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase werden unterschiedliche Substanzen unterschiedlich stark von der stationären Phase zurückgehalten und verlassen daher zu verschiedenen Zeiten die Säule. [13]

Abb. 8:
Die zur Anwendung gekommene Säule

Die Trennung des Substanzgemisches der durchgeführten SC wird einerseits durch Größenausschlusschromatographie erreicht, als auch aufgrund des adsorptionschromatographischen Trennprinzips. Dieser Besonderheit liegt die stationäre Phase Sephadex LH-20 zugrunde. Sephadex ist ein quervernetztes Dextrangel. Sephadex LH-20 ist durch zusätzliche Hydroxypropyl-Gruppen lipophilisiert und deshalb organophil. Aufgrund dieser organophilen Matrix ist es möglich, organische Lösungsmittel anzuwenden. Sephadex hat sich zur Abtrennung höhermolekularer Substanzen bewährt und ist deshalb zur Analyse komplexer Pflanzenextrakte gut geeignet. Hierbei spielen vor allem die Trennungen nach der Molekülgröße eine Rolle. Bei den phenolischen Verbindungen treten allerdings Adsorptionseffekte an der Matrix in den Vordergrund. Phenolische Verbindungen eluieren deutlich später als nicht phenolische Substanzen und können somit selektiv von nicht-phenolischen Probenkomponenten abgetrennt werden. [13]

Die Eluierung erfolgte mittels Gradientenelution (Gradient Methanol - Wasser) und die austretenden Eluate wurden volumetrisch fraktioniert.

Die SC wird auch als klassische SC bezeichnet und wurde in dieser Arbeit zur präparativen Trennung eingesetzt, um aus einem OWE Fraktionen zu gewinnen.

Allgemeine Säulenparameter:

Glassäule

Durchmesser: 3,5 cm

Stationäre Phase:

Sephadex LH-20, in Methanol gequollen, Korngröße 25-100 µm, Länge 45 cm

Mobile Phase: Gradient Methanol - Wasser (siehe Tab. 4)

Tropfgeschwindigkeit: ca. 40 Tropfen/Minute

Aufgetragene Extraktmenge: 3g

Elutionsmittel je 200ml pro Fraktion	Bezeichnung der Fraktion
Wasser	Ia, Ib, Ic
20% Methanol	IIa, IIb
40% Methanol	IIIa, IIIb, IIIc
60% Methanol	IVa, IVb, IVc, IVd
80% Methanol	Va, Vb
100% Methanol	VIa, VIb, VIc, VId, VIe, VIg, VIh

Tab. 4: Gewinnung der Fraktionen durch säulenchromatographische Aufreinigung von BE 48/04 (siehe Abb. 7, S. 19) an Sephadex LH-20

2.2.3 High performance liquid chromatography (HPLC)

Die HPLC ist eine trennanalytische Methode für in Flüssigkeiten lösliche Stoffgemische und dient auch der präparativen Trennung von Stoffen. [11]

Bei der HPLC befindet sich die stationäre Phase in Trennsäulen aus Edelstahl, deren Länge 5-30 cm beträgt und deren Innendurchmesser bei 1,5-8 mm liegt. Die mobile Phase wird mittels einer Pumpe bei Drücken von bis zu 400 bar durch die Trennsäule gepumpt. Aufgrund mikroprozessorgesteuerter Gradientenmischer können variable Mischungen aus zwei oder mehr Elutionsmitteln hergestellt werden. An dem Auslass der Säule ist ein Detektor angeschlossen, der ein der Substanzmenge äquivalentes elektrisches Signal liefert. [14]

Die Analytik biogener Arzneistoffe wurde durch die HPLC entscheidend weiterentwickelt. Wesentlich war die Einführung von derivatisierten Kieselgelen mit apolarer Oberfläche (Reversed Phase = RP) als stationäre Phase. Der Vorteil der HPLC liegt darin, dass mit einer stationären Phase und verhältnismäßig einfachen, Wasser enthaltenden Lösungsmittelgemischen, sowie mit wenigen Modifikatoren ca. 80% der Trennprobleme im Bereich der Naturstoffe gelöst werden können. [13]

In vorliegender Arbeit wurde als stationäre Phase RP-18-Material verwendet. Als mobile Phase dienten Elutionsmittelgemische bestehend aus Acetonitril - Wasser und Methanol - Wasser. Das Wasser wurde mit konzentrierter Ameisensäure auf einen pH-Wert von 2,8 eingestellt, um allfällig vorhandene Phenole aus der Phenolatform in die Form des freien Phenols zu drängen. Phenolate zeigen eine Wechselwirkung mit dem schwach sauren Kieselgel und führen somit zu Tailing. Durch Senken des pH-Wertes kann das verhindert werden, und es resultieren symmetrische Peaks. Die Elution erfolgte mittels Gradientenelution. Durch die Änderung der Eluentenzusammensetzung hin zu höheren Anteilen an organischen Lösungsmitteln steigert man die Elutionskraft mit der Zeit. [11]

Zur Detektion der Substanzen kamen verschiedene Detektoren zum Einsatz. Der Dioden-Array-Detektor (= DAD) ist ein UV/Vis-Messgerät, das dank der Anordnung von einigen hundert Dioden auf einem „Schirm“ (Array) das gesamte Absorptionsspektrum der eluierenden Substanzen messtechnisch

erfassen kann. Dabei resultiert im Prinzip ein dreidimensionales Chromatogramm mit den Koordinaten Elutionszeit, Wellenlänge und Absorption. Bei der Analyse mittels Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (Evaporative Light Scattering Detector = ELSD) wird das Eluat nach der Trennung zusammen mit einem warmen, partikelfreien Luftstrom in ein Interface eingesprüht. Das Lösungsmittel verdampft, und es entsteht ein Nebel aus kleinen Partikeln, die von einer Lichtquelle bestrahlt werden. Das resultierende Streulicht wird von einem Photomultiplier gemessen. Das resultierende Signal ist über einen weiten Bereich proportional zur Konzentration des Analyten im Eluat. [13]

Innerhalb dieser Arbeit wurde die HPLC sowohl für Analysenzwecke genutzt, als auch im präparativen Maßstab, um eine Substanz zu isolieren.

Die angewandten HPLC-Methoden sind in den Tabellen 5 – 7 genau beschrieben. Sie unterscheiden sich in Gerätetypen, Detektoren, mobiler und stationärer Phase. Während Lösungen von Reinsubstanzen für Vergleichszwecke in einer Konzentration von 0,005% zur Einspritzung kamen, wurden für die Analyse der Extrakte und Fraktionen Lösungen im Konzentrationsbereich von 1%-5% hergestellt.

	HPLC-Methode 1
Geräte	Shimadzu Degaser DGU-20A ₅ Shimadzu Autosampler SIL-20AC HT Shimadzu DAD SPD-M20A Shimadzu Säulenofen CTO-20AC
Software	Shimadzu LAB-Solution-LC-Solution
Säule	LiChrospher® 100 RP-18e Länge: 250 mm Durchmesser: 4,6 mm Teilchengröße: 5,0 µm
Stationäre Phase	RP 18 e
Mobile Phase	Mischung Methanol-Wasser Wasser angesäuert auf pH 2,8 (mit Ameisensäure conc.)
Gradient	Startkonzentration 10% Methanol 10% → 40% in 30 min (1%/min) 40% → 100% in 20 min (3%/min)
Flussrate	1 ml/min
Detektion	DAD
Einspritzvolumen	10 µl

Tab. 5: Parameter der HPLC-Methode 1

	HPLC-Methode 2
Geräte	Shimadzu Degaser DGU-20A ₅ Shimadzu Autosampler SIL-20AC HT Shimadzu DAD SPD-M20A Shimadzu Säulenofen CTO-20AC
Software	Shimadzu LAB-Solution-LC-Solution
Säule	Acclaim ® Länge: 150 mm Durchmesser: 2,1 mm Teilchengröße: 3,0 µm
Stationäre Phase	RP 18 e
Mobile Phase	Mischung Acetonitril-Wasser Wasser angesäuert auf pH 2,8 (mit Ameisensäure conc.)
Gradient	Startkonzentration 5% Acetonitril 5% → 15% in 13 min Isokatisch für 6 min 15% → 35% in 11 min 35% → 55% in 8 min
Flussrate	0,4 ml/min
Detektion	DAD, ELSD, MS
Einspritzvolumen	3-5 µl

Tab. 6: Parameter der HPLC-Methode 2

	HPLC-Methode 3
Geräte	Merck HITACHI Pump L-7100 Merck HITACHI Diode Array Detector L-7450 Merck HITACHI Interface D-7000
Software	D-7000 HSM
Säule	LiChrospher ® 100 RP-18e Länge: 250 mm Durchmesser: 4,6 mm Teilchengröße: 5,0 µm
Stationäre Phase	RP 18 e
Mobile Phase	Mischung Methanol-Wasser Wasser angesäuert auf pH 2,8 (mit Ameisensäure conc.)
Gradient	Startkonzentration: 35% Methanol 35% → 45% in 20 min
Flussrate	1 ml/min
Detektion	DAD
Einspritzvolumen	20 µl

Tab. 7: Parameter der HPLC-Methode 3

2.2.4 Massenspektrometrie (MS)

Die MS ist nicht wie die bisher besprochenen Methoden eine Trennmethode, sondern dient der Aufklärung von Strukturen. Sie spielt in der Analytik biogener Arzneistoffe eine wichtige Rolle, da man entscheidende Moleküldaten wie z.B. Molmasse, Summenformel und Informationen über Partialstrukturen erhält.

Das Prinzip der MS liegt darin, dass Probenmaterial ionisiert wird, und die gebildeten Ionen nach ihrer Masse und Ladung aufgetrennt werden. Danach werden sie mittels Detektions- und Auswertesystemen nach Masse und Häufigkeit mit Hilfe von Analysatoren qualitativ und quantitativ charakterisiert. Massenspektrometer bestehen aus vier Bauelementen: einer Probenzuführungseinheit, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem geeigneten Detektor mit angeschlossener Datenverarbeitung. [13]

In vorliegender Arbeit wurden HPLC-MS (= LC-MS) - Analysen durchgeführt, das heißt, dass die MS mit der HPLC gekoppelt ist. Es gibt verschiedene Methoden der Ionisation, innerhalb dieser Arbeit kam das Elektrospray-Verfahren zum Einsatz. Dabei wird die Probe über eine unter Spannung stehende Kapillare in ein elektrisches Feld versprüht. Hauptziel der Ionisierung ist die Bildung unzerstörter Molekülionen zur Identifizierung der Substanzen anhand der Molekularmassen. Deswegen werden die sogenannten „weichen“ Ionisationsverfahren, wie eben auch das Elektrospray-Verfahren, bevorzugt. [13]

Als Massenanalysator enthielt das zum Einsatz gekommene Gerät eine Ionenfalle. Hierbei werden Ionen auf bestimmten, ihrem m/z -Verhältnis entsprechenden zyklischen Bahnen gehalten, wodurch sie für eine gewisse Zeit „aufbewahrt“ werden können. Danach wird die elektrische Einstellung stetig verändert, um die Ionen nach steigendem m/z aus der Ionenfalle zu „entlassen“ und daraufhin eine Registrierung durch den Detektor zu ermöglichen. [15] Durch die schrittweise Fragmentierung (MS^2 - MS^n) erhält man weitere Ionen, wodurch man zusätzliche Informationen zu Molekülteilstrukturen erhält.

Die Geräte-Parameter der durchgeführten HPLC-MS-Analysen sind in Tab. 8 zusammengefasst.

	Massenspektrometer
Gerät	Bruker Daltonics ESI-IT-MS
Ionisation	Elektrospray
Ionenpolarität	Negativ
Trocknungstemperatur	320°C
Trocknungsgasfluss	8 l/min (N ₂)
Vernebler	22 psi (N ₂)
Kapillarenspannung	4,0 kV
Messbereich MS	100 – 1000 m/z
Messbereich MS (n)	40 – 1000 m/z
Durchschnittliche Anzahl MS	5 Spektren
Durchschnittliche Anzahl MS (n)	3 Spektren
Kollisionsgas	Helium 5.0
	HPLC-Einheit
Gerät	Dionex UltiMate 3000 RSLC-series System
Parameter	siehe HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27)

Tab. 8: Parameter der LC-MS-Methode

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 ANALYTISCHER TEIL

Im analytischen Teil werden die vorhandenen OWEs sowie die Fraktionen und UC2 analysiert. Es kamen DC, HPLC und LC-MS zum Einsatz.

3.1.1 Analyse der OWEs

Zu Beginn des analytischen Arbeitens war ein Vergleich der verschiedenen vorhandenen OWEs von Interesse und die Auswahl eines der drei OWEs, um dieses weiter zu analysieren. Es zeigte sich, dass die Entwicklung einer geeigneteren HPLC-Methode notwendig war, um bessere Trennergebnisse der enthaltenen Substanzen zu erreichen. Deswegen erfolgte eine Methodenoptimierung. Weiters wurde OWE 48/04 Vergleichen mit Reinsubstanzen mittels HPLC unterzogen.

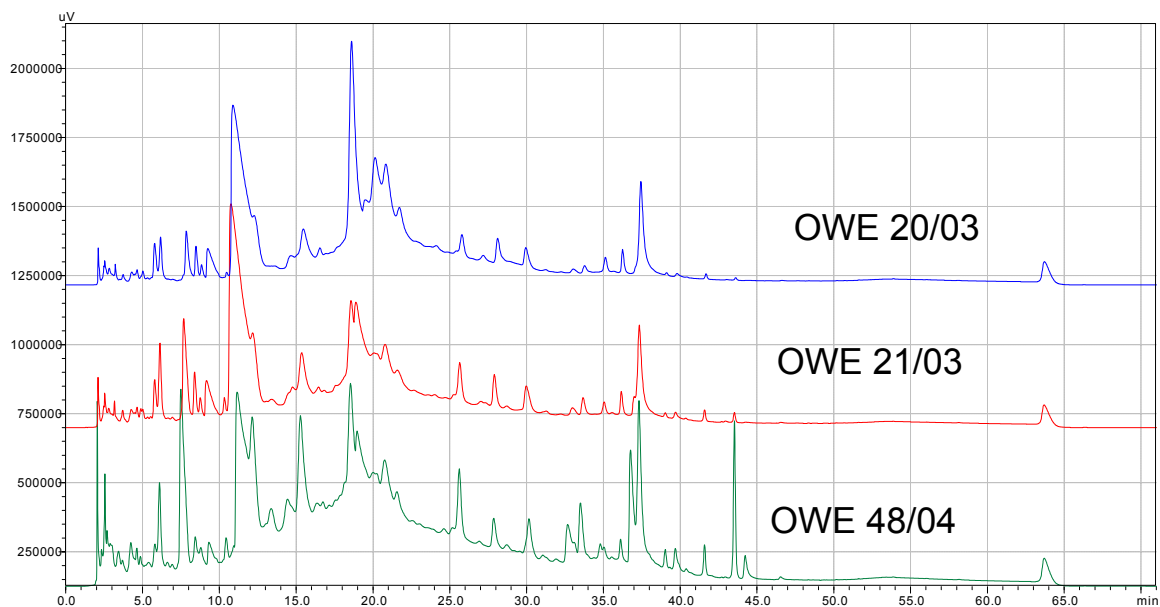


Abb. 9: Vergleich von OWEs unterschiedlicher Chargen (siehe Kap. 2.1, S. 17/18) mittels HPLC-Methode 1 (siehe Kap. 2.2.3, Tab. 5, S. 26) bei 254nm

Beim Vergleich der drei Original Water Extracts der unterschiedlichen Sammelorte und -daten wird die Ähnlichkeit deutlich. Die weniger polaren Inhaltsstoffe mit den Retentionszeiten 32-34 min, 36-37 min und 43-44 min in OWE 48/04 dürften etwas höher konzentriert sein als in den anderen beiden OWEs. Ansonsten spricht der Befund nach HPLC-Analyse für eine sehr ähnliche qualitative Zusammensetzung mit natürlichen Schwankungen. Zur weiteren Analyse wurde OWE48/04 ausgewählt. Einerseits, weil die auf Cytotoxizität getesteten und mittels SC hergestellten Fraktionen auch aus dem OWE 48/04 stammen, und andererseits war die vorhandene Extraktmenge bei OWE 48/04 am größten.

Sehr deutlich ist in dem Chromatogramm zu erkennen, dass es sich bei den Extrakten um Vielstoffgemische handelt, die eine Optimierung der für analytische Zwecke notwendigen Trennung erforderte (siehe Kap. 3.1.1.1).

3.1.1.1 Methodenoptimierung

Durch Änderung von Fließmittelzusammensetzung, Gradienten, Dauer, Flussrate, Temperatur, Säulenmaterial (Zusammensetzung, Durchmesser der Partikel), Länge und Durchmesser der Säule sowie Änderung einiger weiterer Parameter kann eine bessere Trennleistung erzielt werden. Aufgrund der vielen Parameter, die das Retentionsverhalten der Substanzen und die Trennleistung beeinflussen können, sind oft viele Optimierungsschritte notwendig. Die Methodenoptimierung für das OWE 48/04 erstreckte sich über mehr als 17 Versuche bevor die, in dieser Arbeit als HPLC-Methode 2 beschriebene Methode, beibehalten wurde (siehe Tab. 6, S. 27). Die Ausgangsmethode HPLC-Methode 1 (siehe Tab. 5, S. 26) wurde nach und nach mit dem Ziel modifiziert, eine bessere Trennleistung zu erreichen. Die Änderungen wurden schrittweise vorgenommen und resultierten in Optimierungsmethoden 1-17. Drei davon führten zu deutlich besseren Trennergebnissen, sie sind in Tab. 9 (S. 32) zusammengefasst. Die dazugehörigen Chromatogramme sind in Abb. 10 – 13 dargestellt (S. 33/34).

	Durchgeführte Veränderungen
Optimierungsmethode 1 Mobile Phase: Gradient:	Umstellung des organischen Anteils von Methanol auf Acetonitril Mischung Acetonitril-Wasser Wasser angesäuert auf pH 2,8 (mit Ameisensäure conc.) Startkonzentration 10% Acetonitril 10% → 40% in 30 min (1%/min) 40% → 100% in 20 min (3%/min)
Optimierungsmethode 5 Mobile Phase: Gradient:	Andere Startkonzentration, langsamere Steigerung des organischen Anteils und teilweise isokratische Elution Mischung Acetonitril-Wasser Wasser angesäuert auf pH 2,8 (mit Ameisensäure conc.) Startkonzentration 5% Acetonitril 5% → 15% in 20 min (0,5%/min) 15% → 15% 10 min (isokratisch) 15% → 40% in 25 min (1%/min) 40% → 55% in 5 min (3%/min)
Optimierungsmethode 10 Mobile Phase: Gradient:	Kürzere Säule mit geringerem Durchmesser und kleinerer Partikelgröße, noch langsamere Steigerung des organischen Anteils zu Beginn Mischung Acetonitril-Wasser Wasser angesäuert auf pH 2,8 (mit Ameisensäure conc.) Startkonzentration 5% Acetonitril 5% → 15% in 10 min (0,5%/min) 15% → 15% 9 min (isokratisch) 15% → 40% in 9 min (1%/min) 40% → 55% in 2 min (3%/min)

Tab. 9: Ausgewählte Optimierungsschritte in der Methodenoptimierung

Der erste Versuch war eine Umstellung der mobilen Phase von einer Methanol-Wasser-Mischung auf eine Acetonitril-Wasser-Mischung. Hier ergibt sich eine dramatische Verkürzung der Retentionszeiten durch die höhere Elutionskraft von Acetonitril, wie in Abb. 10 ersichtlich wird.

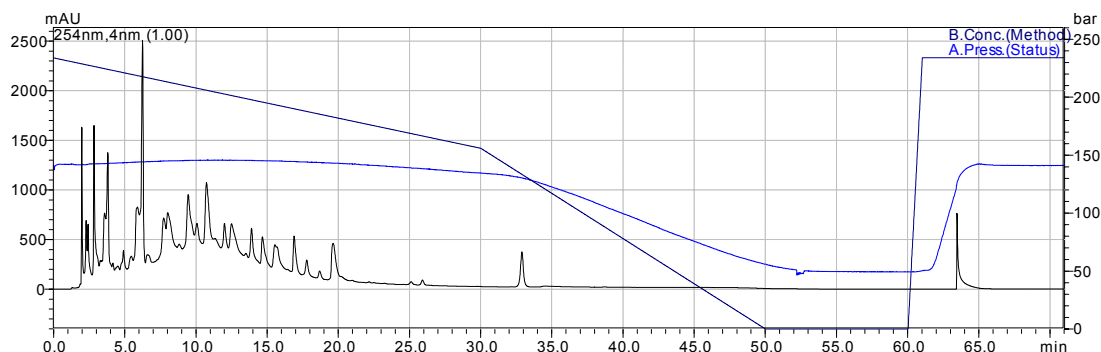


Abb. 10: Analyse von OWE 48/04 mittels HPLC-Optimierungsmethode 1 (siehe Tab. 9, S. 32)

In der Folge wurde die Startkonzentration von 10% Acetonitril auf 5 % gesenkt und eine langsamere Steigerung des organischen Anteils unternommen, um einen längeren Verbleib der Substanzen auf der Säule zu erzielen. Auch der isokratische Schritt sollte eine verbesserte Trennung erzielen. Wie in Abb. 11 zu erkennen ist, haben diese Veränderungen tatsächlich eine deutliche Verbesserung der Trennleistung bewirkt.

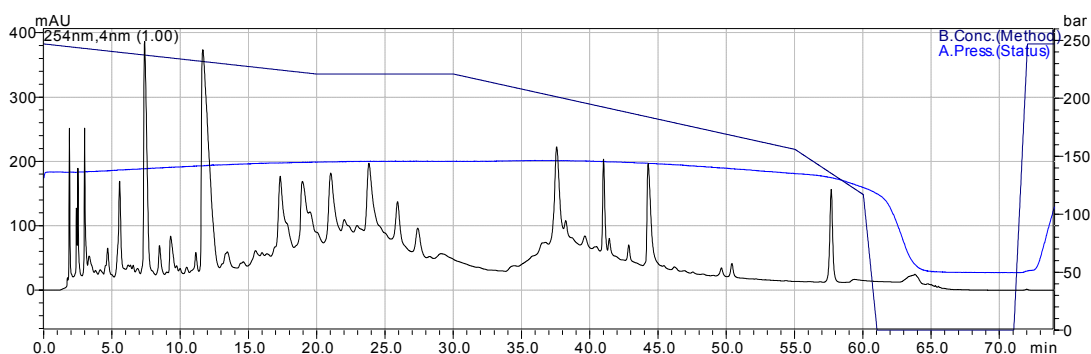


Abb. 11: Analyse von OWE 48/04 mittels HPLC-Optimierungsmethode 5 (siehe Tab. 9, S. 32)

Um die doch sehr lange Methode zu verkürzen und eventuell noch Verbesserungen in der Peakschärfe zu erzielen, wurde mit einer kleiner dimensionierten RP 18 e - Säule gearbeitet (siehe Tab. 10, S. 34).

Mit Hilfe eines Umrechnungsprogramms (Dionex UltiMate 3000_RSLC Method Speed-Up Tool 1.14i) wurden die neuen Parameter ermittelt, um eine vergleichbare Methode mit der neuen Säule zu ermöglichen.

	Säule 1	Säule 2
Stationäre Phase	LiChrospher ® 100 RP-18e	Acclaim ® RP-18e
Länge	250 mm	150 mm
Durchmesser	4,6 mm	2,1 mm
Partikelgröße	5,0 µm	3,0 µm

Tab. 10: Gegenüberstellung der Säulenparameter

Aufgrund des kleineren Durchmessers und der geringeren Partikelgröße der Säule 2 kam es zu einer starken Druckerhöhung und die Flussrate musste von 1,0 ml/min auf 0,35 ml/min gesenkt werden. Der große Vorteil der neuen Säule lag vor allem in der beachtlichen Verkürzung der Analysenzeit. Benötigte die Methode mit Säule 1 75 min, konnte durch die Anwendung von Säule 2 die Dauer auf nur 45 min gesenkt werden (siehe Abb. 12). Außerdem konnte das Einspritzvolumen von 10 µl auf 3-5 µl verringert werden.

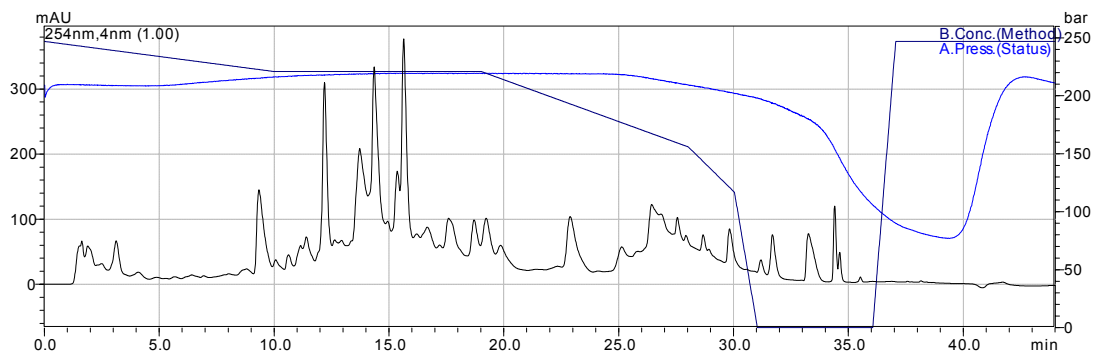


Abb. 12: Analyse von OWE 48/04 mittels HPLC-Optimierungsmethode 10 (siehe Tab. 9, S. 32)

Nach einigen Versuchen, die Methode weiter zu optimieren, indem einerseits der Anstieg der Acetonitril-Konzentration verlangsamt wurde und andererseits die isokratische Elution verlängert wurde, wurde mit dem 17. Optimierungsschritt die HPLC-Methode 2 (siehe Tab. 6, S. 27) erreicht, die dann für die weiteren Analysen von OWE 48/04 beibehalten wurde.

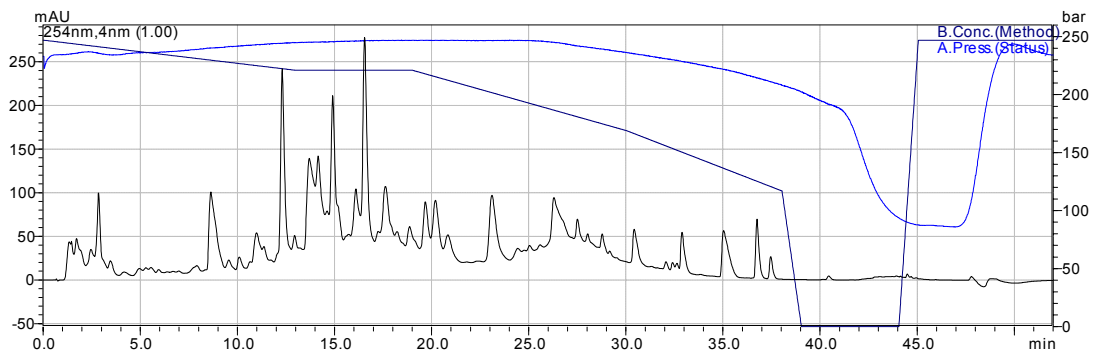


Abb. 13: Analyse von OWE 48/04 mittels HPLC-Methode 2 (siehe Tab. 6, S. 27)

3.1.1.2 Vergleich von OWE 48/04 mit ausgewählten Reinsubstanzen

Aufgrund einer Literaturrecherche über die Inhaltsstoffe verschiedener *Myricaria*-Arten wurden zunächst einige Flavonoide ausgewählt und die Reinsubstanzen mittels der in Kap. 3.1.1.1 entwickelten HPLC-Methode 2 verglichen.

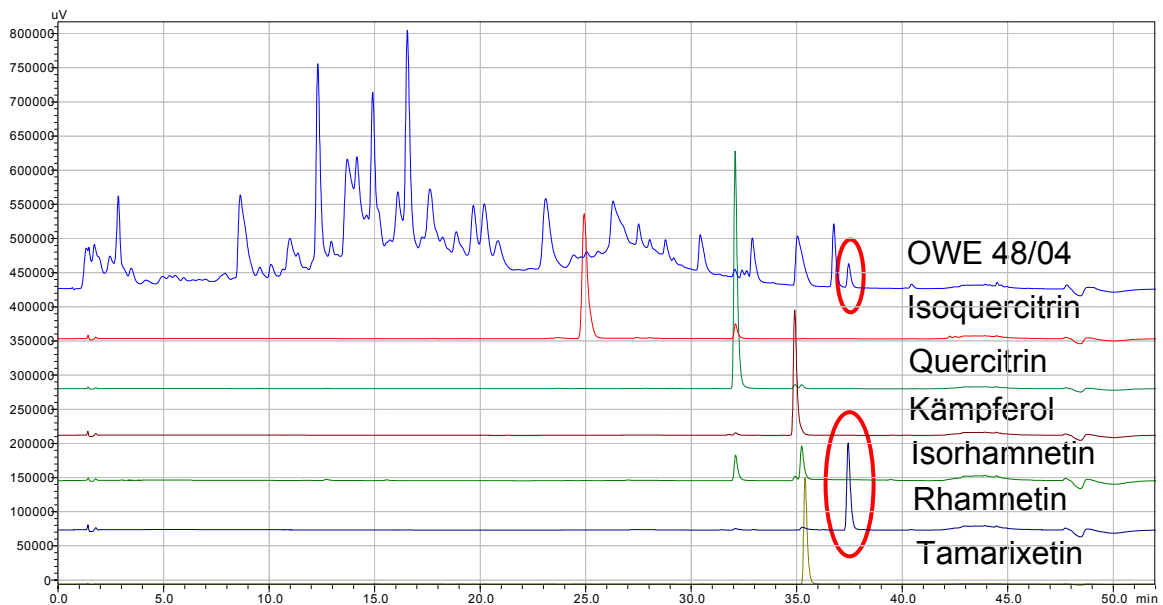


Abb. 14: Vergleich von OWE 48/04 mit ausgewählten Flavonoiden mittels HPLC-Methode 2 (siehe Tab. 6, S. 27) bei 254nm

Es können die Retentionszeiten der Reinsubstanzen mit denen der im OWE enthaltenen Substanzen verglichen werden. Weiters können auch die zum jeweiligen Zeitpunkt erhaltenen UV-Spektren verglichen werden. Interessant ist die Substanz Rhamnetin, deren Retentionszeit einem Peak im Chromatogramm des OWEs entspricht. Die Charakterisierung und Identifizierung dieser Substanz ist in Kap. 3.3.1, S. 60 f beschrieben.

Bei den anderen Substanzen gibt es keinen eindeutigen Hinweis, dass sie im OWE enthalten sind. Die Analyse eines OWEs – wie auch jedes anderen Extraktes – beinhaltet die Problematik, dass eine Fülle an Substanzen enthalten ist und diese im Chromatogramm überlappend erscheinen. Die erhaltenen UV-Spektren sind demnach häufig Mischspektren. Hingegen sind die UV-Spektren der Reinsubstanzen für diese charakteristisch. Aufgrund der

Mischspektren ist es möglich, dass Substanzen im Chromatogramm nicht zugeordnet werden können, auch wenn diese enthalten wären. Hier sind weitere Analysen durch Kombination mit anderen Verfahren wie z.B. der MS hilfreich.

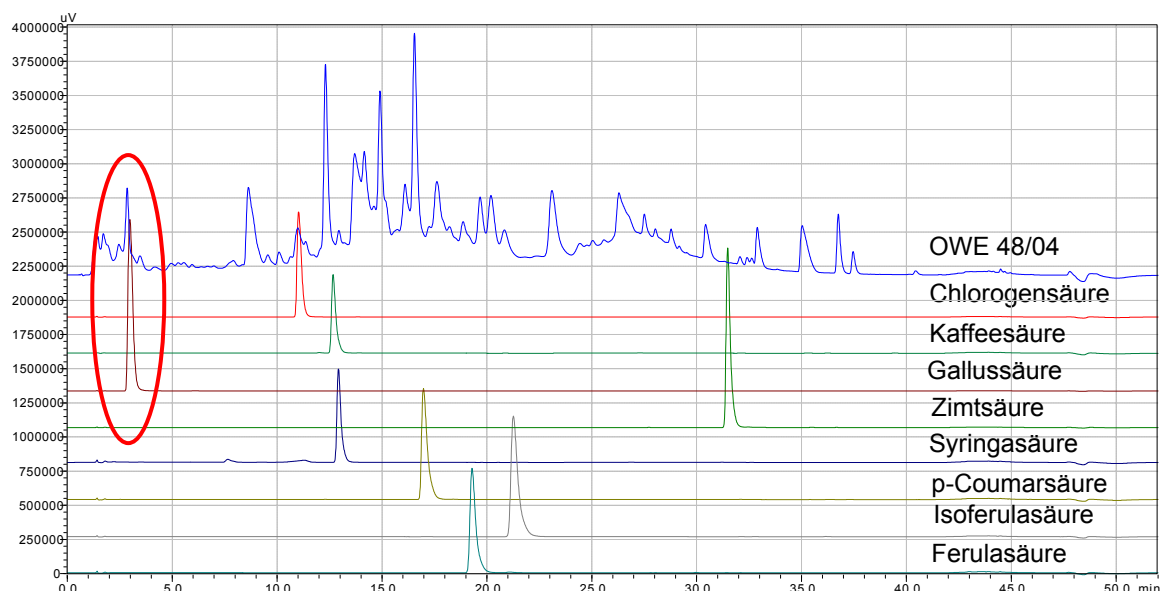
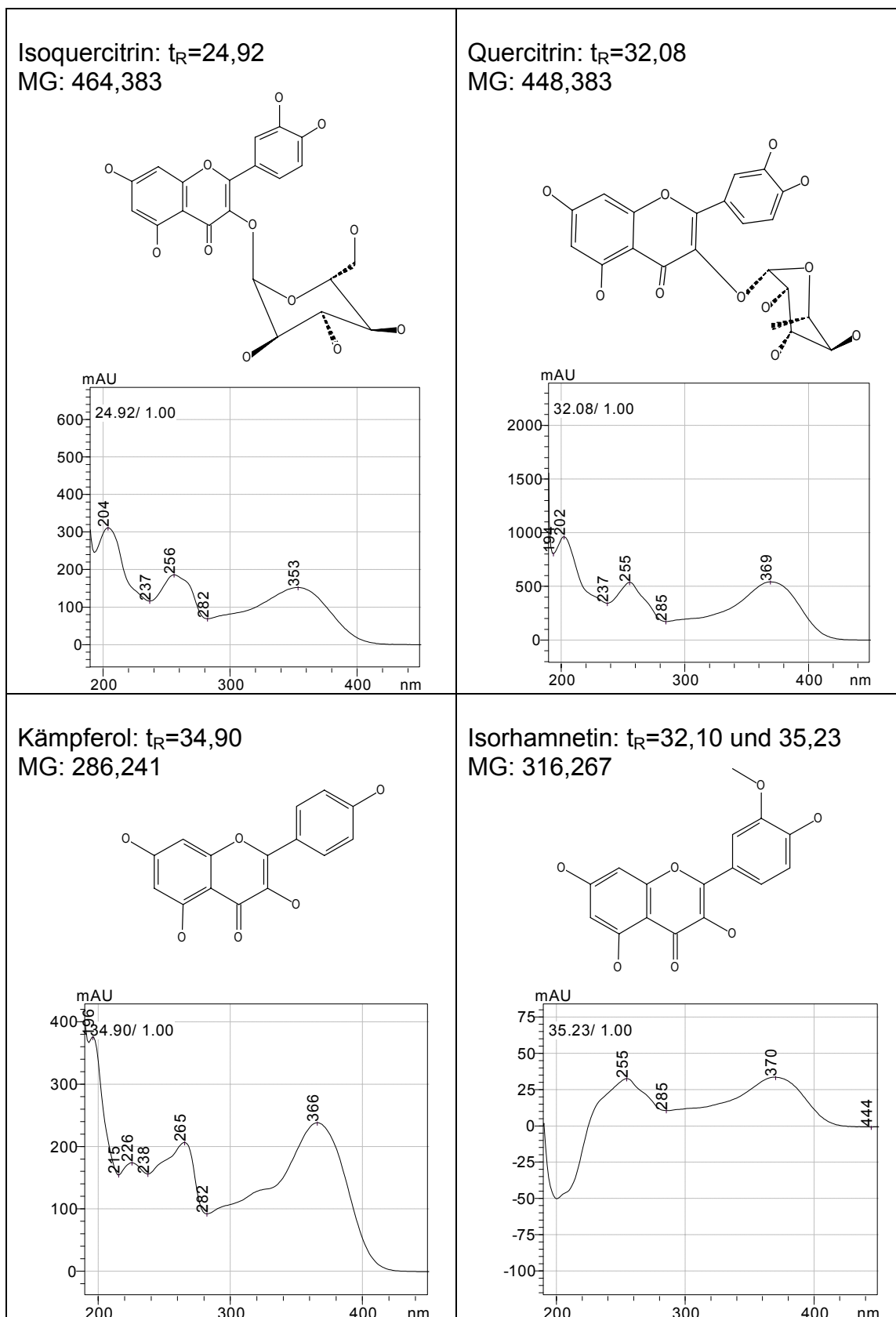


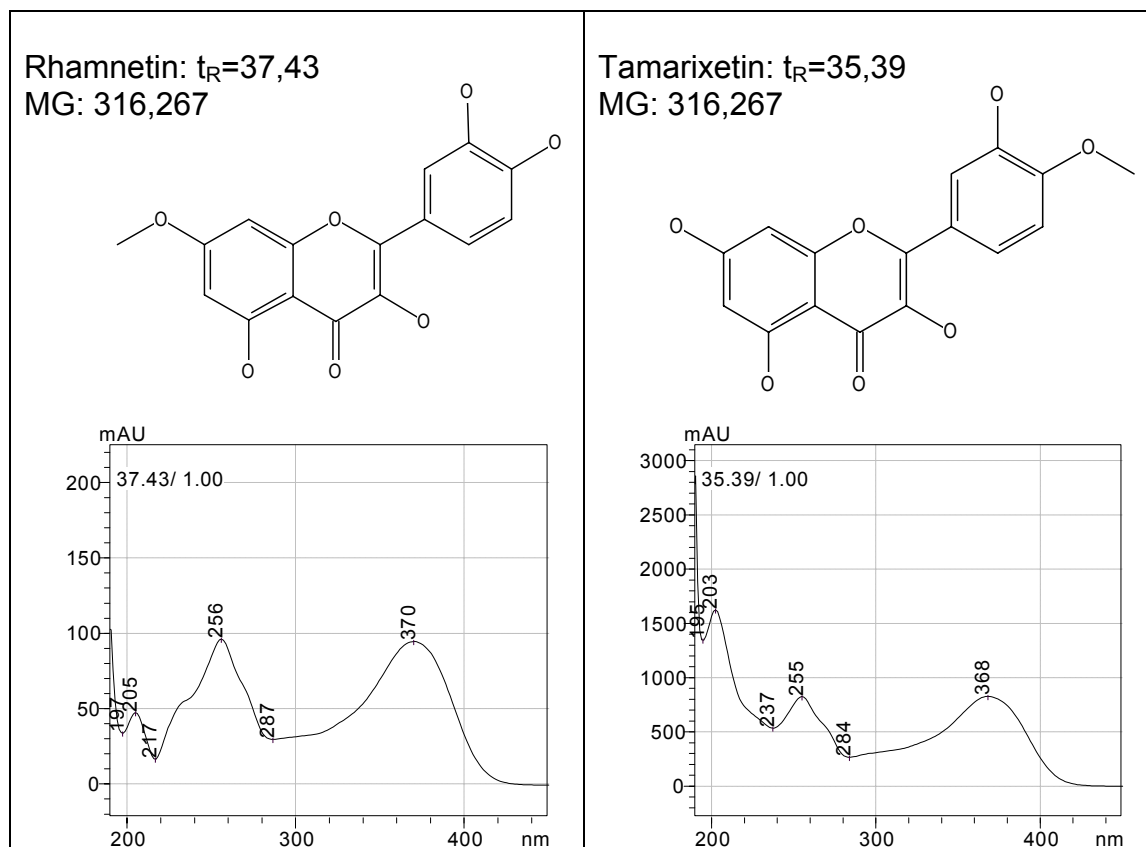
Abb. 15: Vergleich von OWE 48/04 mit ausgewählten phenolischen Säuren mittels HPLC-Methode 2 (siehe Tab. 6, S. 27) bei 254nm

In Abb. 15 ist der Vergleich von OWE 48/04 mit ausgewählten phenolischen Säuren dargestellt. Hier zeigt die Gallussäure Übereinstimmung mit dem Peak der Probenlösung bei 3 min. Identifizierung und Charakterisierung sind in Kap. 3.3.2 (S. 62 f) beschrieben.

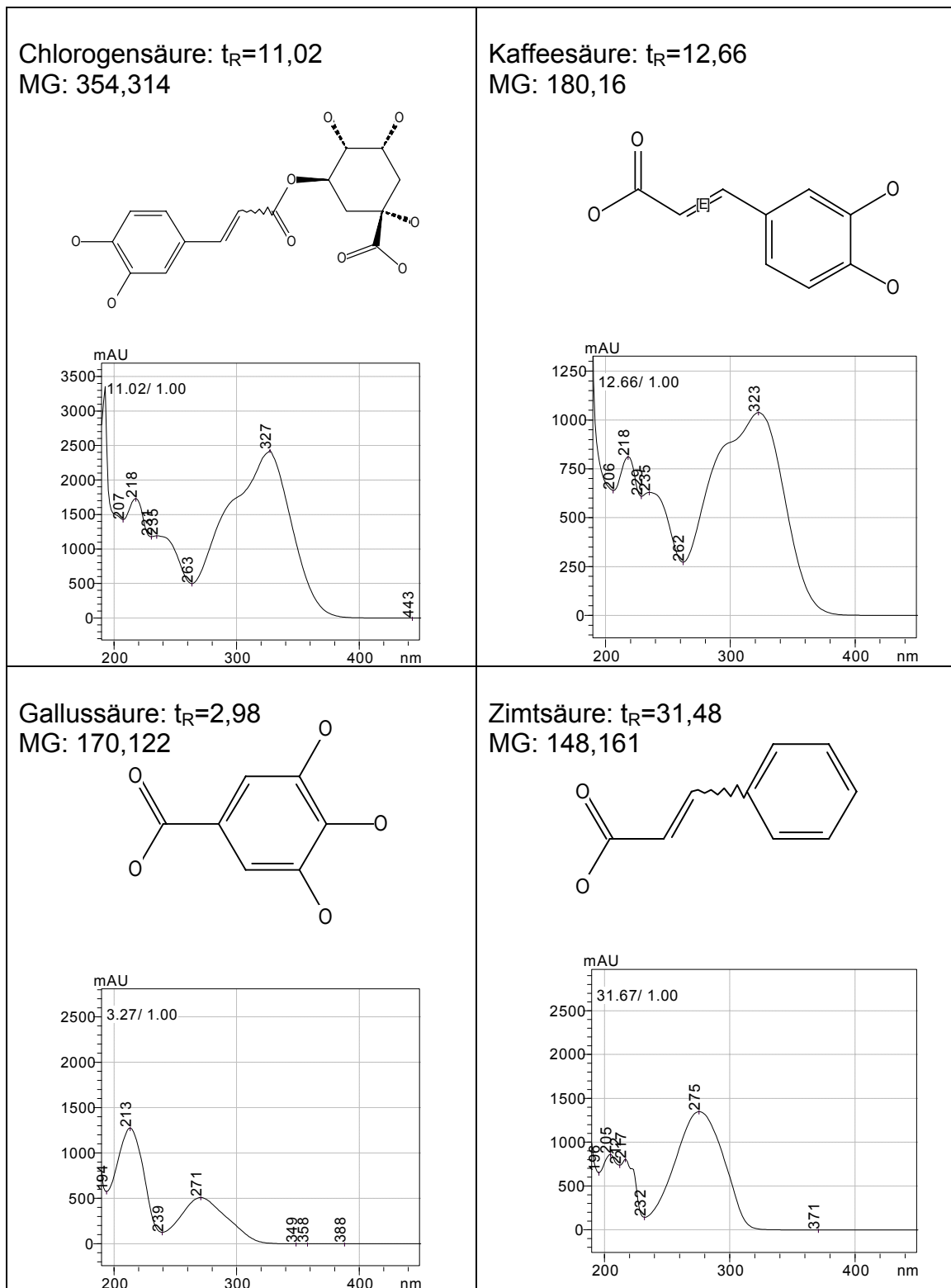
In Tab. 11 und 12 (S. 37-40) sind Retentionszeiten, UV-Spektren, Strukturformeln und Molekulargewichte der ausgewählten Flavonoide und phenolischen Säuren aufgelistet. Strukturformeln und Molekulargewichte sind der Crossfire Beilstein Datenbank (CrossFire Server Software, Version 7.1.SP1, Build 52) entnommen, die Retentionszeiten (in min) und die UV-Spektren wurden experimentell unter Verwendung von HPLC-Methode 2 ermittelt (siehe Abb. 14, S. 35 und Abb. 15, S. 36).



Tab. 11: Strukturformeln, Molekulargewichte, Retentionszeiten (HPLC-Methode 2, Tab. 6, S. 27) und UV-Spektren der ausgewählten Flavonoide

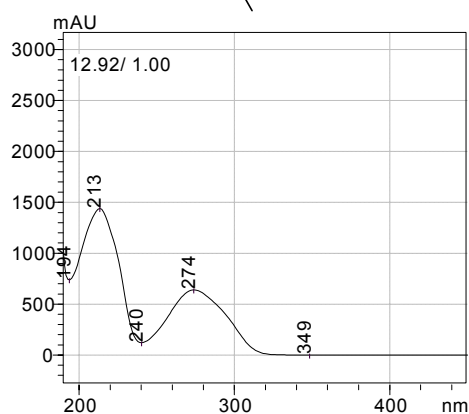
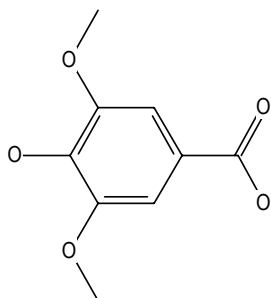


Tab. 11: Fortsetzung:
Strukturformeln, Molekulargewichte, Retentionszeiten (HPLC-Methode 2, Tab. 6, S. 27) und UV-Spektren der ausgewählten Flavonoide

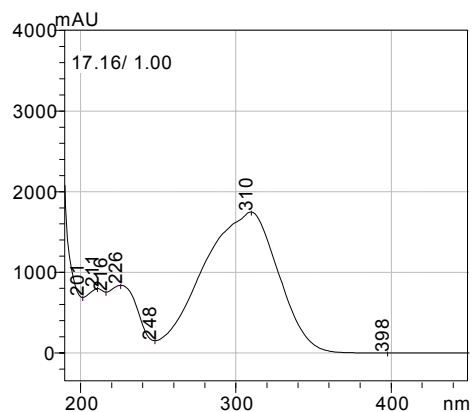
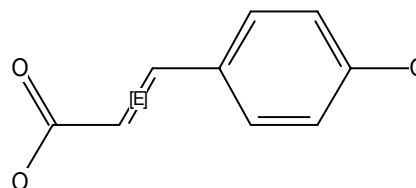


Tab. 12: Strukturformeln, Molekulargewichte, Retentionszeiten (HPLC-Methode 2, Tab. 6, S. 27) und UV-Spektren der ausgewählten Säuren

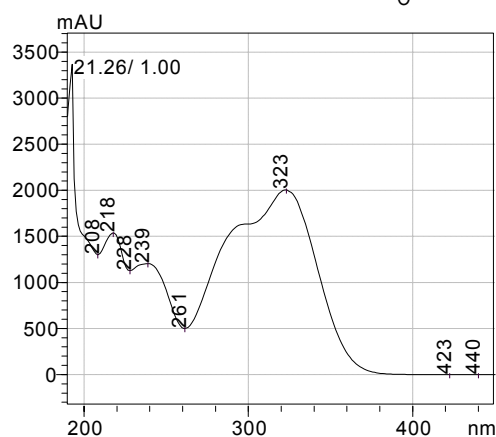
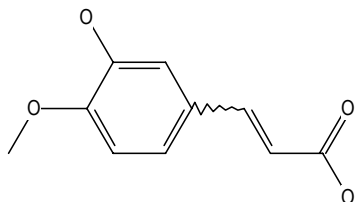
Syringasäure: $t_R=12,92$
MG: 198,175



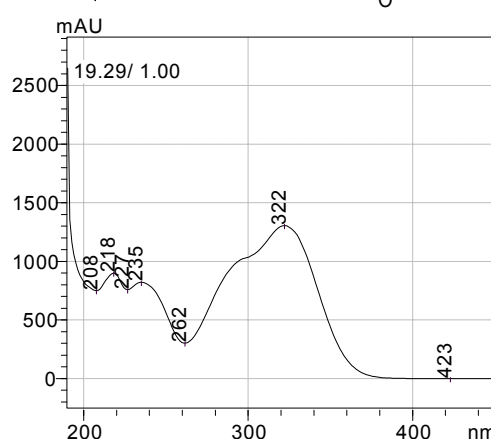
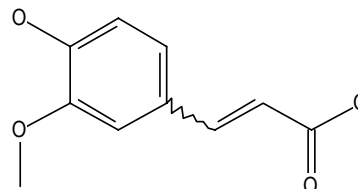
p-Coumarsäure: $t_R=17,09$
MG: 164,161



Isoferulasäure: $t_R=21,26$
MG: 194,187



Ferulasäure: $t_R=19,29$
MG: 194,187



Tab. 12: Fortsetzung:
Strukturformeln, Molekulargewichte, Retentionszeiten (HPLC-Methode 2, Tab. 6, S. 27) und UV-Spektren der ausgewählten Säuren

Weiters erfolgte eine LC-MSⁿ-Analyse des OWEs 48/04 (siehe Abb. 16).

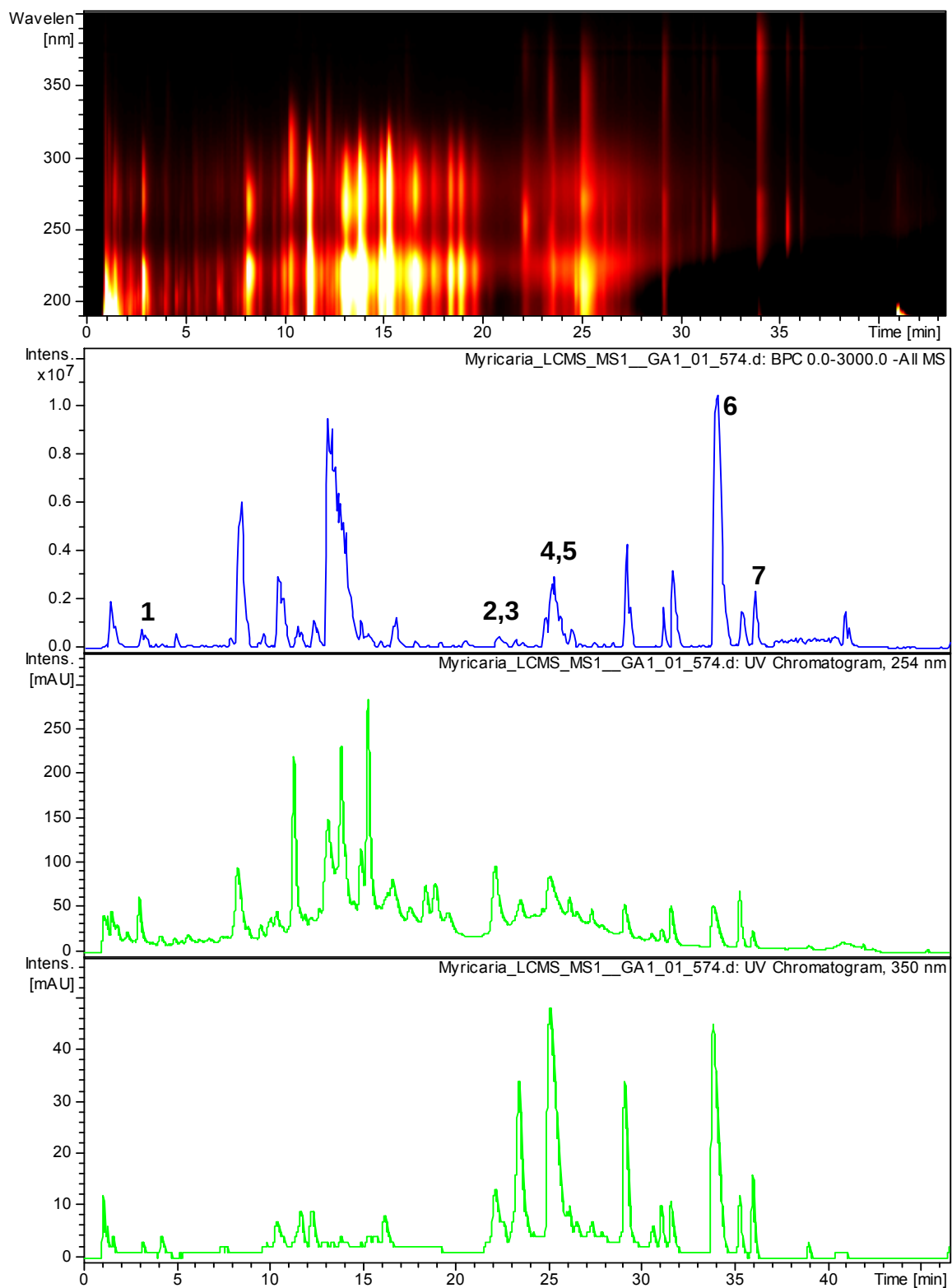


Abb. 16: LC-MSⁿ-DAD-Analyse des OWEs 48/04 mittels LC-MS-Methode (siehe Tab. 8, S. 29), Peakbezeichnung und entsprechende Substanzzuordnung siehe Tab. 13, S. 42

Das blaue Chromatogramm in Abb. 16 (S. 41) ist das „Base Peak Chromatogramm“, das durch Summierung der Fragmente mit der höchsten Intensität im Massenspektrum ermittelt wird. Die beiden grünen Chromatogramme stellen die beiden UV-Spuren bei 254nm und 350nm dar. Die Datenbank, die uns für Vergleiche zur Verfügung stand, war im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit erstellt worden [18] und beinhaltet Flavonoide, die an dem von uns benützten Massenspektrometer vermessen worden waren. Die in Tab. 13 angeführten Substanzen wiesen hohe Übereinstimmung im Fragmentierungsmuster auf, sodass wir sie als Inhaltsstoffe von OWE 48/04 in Betracht zogen. Die Massenspektren der im Chromatogramm (Abb. 16, S. 41) nicht bezifferten Peaks lieferten vorerst noch unklare Hinweise, sodass noch kein Strukturvorschlag erstellt werden konnte. Diese Verbindungen blieben daher in vorliegender Arbeit unberücksichtigt.

Peak-Bezeichnung	Retentions-Zeit (min)	Molekular-Gewicht (Da)	Vermutete Substanz
1	3,0	170	Gallussäure
2	21,5	381	Quercetinsulfat
3	22,1	302	Ellagsäure
4	22-26	396	Isorhamnetinsulfat
5	23,1	478	Quercetinglucuronid
6	33,7	396	Rhamnetinsulfat
7	35,9	316	Rhamnetin

Tab. 13: Vergleich der Ergebnisse der LC-MSⁿ-Analyse des OWEs 48/04 mit einer Datenbank [18]

3.1.2 Analyse vorhandener Fraktionen

Die Parameter der säulenchromatographischen Fraktionierung, die im Zuge phytochemischer Arbeiten an *Myricaria longifolia* durchgeführt wurde, sind aus Tab. 2 (S. 19) zu entnehmen.

Die dünnschichtchromatographische Analyse dieser Fraktionen ist in Abb. 4 (S. 14) dargestellt. Die auffallend hellblau fluoreszierende Substanz mit einem R_f -Wert von ca. 0,6 ist in den Fraktionen S5-S11 enthalten (siehe S. 14/15). Diese, UC2 genannte, Substanz wurde mittels semipräparativer HPLC – wenngleich in äußerst geringen Mengen - isoliert und lag zu Beginn dieser Arbeit als Reinsubstanz vor. Deswegen stand sie für weitere Analysen zur Verfügung. In Kap. 3.1.3, (S. 45 f) werden die durchgeführten Analysen genau erläutert, und die Identifizierung von UC2 ist im Kap. 3.3.3 (S. 64 ff) beschrieben.

Fraktion S3 enthält gleich drei auffallende Zonierungen: Eine blaue Zonierung mit einem R_f -Wert von ca. 0,9 gab einen Hinweis auf das Vorliegen von Gallussäure. Nähere Analysen dazu sind in Kapitel 3.3.2 (S. 62 f) beschrieben. Die gelb-orangen Zonen der Fraktion S3 mit einem R_f -Wert von 0,6 und einem von 0,8 gaben einen Hinweis auf das Vorliegen von Flavonoiden.

Eine Analyse der Fraktionen S3, S5 und S9 erfolgte mittels HPLC (siehe Abb. 17). Beim Vergleich mit OWE 48/04 wurde deutlich, dass in den verschiedenen Fraktionen unterschiedliche Substanzen unterschiedlich stark angereichert vorliegen.

In Fraktion S3 liegt der Peak bei 3 min in stark angereicherter Form und scheinbar ohne andere Substanzen vor. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die Gallussäure handelt (siehe Abb. 15, S. 36). Die erfolgreiche Identifizierung ist in Kap. 3.3.2 (S.62 f) zu finden.

In Fraktion S5 ist vor allem der Peak mit einer Retentionszeit von 23,4 min von Interesse, es handelt sich hierbei um die Substanz UC2 (siehe Kap. 1.2, S. 14/15).

In Abb. 17 ist UC2 im OWE 48/04 und in Fraktion S5 mittels rotem Kreis gekennzeichnet. Das Kapitel 3.1.3 (S. 45 f) beinhaltet die Analyse von UC2 und in Kapitel 3.3.3 (S. 64 ff) ist die erfolgreiche Charakterisierung und Identifizierung beschrieben. Weiters ist in Fraktion S5 der Peak mit einer Retentionszeit von ca. 35 min auffallend. Weitere Analysen hierzu sind in der parallel durchgeführten Diplomarbeit von Barbara Kubasa zu finden. [17]

In Fraktion S9 sind vor allem Substanzen mit Retentionszeiten zw. 9 min und 17 min angereichert.

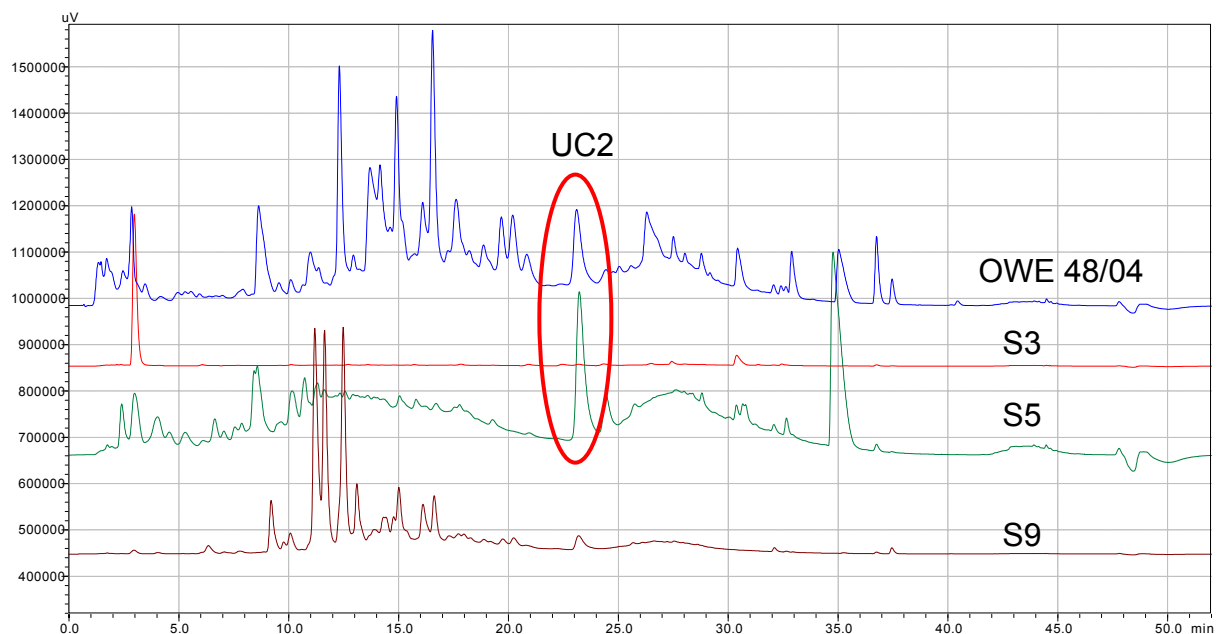


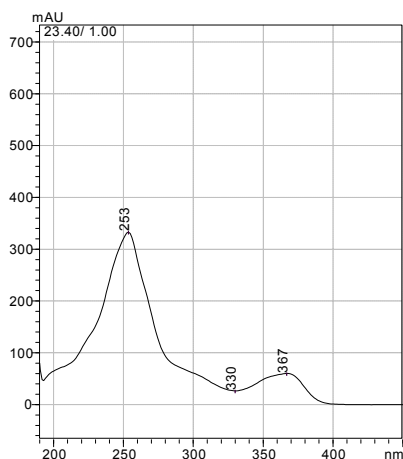
Abb. 17: HPLC-Analyse der Fraktionen S3, S5, S9 (siehe Abb. 4, S 14 und Tab. 2, S.19) im Vergleich mit dem OWE 48/04 mittels HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27), Detektion: 254nm

3.1.3 Analyse von UC2

Zunächst erfolgte eine dünnschichtchromatographische Analyse der Substanz UC2 und der Fraktionen, in denen sie enthalten ist (siehe Kap. 1.2, Abb. 4, S. 14). In Abb. 18 ist deutlich zu erkennen, dass die blau fluoreszierende Substanz UC2 isoliert vorliegt und eine Abtrennung erreicht wurde. Auffallend bei dieser Substanz ist das starke Tailing im DC-System 1. Deswegen erfolgte eine erneute Analyse mit einem anderen DC-System. Die Umstellung von Kieselgel auf Cellulose als stationäre Phase und auch die Änderung der mobilen Phase erzielten eine deutliche Verminderung des Tailings. Dies ist in Abb. 19 erkennbar.

	
Abb. 18: Analyse von UC2 mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21) nach Besprühen der Platte mit NSRA & PEG 400, Detektion: UV 366nm	Abb. 19: Analyse von UC2 mittels DC-System 2 (Tab. 3, S. 21) nach Besprühen der Platte mit NSRA & PEG 400, Detektion: UV 366nm

Es erfolgte auch eine HPLC-Analyse mit der in dieser Arbeit entwickelten HPLC-Methode 2. Im Chromatogramm war gut zu erkennen, dass die Isolierung der Substanz erfolgreich war und keine nennenswerten Verunreinigungen enthalten sein dürften. In Abb. 17 (S. 44) ist im OWE 48/04 und in der Fraktion S5 deutlich der Peak der Substanz UC2 zu erkennen. Die Retentionszeit beträgt 23,4 min bei der Analyse mit HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27).



Das erhaltene UV-Spektrum der Substanz UC2 (siehe Chromatogramm Abb. 17, S. 44) ist in Abb. 20 abgebildet.

Abb. 20: UV-Spektrum von UC 2 ($t_R=23,40$ min) nach Analyse des OWE 48/04 mittels HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27)

Weiters erfolgte eine LC-MS-Analyse von UC2. Laut dieser beträgt das Molekulargewicht der Substanz 302 Da. Die bei der MS^2 - Analyse erhaltenen Fragmentationen sind in Abb. 21 rot markiert.

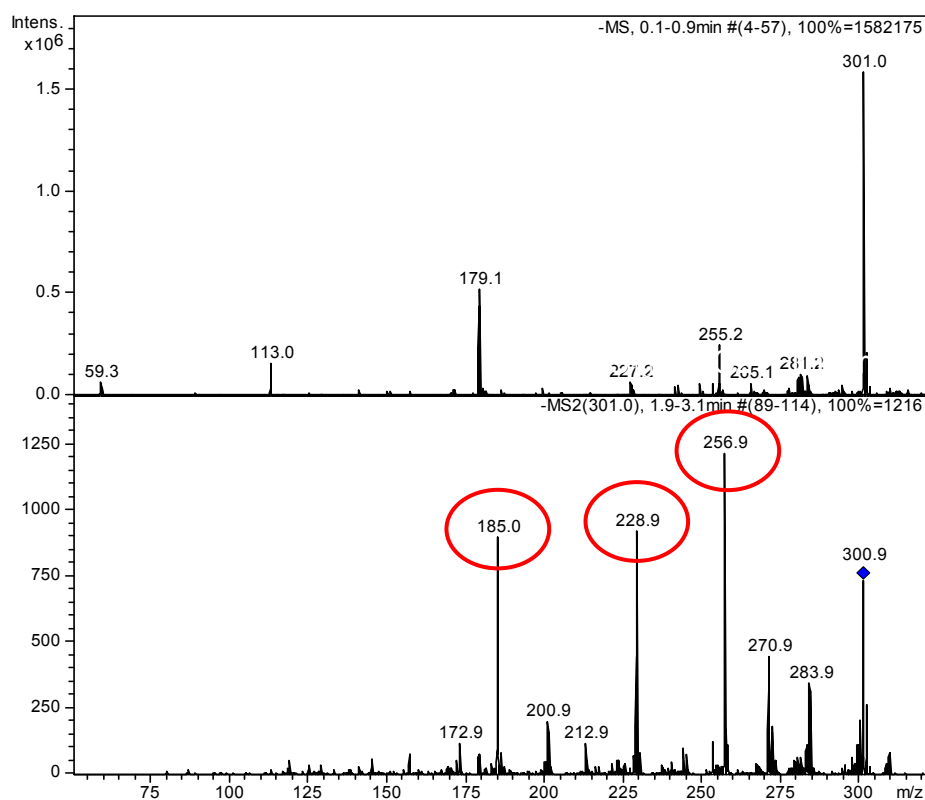


Abb. 21: LC-MS-Analyse der isolierten Substanz UC2
Methode: LC-MS-Methode (siehe Tab. 8, S. 29)

Aufgrund der erhaltenen Informationen wurde eine Literatursuche durchgeführt, und es ergab sich die Vermutung, dass es sich bei dieser Substanz um Ellagsäure handeln könnte. Nähere Untersuchungen dazu sind in Kapitel 3.3.3 (S. 64 ff) beschrieben.

3.2 PRÄPARATIVER TEIL

Im präparativen Teil wird zunächst die säulenchromatographische Auftrennung des BE 48/04 (siehe Kap. 2.1.3, Abb. 7, S. 19) beschrieben. Es erfolgen Erläuterungen zu Probenvorbereitung, Fraktionierung und Analytik der Fraktionen. Danach wird im Kapitel 3.2.2 S 57 ff) die Isolierung eines Flavonoids aus einer säulenchromatographisch gewonnenen Fraktion mittels semipräparativer HPLC beschrieben.

3.2.1 Säulenchromatographische Trennung

Zum Zeitpunkt der Durchführung der SC war es noch nicht gelungen UC2 (siehe Kap. 3.1.3, S. 45 f) zu identifizieren, deswegen war einer der Hauptgründe für das Durchführen einer SC die Gewinnung von Fraktionen, um aus diesen wiederum UC2 und weitere Substanzen isolieren zu können. Durch die von UC 2 bekannte Retentionszeit und das charakteristische UV-Spektrum konnte das Vorliegen von UC2 im chlorophyllbefreiten BE 48/04 (siehe Probenvorbereitung, Abb 22, S. 48 und Abb 23., S. 48) nachgewiesen werden bevor mit der Fraktionierung mittels SC begonnen wurde.

- Probenvorbereitung:

In Kap. 2.1.3 (S.18/19) ist das Ausgangsmaterial für die Säulenchromatographie beschrieben. Aufgrund des recht hohen Chlorophyll-Anteils des Blätterextraktes 48/04 erfolgte zunächst eine Abtrennung des Chlorophylls.

Die Abtrennung erfolgte durch Ausschütteln des in 20% Methanol gelösten BE 48/04 mit n-Hexan, da Chlorophyll in n-Hexan gut löslich ist.

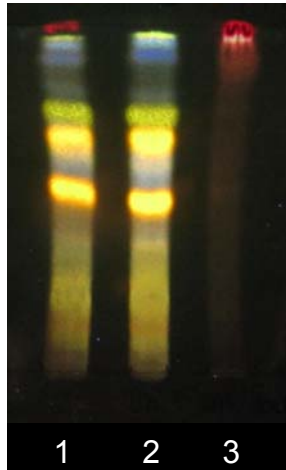


Abb. 22: Überprüfung der Abtrennung des Chlorophylls mittels DC-Analyse (DC-System 1, Tab. 3, S. 21) nach Besprühen der Platte mit NSRA und PEG 400, Detektion: UV 366nm

- 1: BE 48/04 (siehe Kap. 2.1.3, Abb. 7, S. 19)
- 2: wässrig-methanolische Phase = Unterphase
- 3: organische n-Hexan Phase = Oberphase

In Abb. 22 ist deutlich erkennbar, dass die Abtrennung erfolgreich war. Bande 1 zeigt BE 48/04 (siehe Kap. 2.1.3, Abb. 7, S. 19), Bande 2 die wässrig-methanolische Phase, in der sich fast alle Substanzen von BE 48/04 gelöst haben und Bande 3 zeigt die organische n-Hexan-Phase, in der sich das Chlorophyll gelöst hat und als rote Zonierung an der Fließmittelfront erkennbar ist. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird das nach dem Ausschütteln erhaltene Extrakt (Abb. 22, S. 48, Bande 2) als **chlorophyllbefreites BE 48/04** bezeichnet.

Parallel zur DC sollte noch vor Beginn der Säulenchromatographie eine Überprüfung mittels HPLC erfolgen um festzustellen, ob die Vergleichbarkeit von BE 48/04 nach der Ausschüttelung mit den bereits analysierten OWES gegeben war und ob UC2 noch enthalten war.

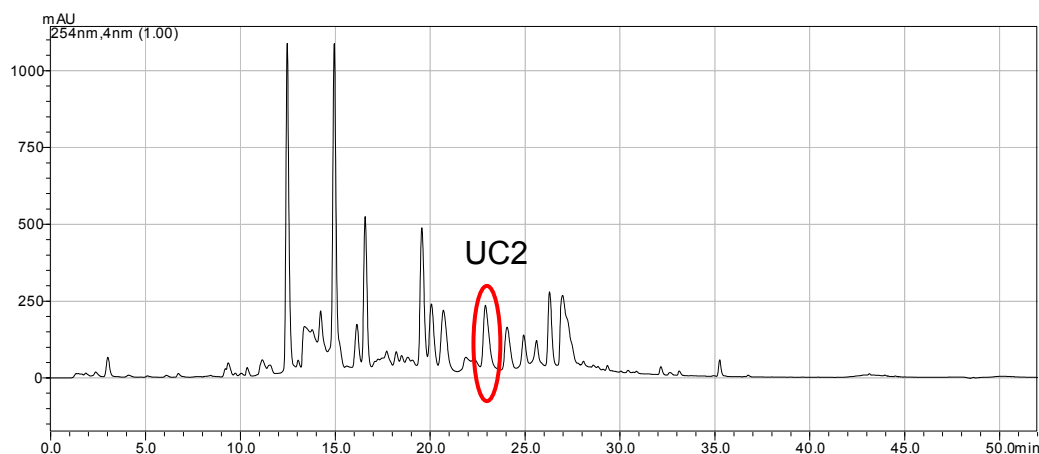


Abb. 23: Analyse des chlorophyllbefreiten BE 48/04 mittels HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27), Detektion: 254nm

Beim Vergleich des Chromatogramms des chlorophyllbefreiten BE 48/04 (Abb. 23 S. 48) mit den HPLC-Chromatogrammen von OWE 48/04 (siehe Abb. 17, S. 44) wird deutlich, dass sich die qualitative Zusammensetzung durch die Chlorophyll-Abtrennung nicht wesentlich verändert hat. Es dominieren zwei Substanzen mit den Retentionszeiten $t_R=11$ min und $t_R=13,8$ min. Diese liegen angereichert vor. Das Vorhandensein von UC2 konnte anhand von Retentionszeit und UV-Spektrum nachgewiesen werden. Detaillierte Analysen dazu sind in Kap. 3.1.3 (S. 45 f) und in Kap. 3.3.3 (S. 64 ff) besprochen. Von dem chlorophyllbefreiten BE 48/04 wurden 3g auf die Säule aufgetragen.

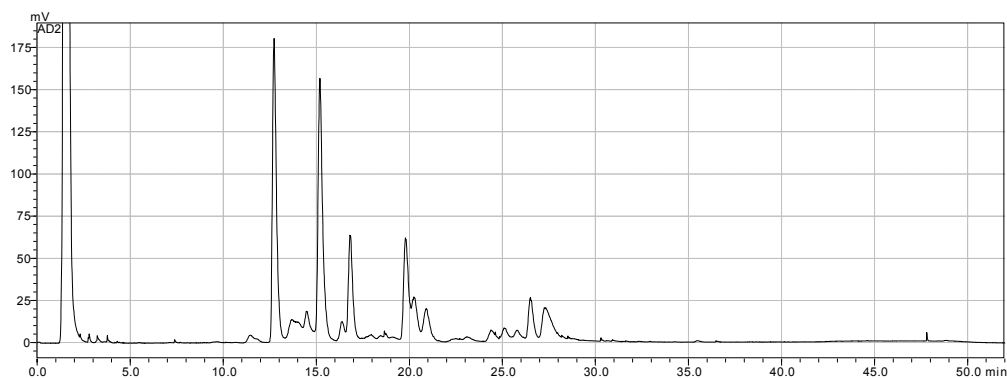


Abb. 24: Analyse des chlorophyllbefreiten BE 48/04 mittels HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27), Detektion: ELSD

In Abb. 24 ist ein Chromatogramm von dem chlorophyllbefreiten BE 48/04 dargestellt, dessen Detektion mittels Lichtstreuendetektor erfolgt ist. Auffallend ist der bei ca. 1,8 min. erhaltene Peak, der gut wasserlöslichen Inhaltsstoffen entspricht. Vermutlich handelt es sich bei diesen polaren Ballaststoffen hauptsächlich um Polysaccharide und Zucker. Nachdem diese nicht UV-aktiv sind, ergeben sie bei einer Detektion mittels UV-Detektor kein Signal (vergleiche Abb. 23, S. 48). Die Mengenverhältnisse der einzelnen Substanzen können mittels ELSD besser dargestellt werden als durch UV-Detektion.

- Fraktionierung:

In Kap. 2.2.2 (S. 22 f) sind die Parameter der Säulenchromatographie beschrieben. Es wurden 22 Fraktionen gewonnen. Nach Erhalt von je 200 ml Eluat wurde dieses im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht beziehungsweise bei den reinen wässrigen Eluaten erfolgte eine Trocknung mittels Lyophilisation.

Die Ausbeuten der SC können Tab. 14 bzw. Abb. 25 (S. 51) und Abb. 26 (S. 52) entnommen werden.

Fraktion	Ausbeute (mg)
Ia	368,80
Ib	930,70
Ic	48,92
IIa	31,31
IIb	17,56
IIIa	7,18
IIIb	32,36
IIIc	62,24
IVa	16,26
IVb	27,44
IVc	32,03
IVd	19,51
Va	12,31
Vb	16,54
VIa	16,86
VIb	18,95
VIc	29,84
VId	49,11
VIe	25,00
VI f	19,19
VIg	21,28
VIh	24,13
Gesamt	1827,52

Tab. 14: Fraktionen und Ausbeuten (mg) nach säulenchromatographischer Auftrennung des chlorophyllbefreiten BE 48/04 (siehe Tab. 4, S. 23 und Abb. 22, S. 48)

Myricaria longifolia Ausbeuten SC

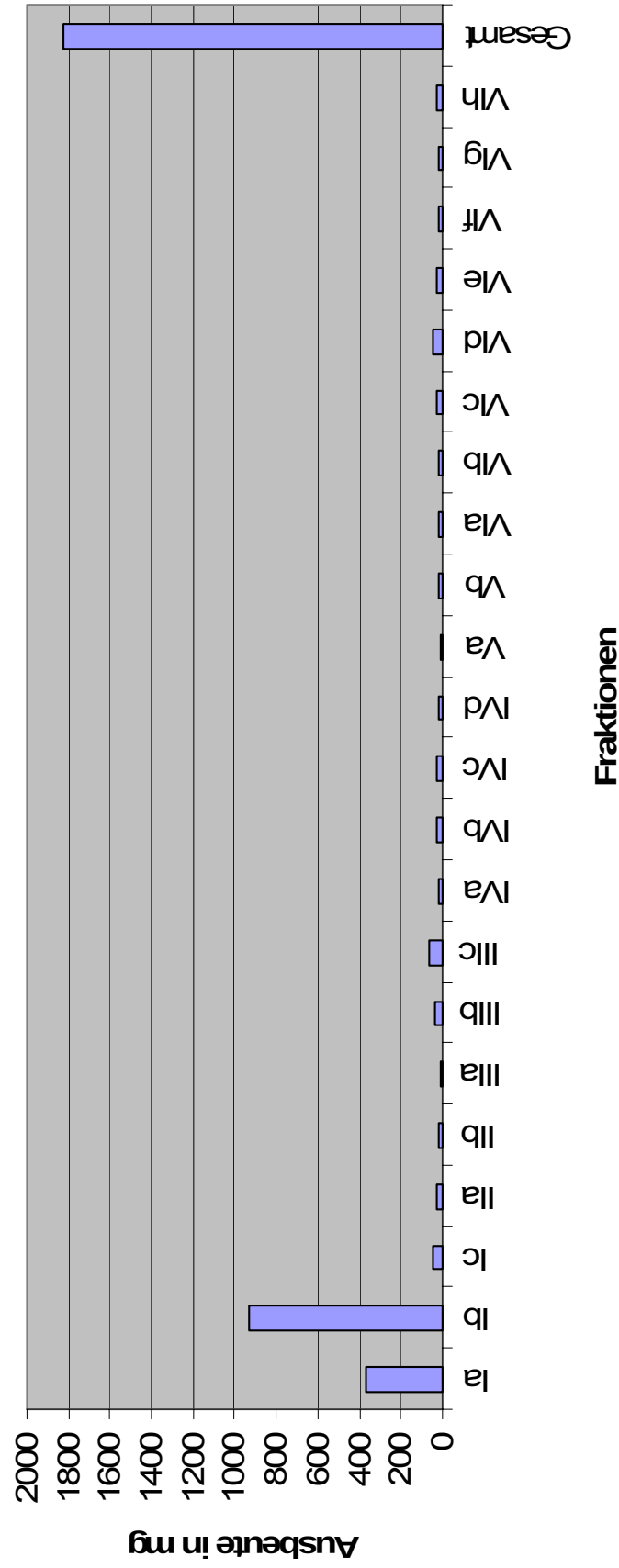


Abb. 25: Ausbeuten aller Fraktionen nach säulenchromatographischer Auftrennung des chlorophyllbefreiten BE 48/04 (siehe Tab. 14, S. 50, Tab. 4, S. 23 und Abb. 22, S. 48)

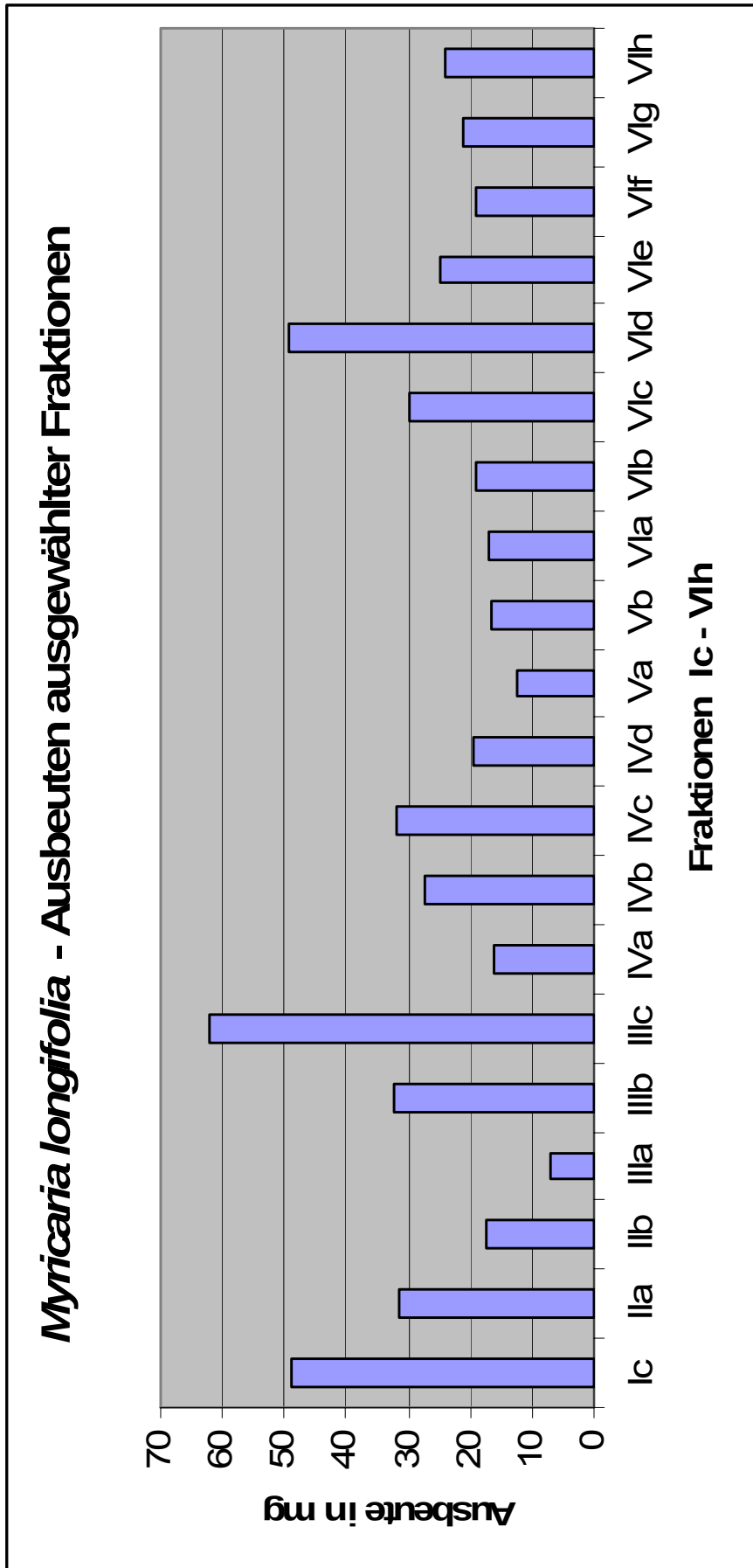


Abb. 26: Ausbeuten ausgewählter Fraktionen nach säulenchromatographischer Auftrennung des chlorophyllbefreiten BE 48/04 (siehe Tab. 14, S. 50, Tab. 4, S. 23 und Abb. 22, S. 48)

- Analytik der Fraktionen:

Die Analyse der Fraktionen (siehe Tab. 14, S. 50, Abb. 25, S. 51 und Abb. 26, S. 52) erfolgte zunächst mittels DC. Das Gesamtextrakt (= G.E.) entspricht dem auf die Säule aufgetragenen chlorophyllbefreiten BE 48/04.

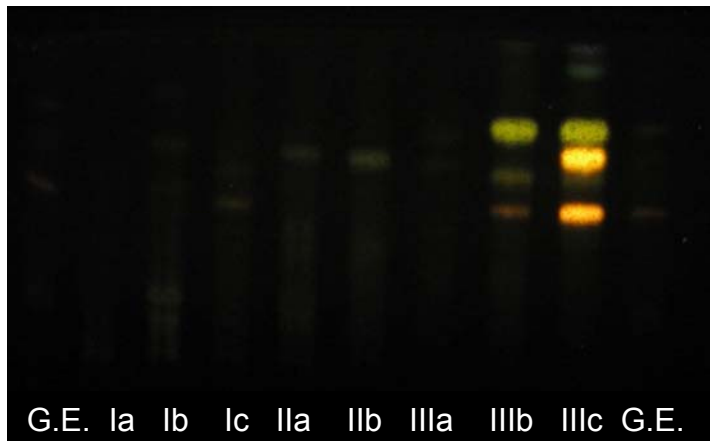


Abb. 27: Analyse der Fraktionen Ia–IIIc mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21), Detektion bei 366nm nach Besprühen mit NSRA & PEG 400

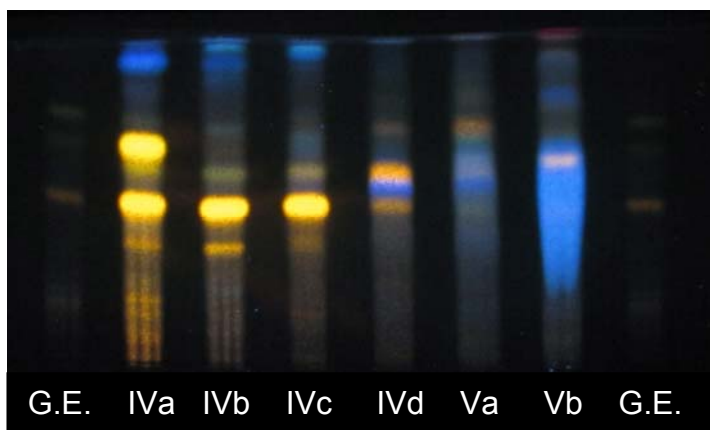


Abb. 28: Analyse der Fraktionen IVa–Vb mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21), Detektion bei 366nm nach Besprühen mit NSRA & PEG 400

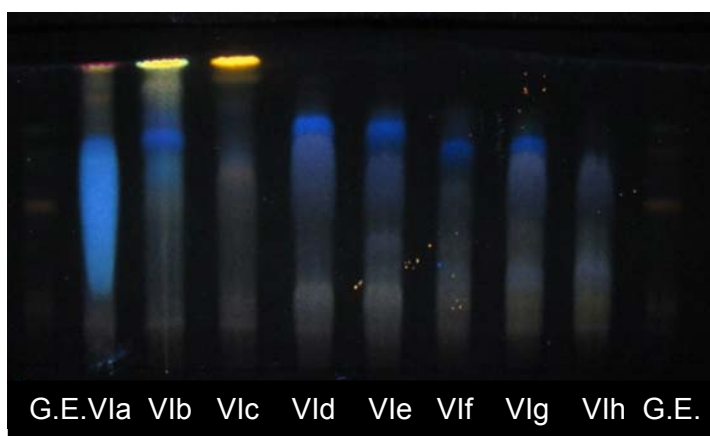


Abb. 29: Analyse der Fraktionen VIa–VIh mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21), Detektion bei 366nm nach Besprühen mit NSRA & PEG 400

Da bei der Detektion mit UV-Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen teilweise auch unterschiedliche Substanzen zu erkennen sind, sind auch die Abbildungen der Chromatogramme unter UV 254nm aufgelistet. Die Fotografien wurden vor Besprühen der Platte aufgenommen. Vor allem in den Fraktionen Ia-IIIa sind unter UV 366nm keine Zonierungen erkennbar (Abb. 27, S. 53), unter UV 254nm werden jedoch einige Zonen sichtbar (Abb. 30).

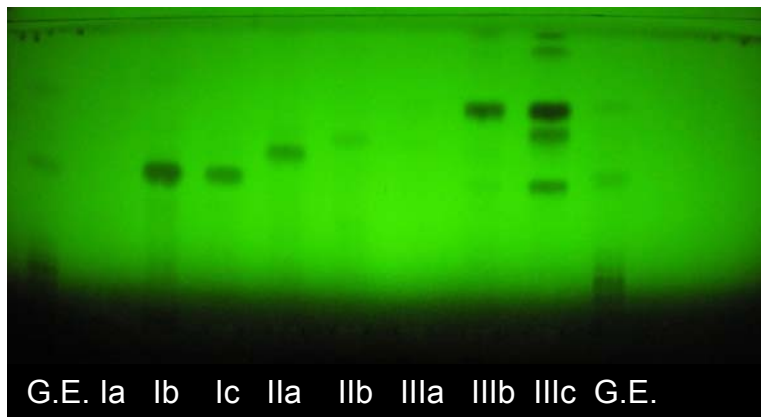


Abb. 30: Analyse der Fraktionen Ia–IIIc mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21), Detektion bei 254nm

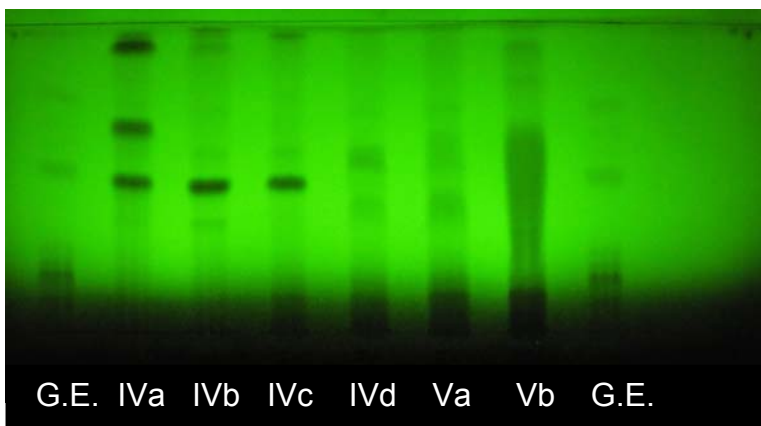


Abb. 31: Analyse der Fraktionen IVa–Vb mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21), Detektion bei 254nm

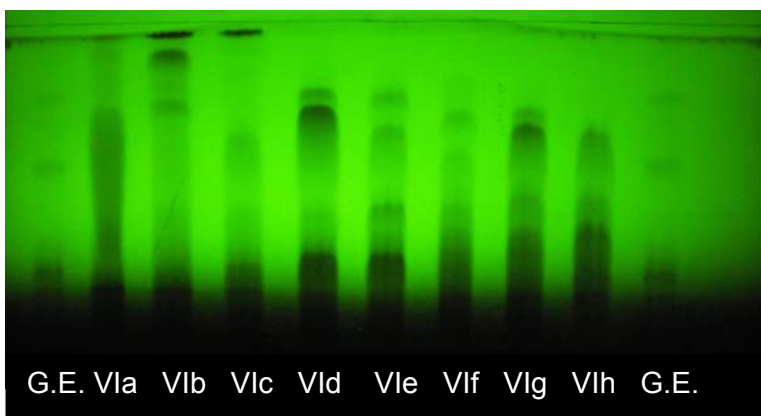


Abb. 32: Analyse der Fraktionen VIa–VIh mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21), Detektion bei 254nm

Anschließend erfolgte eine Charakterisierung aller Fraktionen mittels HPLC mit HPLC-Methode 2. Zusätzlich zum UV-Detektor kam auch eine Detektion durch ELSD zum Einsatz.

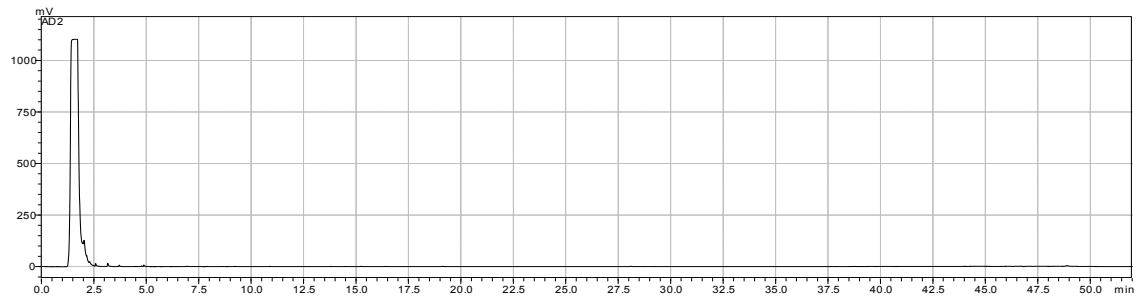


Abb. 33: Analyse der Fraktion Ia (siehe Tab. 14, S. 50 und Abb. 25, S. 51) mittels HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27), Detektion: ELSD

Die im ELSD-Chromatogramm so dominant erscheinenden Substanzen bei einer Retentionszeit von ca. 1,6 min machen mengenmäßig den Hauptteil aus (siehe auch Tab. 14, S. 50 und Abb. 25, S. 51). Diese Hauptmenge der gewonnenen Substanzen, bei denen es sich vermutlich um Polysaccharide und Zucker handelt, ist in den Fraktionen Ia und Ib enthalten. Das wird auch durch die erhaltene Ausbeute bestätigt, wie in Abb. 25 (S. 51) und in Tab. 14 (S. 50) deutlich zu erkennen ist.

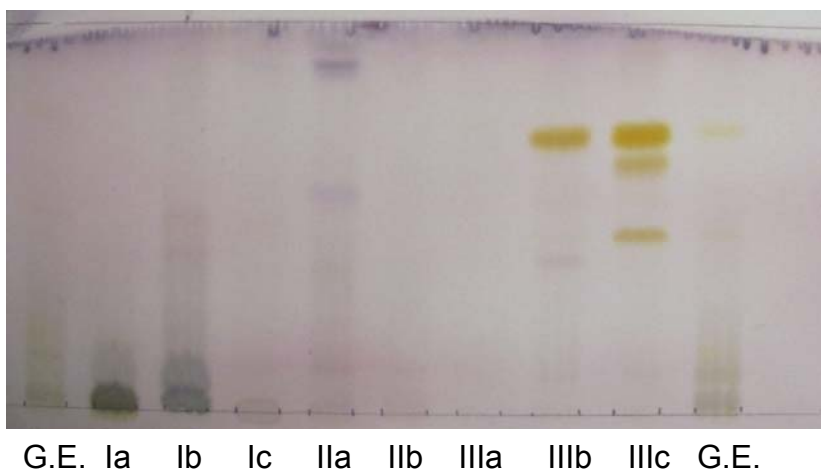


Abb. 34: Analyse der Fraktionen Ia–IIIc (siehe Tab. 14, S. 50 und Abb. 25, S. 51) mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21), Detektion: VIS nach Besprühen mit AS

Zusätzlich zeigt sich bei der Überprüfung mittels DC und Besprühung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AS) eine schwarzgraue Zonierung am Startfleck der Banden Ia und Ib. Dunkle Zonen erhält man bei diesem Sprühreagens unter anderem bei gut wasserlöslichen Inhaltsstoffen wie Mono-, Oligo- und Polysacchariden. Auch die Tatsache, dass es bei den Inhaltsstoffen dieser beiden Fraktionen zu keiner Wanderung kam, spricht für die starken hydrophilen Eigenschaften der Inhaltsstoffe.

Durch die durchgeführte SC wurden 22 Fraktionen gewonnen. Im Gegensatz dazu lagen aus der bereits in Vorarbeiten durchgeführten SC nur 10 Fraktionen vor (Abb. 4, S. 14). Aufgrund des höheren Fraktionierungsgrades des Extraktes ist einerseits eine leichtere Identifizierung der Substanzen möglich, da pro Fraktion weniger Substanzen vorliegen und andererseits liegt die Vermutung nahe, dass auch die für die Cytotoxizität verantwortlichen Inhaltsstoffe sich nicht – wie bisher – über viele Fraktionen erstrecken, sondern schärfer getrennt vorliegen und nur in einer oder wenigen Fraktionen vorhanden sind.

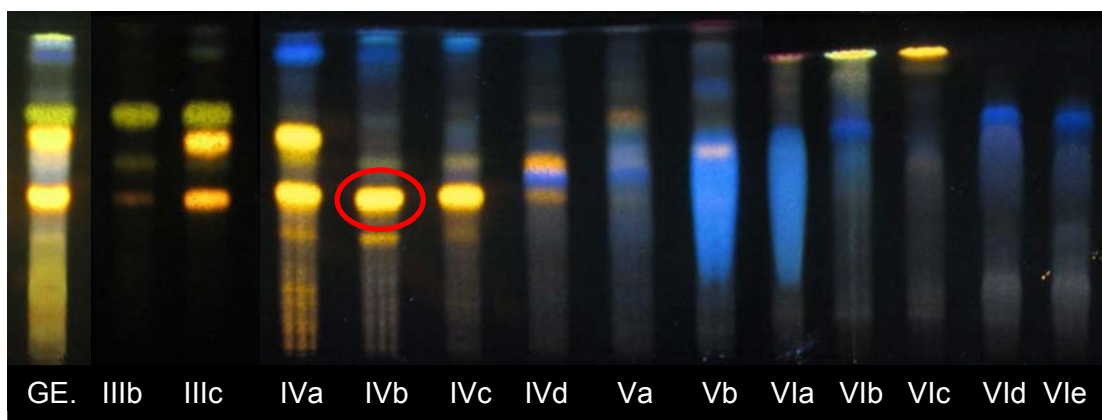


Abb. 35: Analyse der Fraktionen IIIb-VIe (siehe Tab. 14, S. 50 und Abb. 26, S. 52) mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21) nach Besprühen mit NSRA & PEG 400, Detektion: 366nm

3.2.2 Isolierung mittels semipräparativer HPLC

Der Hauptgrund für die Durchführung einer SC ist die Erreichung eines höheren Trennungsgrades der enthaltenen Substanzen im Vergleich zum Extrakt. In Chromatogrammen von Extrakten liegen viele Substanzen überlappend vor, sodass eine Analyse der einzelnen Substanzen erschwert ist. In den einzelnen Fraktionen hingegen liegen die Substanzen besser aufgetrennt vor, und es wird leichter möglich mittels semipräparativer HPLC eine Isolierung einzelner Substanzen vorzunehmen.

In Abb. 35 (S. 56) sind die wichtigsten Fraktionen zusammenfassend abgebildet. Eine dominierende Zone ist die mittels rotem Kreis markierte. Im Gesamtextrakt zu erkennen und vor allem in den Fraktionen IIIc – IVc enthalten ist eine gelb leuchtende Substanz mit einem R_f -Wert von ca. 0,5. In Abb. 31, S. 54 ist diese Substanz durch eine Fluoreszenzlöschung zu erkennen. Es gelang die Substanz BM im HPLC-Chromatogramm zuzuordnen (siehe Abb. 36). Die Retentionszeit von BM beträgt bei der Analyse mit HPLC-Methode 2 24,16 min. In Fraktion IVb liegt BM ganz besonders stark angereichert vor (siehe Abb. 36). In der Folge galt es, diese als BM bezeichnete Substanz mittels semipräparativer HPLC aus der Fraktion IVb zu isolieren.

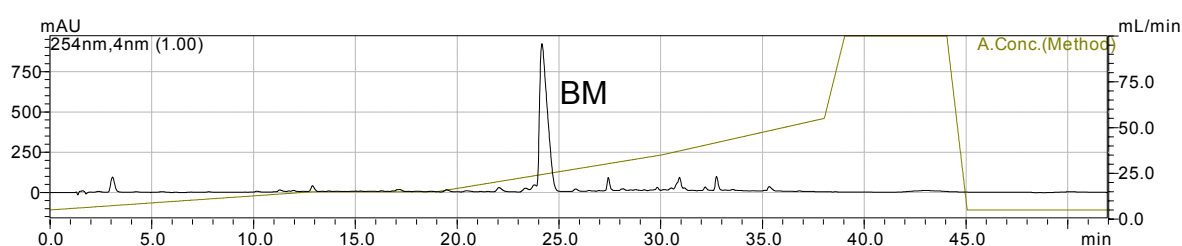
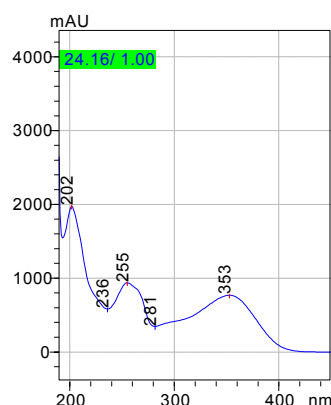


Abb. 36: Analyse der Fraktion IVb (siehe Abb. 35, S. 56) mittels HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27), Detektion: 254nm



Das UV-Spektrum der BM genannten Substanz mit einer Retentionszeit von 24,16 min ist in Abb. 37 zu sehen.

Abb. 37: UV-Spektrum von BM nach HPLC-Analyse der Fraktion IVb (siehe Abb. 36) mit HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27)

Zunächst erfolgte eine Methodenoptimierung, da es für die Isolierung von BM notwendig war, von der analytischen HPLC-Methode 2 auf eine für präparatives Arbeiten geeignetere Methode umzusteigen. Einerseits erfolgte aus Kostengründen eine Umstellung des organischen Lösungsmittels von Acetonitril auf Methanol. Andererseits wurde mit einer Säule von größerem Durchmesser gearbeitet, da diese eine höhere Kapazität aufweist und somit ein größeres Einspritzvolumen und eine höhere Flussrate ermöglicht. Die genauen Parameter der HPLC-Methode 3 sind in Kap. 2.2.3 (Tab. 7, S. 27) angegeben. Die Trennung war nach wie vor ausreichend für eine Isolierung, wie man aus Abb. 38 erkennen kann.

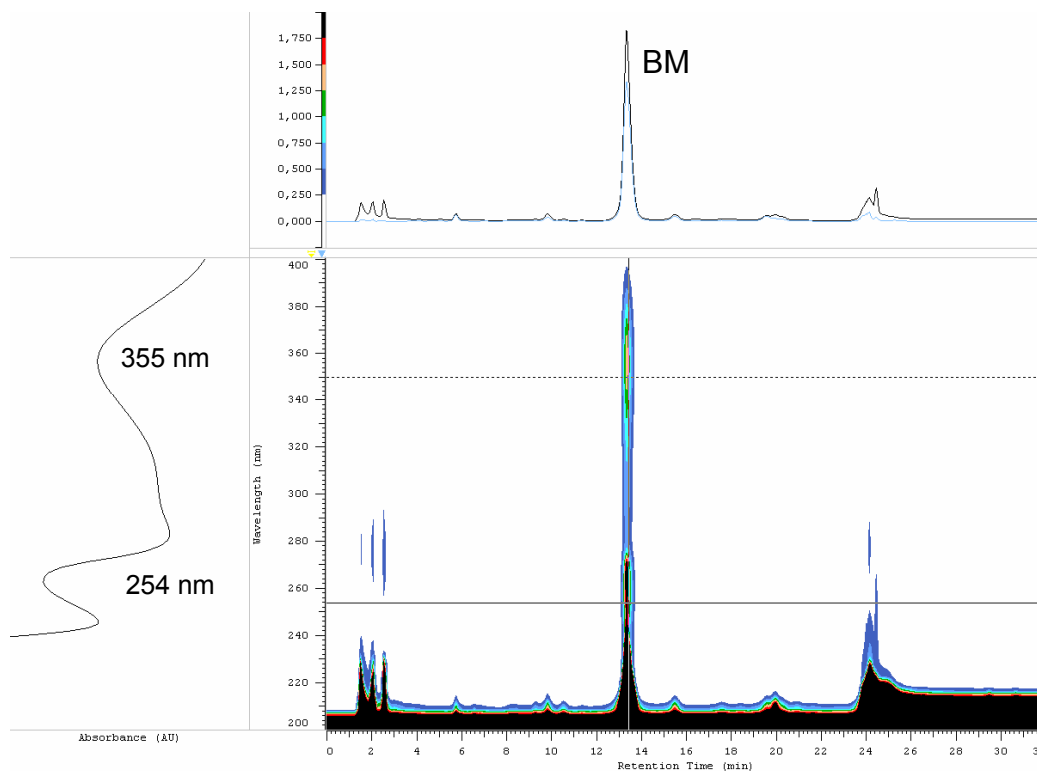


Abb. 38: Analyse der Fraktion IVb mittels HPLC-Methode 3 (Tab. 7, S. 27), Detektion: 254nm

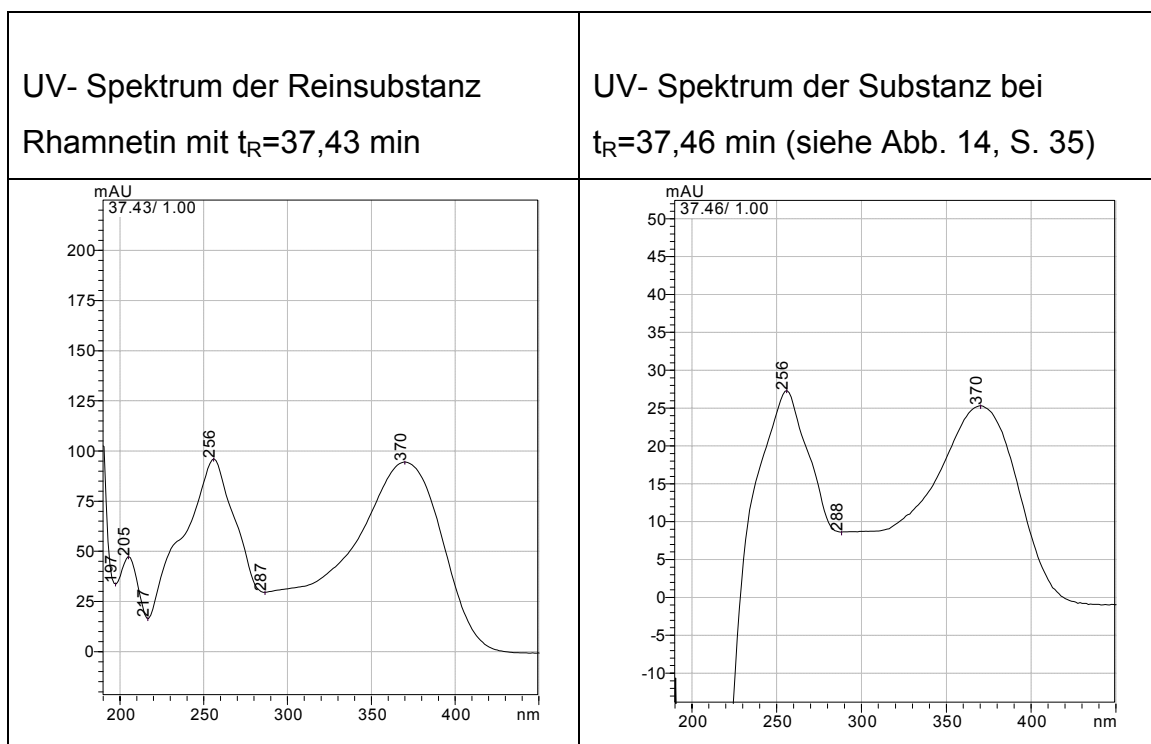
Es gelang auch eine deutliche Verkürzung der Analysendauer. Die Retentionszeit der Substanz BM verringerte sich von 24 min auf 13,38 min. Dies ist vor allem beim präparativen Arbeiten von großem Vorteil, da viele Durchgänge notwendig sind, um eine für weitere Analysen adäquate Substanzmenge zu erhalten. Im Fall von BM waren ca. 60 Einspritzungen einer 0,4%igen Lösung der Fraktion IVb notwendig, um 2 mg Substanz BM zu gewinnen. Als Lösungsmittel diente 50%iger Methanol.

BM wurde in der Folge einer NMR-Analyse unterzogen, um einerseits eine Bestätigung über seine Identität zu erhalten und andererseits auch z.B. Positionen von Substituenten zu bestimmen. Näheres zur Strukturaufklärung der Substanz BM wird im Kapitel 3.3.4 (S. 68 f) behandelt.

3.3 CHARAKTERISIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG

3.3.1 Rhamnetin

Bei der HPLC-Analyse wurde das OWE 48/04 mit ausgewählten Reinsubstanzen verglichen (siehe Kap. 3.1.1.2, Abb. 14, S. 35). Da bei der Retentionszeit der Reinsubstanz Rhamnetin im OWE ein Peak zu erkennen war, wurden dessen UV-Spektrum und das des Rhamnetins miteinander verglichen (siehe Tab. 15).



Tab. 15: Vergleich der UV-Spektren von Rhamnetin und der Substanz mit $t_R=37,46$ im OWE 48/04, HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27)

Anschließend erfolgte die Kopplung der LC mit der Massenspektrometrie (Abb. 39, S. 61). Der Vergleich der erhaltenen Fragmentationen mit den Spektren aus einer Datenbank entsprach der Substanz Rhamnetin. [18] Auch das erhaltene Molekulargewicht von 316 entspricht dem des Rhamnetins. Zusätzlich stimmen die Retentionszeit und das UV-Spektrum überein, womit Rhamnetin im OWE 48/04 von *Myricaria longifolia* identifiziert wurde.

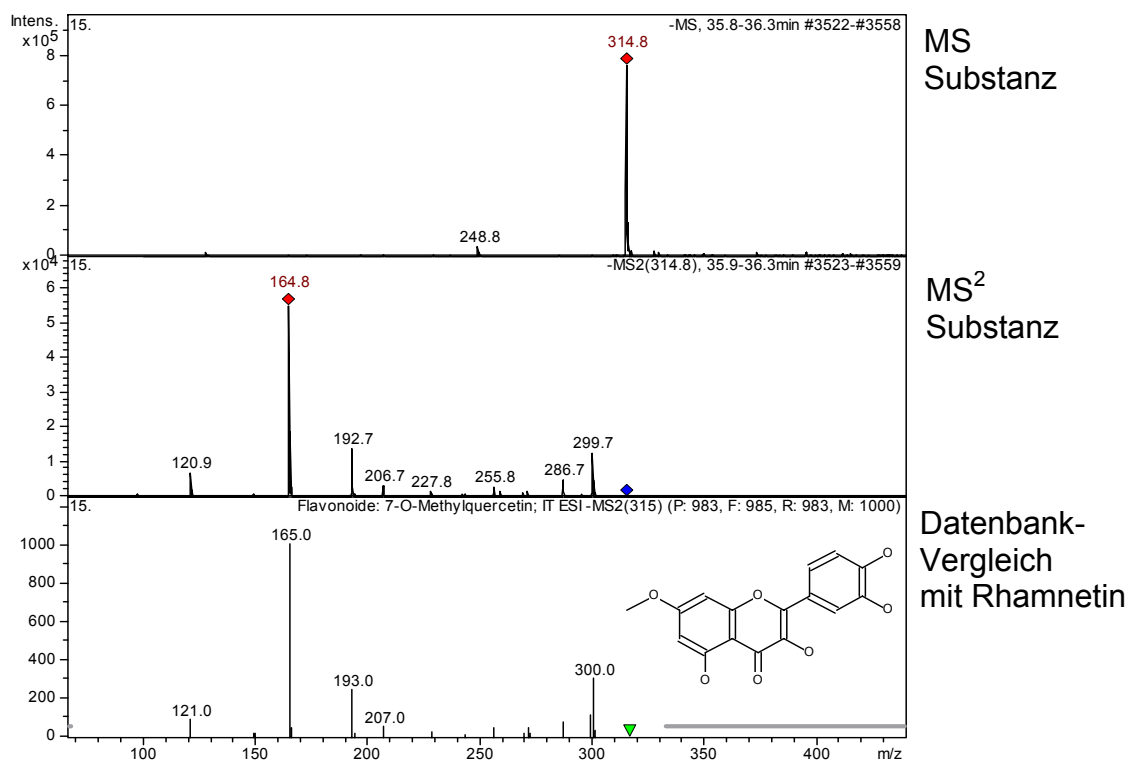


Abb. 39: Massenspektren der Substanz bei $t_R=37,46\text{min}$ im OWE 48/04 (siehe Abb. 14, S. 35) nach LC- MSⁿ –Analyse im Vergleich mit dem MS² – Spektrum von Rhamnetin aus der Datenbank [18]
Methode: LC-MS-Methode (Siehe Tab. 8, S. 29)

Rhamnetin ist ein Flavonol-Derivat, es handelt sich um 7-Methylquercetin.

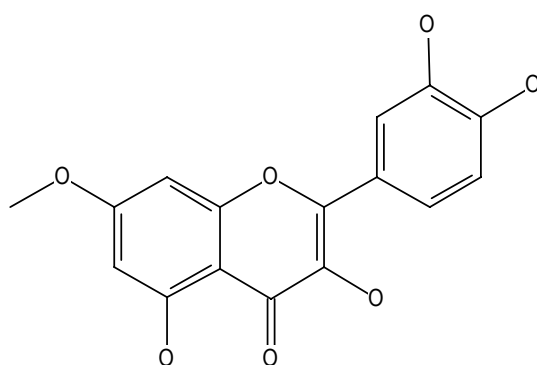
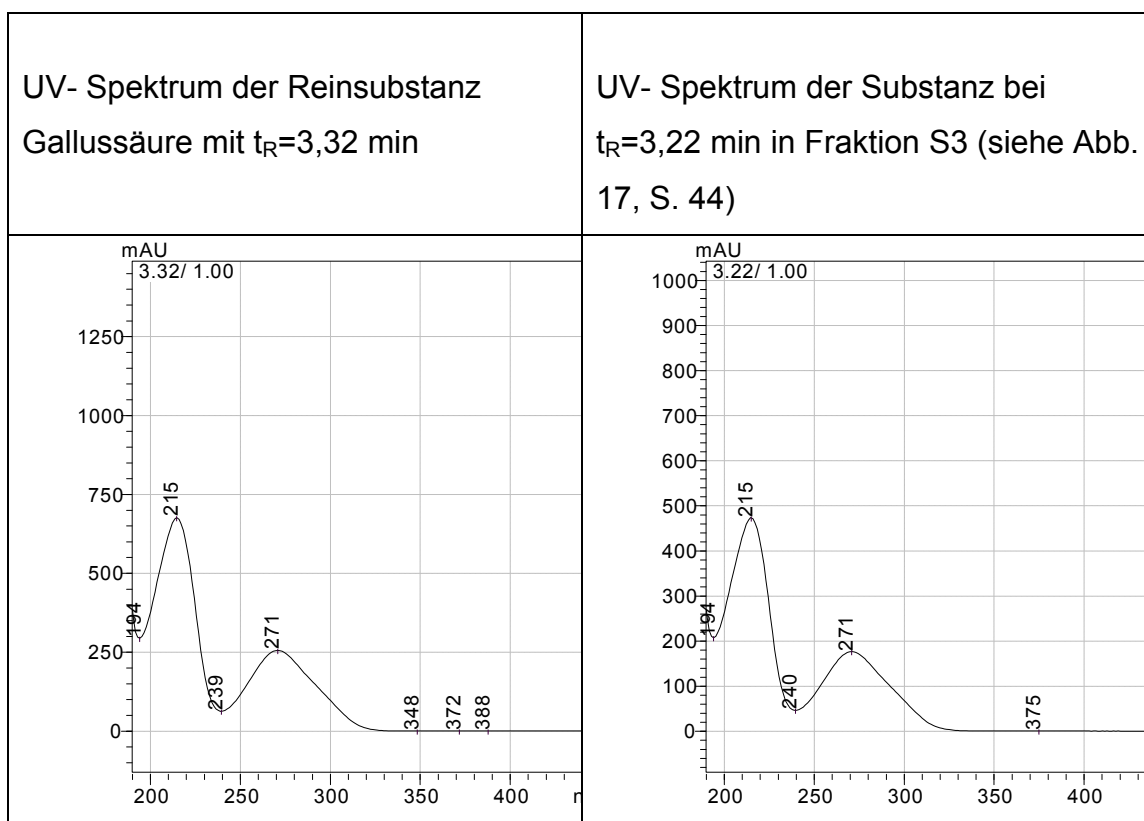


Abb. 40: Strukturformel von Rhamnetin
(Datenquelle: Crossfire Beilstein Datenbank)

3.3.2 Gallussäure

Beim Vergleich von OWE 48/04 mit ausgewählten Säuren (siehe Kap. 3.1.1.2, Abb. 15, S. 36) war vor allem die Übereinstimmung von Gallussäure mit dem Peak bei $t_R=3,22$ min im OWE auffallend. Diese Substanz konnte auch in einigen Fraktionen nachgewiesen werden. Besonders stark angereichert und in hoher Reinheit lag diese Substanz in Fraktion S3 (siehe Abb. 17, S. 44) vor. Ein Vergleich des UV-Spektrums mit jenem der Reinsubstanz Gallussäure nach HPLC-Analyse (siehe Abb. 17, S. 44 und Abb. 15, S. 36) deutete auf hohe Übereinstimmung hin.



Tab. 16: Vergleich der UV-Spektren von Gallussäure und der Substanz mit $t_R=3,22$ min aus Fraktion S3 (siehe Abb. 17, S. 44) nach Analyse mit HPLC-Methode 2 (Tab. 6, S. 27)

Es wurde auch eine dünnschichtchromatographische Analyse durchgeführt, durch die sich eine zusätzliche Bestätigung für das Vorliegen von Gallussäure ergab.



Abb. 41: Analyse der Fraktion S3 und der Reinsubstanz Gallussäure (Gall.s.) mittels DC-System 1 (Tab. 3, S. 21), Detektion bei 366nm nach Besprühen mit NSRA und PEG 400

Die blaue Zonierung der Gallussäure mit einem R_f -Wert von 0,9 ist sehr deutlich in der Fraktion S3 zu finden. Darüber hinaus konnte Gallussäure auch bei der MS^n -Analyse von OWE 48/04 nachgewiesen werden (siehe Abb. 16, S. 41 und Tab. 13, S. 42). Der mit der Ziffer 1 bezeichnete Peak, beziehungsweise die dazugehörige Verbindung, entsprach sowohl hinsichtlich der Retentionszeit als auch des Massenspektrums der Reinsubstanz Gallussäure.

Bei Gallussäure handelt es sich um 3,4,5-Trihydroxy-benzoesäure.

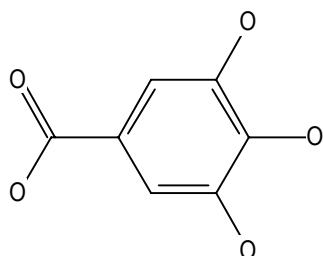


Abb. 42: Strukturformel von Gallussäure
(Datenquelle: Crossfire Beilstein Datenbank)

3.3.3 Ellagsäure

Wie in Kap. 3.1.3, S. 45 f beschrieben ist, konnte angenommen werden, dass es sich bei der aus den SC-Fractionen (siehe Kap. 2.1.4, S. 19) mittels semipräparativer HPLC isolierten Substanz UC2 (siehe Kap. 3.1.3, S. 45 f) um Ellagsäure handelt. Deshalb wurde ein Vergleich von OWE 48/04 mit der Reinsubstanz mittels HPLC unternommen.

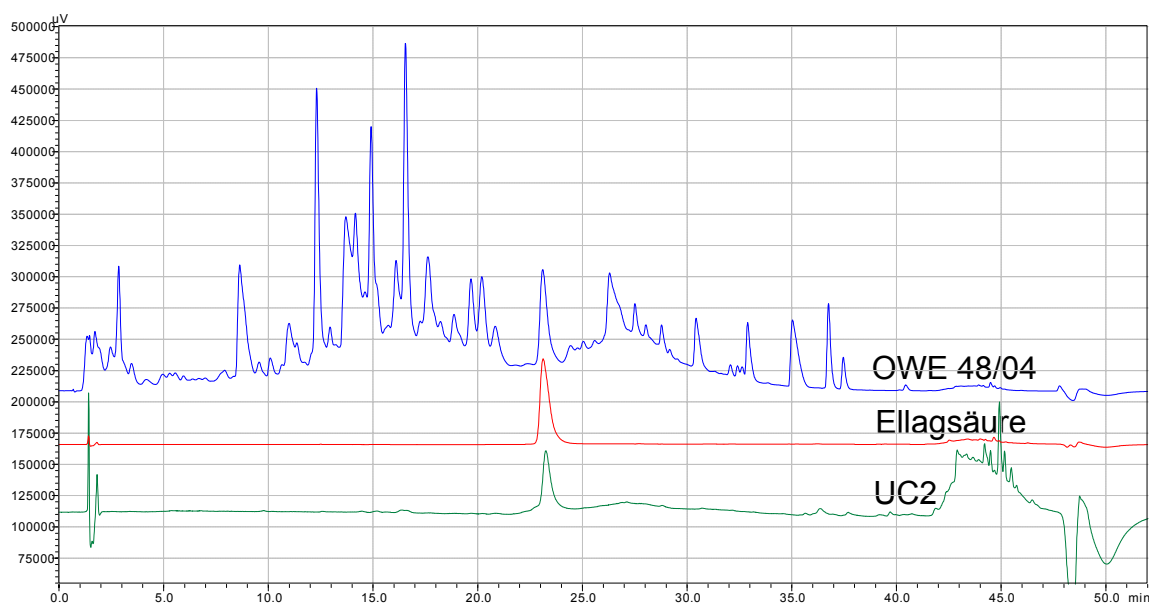
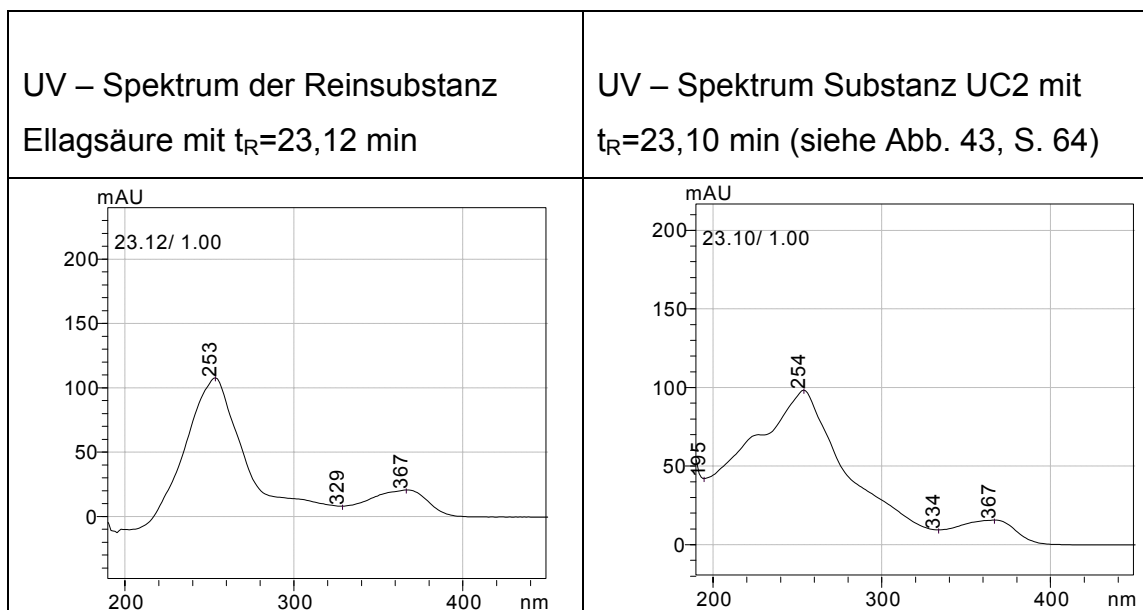


Abb. 43: Vergleich der HPLC-Analysen (HPLC-Methode 2, Tab. 6, S. 27) von OWE 48/04, Ellagsäure und der Substanz UC2 (siehe Kap. 1.2, S. 14/15 und Kap. 3.1.3, S. 45 f), Detektion: 254nm

Wie aus Abb. 43 ersichtlich ist, entspricht die Retentionszeit der Ellagsäure derjenigen von UC2 und einem entsprechenden Peak im OWE 48/04. Beim Vergleich der UV-Spektren wird deutlich, dass es sich um die gleiche Substanz handeln muss.

Die Schulter im Spektrum der Substanz UC2 dürfte auf eine Verbindung, die mit UC2 im Extrakt OWE 48/04 koeluiert zurückzuführen sein. Ansonsten entsprechen die Maxima denjenigen der Ellagsäure.



Tab. 17: Vergleich der UV-Spektren von Ellagsäure und der Substanz UC2 (HPLC-Methode 2, Tab. 6, S. 27)

Aus Abb. 21 (S. 46) wird ersichtlich, dass laut LC-MS das Molekulargewicht der Substanz UC2 302 Da beträgt. Dies entspricht dem Molekulargewicht der Ellagsäure. Auch die im MS^2 – Spektrum erhaltenen Fragmentationen sind charakteristisch für die Ellagsäure. (Abb. 21, S. 46)

Abb. 44 zeigt den dünnschichtchromatographischen Vergleich der Substanz UC2 mit der Reinsubstanz Ellagsäure.

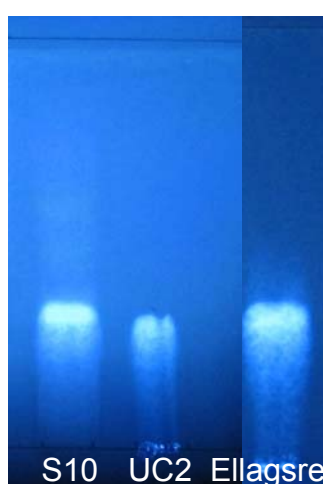


Abb. 44: Vergleich der Substanz UC2 mit der Reinsubstanz Ellagsäure mittels DC-System 2 (Tab. 3, S. 21), Detektion nach Besprühen mit NSRA und PEG 400 bei 366nm

Der Retentionsfaktor ist, wie in Abb. 44 (S. 65) zu sehen ist, nicht ganz identisch. Deswegen wurden mittels einer Verdünnungsreihe sechs verschieden konzentrierte Lösungen der Ellagsäure hergestellt und mittels DC (siehe Abb. 45) und HPLC (siehe Abb. 46, S. 67) analysiert. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass bei der Ellagsäure eine konzentrationsabhängige Änderung des Retentionsverhaltens zu beobachten ist. Immerhin variieren die R_f -Werte von 0,35 bei einer 0,05%-igen Lösung bis zu 0,24 bei einer nur 0,000625%-igen Lösung.

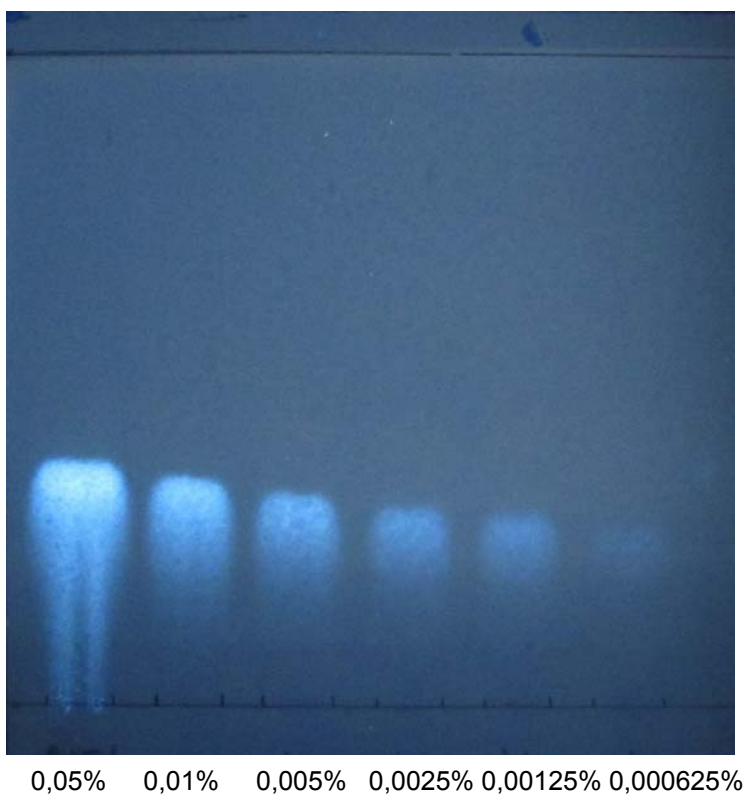


Abb. 45: Analyse von Ellagsäure in verschiedenen Konzentrationsstufen mittels DC-System 2 (Tab. 3, S. 21), Detektion nach Besprühen mit NSRA und PEG 400 bei 366nm

Dieses Phänomen ist, wenn auch in geringerem Ausmaß, auch in der HPLC zu beobachten.

3.3.4 Quercetinglucuronid (BM)

In Kap. 3.2.2 (S. 57 ff) wird die Isolierung der Substanz BM mittels semipräparativer HPLC beschrieben. BM lag stark angereichert in Fraktion IVb vor (siehe Abb. 36, S. 57). Nun wurde die Fraktion IVb mittels LC-MSⁿ analysiert. Bereits die LC-MSⁿ-Analyse von OWE 48/04 hatte einen Hinweis auf das Vorliegen eines Quercetinglucuronids mit dem Molekulargewicht von 478 Da ergeben (siehe Kap. 3.1.1, Abb. 16, S. 41 und Tab. 13, S. 42). Bei der MS² – Analyse war eine Abspaltung von 176 Da zu beobachten, was dem Verlust einer Glucuronsäure entspricht. Das resultierende Fragmentation m/z 300 wurde einer MS³-Analyse unterzogen und das entstandene Spektrum mit jenem von Quercetin verglichen. Der Datenbankvergleich zeigte eine Übereinstimmung der Fragmente. Dadurch bestätigte sich die Vermutung, dass es sich bei der Substanz BM um ein Quercetinglucuronid handelt.

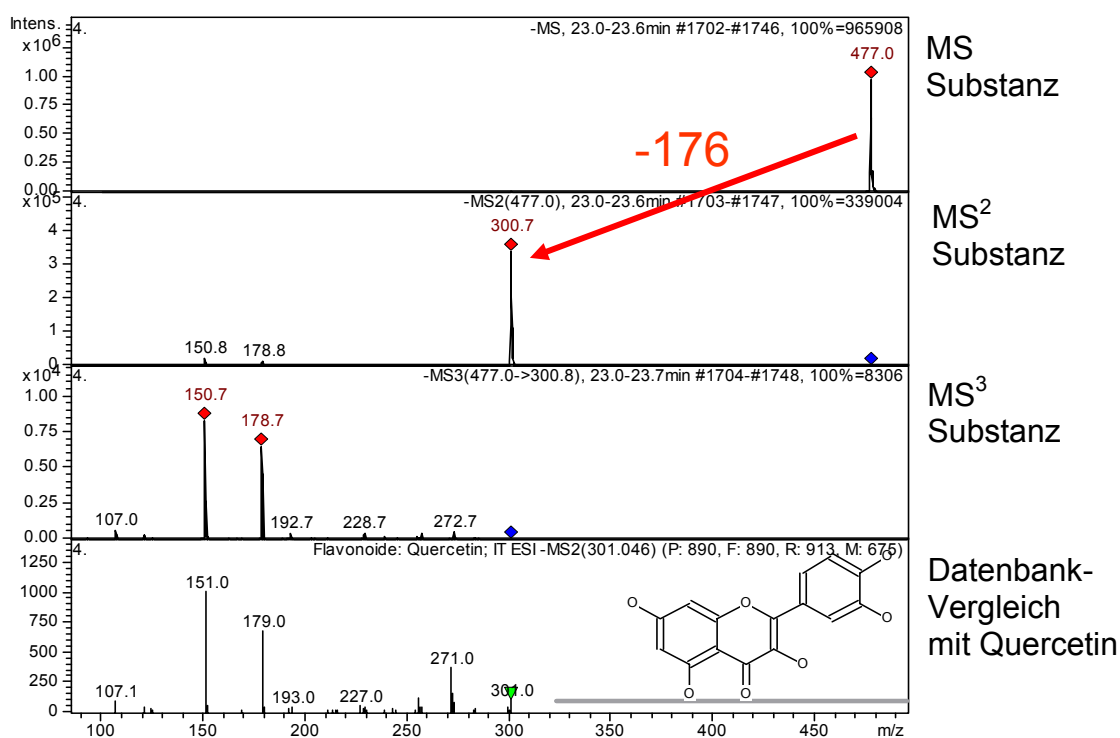


Abb. 48:

Massenspektrum von BM nach Analyse von Fraktion IVb mittels LC-MSⁿ und Datenbankvergleich [18]

Methode: LC-MS-Methode (siehe Tab. 8, S. 29)

Um eine Bestätigung für das Ergebnis zu erhalten und eine Strukturaufklärung zu ermöglichen, wird die Substanz BM derzeit mittels Kernresonanzspektroskopie untersucht. Zusätzliche Informationen über die Struktur des Moleküls können über UV/Vis-Versuche mit Shift-Reagenzien erhalten werden. Auch die Reihenzugehörigkeit der Glucuronsäure sowie deren Substitutionsposition sollte bestimmt werden. Innerhalb dieser Arbeit konnten diese Analysen nicht mehr durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in der Diplomarbeit meiner Kollegin Barbara Kubasa zu finden. [17]

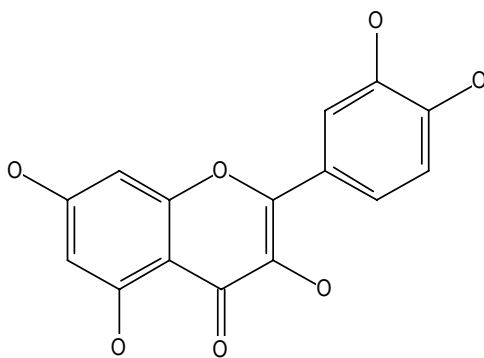


Abb. 49: Strukturformel von Quercetin
(Datenquelle: Crossfire Beilstein Datenbank)

3.3.5 Diskussion und Ausblick

Die Annahme, dass es sich bei der isolierten Reinsubstanz UC2 um eine für die cytotoxische Wirkung verantwortliche Substanz handelt, hat sich nicht bestätigt. Die Annahme basierte darauf, dass UC2 einen Hauptbestandteil der am stärksten wirksamen Fraktionen darstellt. Da UC2 als Ellagsäure identifiziert werden konnte, und sich auch nach einer Literaturrecherche keinerlei Hinweise einer cytotoxischen Wirkung der Ellagsäure ergeben hatten, kann angenommen werden, dass andere Substanzen für die Wirkung verantwortlich sind. Bei den drei anderen identifizierten Verbindungen handelt es sich um ubiquitäre Substanzen, für die eine cytotoxische Wirkung ebenfalls auszuschließen ist. Deswegen sind weitere phytochemische Analysen vonnöten. Vielversprechend wäre eine Abtrennung der Ellagsäure und eine neuerliche Testung der Fraktionen. Deswegen wurden Versuche unternommen eine quantitative Abtrennung zu erzielen, doch aufgrund der ausgesprochen schlechten Löslichkeit von Ellagsäure gelang dies nicht. Außerdem könnte die Reinsubstanz Ellagsäure an Rattenhepatocyten getestet werden, um eine cytotoxische Wirkung auszuschließen.

Eine weitere Möglichkeit bieten die im Zuge dieser Arbeit neu mittels SC gewonnenen Fraktionen. Da mehr Fraktionen gewonnen wurden als bei der vorangegangenen SC, gelang eine effizientere Auftrennung des OWes. Dadurch könnte eine bessere Eingrenzung der Wirkung auf eine oder wenige Fraktionen erreicht worden sein, was eine leichtere Identifizierung der enthaltenen Substanz oder Substanzen ermöglichen würde. Um dies herauszufinden werden die Cytotoxizitätstests mit den in dieser Arbeit gewonnenen Fraktionen derzeit wiederholt.

4 ZUSAMMENFASSUNG (ABSTRACT)

Die vorliegende Diplomarbeit liefert Beiträge zur phytochemischen Analyse der mongolischen Heilpflanze *Myricaria longifolia*. Diese Pflanze findet in der traditionellen mongolischen Medizin bei Lebererkrankungen Anwendung. Nachdem in der Mongolei die traditionelle Medizin einen hohen Stellenwert hat und auch in den westlichen Ländern eine steigende Bedeutung alternativer Heilmethoden zu beobachten ist, sind wissenschaftliche Analysen dieser Heilpflanzen von Bedeutung.

Ziel der Arbeit war es, analytische Systeme (DC, HPLC) für die Untersuchung verschiedener Extrakte und Fraktionen von *Myricaria longifolia* zu entwickeln. Es wurden verschiedene stationäre Phasen erprobt und die Gradientenelution variiert, wodurch die Optimierung der Systeme sowohl für das analytische als auch für das präparative Arbeiten gelang. Weiters erfolgte eine Fraktionierung eines wässrigen Extraktes durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20. Aus einer der Fraktionen wurde eine Verbindung isoliert, deren Struktur als Quercetinglucuronid geklärt werden konnte. Um dieses Ergebnis zu bestätigen und die exakte Struktur des Quercetinglucuronids aufzuklären wird derzeit eine NMR-Analyse durchgeführt. Es muss noch die Substitutionsposition der Glucuronsäure und deren Reihenzugehörigkeit mittels Hydrolyse und anschließender Detektion durch GC-MS geklärt werden. Auch die Substanz Rhamnetin, das Benzoessäurederivat Gallussäure und die Substanz Ellagsäure konnten mit den zur Verfügung stehenden analytischen Methoden (LC-DAD, LC-MS und Retentions- und Farbverhalten bei der DC) identifiziert und charakterisiert werden. Keine der vier zugeordneten Strukturen lässt auf die cytotoxische Wirkung des wässrigen Gesamtextraktes schließen. Daher müssen andere Verbindungsklassen enthalten sein, die es in künftigen Forschungsarbeiten aufzuklären gilt.

5 LITERATURVERZEICHNIS

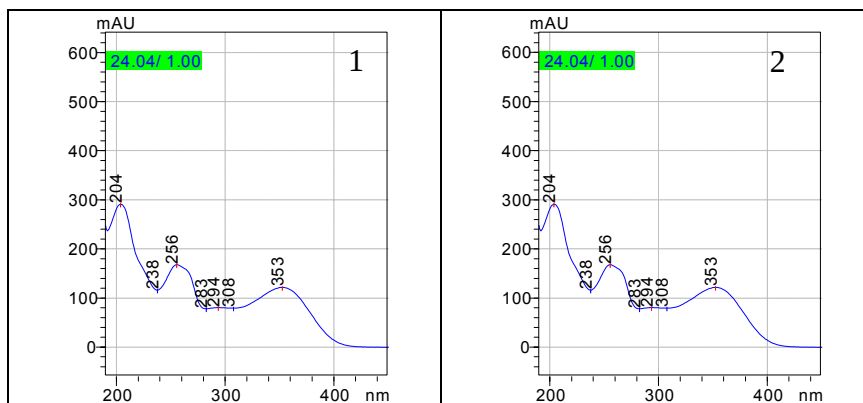
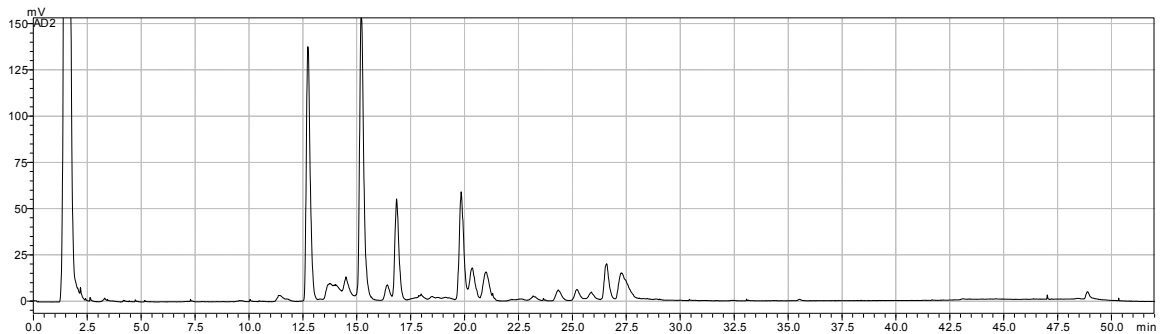
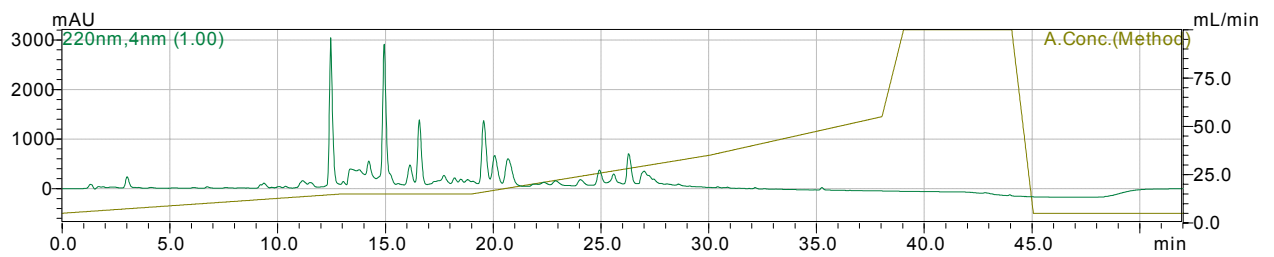
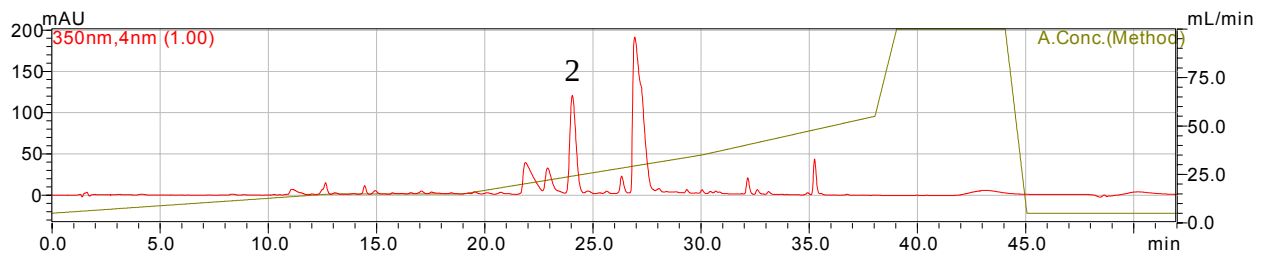
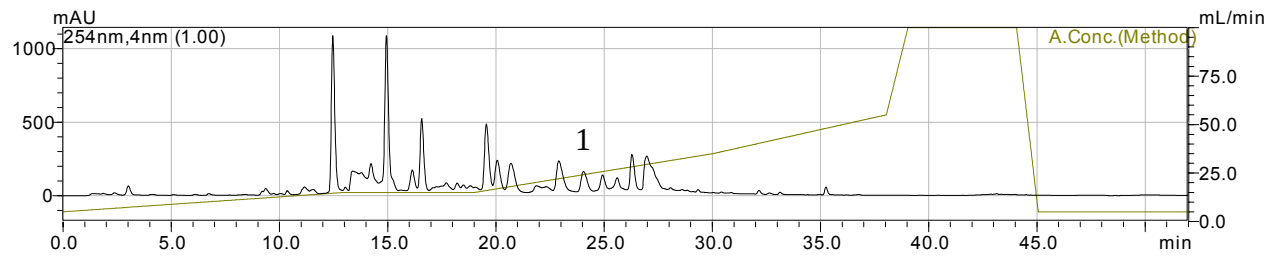
- [1] Mayr K.: Charakterisierung von Sesquiterpenlactonen und Flavonoiden aus *Saussurea amara* Dc. (Asteraceae), Diplomarbeit, Universität Wien 2006
- [2] Munkhdelger Ch., Tserenkhagva R.: Report of Market Research on Mongolian Traditional Medicinal Drugs, Ministry of Health Mongolia, School of Pharmacy, Health Sciences University of Mongolia, 2007
- [3] Sigmund A.: Phytochemische Untersuchungen an einem Dichlormethan-extrakt der mongolischen Arzneipflanze *Euphorbia pallasii* TURCZ., Diplomarbeit, Universität Wien 2009
- [4] Obmann A., Tsendayush D., Thalhammer Th., Zehl M., Vo T.P.N., Purevsuren S., Natsagdorj D., Narantuya S., Kletter Ch., Glasl S.: Extracts from the Mongolian Traditional Medicinal Plants *Dianthus versicolor* FISCH. and *Lilium pumilum* DELILE Stimulate Bile Flow in an Isolated Perfused Rat Liver Model, Journal of Ethnopharmacology, im Druck
- [5] Vogl C., Krencker D., Bresgen N., Eckl P. M., Glasl S., Kletter Ch.: In vitro toxicological properties of selected Mongolian traditional medicinal plants Posterbeitrag anlässlich der Tagung "50 Years of the Phytochemical Society of Europe", Churchill College, Cambridge UK, 11.-14. April 2007, Tagungsunterlagen
- [6] Badgaa A.: Bericht über die Arbeiten an *Euphorbia palasii* und *Myricaria longifolia*, Universität Wien 2007-2008
- [7] Vogl C., Bresgen N., Eckl P.M., Glasl S., Kletter Ch.: In vitro evaluation of the Hepatotoxic Potential of Aqueous and Methanolic Extracts of *Myricaria longifolia*, Sci Pharm. 2009; 77: 268
Posterpräsentation im Rahmen der 21. wissenschaftlichen Tagung der österreichischen pharmazeutischen Gesellschaft (ÖPHG), Wien 2009

- [8] Donath O.: Charakterisierung von phenolischen Inhaltsstoffen der mongolischen Heilpflanze *Myricaria longifolia* EHRENB., Diplomarbeit, Universität Wien 2006
- [9] Ligaa U., Davaasuren B., Ninjiil N.: Medicinal Plants of Mongolia used in Western and Eastern Medicine, Ulaanbaatar 2006
Übersetzung aus dem Mongolischen von Sarantuya Jav
- [10] Kletter Ch., Glasl S., Thalhammer Th., Narantuya S.: Traditional Mongolian Medicine – A Potential for Drug Discovery, Sci Pharm. 2008, 76: 49-63
- [11] Böcker J.: Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, Vogel Buchverlag 1997
- [12] Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M.: Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer-Verlag Berlin Heidelberg NewYork 1983
- [13] Adam K.P., Becker H.: Analytik biogener Arzneistoffe, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 2000
- [14] Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch – 8., neu bearb. und erw. Aufl. von Artur Burger und Helmut Wachter – Berlin; New York: de Gruyter , 1998
- [15] Hesse M., Meier H., Zeeh B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 7., überarbeitete Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2005
- [16] Williams D.H., Fleming I.: Strukturaufklärung in der organischen Chemie, 5., neubearbeitete Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 1985
- [17] Kubasa B.: Diplomarbeit in Vorbereitung, Universität Wien
- [18] Burgert M.: Diplomarbeit in Vorbereitung, Universität Wien

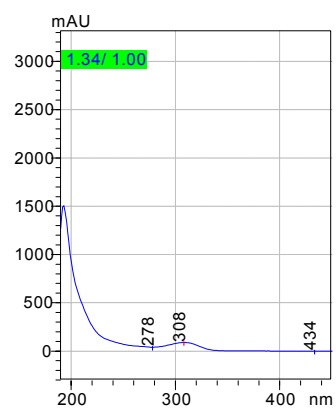
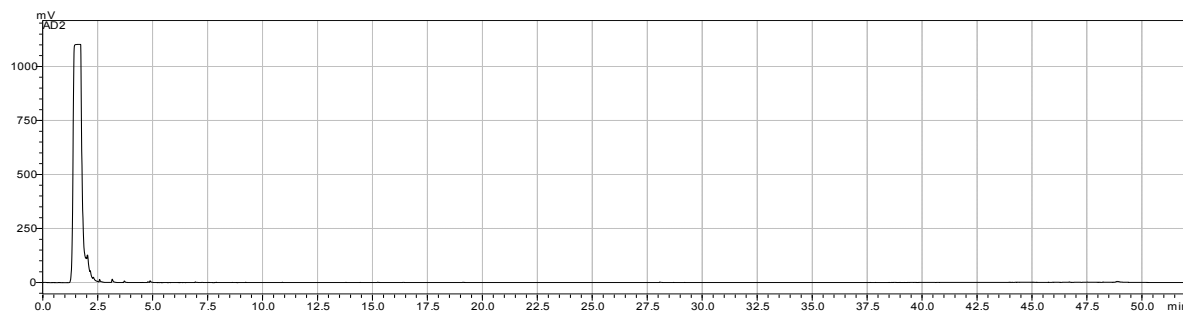
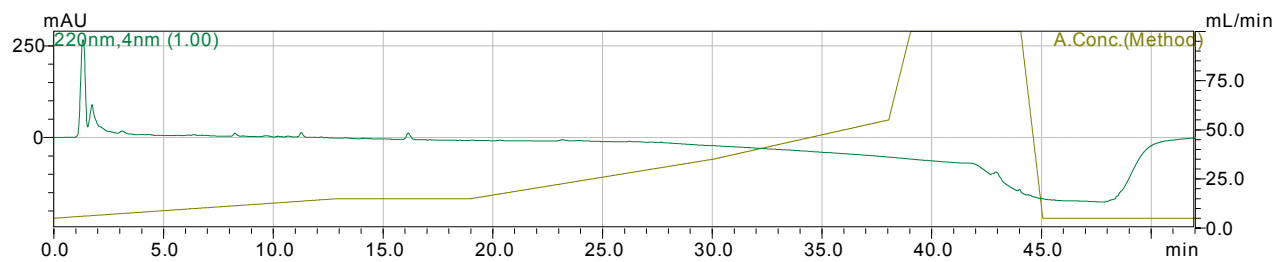
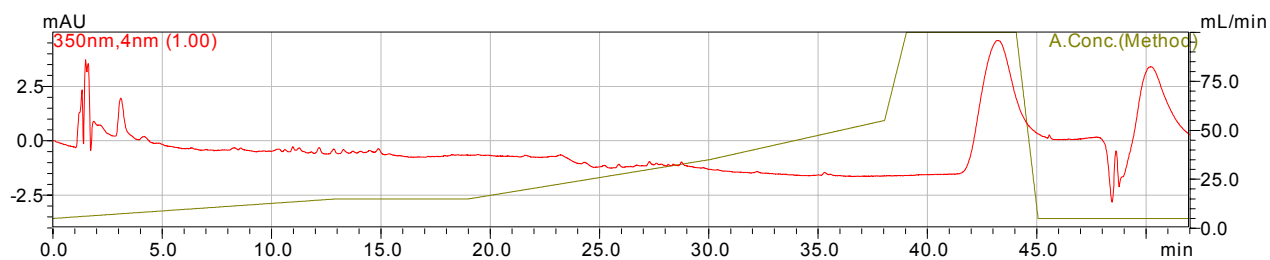
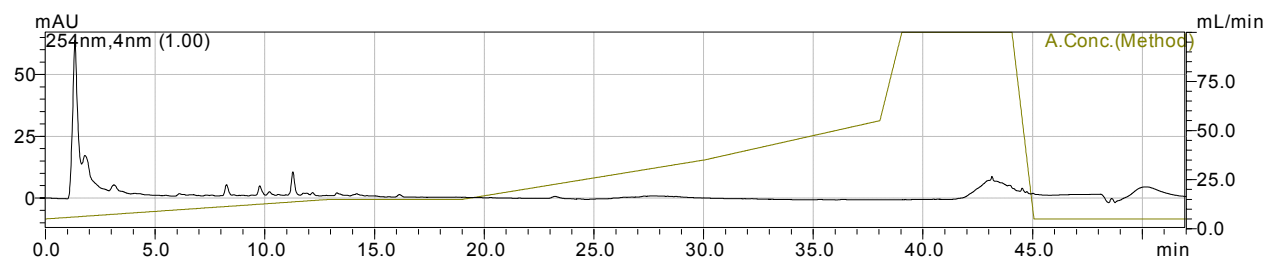
6 ANHANG

Im Anhang sind die HPLC-Analysen aller säulenchromatographisch gewonnenen Fraktionen und des Gesamtextraktes aufgelistet. Das Gesamtextrakt (=G.E.) entspricht dem auf die Säule aufgetragenen chlorophyllbefreiten BE 48/04 (siehe Kap. 2.1.3, S. 18 f und Kap. 3.2.1, S. 47 ff). Die verwendete Methode ist die in Kapitel 2.2.3 (Tab. 6, S. 27) beschriebene HPLC-Methode 2. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei den Wellenlängen 254nm (schwarzes Chromatogramm), 350nm (rotes Chromatogramm) und 220nm (grünes Chromatogramm). Außerdem erfolgte eine Detektion mittels ELSD. Die ELSD-Chromatogramme (in schwarzer Farbe, Bezeichnung ‚AD2‘) wurden allerdings nur bei den Fraktionen abgebildet, wo eine Detektion mittels Lichtstreuendetektor andere Substanzen sichtbar macht. Weiters sind die UV-Spektren ausgewählter Substanzen aufgelistet. Die Nummerierung der Peaks erfolgt bei jeder Fraktion von neuem und unabhängig von den vorigen.

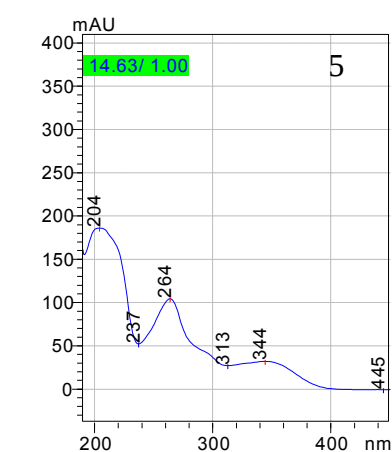
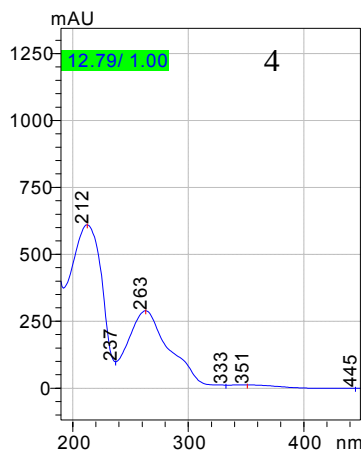
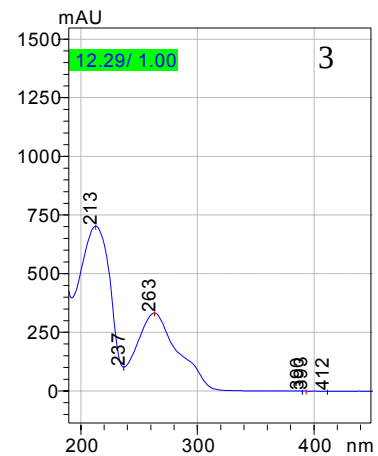
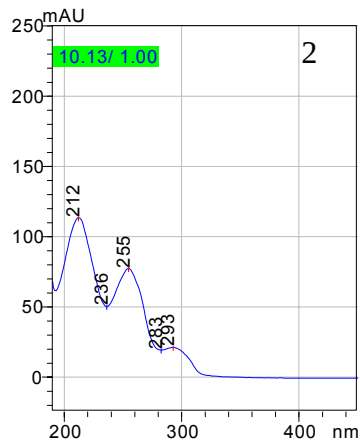
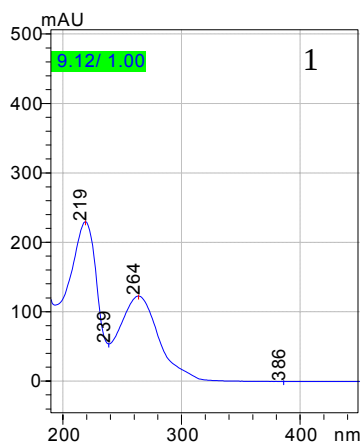
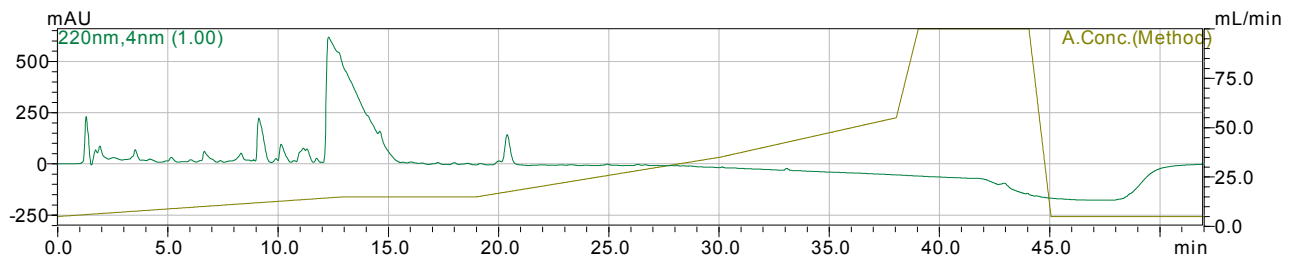
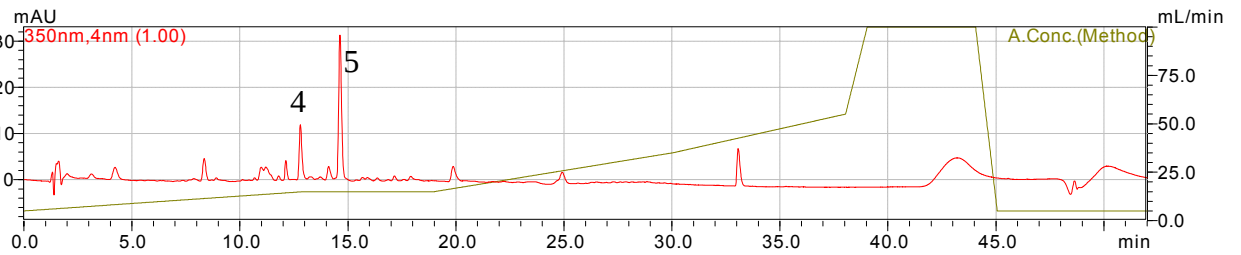
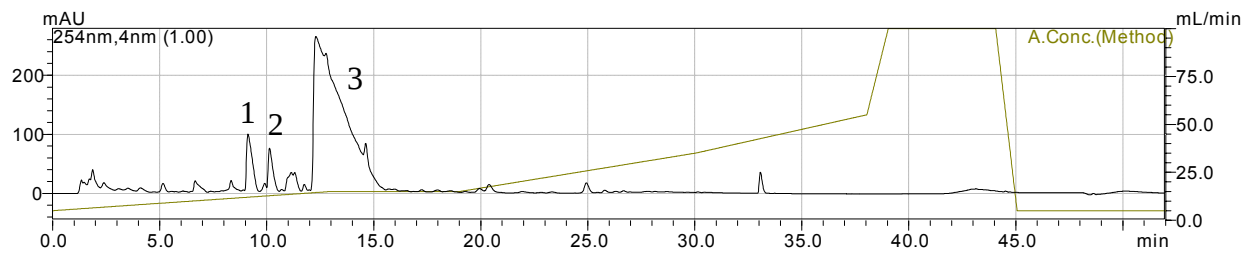
Gesamtextrakt der Säulenchromatographie



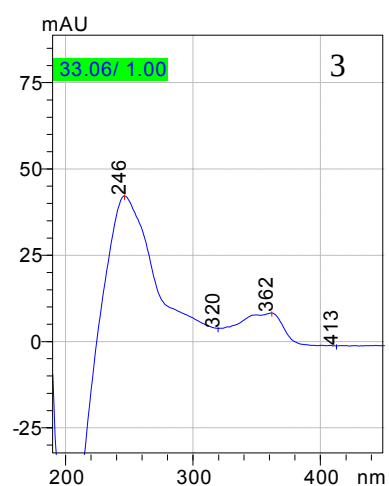
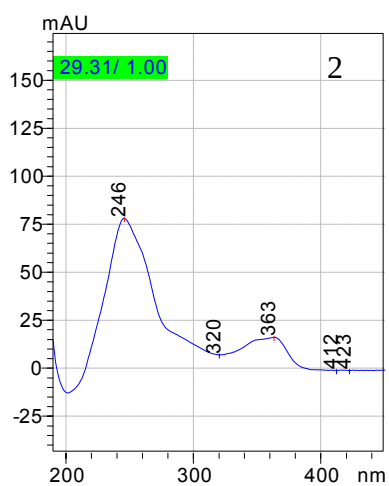
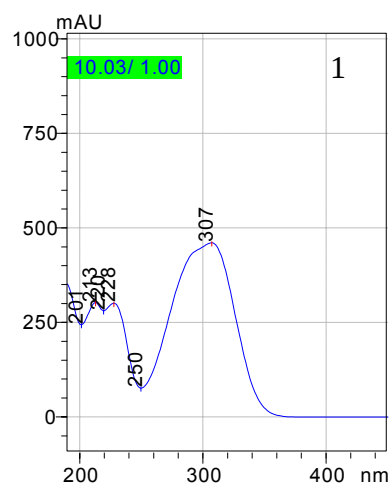
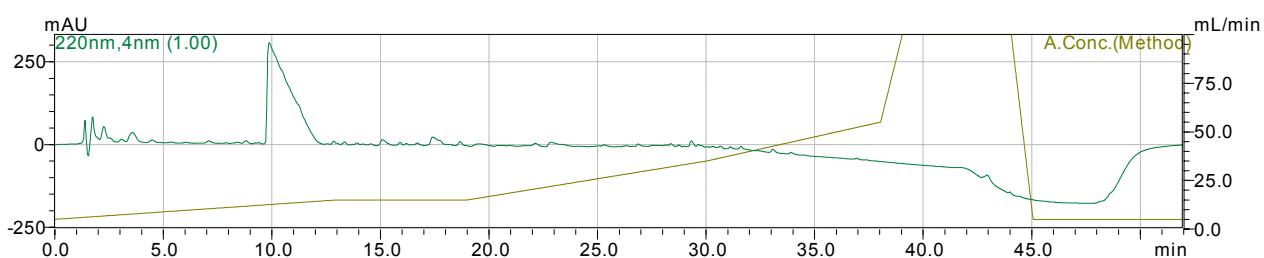
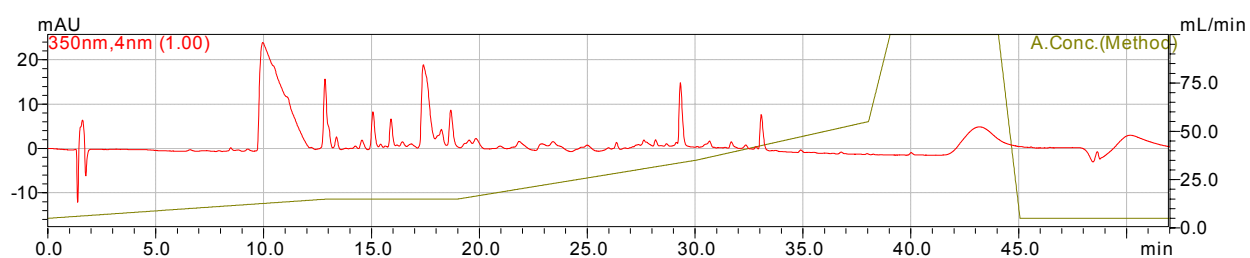
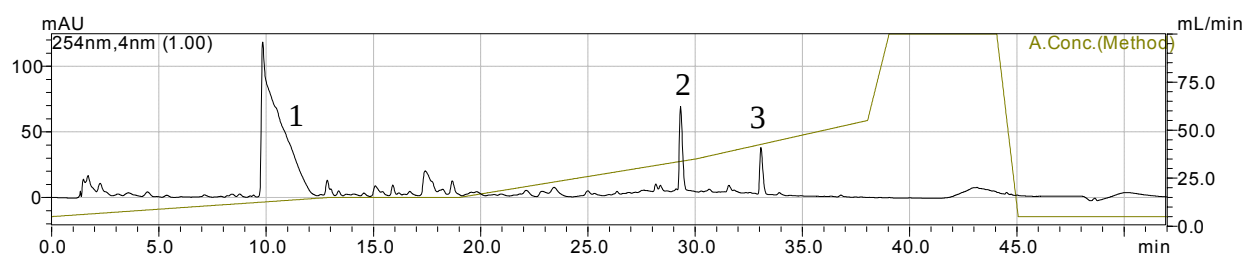
Fraktion Ia der Säulenchromatographie



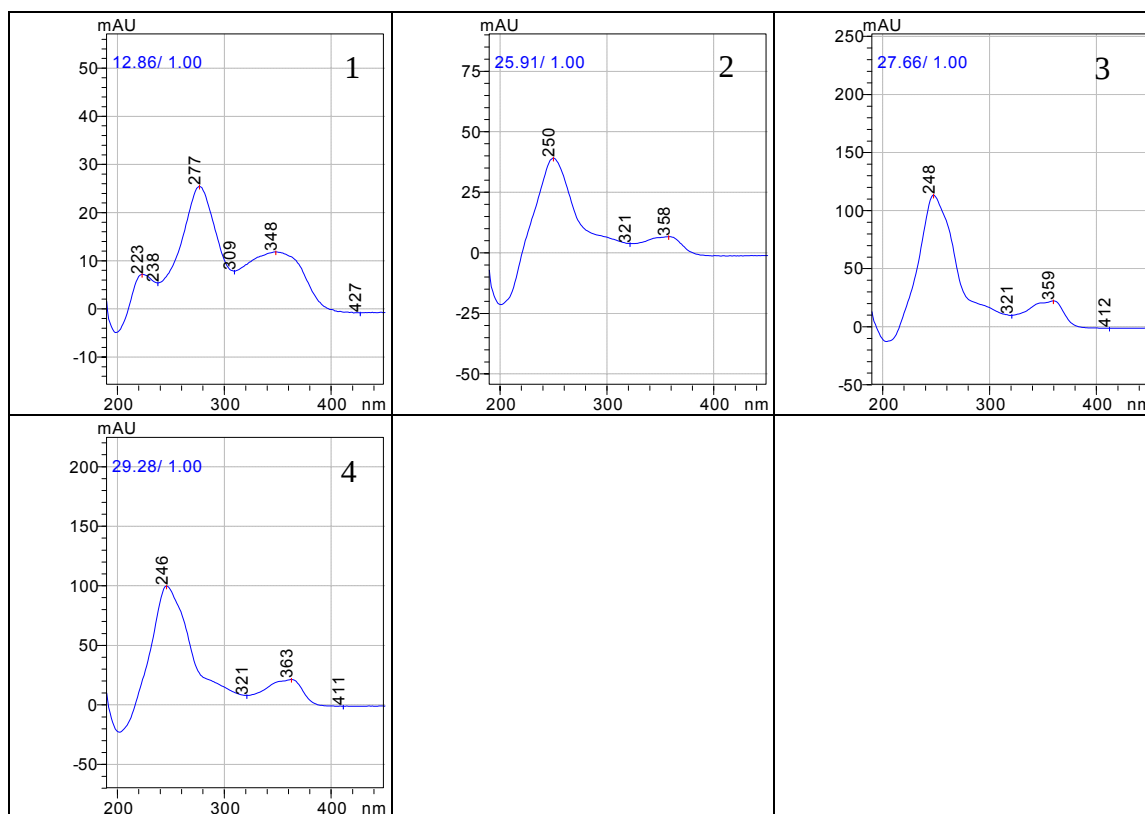
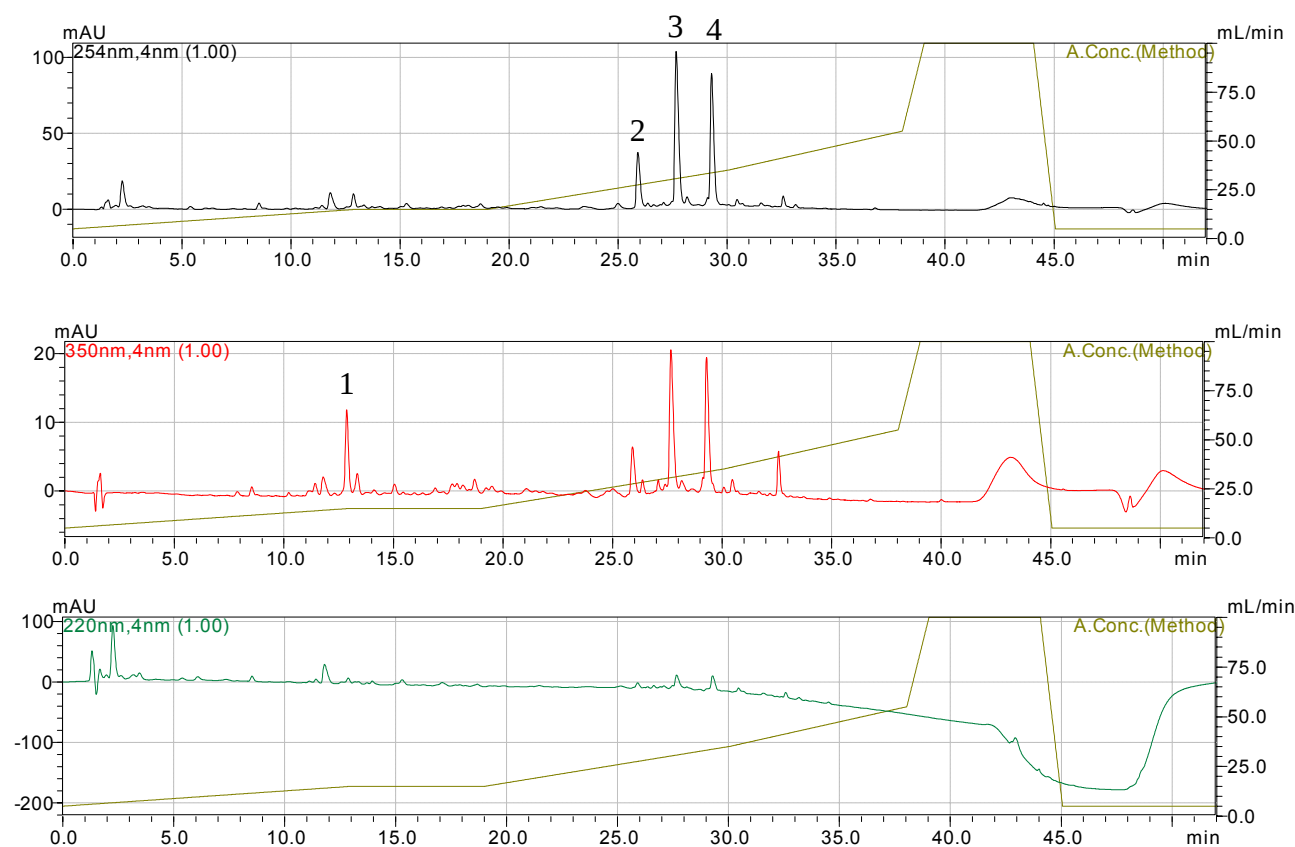
Fraktion Ib der Säulenchromatographie



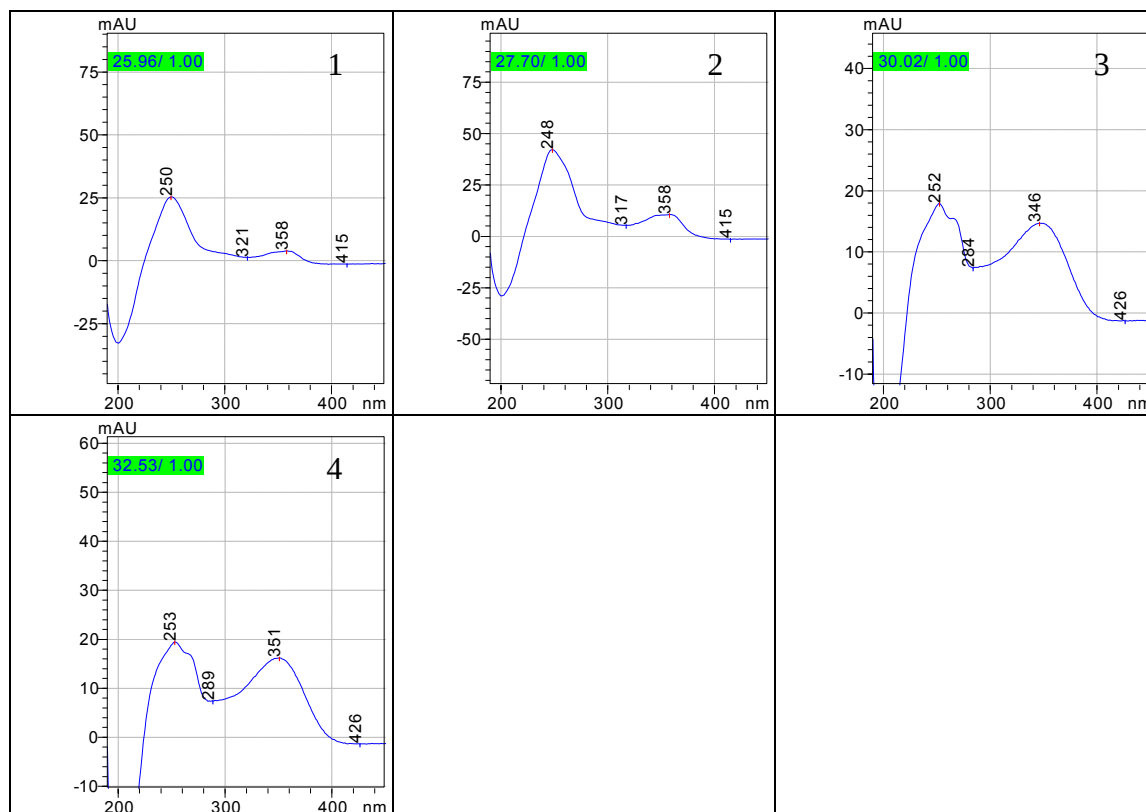
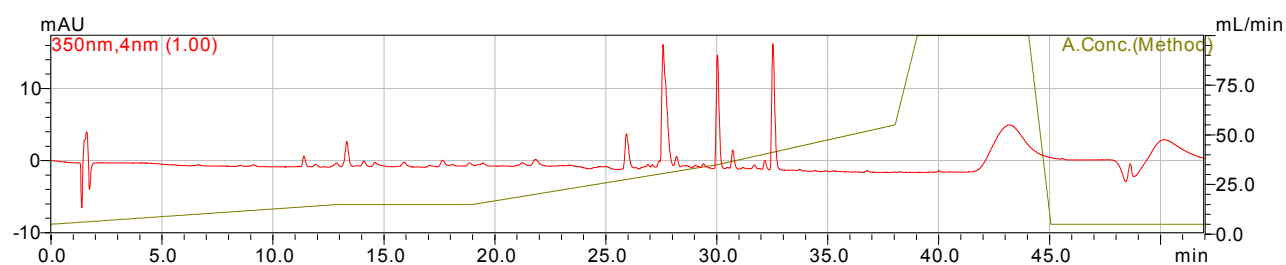
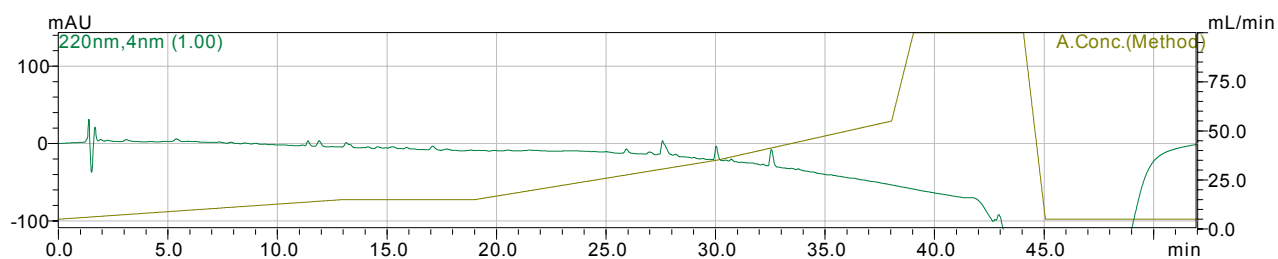
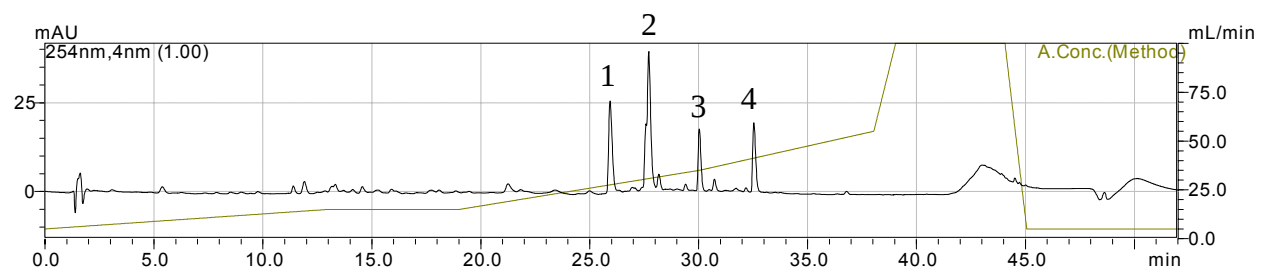
Fraktion IIa der Säulenchromatographie



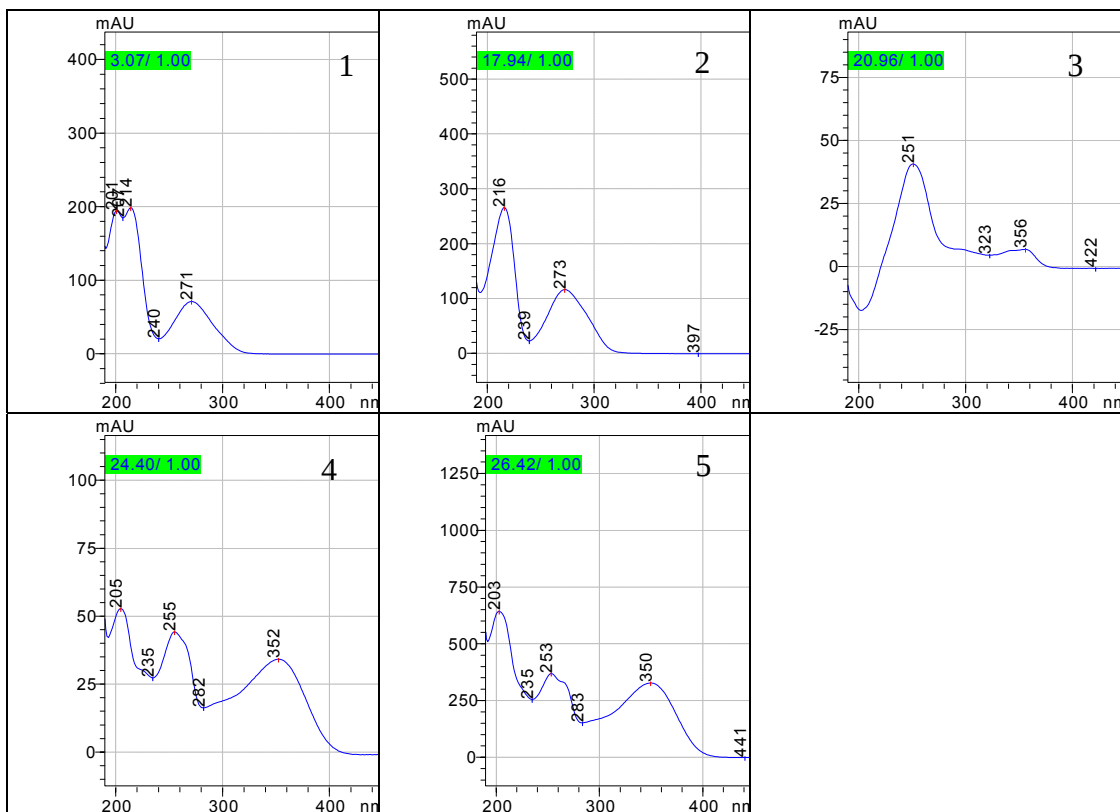
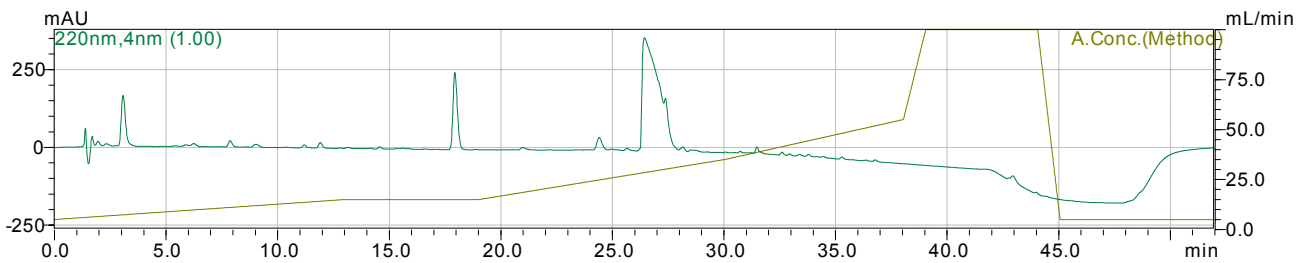
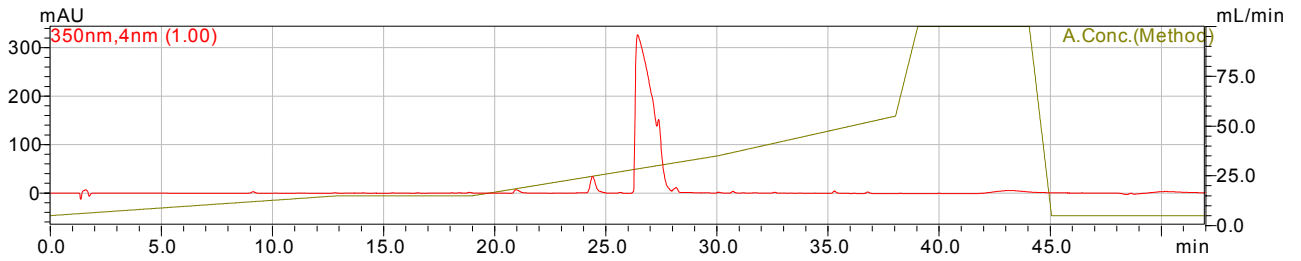
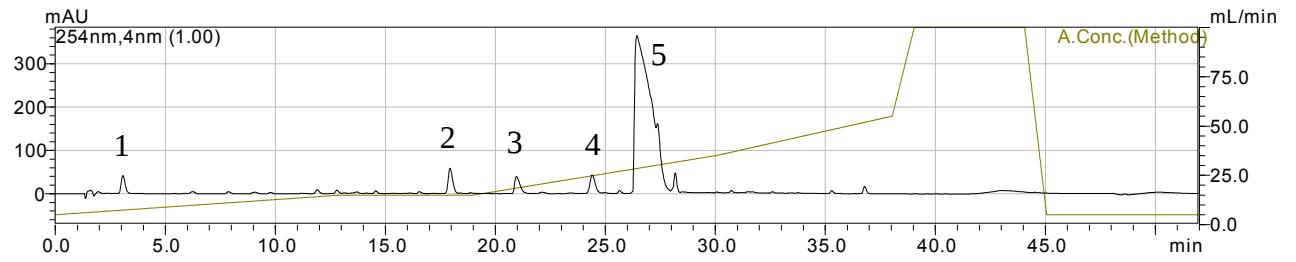
Fraktion IIb der Säulenchromatographie



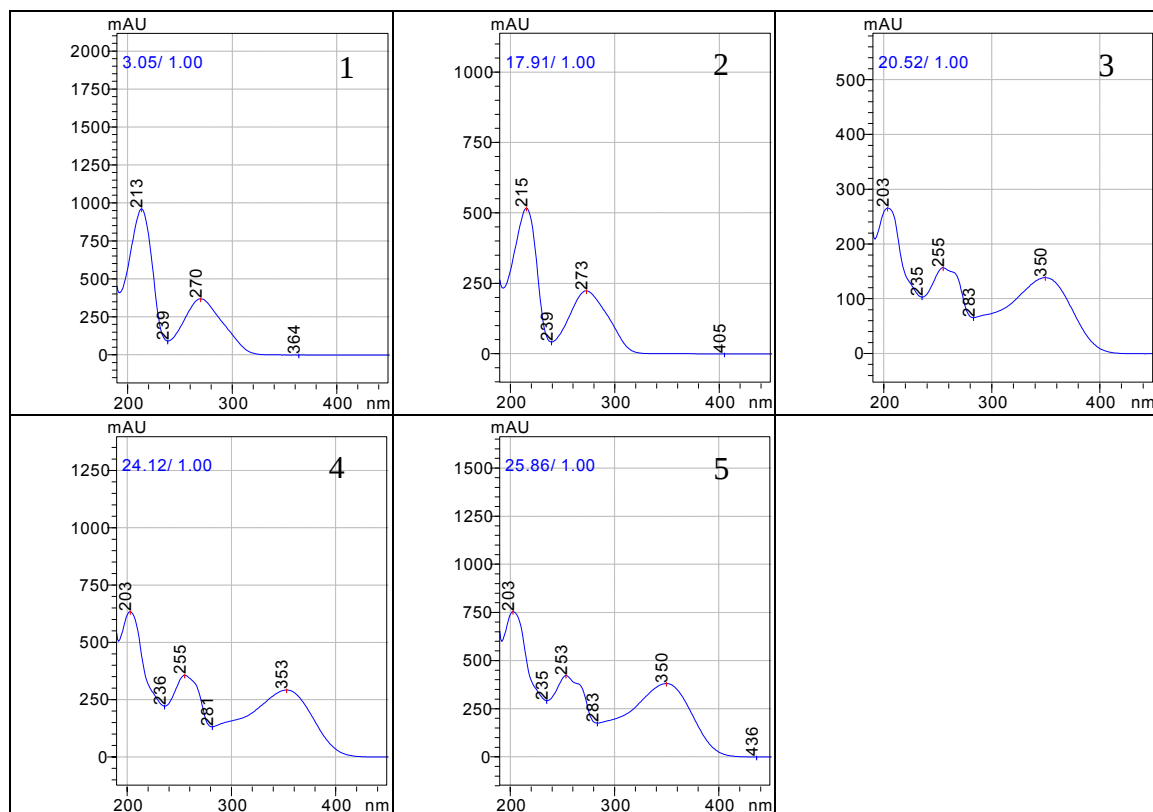
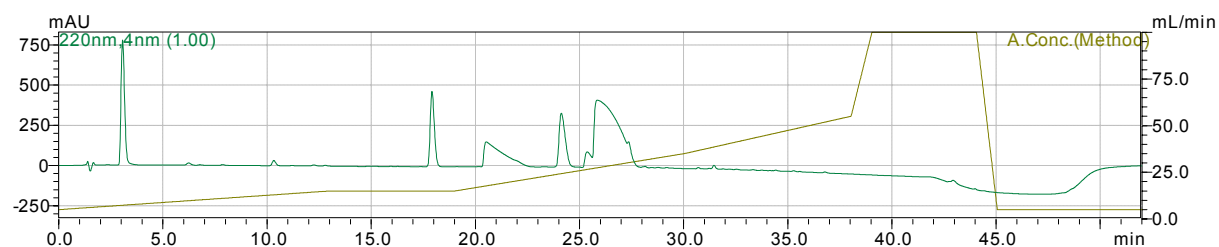
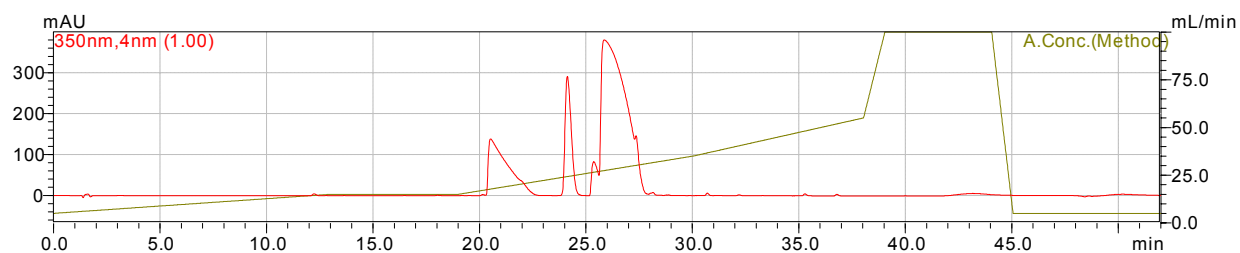
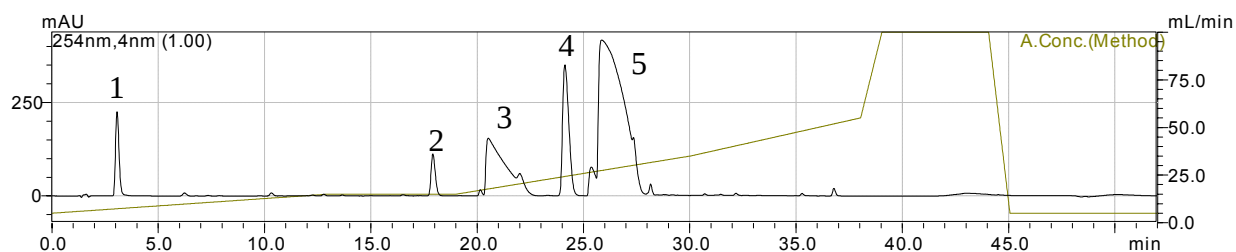
Fraktion IIIa der Säulenchromatographie



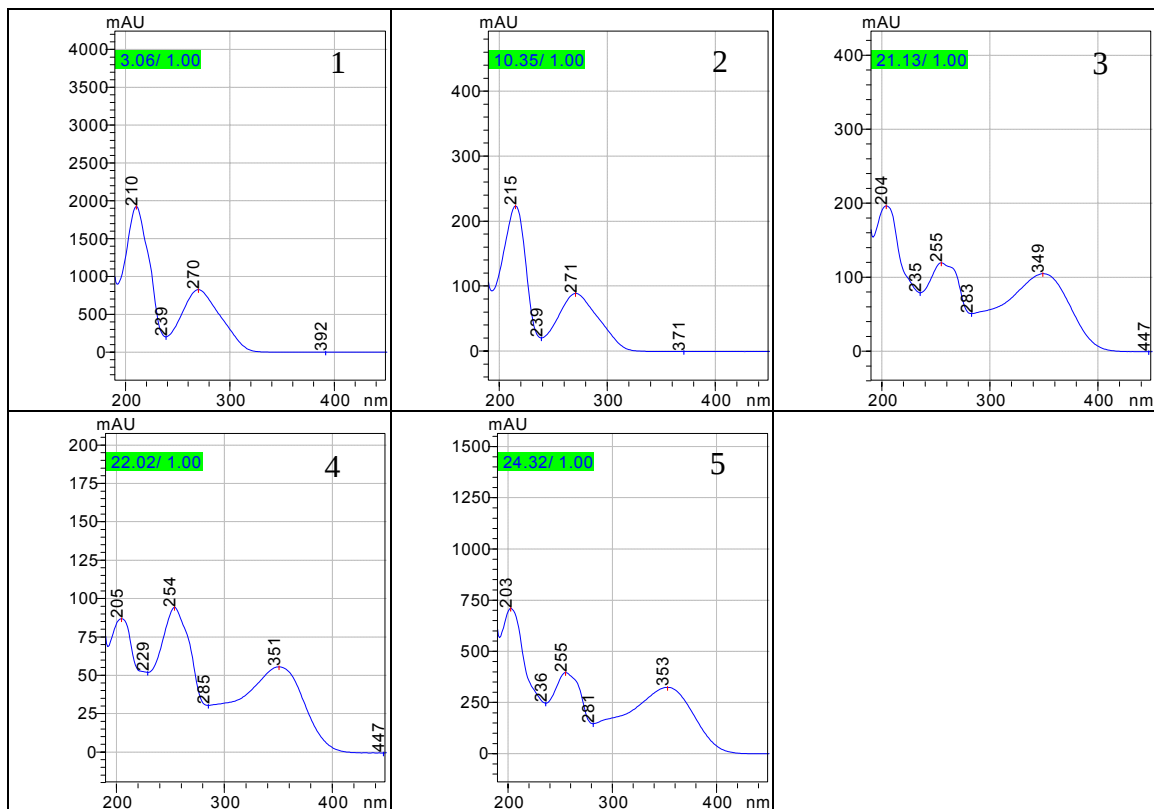
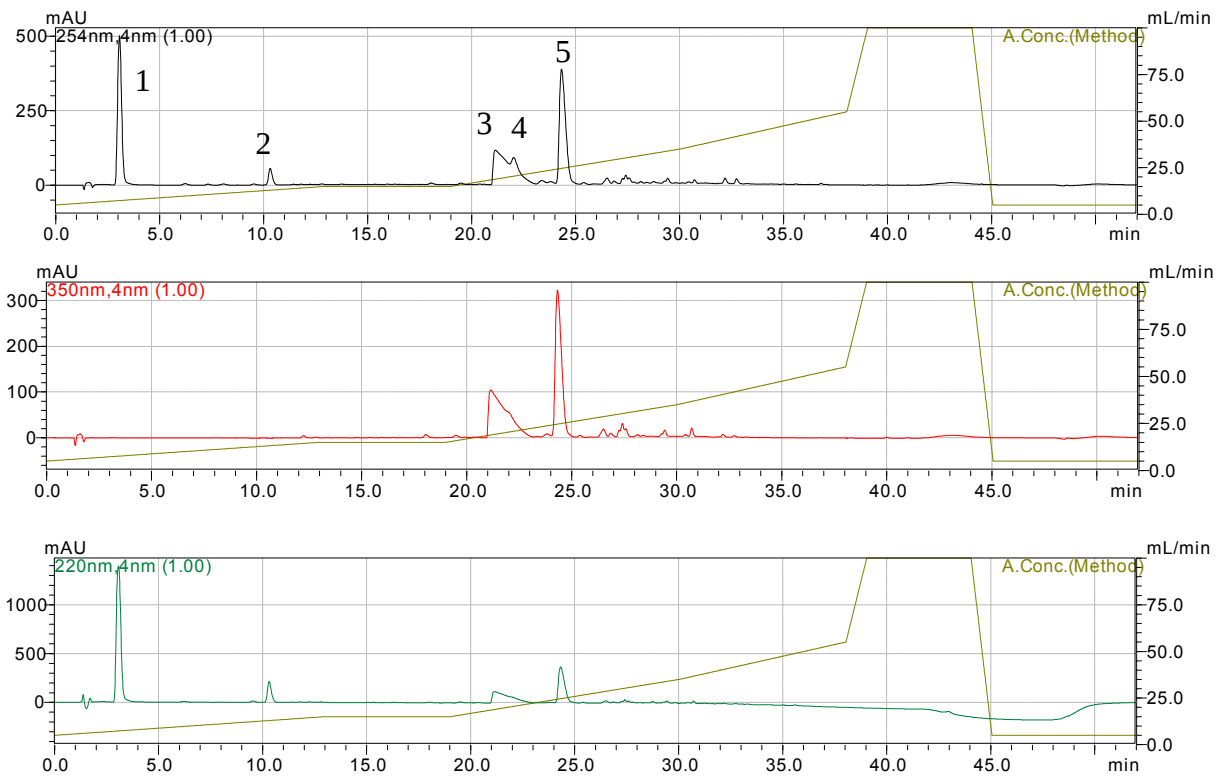
Fraktion IIIb der Säulenchromatographie



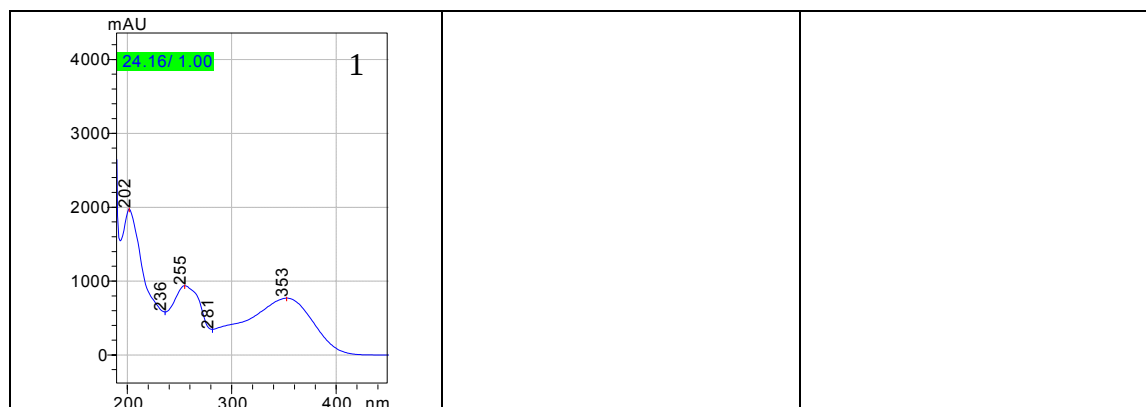
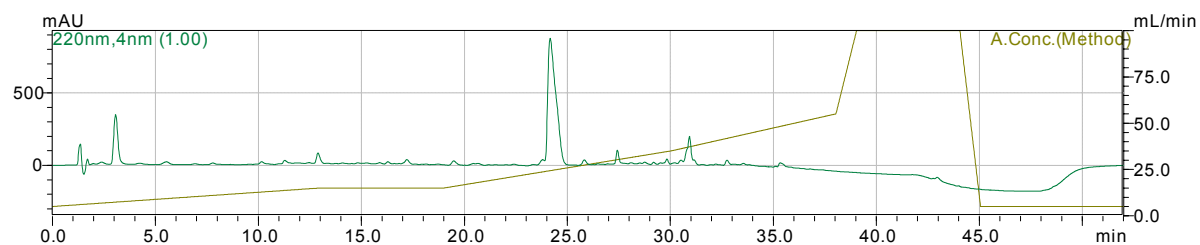
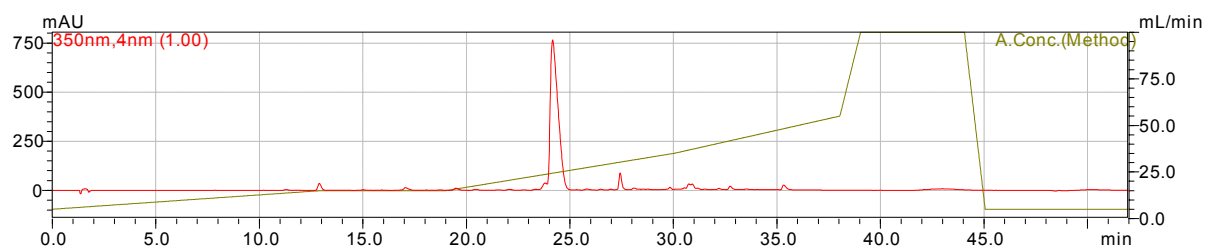
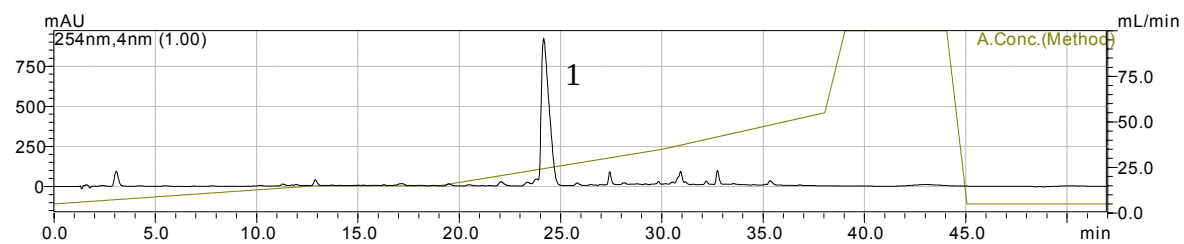
Fraktion IIIc der Säulenchromatographie



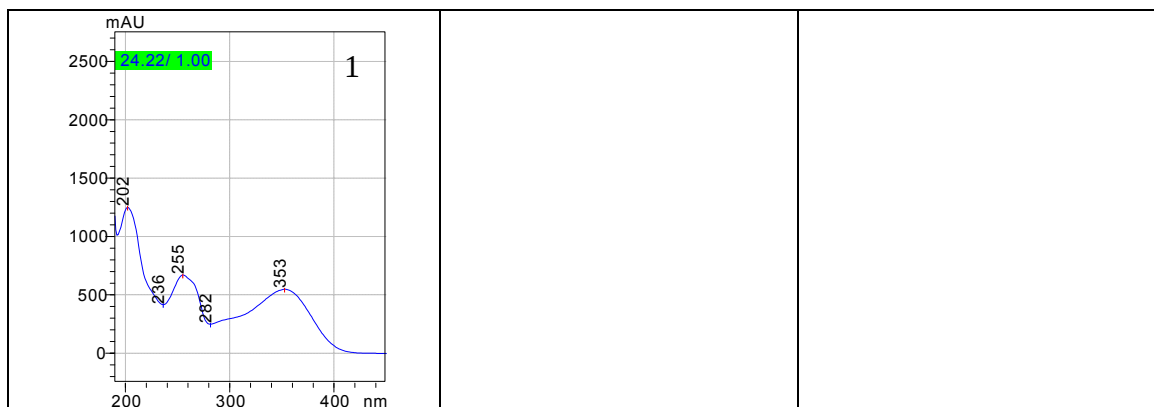
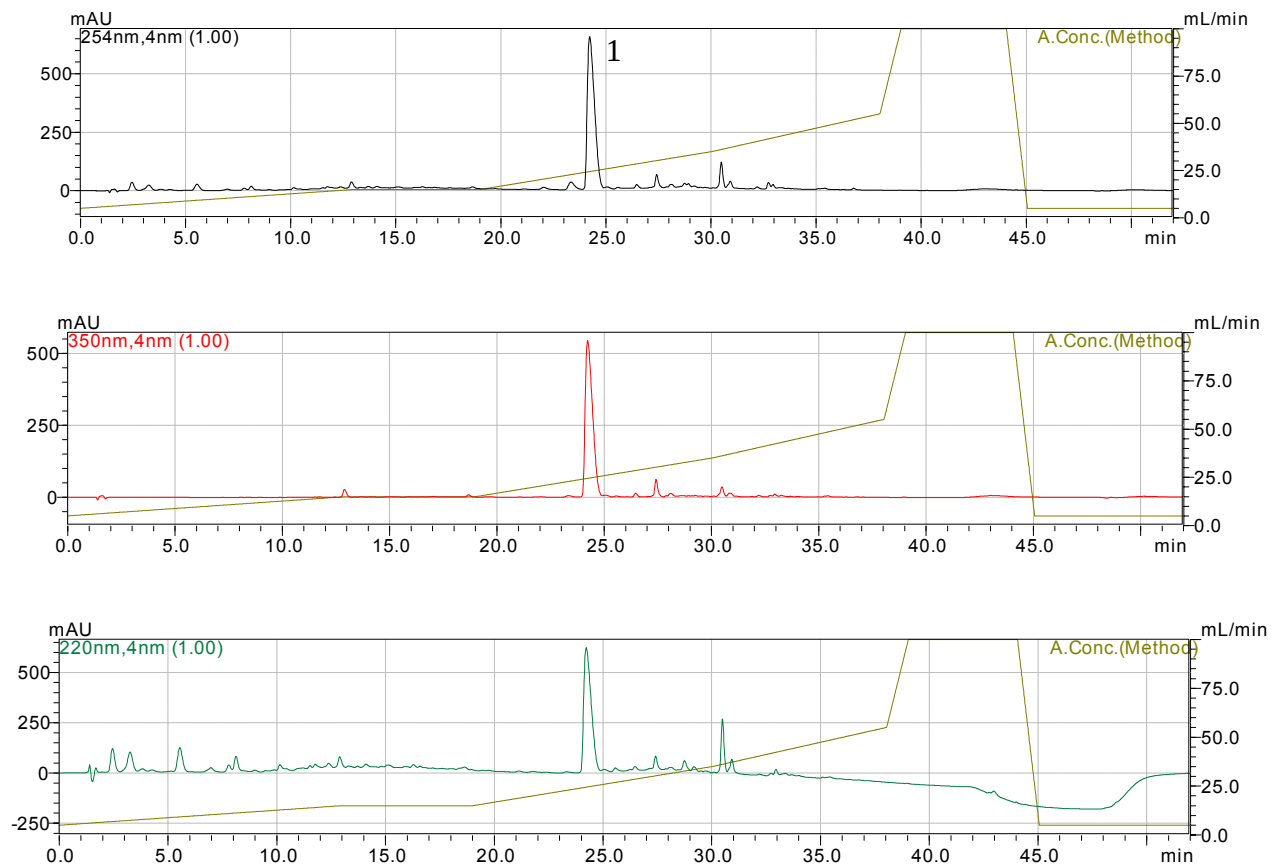
Fraktion IVa der Säulenchromatographie



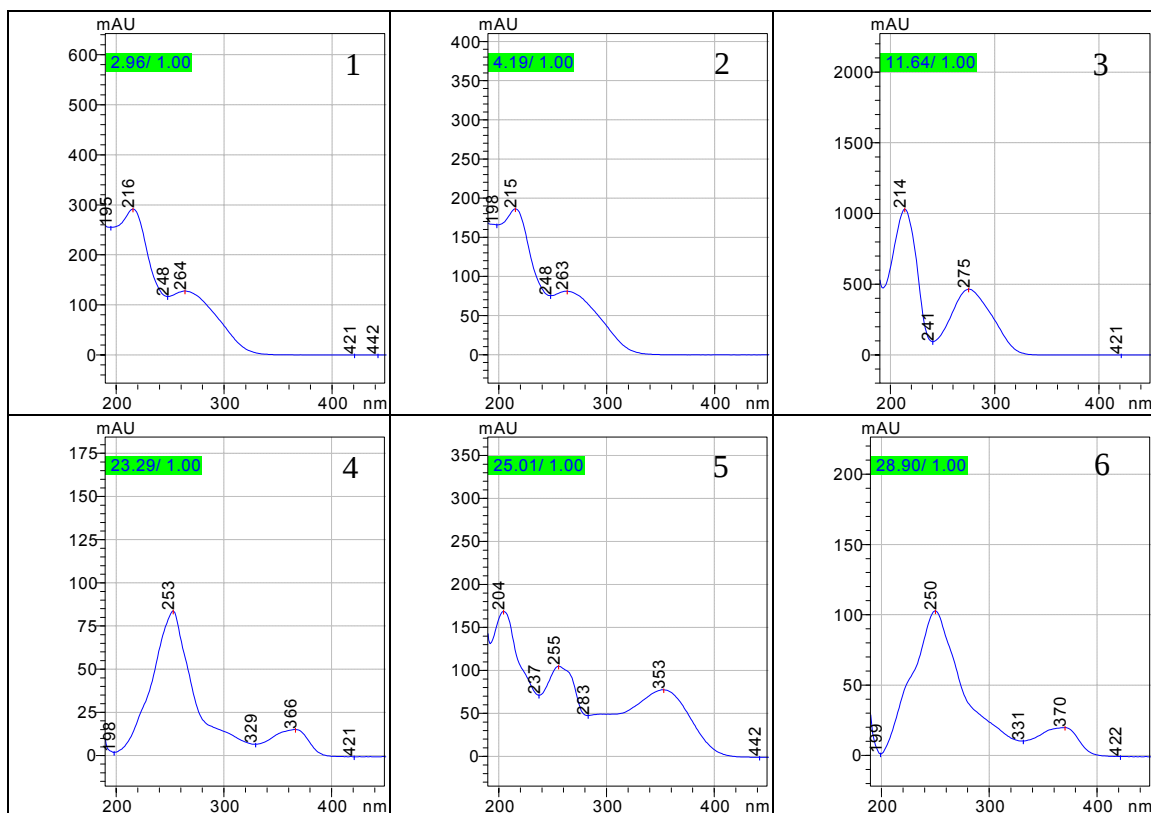
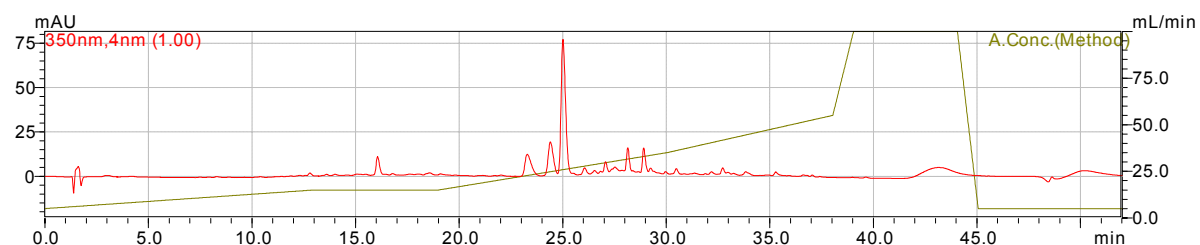
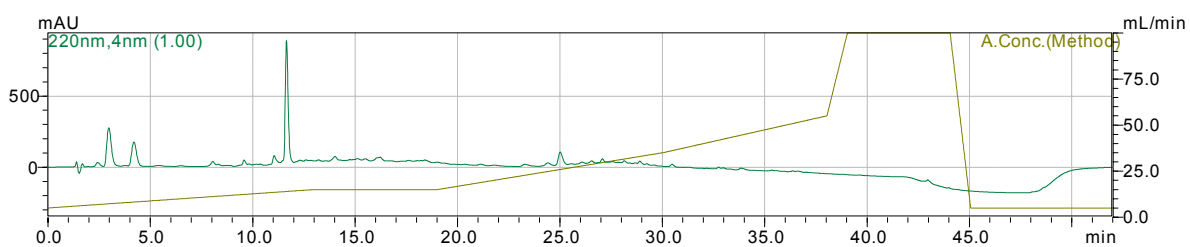
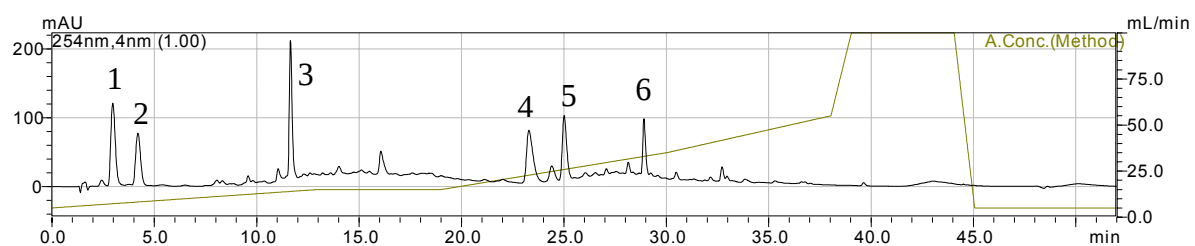
Fraktion IVb der Säulenchromatographie



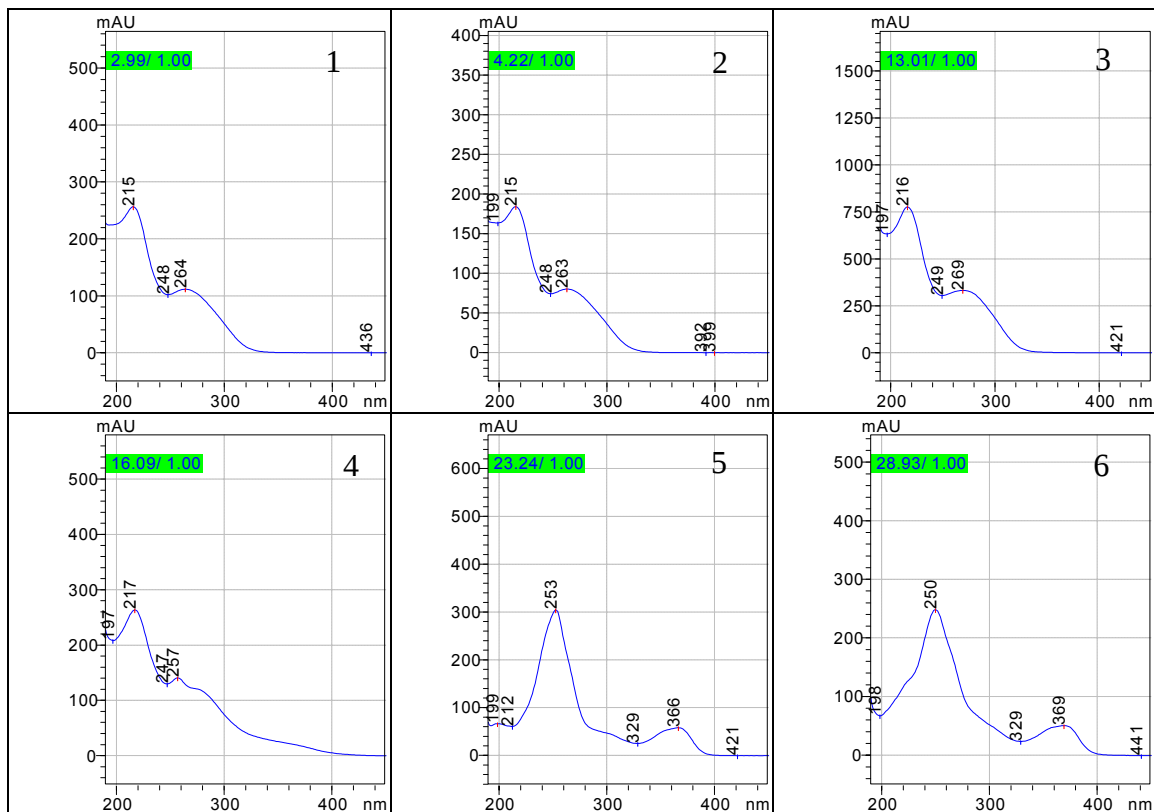
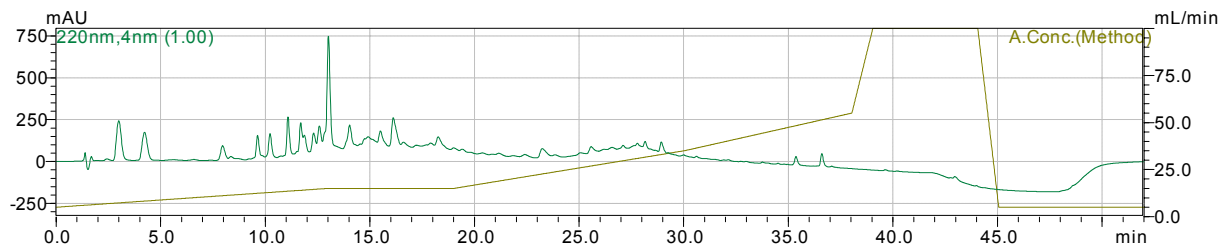
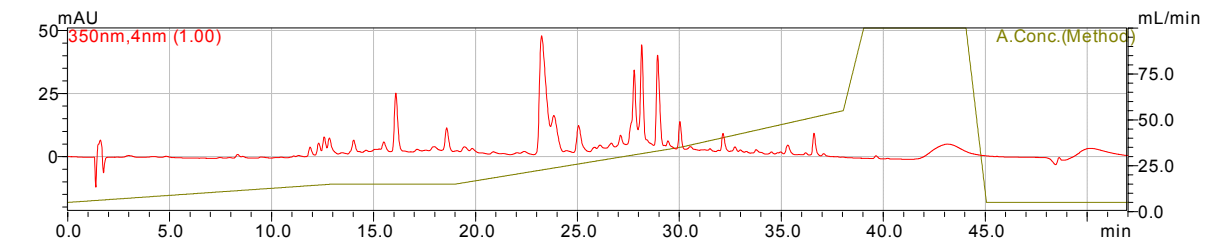
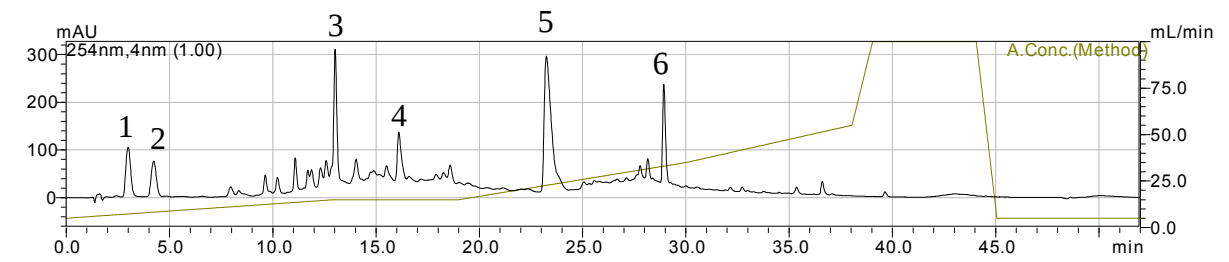
Fraktion IVc der Säulenchromatographie



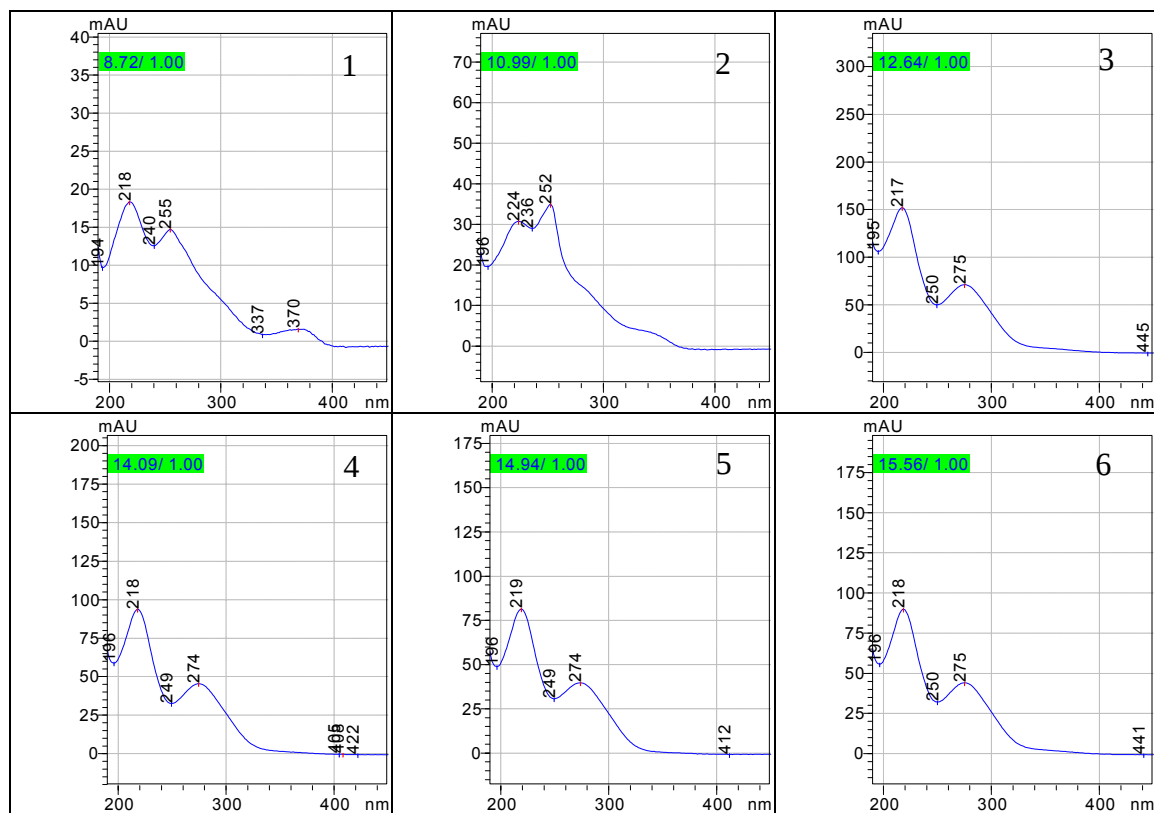
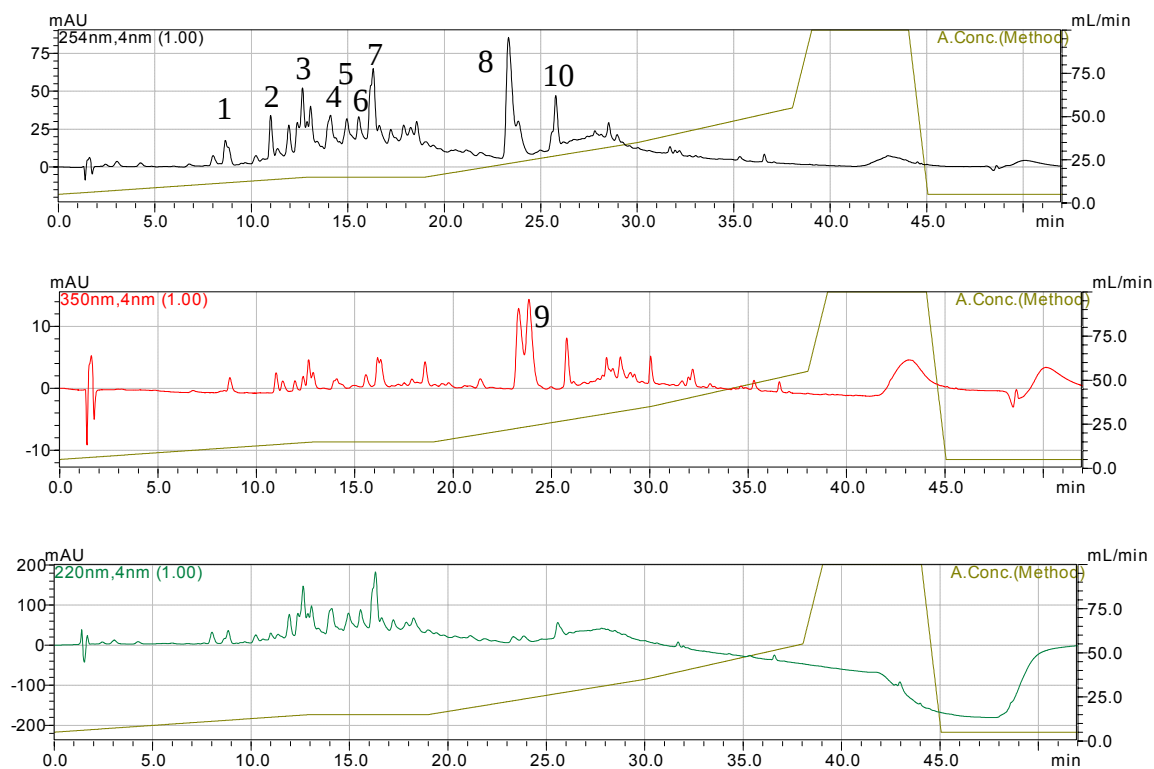
Fraktion IVd der Säulenchromatographie

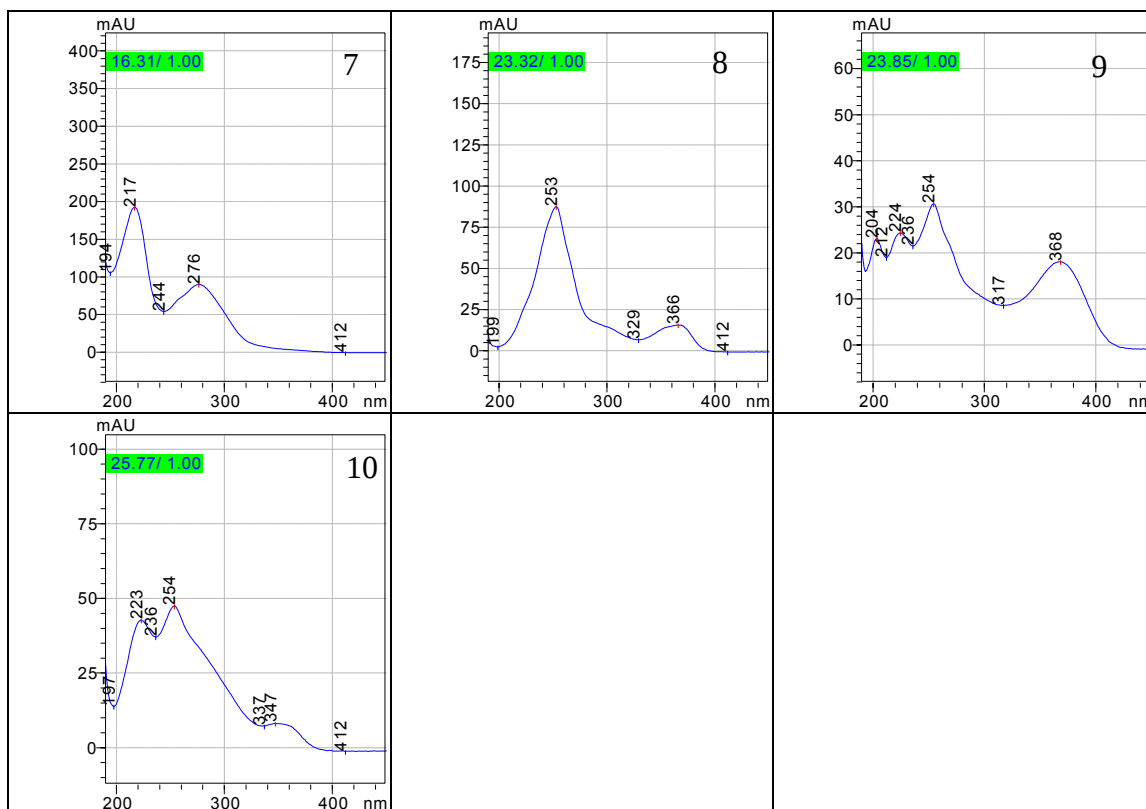


Fraktion Va der Säulenchromatographie

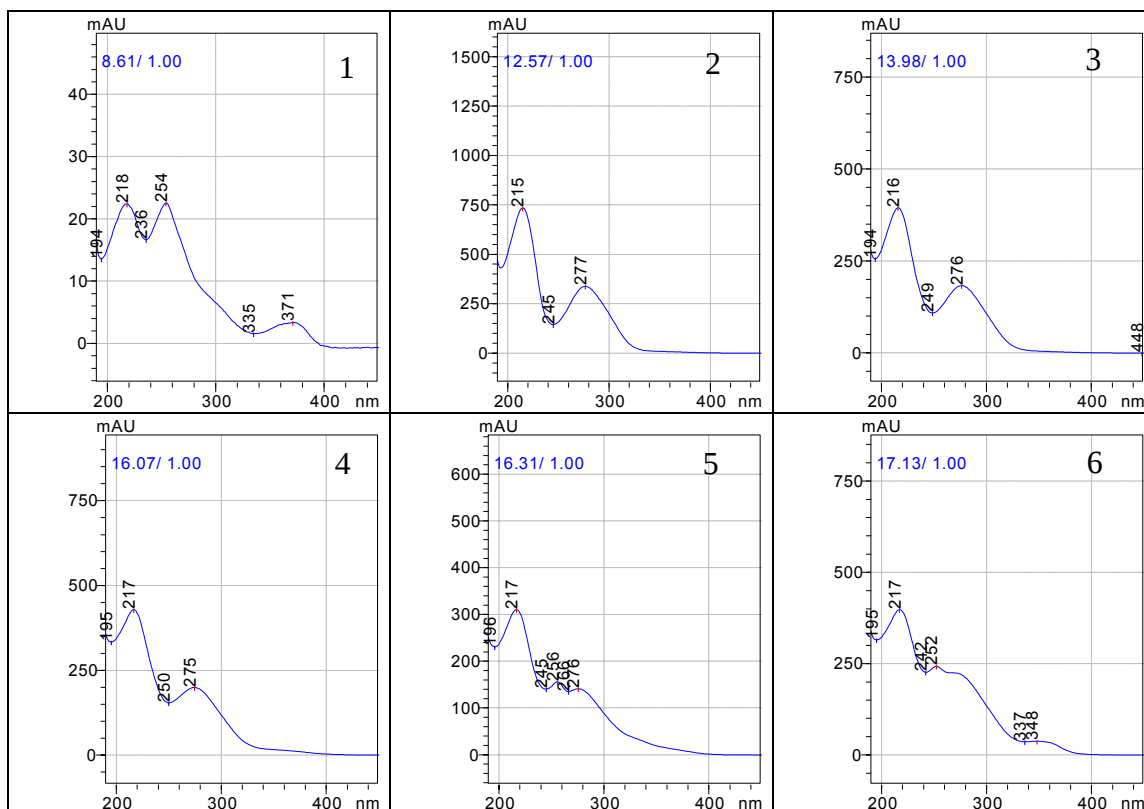
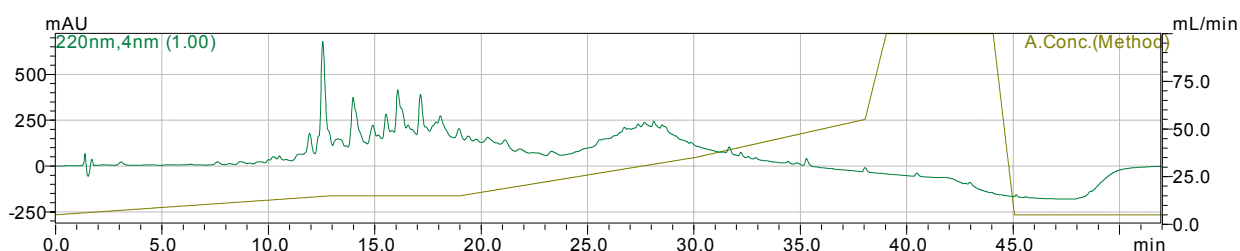
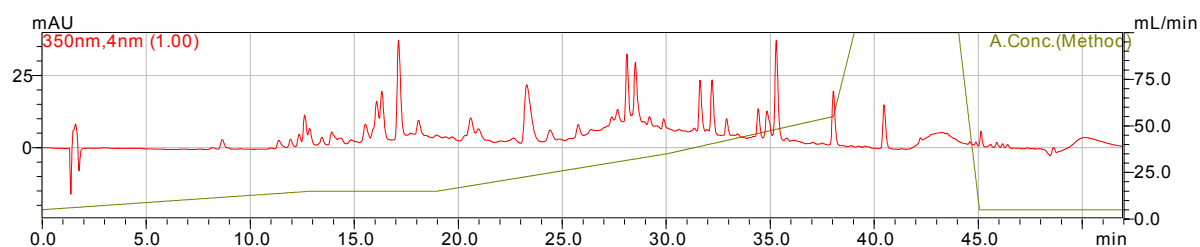
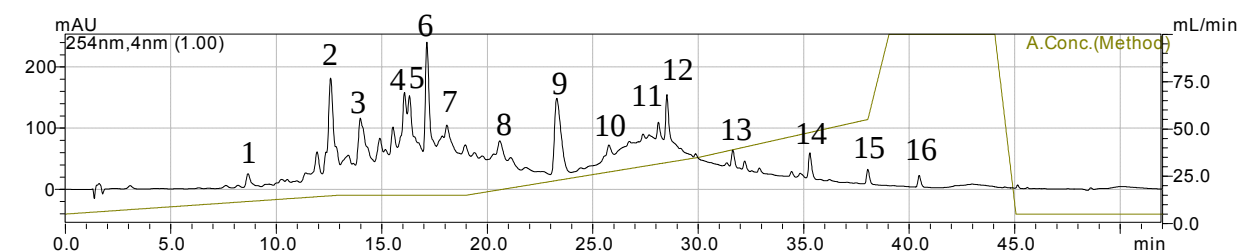


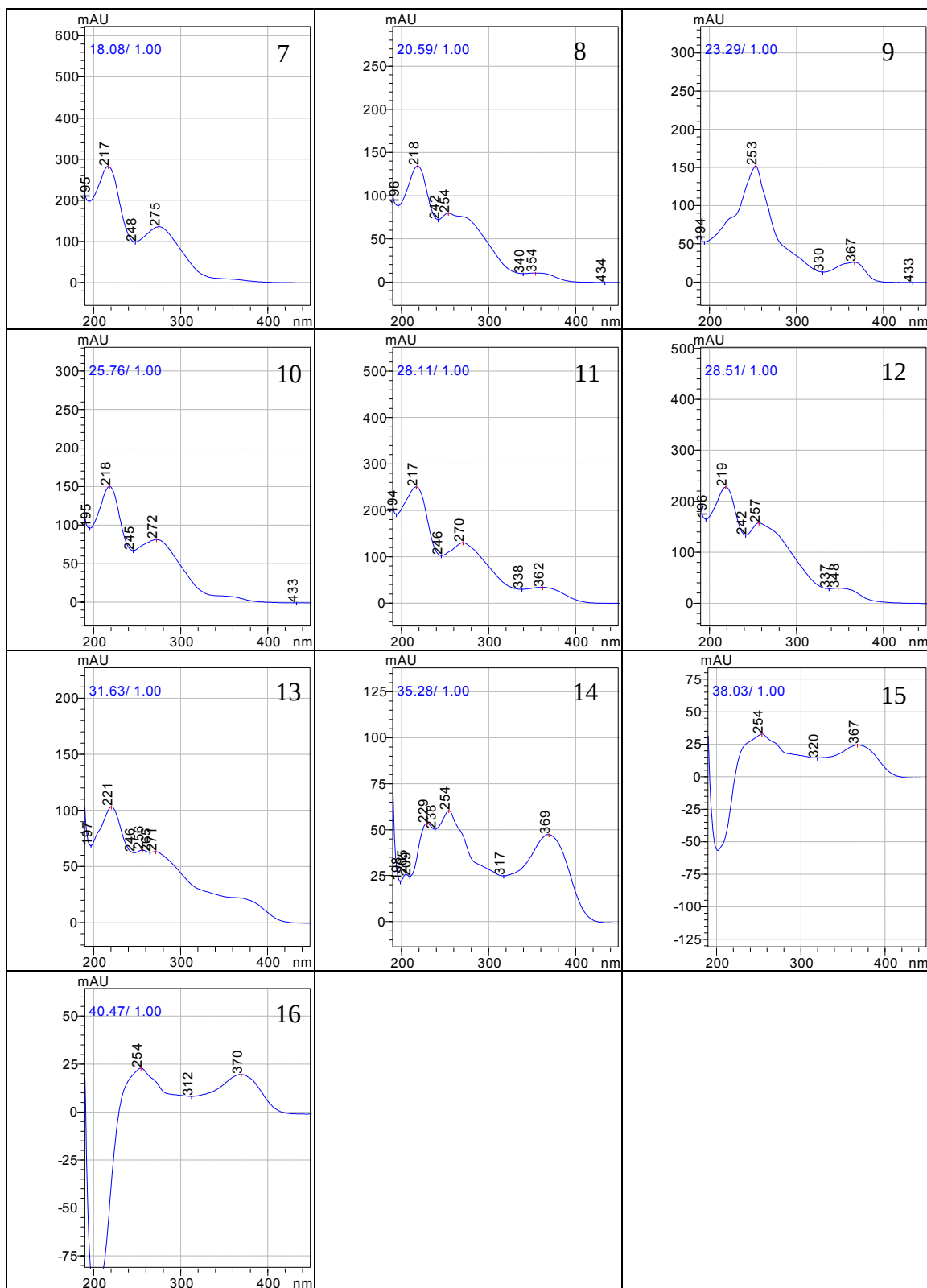
Fraktion Vb der Säulenchromatographie



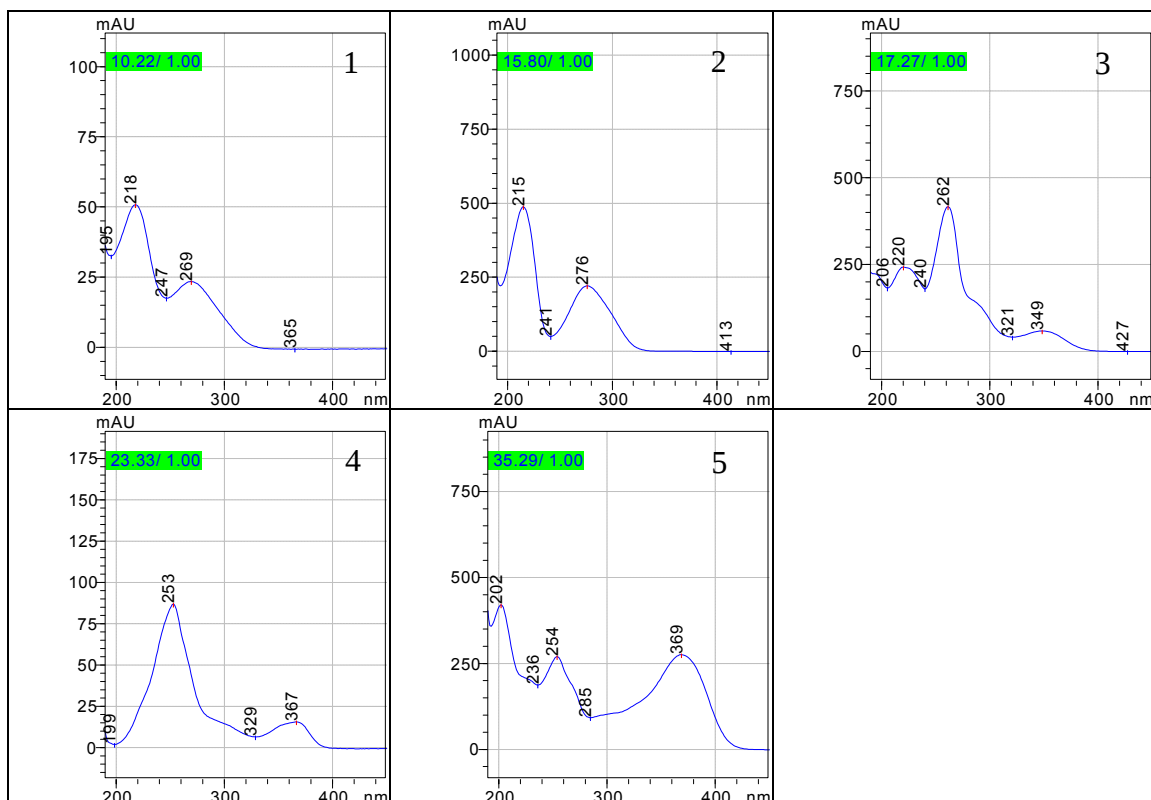
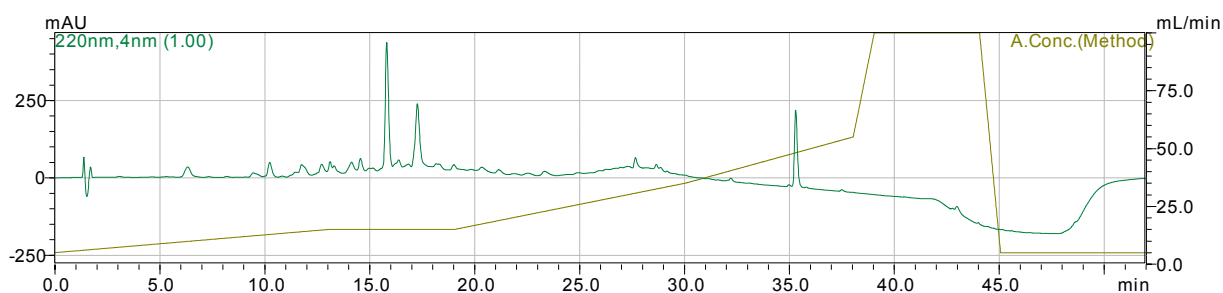
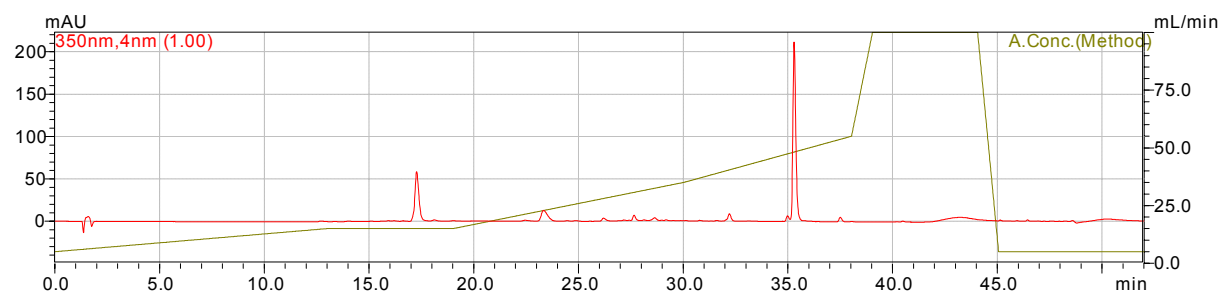
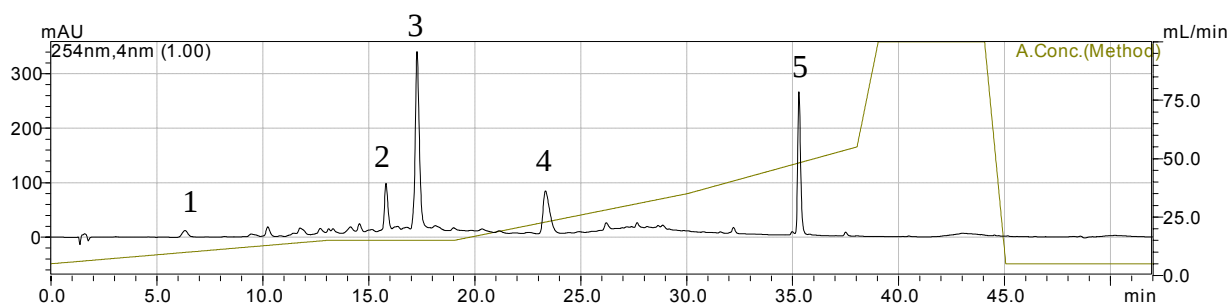


Fraktion Via der Säulenchromatographie

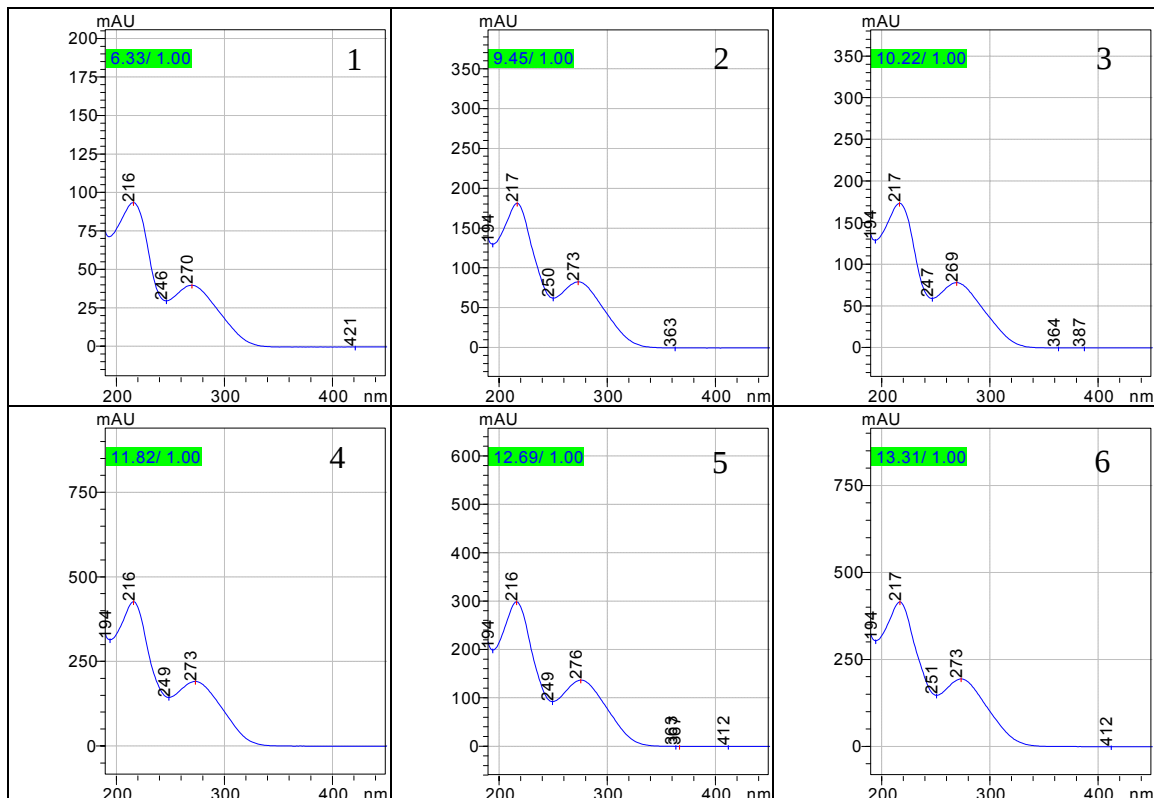
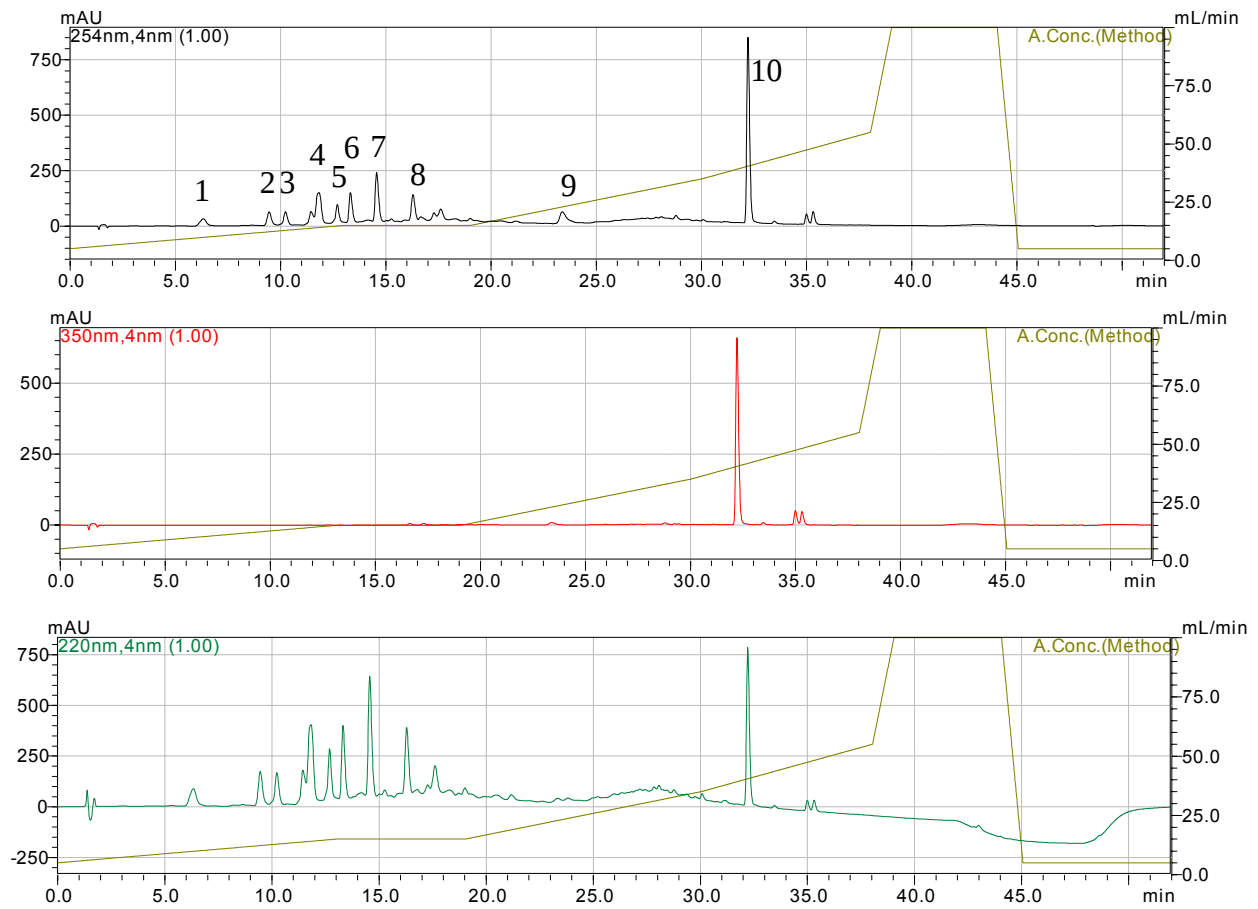


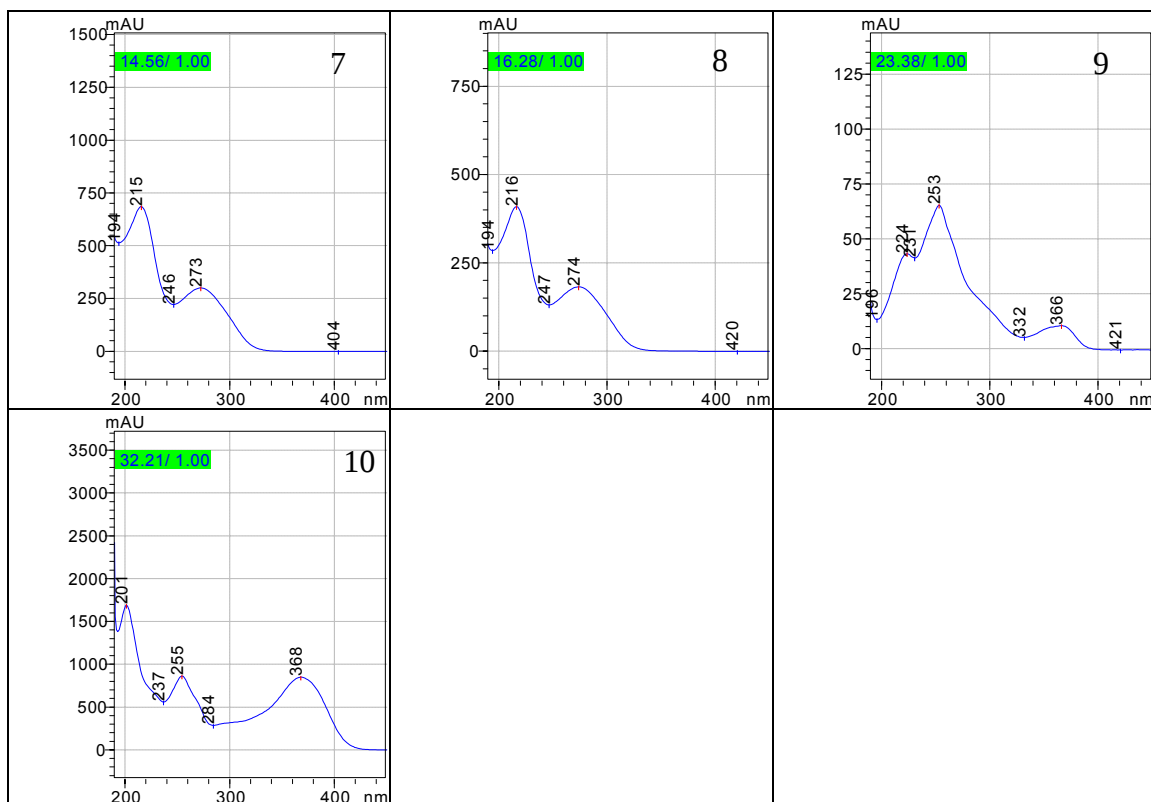


Fraktion VIb der Säulenchromatographie

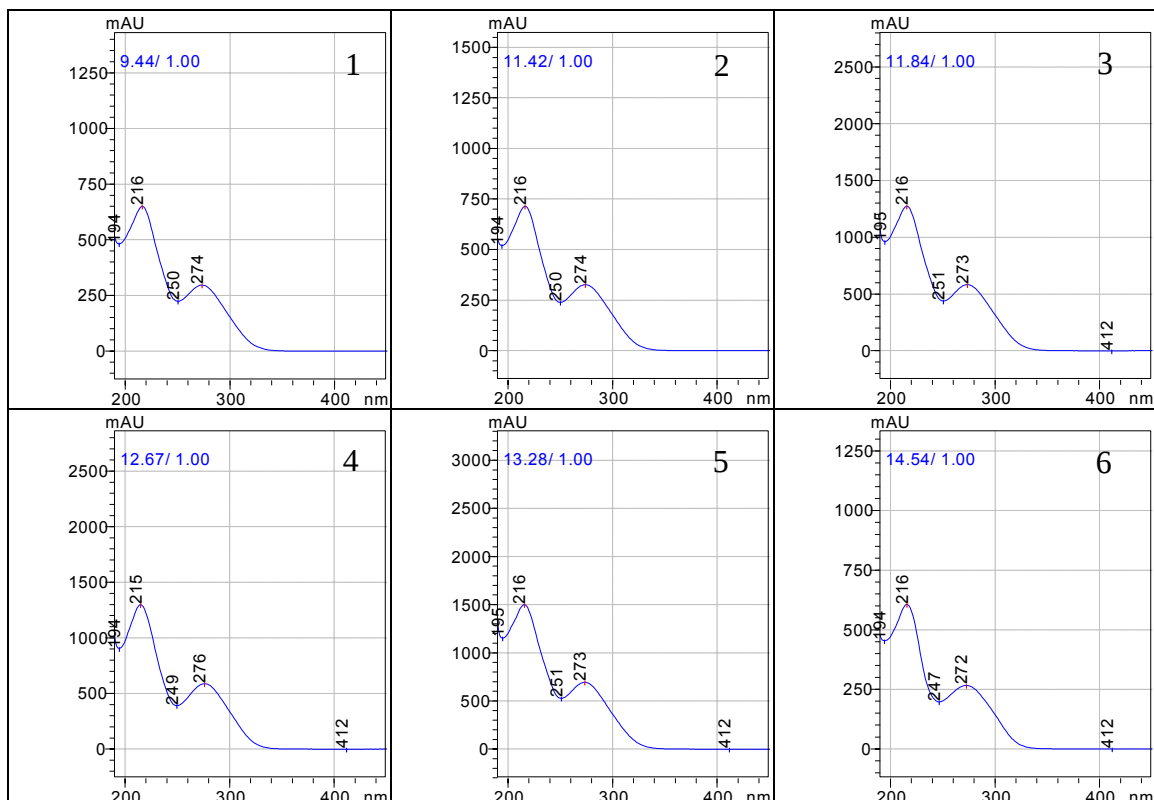
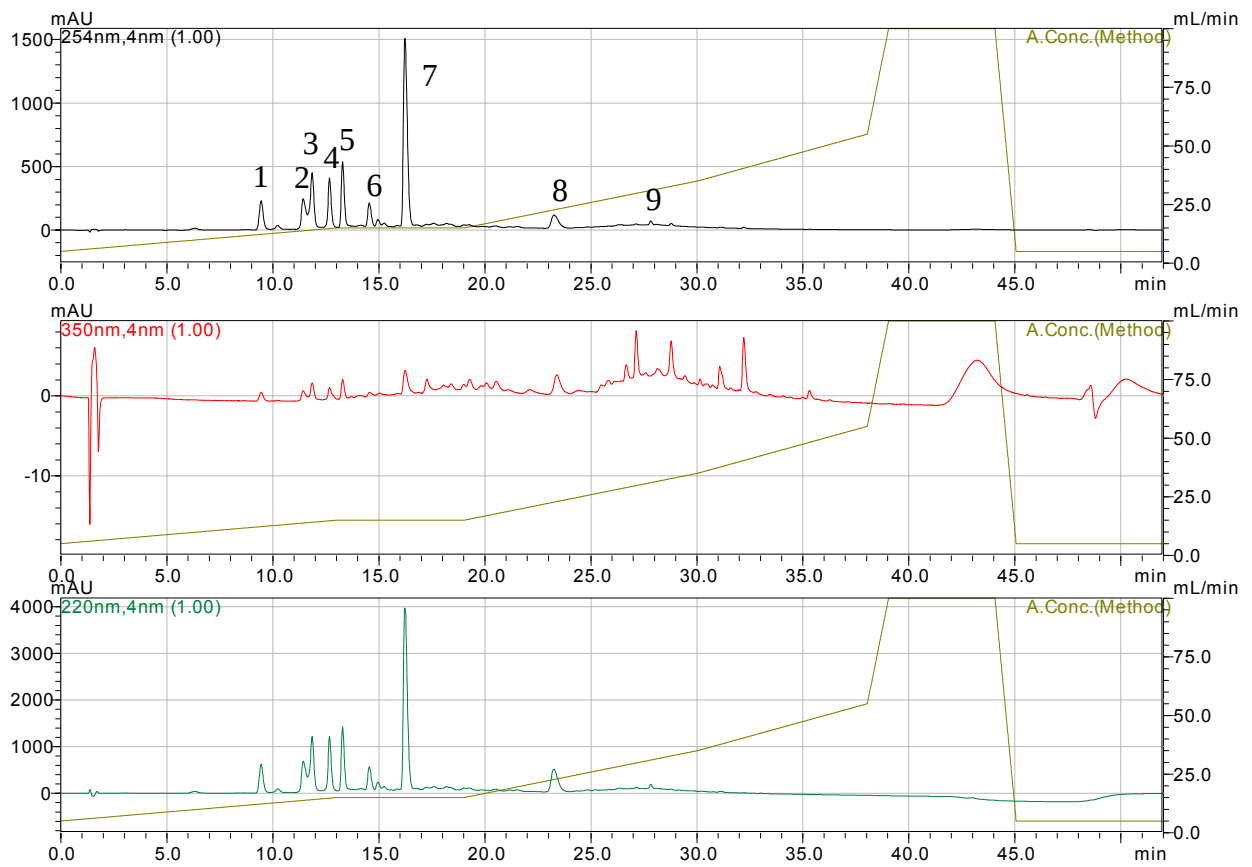


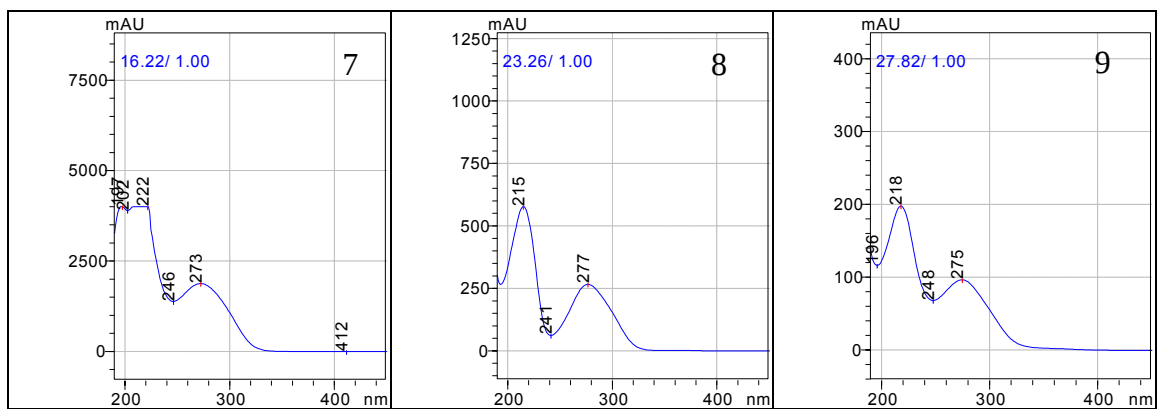
Fraktion VIc der Säulenchromatographie



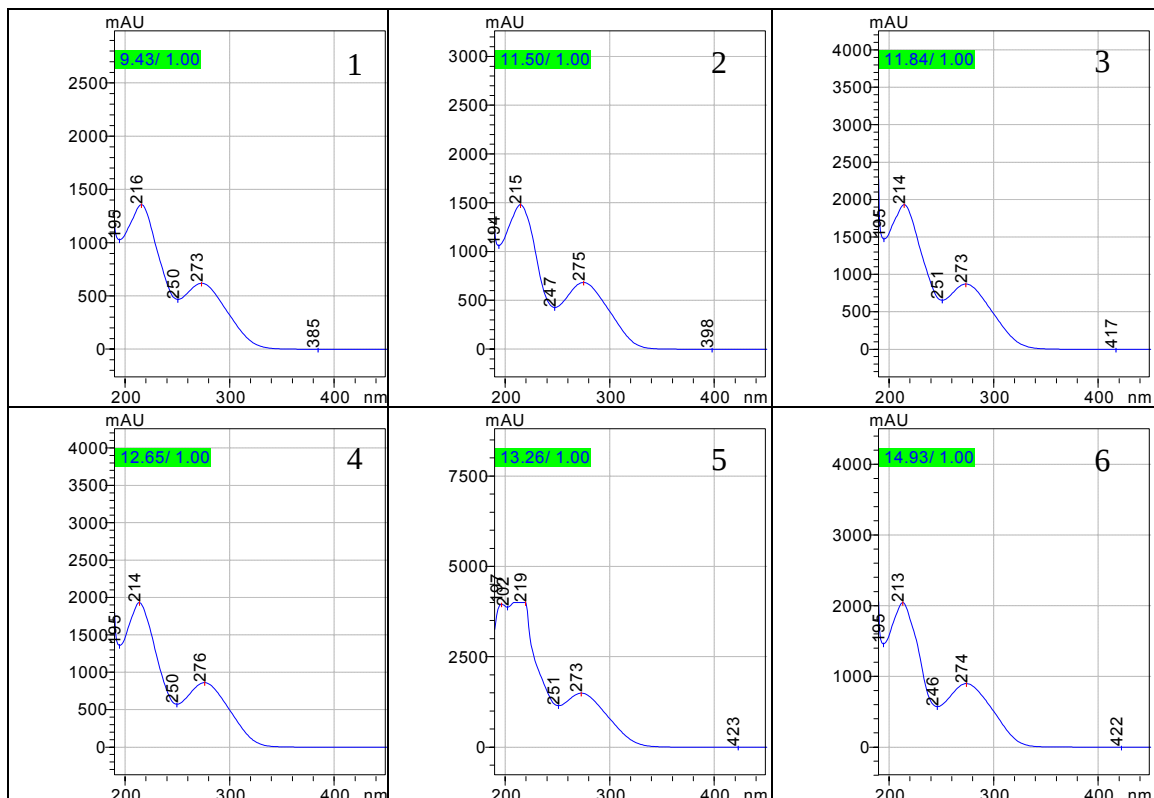
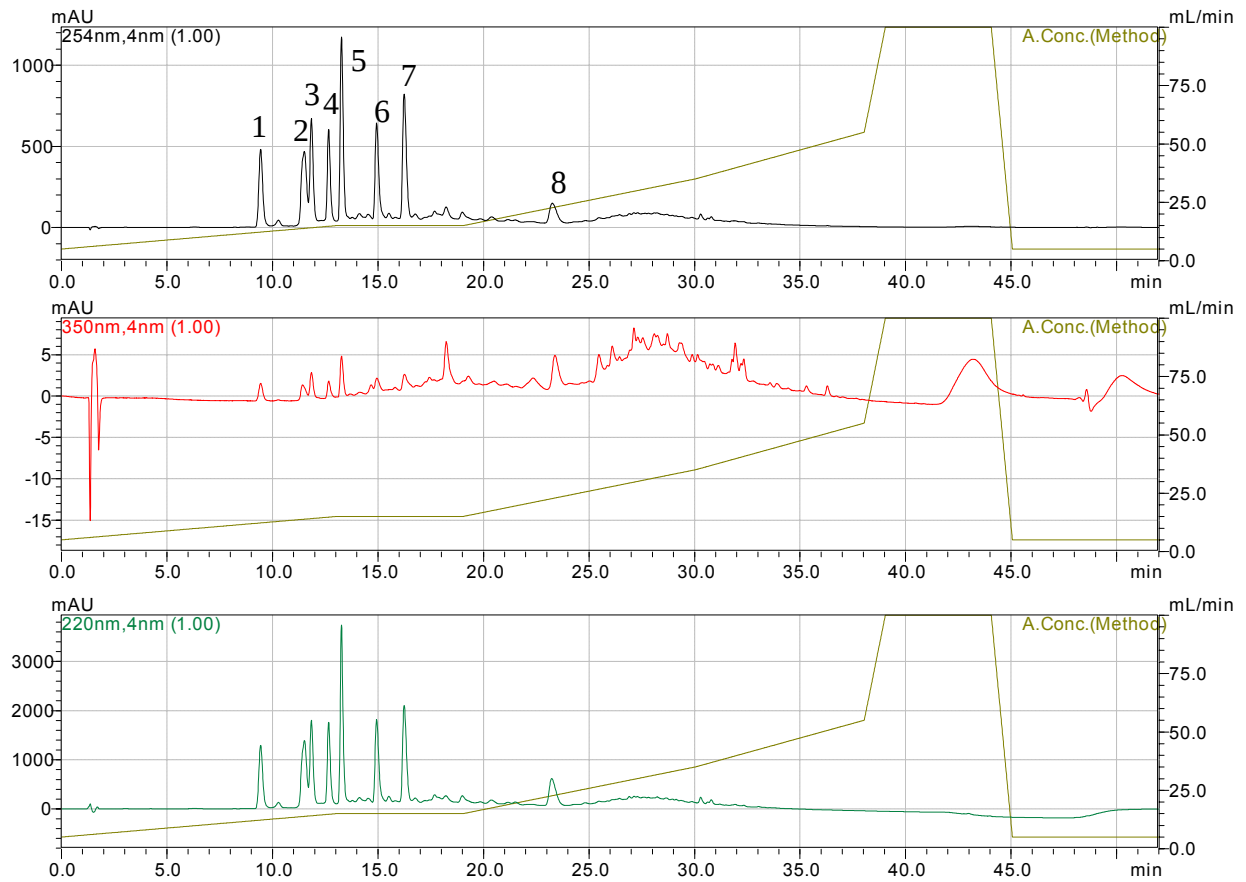


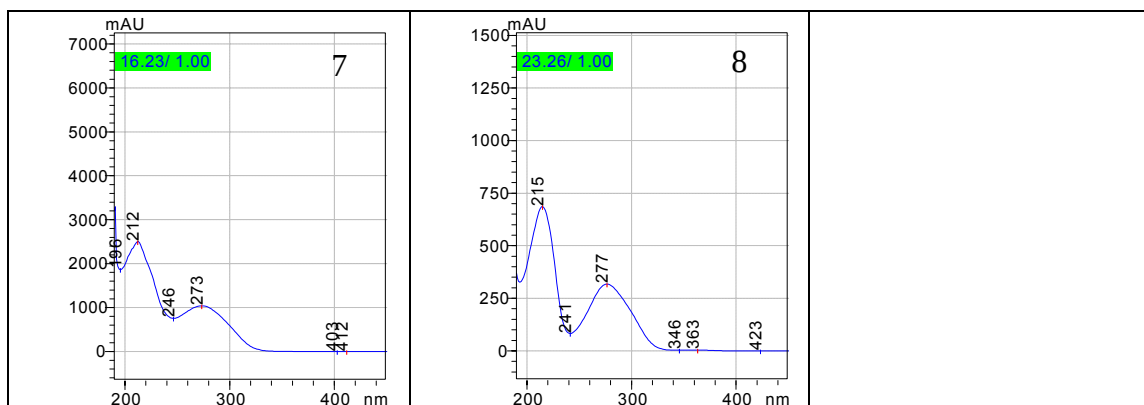
Fraktion Vld der Säulenchromatographie



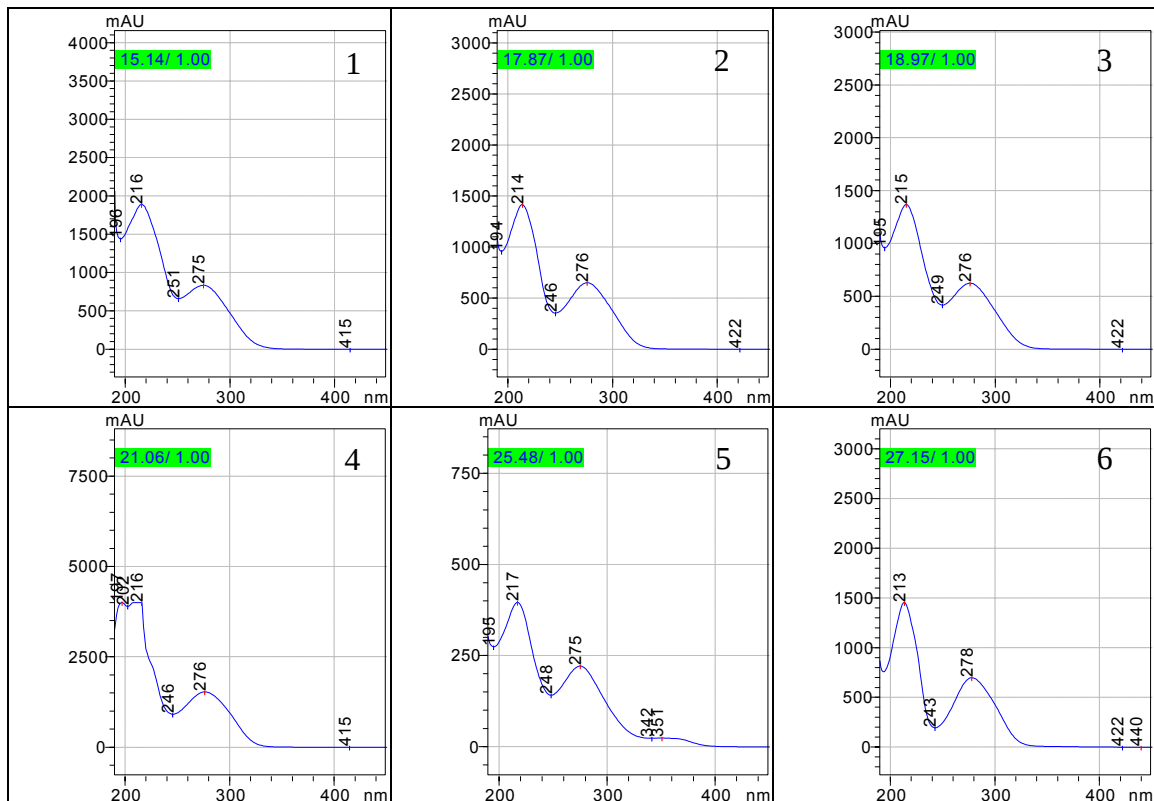
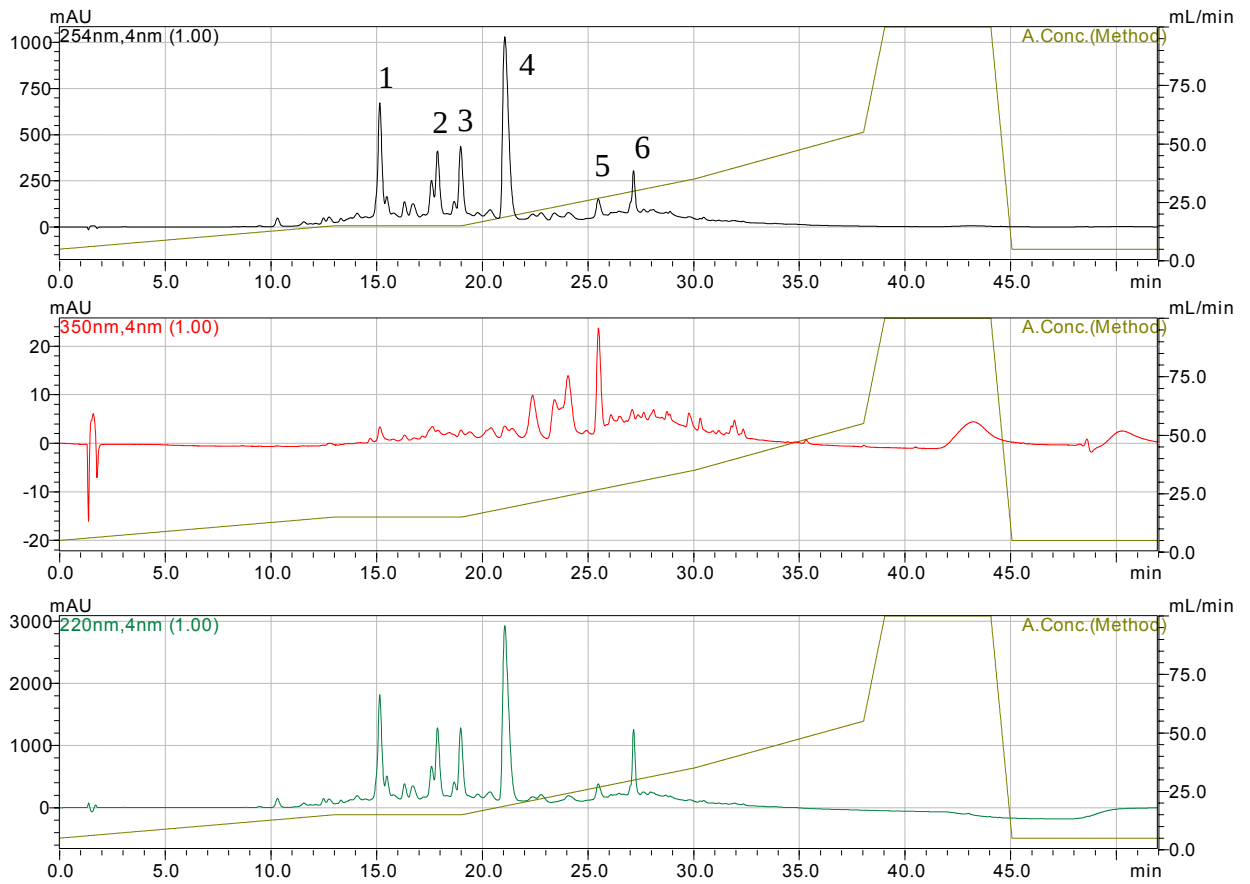


Fraktion Vle der Säulenchromatographie





Fraktion VIg der Säulenchromatographie



7 CURRICULUM VITAE

Zu meiner Person:

Name: Bettina Andrea Mraz
Geburtsdatum: 26. März 1985
Geburtsort: Wien, 1130
Eltern: Josef Mraz (Tontechniker)
Christa Mraz (Volksschullehrerin)
Geschwister: Mag. Bernhard Mraz (geb. 1975)
Dr. Barbara Staudinger (geb. 1979)
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig



Schulische Ausbildung:

1991–1995: Volksschule St. Ursula, Wien 1230
1995–2003: Gymnasium und Oberstufenrealgymnasium St. Ursula, Wien 1230
Juni 2003: Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

Universitäre Ausbildung:

2003–2004: Studium der Translationswissenschaft (Übersetzen/Dolmetschen)
Deutsch/Englisch/Spanisch an der Universität Wien
Seit März 2004: Studium der Pharmazie an der Universität Wien
Jänner-Mai 2010 Praktische Arbeiten für die Diplomarbeit am
Department für Pharmakognosie

Berufliche Erfahrung:

2006: Aushilfstätigkeit bei Dr. Robert Heinz und Partner GMBH
Medical Consulting
Seit Mai 2007: Geringfügig beschäftigt in Vital Apotheke, Wien 1230