



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Universelle Quantifizierung
unterschiedlicher Substanzklassen in Arzneipflanzen
mittels Charged Aerosol Detector“

Verfasserin:

Steiner Lisa

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin:

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

Danksagung

Zu Beginn möchte ich all jenen herzlich danken, die zum guten Gelingen der Diplomarbeit beigetragen haben.

Danke an Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Zehl und Frau Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die hervorragende Betreuung während der praktischen Arbeit und das Vertrauen beim Verfassen der Diplomarbeit.

Weiters möchte ich Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp, Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn und Sara Hassanein für die Bereitstellung von Substanzen danken.

Ebenfalls möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen des Departments für Pharmakognosie für das angenehme Arbeitsklima danken.

Zum Schluss möchte ich noch ein großes Dankeschön an meine Familie und an meine Freunde richten, die mich das ganze Studium hindurch unterstützt haben und mir immer hilfreich zur Seite gestanden sind.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	3
1.1	QUANTIFIZIERUNG VON PFLANZENINHALTSSTOFFEN	3
1.2	PROBLEMSTELLUNG	11
1.2.1	<i>Universelle Quantifizierung mittels Charged Aerosol Detector</i>	<i>11</i>
1.2.2	<i>Methodenvergleich HPLC – UV/Vis und HPLC – CAD für die Quantifizierung von Hederacosid C in Efeublättern.....</i>	<i>11</i>
1.2.3	<i>Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Peptiden in Holunderfrüchten.....</i>	<i>11</i>
2	MATERIAL	13
2.1	REINSUBSTANZEN	13
2.2	PFLANZENMATERIAL	15
2.2.1	<i>Efeublätter.....</i>	<i>15</i>
2.2.2	<i>Holunderfrüchte</i>	<i>15</i>
3	METHODEN.....	16
3.1	INSTRUMENTIERUNG	16
3.2	EXPERIMENTE MITTELS FLIEßINJEKTIONSANALYSE (FIA).....	17
3.2.1	<i>Versuch 1: Ermittlung des linearen Bereiches des CAD</i>	<i>17</i>
3.2.2	<i>Versuch 2: Einfluss der Lösungsmittel - Zusammensetzung</i>	<i>18</i>
3.2.3	<i>Versuch 3: Vergleich verschiedener Substanzklassen.....</i>	<i>18</i>
3.2.4	<i>Versuch 4: Einfluss des Gehalts an Rest-Wasser und Lösungsmittel der Reinsubstanzen</i>	<i>19</i>
3.3	EXPERIMENTE MITTELS HPLC.....	20
3.3.1	<i>Versuch 5: Zusammenhang der Peakflächen mit der Laufmittel-Zusammensetzung</i>	<i>21</i>
3.3.2	<i>Quantifizierung von Hederacosid C in Efeublättern</i>	<i>22</i>
3.3.3	<i>Quantifizierung der Peptide in Holunderfrüchten</i>	<i>24</i>
4	ERGEBNISSE	27
4.1	EXPERIMENTE MITTELS FLIEßINJEKTIONSANALYSE (FIA).....	27
4.1.1	<i>Versuch 1: Ermittlung des linearen Bereiches des CAD</i>	<i>27</i>
4.1.2	<i>Versuch 2: Einfluss der Lösungsmittel-Zusammensetzung.....</i>	<i>28</i>
4.1.3	<i>Versuch 3: Vergleich unterschiedlicher Substanzklassen.....</i>	<i>29</i>
4.1.4	<i>Versuch 4: Einfluss des Wasser/Lösungsmittel-Gehalts der Reinsubstanzen</i>	<i>39</i>
4.2	EXPERIMENTE MITTELS HPLC.....	41
4.2.1	<i>Versuch 5: Zusammenhang der Peakfläche mit der Laufmittel-Zusammensetzung</i>	<i>41</i>
4.2.2	<i>Quantifizierung von Hederacosid C in Efeublättern</i>	<i>42</i>
4.2.3	<i>Quantifizierung der Peptide in den Holunderfrüchten</i>	<i>45</i>
5	DISKUSSION	54

6	ZUSAMMENFASSUNG	56
7	ABSTRACT	57
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	60
10	CURRICULUM VITAE.....	62

1 Einleitung

1.1 Quantifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen

Seit vielen tausend Jahren werden Kräuter und Heilpflanzen für medizinische Zwecke verwendet, zunächst ohne jegliches Hintergrundwissen, wie viele und welche Wirkstoffe zur Wirkung beitragen. Die Charakterisierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe von Pflanzen ist ein wichtiger Aufgabenbereich der Pharmazeuten.

Zur quantitativen Bestimmung gibt es viele Varianten und Wege, die zu richtigen und reproduzierbaren Ergebnissen führen. Das Arzneibuch schreibt Methoden zur Quantifizierung von Wirkstoffen bzw. charakteristischen Inhaltsstoffen der Arzneipflanzen vor. Meist ist die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe bekannt, jedoch variiert der Gehalt. Aufgrund der rasanten Entwicklung der Analytischen Chemie entsprechen diese Vorschriften in einigen Fällen nicht mehr dem Stand der Technik. Bei einigen Substanzen ist die Analytik nicht ausreichend, wenn z.B. keine chromophore Struktur oder keine Standards vorhanden sind. Hier sind alternative Methoden gefragt.

Arzneipflanzen weisen in der Regel eine komplexe Zusammensetzung an Inhaltsstoffen auf, sodass diese, je nach chemisch-physikalischen Eigenschaften der zu analysierenden Substanz, ein Extraktionsverfahren durchlaufen müssen.

In der Naturstoffanalytik wird häufig die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography) zur Auftrennung von schwerflüchtigen, nicht flüchtigen und thermolabilen Stoffen verwendet. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass mit einer geeigneten stationären Phase und Lösungsmittelgemischen der Großteil der Naturstoffe aufgetrennt werden kann. Die Hauptvoraussetzung für den Einsatz der HPLC ist die Löslichkeit der Analyten in der mobilen Phase, die das chromatographische Transportsystem darstellt. Insbesondere bei der Gradientenelution ist zu beachten, dass die Lösungsmittel gut entgast sind, damit beim Mischen keine Luftblasen entstehen. Die Trennung der einzelnen Substanzen ist schonend, da man problemlos bei Raumtemperatur arbeiten kann (Adam & Becker, 2000).

Wie in Abbildung 1 und Abbildung 2 (Seite 5) zu sehen ist, besteht die HPLC-Anlage prinzipiell aus

- einer oder mehreren Hochdruckpumpen, die einen Gegendruck bis zu 400 bar oder mehr aufbauen können,
- einem Gradientensystem (mobile Phase),
- einem Autosampler, der die Proben aufnimmt,
- einer gepackten Säule (stationäre Phase),
- einem Detektor,
- und einem PC.

Die Trennsäule enthält die stationäre Phase, die zumeist aus Kieselgel besteht, welches oft derart modifiziert ist, dass es eine apolare Oberfläche aufweist (Reversed Phase). Bei diesen Umkehrphasen (reversed phases, RP) sind die Polaritätsverhältnisse "umgekehrt" im Vergleich zu den Normalphasen. Unpolare Seitenketten sind an ein Kieselgelgerüst oder an ein Polymer gebunden und verhalten sich dadurch hydrophob. Der Trennmechanismus basiert auf der hydrophoben Wechselwirkung. Je ähnlicher der Analyt der Kohlenwasserstoffkette der Phase ist, umso größer sind seine Wechselwirkungen mit der Säule. Die in dieser Diplomarbeit verwendete stationäre Phase war eine C18 Umkehrphase. C18 bedeutet, dass an das Kieselgel Ketten mit 18 Kohlenstoffatomen gebunden sind. Mit zunehmender Kettenlänge wird das System unpolarer. Das unmodifizierte Normalphasen-Kieselgel wird heute nur mehr in seltenen Fällen eingesetzt.

Die zu analysierende Probe wird über den Autosampler aufgenommen. Der Elutionsmittelstrom transportiert die Probe weiter. Der eigentliche Trennvorgang findet an der stationären Phase statt. Die zu untersuchenden Substanzen stehen in Wechselwirkung mit der stationären Phase. Je stärker die Adsorption der zu trennenden Substanz an die stationäre Phase ist, desto länger wird der Stoff zurückgehalten. Anhand der verschiedenen Retentionszeiten kann eine Identifizierung vorgenommen werden.

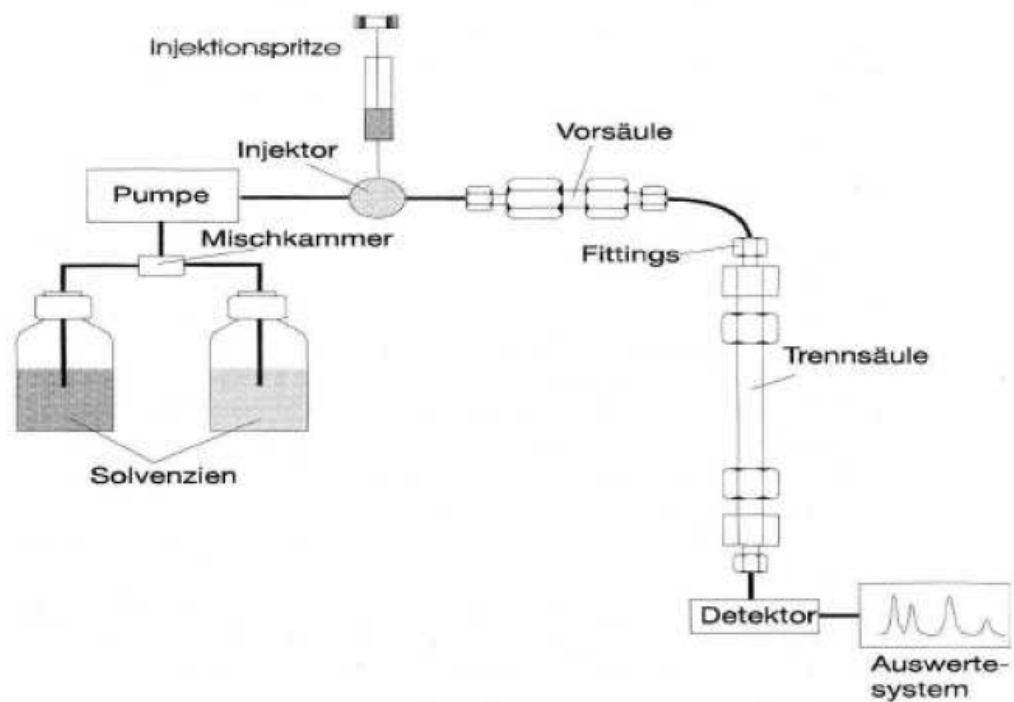


Abbildung 1: Aufbau einer HPLC Anlage

(Otto, 2000)



Abbildung 2: Die in dieser Arbeit verwendete HPLC-Anlage Dionex UltiMate 3000 RSLC

(Thermo Scientific, 2014)

Die aufgetrennten Substanzen sind nun für die Detektion bereit. Die zurzeit gängigsten Analysengeräte sind **Massenspektrometer (MS)** und **UV/Vis Detektoren**. Das Prinzip der MS-Detektion besteht darin, die Analyten zunächst in der Quelle in geeigneter Form zu ionisieren, intakt in die Gasphase überzuführen und dann die gebildeten Ionen im Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) zu trennen. Danach werden sie mittels Detektions- und Auswertungssystemen nach m/z und Häufigkeit qualitativ und quantitativ charakterisiert (Adam & Becker, 2000).

Der **UV/Vis Detektor** wird am häufigsten in Kombination mit verschiedenen chromatographischen Methoden (HPLC, LC, SFC) verwendet. Zur Detektion müssen die Substanzen ein chromophores System aufweisen. Prinzipiell können alle Verbindungen, die im ultravioletten (UV) (200 bis 400 nm) oder im sichtbaren (Vis) (400 bis 750 nm) Bereich Licht absorbieren, gemessen werden (siehe Abbildung 3, Seite 6).

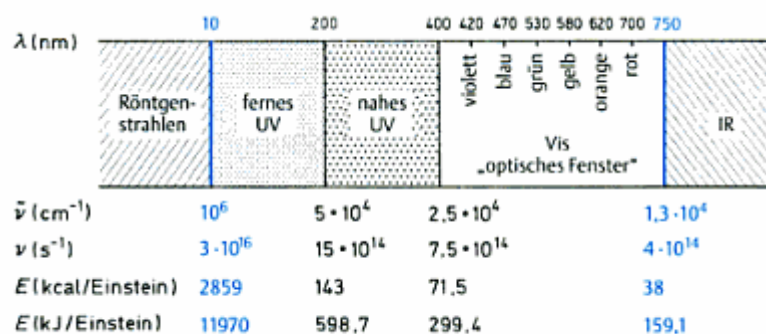


Abbildung 3: Elektromagnetisches Spektrum

(Hesse, 2005)

Eine Detektion und somit die Quantifizierung mit dem UV/Vis Detektor ist nicht möglich, wenn kein chromophores System vorhanden ist. Grundsätzlich ist dieser Detektor sehr empfindlich und in einem großen linearen Bereich einsetzbar. Zur quantitativen Bestimmung muss eine Kalibrierung mit Vergleichssubstanzen durchgeführt werden. Die Kalibrierfunktion erhält man durch die Messung von externen Standardlösungen des zu bestimmenden Stoffes in unterschiedlichen Konzentrationen.

Trotz der vielen Möglichkeiten gibt es immer noch Gemische und Substanzen die nur sehr schwer bzw. nicht ausreichend empfindlich erfasst und quantifiziert werden können. Eine relativ neue Alternative für die universelle Quantifizierung ist die Analyse mittels Charged Aerosol Detector (CAD).

Dieser Detektor weist eine hohe Empfindlichkeit im Vergleich zu anderen universellen Detektoren auf und ermöglicht ein sehr breites Spektrum von nicht- bis semi-flüchtigen chemischen Substanzen und Substanzklassen zu detektieren. Die Voraussetzung für die Benützung des CAD ist ähnlich der MS-Detektion: Es muss eine vollständig flüchtige mobile Phase verwendet werden. Der Detektor misst die Ladung, die im direkten Verhältnis zur Menge des Analyten steht. Prinzipiell kann man eine große Varietät an Strukturen mit diesem Gerät messen (Siehe Abbildung 4, Seite 7). Dieser Detektor verfügt über eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit (Thermo Scientific, 2014).

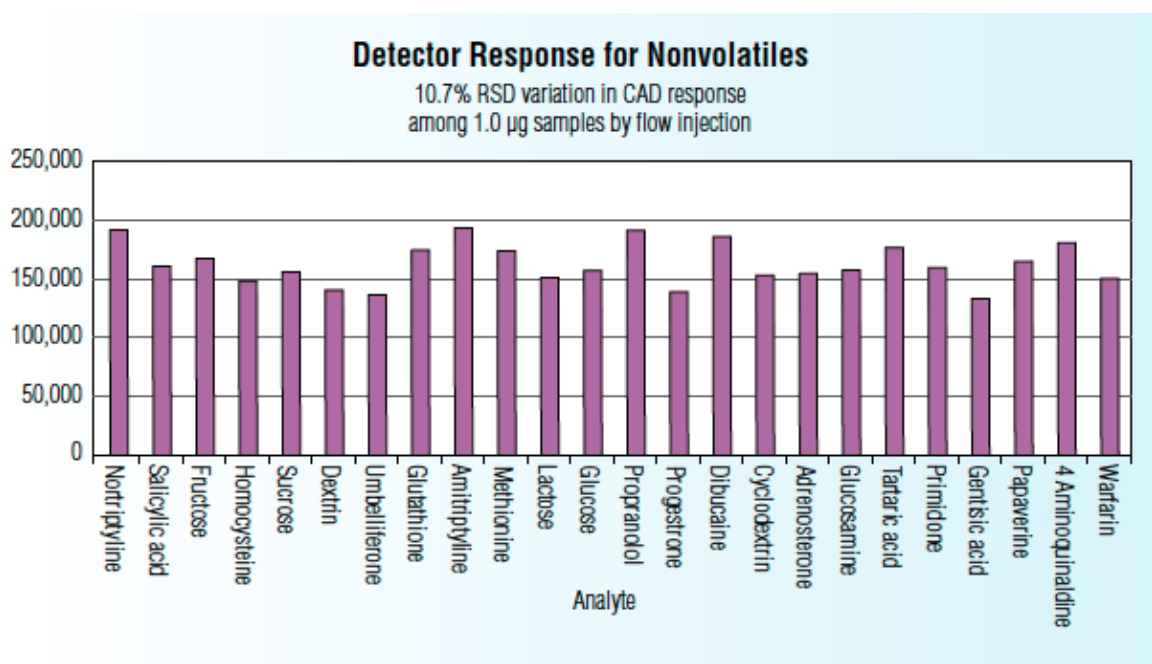


Abbildung 4: Messung unterschiedlicher Substanzklassen durch den Hersteller

(Thermo Scientific, 2014)

Der Prozess startet, indem das HPLC-Säuleneluat in den Charged Aerosol Detector gelangt und dort mit Stickstoffgas vernebelt wird (siehe Abbildung 5, Seite 8). Die größeren Tropfen werden abgetrennt und die kleineren Tropfen werden getrocknet, wobei nicht-flüchtige Bestandteile Partikel bilden, deren Größe proportional zur Analytkonzentration

ist. Ein Strom positiv geladener Gasionen kollidiert mit dem Partikelstrom in der Reaktionskammer. Je größer der Aerosolpartikel ist, desto mehr Ladungen werden aufgenommen. Überschüssige Gasionen werden durch eine sogenannte „Ionenfalle“ entfernt. Im Kollektor angekommen, werden die an den Analytpartikeln befindlichen Ladungen mittels eines sensiblen Elektrometers gemessen. Dieser erzeugt ein Signal, welches in direktem Zusammenhang mit der Quantität des Analyten steht. Größere Partikel mit einer höheren Anzahl an positiven Ladungen ergeben einen größeren Peak als die kleinen Partikel, die weniger Ladung aufgenommen haben.

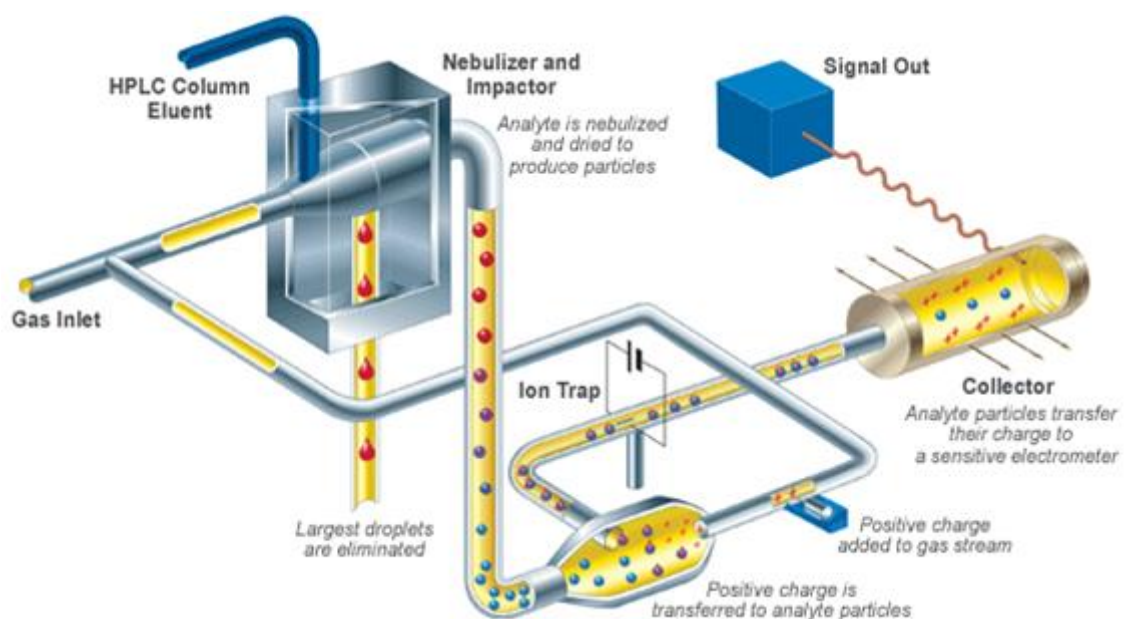


Abbildung 5: Aufbau eines Charged Aerosol Detector

(Thermo Scientific, 2014)

Eine weitere Alternative zum UV/Vis Detektor ist der Evaporative Light-Scattering Detektor (ELSD), der die Probe ähnlich wie der CAD aufbereitet. Das Eluat wird mittels eines Stickstoff-Gases vernebelt und die daraus resultierenden Aerosoltröpfchen werden in einer sogenannten „Drift Tube“ evaporisiert. Die übriggebliebenen Feststoffpartikel passieren einen Lichtstrahl, dessen Intensität von einer Photodioden-Detektorzelle gemessen wird. Das Signal ist proportional zur verringerten Lichtintensität (Gorecki et al, 2006; Sinclair & Gallagher, 2002).

Im Vergleich CAD zu ELSD sind beide auf Aerosol-basierende HPLC-Detektoren. In der ersten Phase ist die Funktionsweise die gleiche, allein in der Detektion der gebildeten

Analytpartikel unterscheiden sie sich. Beide Systeme detektieren nicht- und semiflüchtige Substanzen, ungeachtet deren spektralen oder physikochemischen Eigenschaften. Das CAD System ergibt in höheren Konzentrationen parabolische Kalibrationskurven. In einem niedrigen Level der Konzentration ist die Kalibrationskurve nahezu linear. Der Response des ELSD hingegen ist polynomisch. Daraus resultiert eine starke Abnahme des Signals bei niedrigeren Konzentrationen (Vehovec & Obreza, 2010).

Eine Studie von Wipe et al. (2007) überprüft auch die höhere Sensitivität des CAD in Bezug zum ELSD. Sie zeigt auf, dass das Signal des CAD viel weniger von der Aerosolgröße oder der Größenverteilung der Partikel beeinflusst wird.

In den letzten Jahren sind einige auf Evaporisation basierende Detektoren entwickelt worden, von denen der CAD derzeit den leistungsfähigsten und vielseitigsten darstellt. Es sind schon zahlreiche Studien veröffentlicht worden, die das Potential und die Vorteile des CAD in Verbindung mit der HPLC demonstrieren. Ein großes Spektrum an pharmazeutischen Applikationen, die Einfachheit der Benützung, die Linearität sowie die hohe Sensitivität, die eine Quantifizierung bis zu 1 ng erlaubt, machen den CAD zu einem der nützlichsten Detektoren für Forschungszwecke, Methodenentwicklung sowie Routineanalysen. In Summe erscheint der CAD die Lücke der fehlenden HPLC – Detektoren zu füllen. In den kommenden Jahren wird ein großes Wachstum an Applikationen im Bereich der pharmazeutischen Analytik erwartet (Almeling et al., 2011).

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass der Charged Aerosol Detecotor im Vergleich zur UV/Vis- Detektion, zur Massenspektrometrie (MS) und zum ELSD einige Vorteile bietet.

Um mit dem UV/Vis- Detektor und der Massenspektrometrie präzise und richtige Ergebnisse zu erzielen, müssen die Substanzen bestimmte Eigenschaften vorweisen. Der UV/Vis- Detektor ist auf Substanzen beschränkt, die Licht im UV/Vis Bereich absorbieren. Die Massenspektrometer sind teuer in der Anschaffung und komplex in der Bedienung. Weiters ist zu beachten, dass die Ionisierbarkeit verschiedener Analyten stark variieren kann und der Ionisationsprozess störungsanfällig ist. Einige Substanzen werden nicht oder nur sehr schlecht ionisiert, bzw. bilden instabile Ionen die bei der Analyse spontan fragmentieren. Die Quantifizierung ist nur mit Reinsubstanzen als Standard sinnvoll (Hooijschuur et al., 2000).

Der CAD vereint die neuesten Technologien der Flüssigchromatographie und analysiert Inhaltsstoffe, die der UV/Vis Detektor nicht erkennt und das Massenspektrometer nicht ausreichend detektiert. In Abbildung 6 (Seite 10) ist der Vergleich der 3 unterschiedlichen Detektoren an einem ausgewählten Beispiel ersichtlich.

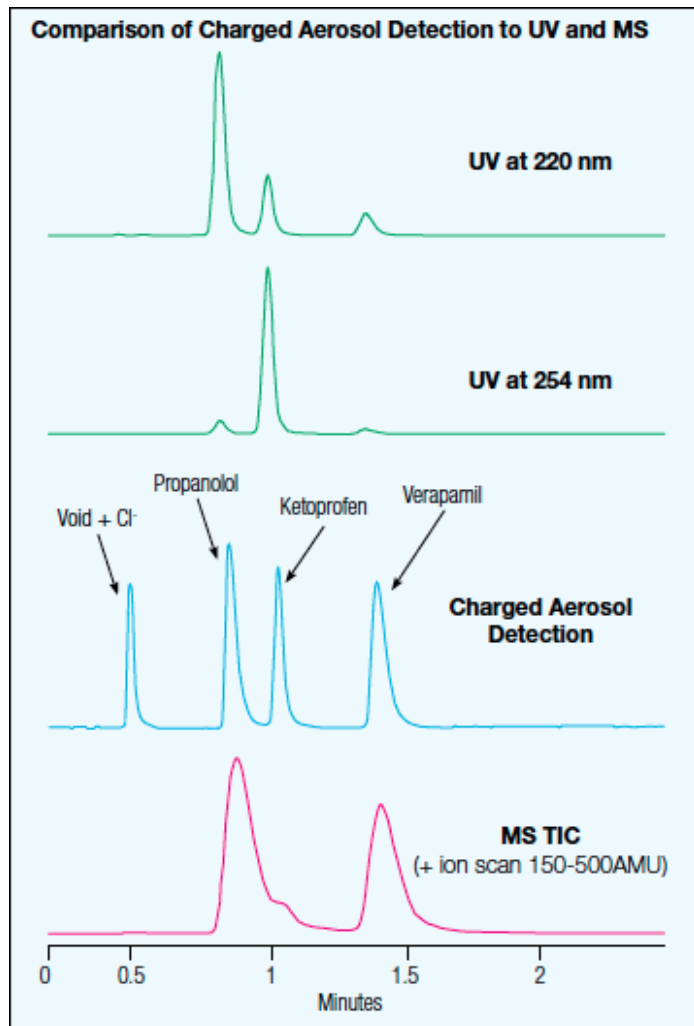


Abbildung 6: Vergleich Charged Aerosol Detektor mit UV/Vis Detektor und Massenspektrometer

(Thermo Scientific, 2014)

1.2 Problemstellung

1.2.1 Universelle Quantifizierung mittels Charged Aerosol Detector

Die Aufgabe der vorliegenden Diplomarbeit war eine systematische Untersuchung von Naturstoffen mittels CAD, um herauszufinden inwieweit der Detektorresponse abhängig oder unabhängig von der Struktur des Analyten ist.

Weiters von Interesse war es, andere Parameter auszutesten, die für die Quantifizierung mittels HPLC - CAD relevant sind, wie z.B. den Versuch 4: Einfluss des Wasser/Lösungsmittel-Gehalts der Standardsubstanzen bzw. Proben (Seite 40) oder den Einfluss der Lösungsmittel-Zusammensetzung (Seite 29). Das erhoffte Endziel war, Pflanzinhaltsstoffe ohne strukturell ähnliche Referenzsubstanzen als Standards quantifizieren zu können.

1.2.2 Methodenvergleich HPLC – UV/Vis und HPLC – CAD für die Quantifizierung von Hederacosid C in Efeublättern

Im Europäischen Arzneibuch wird die Gehaltsbestimmung von Hederacosid C, einem Triterpensaponin in Efeublättern, mittels HPLC-UV/Vis und einer Lösung eines externen Standards durchgeführt (EDQM, 2010).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde versucht, die Gehaltsbestimmung mittels Charged Aerosol Detector mit 2 internen Standards durchzuführen. Anschließend wurden die mit diesen beiden Methoden, HPLC – CAD und der etablierte Methode HPLC – UV/Vis, erhaltenen Resultate anhand des Gehalts an Hederacosid C verglichen.

1.2.3 Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Peptiden in Holunderfrüchten

Das Ziel welches wir verfolgten, war der Einsatz des CAD bei schwierigen Analyten für die es keine Standards gibt. Als optimales Beispiel für die Anwendung des CAD wurde die Quantifizierung von Peptiden in den Holunderfrüchten gewählt. Die Pflanze *Sambucus*

nigra enthält viele Inhaltsstoffe, die bereits ohne Probleme analysiert werden können. Bis heute gibt es jedoch keine etablierte Methode für die Quantifizierung der Peptide, die in den vorangegangenen Diplomarbeiten entdeckt und charakterisiert wurden (Semper, 2012; Hellmayr, 2012; Jilg, 2014).

Bevor mit der Quantifizierung begonnen werden konnte, war es wichtig zu prüfen, mit welcher Extraktionsmethode und mit welchem Extraktionsmittel man die beste Ausbeute erzielt. Der zweite Schritt beinhaltete die Entwicklung eines optimalen Gradientenverlaufes und die Ermittlung passender interner Standards, um die Peptide einwandfrei quantifizieren zu können.

2 Material

2.1 Reinsubstanzen

Es wurden Reinsubstanzen aus verschiedenen Substanzklassen eingesetzt um die Empfindlichkeit und die Universalität des CAD zu überprüfen.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Lösungsmittel

Nr	Substanz	Reinheit	Firma	Produktnummer
1	Acetonitril	99,9%, HPLC Grade	VWR	83639.320
2	Acidum Formicicum conc.	OEAB 98-100%	Gatt-Koller	607001000
3	Dimethylsulfoxid		Merck	1029521000

Tabelle 2: Liste der verwendeten Reinsubstanzen:

Nr.	Substanz	Reinheit	Firma	Produktnummer
1	Rhamnetin	Purum	Roth	9044
2	Galangin	CHR ¹ BCP	Roth	7416
3	Catechin	CHR BCA	Roth	6200
4	Fisetin	95%	Roth	7380
5	Myricitrin	Purum	Roth	8497
6	Daphnetin	Purum	Roth	6618
7	Chlorogensäure	CHR	Roth	6385
8	Rosmarinsäure	97%	Aldrich	0001445477
9	Catalpol	90%	Roth	94332
10	Digoxin	Ph.Eur.	Roth	3589
11	Gentamycinsulfat	KA ²	Fluka	48760
12	Ethylgallat	Purum	Aldrich	1489
13	Chelidonsäurehydrat	Purum	Roth	6240

¹ CHR: Dünnschichtchromatographisch rein

² Keine Angaben

Material

14	Kaffeesäure	CHR	Roth	5869
15	Aucubin	Purum	Roth	9149
16	Loganin	90%	Roth	8857
17	Ellagsäure	98%	Fluka	45140
18	Scopoletin	KA	Sigma	05343750
19	Sinapinsäure	Purum	Fluka	855430
20	Cynarin	KA	KA	04671c
21	Fisetin	95%	Roth	7380
22	Hesperidin	95%	Merck	4357
23	Kämpferol	CHR	Roth	5859
24	Rutin	CHR	Roth	7176
25	Quercetin	CHR	Roth	7136
26	Hyoscyamin	Purum	Merck	4620
27	Frangulin	Depur.	Roth	7404
28	Brucin	99%	Merck	1952
29	Coffein	KA	Sigma	0750
30	Phenylalanin	99%	Fluka	78019
31	Bergapten	HPLC	Fluka	0552
32	Ergosterol	KA	Kodak	2297
33	Sennosid A	Depur	Roth	9349
34	Scopoletin	KA	Sigma	52500
35	Glykocholsäure	97%	Sigma	2878
36	Taurocholsäure	95%	Sigma	4009
37	Valin	99%	Merck	8495
38	Glutamin	99%	Merck	289
39	Glycin	99%	Merck	4201
40	Pyrogallol	KA	Sigma	16040
41	PIFTVPEDVEPK ³	98%	Genscript	C1371K
42	PIFTVPE ³	98%	Genscript	C802I
43	Esculin Hydrat	98%	Sigma	E8250

³ Peptide im Einbuchstaben-Code

Material

44	Methionin	99%	Merck	5707
45	Aloin	96%	Roth	1481
46	β -Aescin	KA	Roth	8688
47	Glycyrrhetinsäure	KA	Merck	4185
48	Hederacosid C	98%	Roth	7472
49	Acacetin	99%	Extrasynthese	1101
50	Chrysin	97%	Roth	6475
51	Tectochrysin	90%	Extrasynthese	1220

2.2 Pflanzenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Pflanzenmaterialien zum Einsatz.

2.2.1 Efeublätter

Verwendete Droge:

Kottas Pharma, Deklaration: „Folium Hederæ helici CS“, Araliaceae, Efeublatt geschnitten nach PhE, Ch.Nr.: P12301841

2.2.2 Holunderfrüchte

Verwendete Droge:

Kottas Pharma, Deklaration: „Fructus Sambuci Nigræ Toto“, Adoxaceae, Holunderbeere ganz, Ch. Nr.: W10201493

3 Methoden

3.1 Instrumentierung

Für die folgenden Versuche wurde eine HPLC Anlage und ein Charged Aerosol Detector benötigt.

HPLC Parameter:

Geräte:	Dionex Ultimate 3000 RSLC Dionex Corona Charged Aerosol Detector Ultra RS
Software:	Chromeleon 7
Mobile Phase:	0,1%ige Ameisensäure (Laufmittel A) Acetonitril (Laufmittel B)
Flussrate:	0,500 mL/min
Einspritzmenge:	2 µL

Zwischen der HPLC-Anlage und dem Charged Aerosol Detector ist ein Splitventil angebracht, um die simultane Detektion mittels Massenspektrometer und dem CAD in einem Lauf zu ermöglichen. Das Splitventil trennt den Eluentenfluss in einem Verhältnis 4:1 auf, 4 Teile in den CAD und 1 Teil in das Massenspektrometer. Obwohl bei den Messungen der vorliegenden Diplomarbeit keine MS-Spektren aufgenommen wurden, musste dieses Splitverhältnis mitberücksichtigt werden, da letztlich nur 4/5 der Substanz in den Detektor gelangen. An der Quantifizierung ändert diese Tatsache nichts, da der für die Quantifizierung verwendete Standard und die Probe zu gleichen Teilen vermindert wird. Jedoch wird durch das Splitten die Empfindlichkeit des CADs beeinflusst.

3.2 Experimente mittels Fließinjektionsanalyse (FIA)

Bei der Fließinjektionsanalyse wird die HPLC-Anlage nur benutzt, um die Probe aufzunehmen und an den CAD zur Detektion abzugeben. Die Proben bestanden aus einem gelösten Reinstoff. Eine Auftrennung mittels einer stationären Phase war daher nicht notwendig und deshalb wurde auch keine Trennsäule eingebaut.

3.2.1 Versuch 1: Ermittlung des linearen Bereiches des CAD

Es wurde eine Verdünnungsreihe mit Esculin Hydrat (Tabelle 3, Seite 17) angesetzt.

Als Lösungsmittel wurde 0,1%ige Ameisensäure / Acetonitril (1:1, v/v) verwendet. Ausgehend von einer Stammlösung mit der Ausgangskonzentration von 1,00 mg/mL wurden folgende Verdünnungen hergestellt:

Tabelle 3: Verdünnungsreihe mit Esculin Hydrat

Bezeichnung	Verdünnung	Konzentration (µg/mL)
V1	1:10	100
V2	1:25	40
V3	1:50	20
V4	1:100	10
V5	1:250	4
V6	1:500	2
V7	1:1000	1
V8	1:2500	0,4
V9	1:5000	0,2

3.2.2 Versuch 2: Einfluss der Lösungsmittel - Zusammensetzung

Im Versuch 2 wurde der Einfluss der Lösungsmittel - Zusammensetzung getestet. Esculin Hydrat wurde in 0,1%iger Ameisensäure / Acetonitril (1:1, v/v) gelöst. Die Ausgangskonzentration war 1,00 mg/mL. Diese Stammlösung wurde dann auf 1:10 verdünnt, wobei die resultierenden Lösungen einen Acetonitrilgehalt von 10-90% (in 10er Schritten) aufwiesen.

Um den Einfluss zu bestätigen, wurden analoge Versuche auch noch mit anderen Substanzen (Kaffeensäure, Esculin Hydrat, Glutamin) durchgeführt. Jeder Versuch wurde 3-mal durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

3.2.3 Versuch 3: Vergleich verschiedener Substanzklassen

Es galt zu überprüfen, ob mit dem Charged Aerosol Detector universell quantifiziert werden kann. Dazu wurden unterschiedliche Reinsubstanzen der verschiedensten Substanzklassen verglichen.

1,00 mg von jeder Reinsubstanz (siehe Tabelle 2, Seite 13) wurde in 10 mL 0,1%iger Ameisensäure / Acetonitril (1:1, v/v) gelöst. Für eine optimale Durchmischung, und um sicher zu sein, dass sich der ganze Stoff gelöst hat, wurde die Probe noch für etwa 5 min in das Ultraschallbad gestellt.

Darauffolgend wurde dasselbe Prozedere nochmals mit einer Einwaage von 10,00 mg der Reinsubstanzen durchgeführt. Die Substanzen wurden in 10 mL gelöst und anschließend verdünnt.

Aufgrund der hohen Sensitivität des Gerätes und der Tatsache, dass alle nicht flüchtigen Komponenten in der FIA mitdetektiert werden, wurde beschlossen, die Vials, die Glasgefäße, die Stoppel und die Pipettenspitzen vor Gebrauch mit dem Lösungsmittel oder der Probe zu spülen.

3.2.4 Versuch 4: Einfluss des Gehalts an Rest-Wasser und Lösungsmittel der Reinsubstanzen

Quercetin, Sinapinsäure, Kämpferol und Galangin (siehe Abbildung 21, Seite 40) wurden in einer Kristallisierschale 2 h bei 105°C im Trockenschrank getrocknet und für 1 h in einem, mit regeneriertem Trocknungsmittel (Blaugel) befüllten Exsikkator gestellt. Danach wurden die Substanzen zu je 10 mg eingewogen, wiederum in 0,1%iger Ameisensäure / Acetonitril (1:1, v/v) gelöst und anschließend mit dem Charged Aerosol Detektor vermessen.

3.3 Experimente mittels HPLC

Bei den folgenden Versuchen

- Zusammenhang von Peakfläche mit der Laufmittel - Zusammensetzung,
- Messung von Hederacosid C in Efeublättern und
- Messung der Peptide in Holunderfrüchten

wurde die HPLC Anlage inkl. Trennsäule verwendet, da die komplexe Zusammensetzung der Extrakte eine Auftrennung erforderte.

HPLC Parameter:

Stationäre Phase:	Acclaim® 120 (Dionex) C18, 3 µm, 120Å 2,1 x 150 mm
Mobile Phase:	0,1%ige Ameisensäure (Laufmittel A) Acetonitril (Laufmittel B)
Flussrate:	0,500 mL/min
Einspritzmenge:	1 µL

Zur bestmöglichen Trennung der Substanzen wurde der Gradientenverlauf bei jeder Probe unterschiedlich angepasst.

3.3.1 Versuch 5: Zusammenhang der Peakflächen mit der Laufmittel-Zusammensetzung

Für diesen Versuch wurden 2 Lösungen mit 9 bzw. 8 Reinsubstanzen (Mischung 1 und 2, siehe Tabelle 4, Seite 21) verwendet (Herkunft und Reinheit siehe Tabelle 2, Seite 13).

Die Einwaage betrug jeweils 1,00 mg. Die Reinstoffe wurden in 2 Mischungen aufgeteilt, um die möglichen Peak-Überlappungen im Chromatogramm zu verhindern. Gelöst wurde das Reinstoffgemisch in 0,1%iger Ameisensäure / Acetonitril (1:1, v/v).

Zusätzlich von Interesse waren die jeweiligen Retentionszeiten, um für zukünftige Versuche abschätzen zu können, bei welchen Acetonitril-Konzentrationen die verschiedenen Komponenten eluiert werden. Dies ist für die Auswahl in Frage kommender interner Standards von Bedeutung.

Tabelle 4: In Versuch 5 verwendete Substanzgemische

Mischung 1	Mischung 2
Phenylalanin	Chlorogensäure
Kaffeesäure	Brucin
Rutin	Digoxin
Quercetin	Galangin
Esculine Hydrat	Catechin
Loganin	Hyoscyamin
Ethylgallat	Sinapinsäure
PIFTVPE	Rosmarinsäure
Kämpferol	

Gradient:

0 min	5% Laufmittel B, 95% Laufmittel A
45 min	95% Laufmittel B, 5% Laufmittel A
54 min	95% Laufmittel B, 5% Laufmittel A
55 min	5% Laufmittel B, 95% Laufmittel A
65 min	5% Laufmittel B, 95% Laufmittel A

3.3.2 Quantifizierung von Hederacosid C in Efeublättern

20,00 g der pulverisierten Droge (Kottas Pharma, Deklaration: „Folium Hederae helici CS“, Araliaceae, Efeublatt geschnitten nach PhE, Ch.Nr.: P12301841) wurden mit 100,00 g Ethanol 70% übergossen und anschließend 12 min mittels Turboextraktion extrahiert. Nach einer groben Filtration wurde mit 13000 U/min 10 min lang zentrifugiert.

Die verwendeten Extrakte wurden aus der Diplomarbeit von Sara Hassanein übernommen (Universität Wien: Diplomarbeit in Vorbereitung).

Im Europäischen Arzneibuch gibt es eine HPLC-Methode zur Quantifizierung von Hederacosid C in Efeublättern. Es wird eine Quantifizierung mittels UV/Vis - Detektor und einem externen Standard vorgenommen. Basierend auf dieser HPLC-Methode wurde ein neuer Gradientenverlauf entwickelt.

Ziel war es, mittels internen Standards, anstelle des teureren externen Standards, die Menge von Hederacosid C zu bestimmen, um die jeweiligen Varianten

1. UV/Vis externer Standard (Ph.Eur)
2. CAD externer Standard
3. CAD interner Standard

vergleichen zu können. Ein HPLC-Lauf liefert Ergebnisse für beide Detektionsmethoden, da die beiden Detektoren in Serie geschaltet wurden. Derselbe Gradient wurde für alle 3 Varianten angewendet.

HPLC-Parameter der Probe mit Efeublättern:

Externer Standard: Hederacosid C (5,10 mg in 10 mL Methanol)

Gradient:

0	min	23% Laufmittel B, 77% Laufmittel A
28	min	30% Laufmittel B, 70% Laufmittel A

Methoden

38 min	42% Laufmittel B, 58% Laufmittel A
38,1 min	95% Laufmittel B, 5% Laufmittel A
47,9 min	95% Laufmittel B, 5% Laufmittel A
48 min	23% Laufmittel B, 77% Laufmittel A
58 min	23% Laufmittel B, 77% Laufmittel A

Interne Standards:

Kämpferol	Retentionszeit 16,9 min
Galangin	Retentionszeit 37,4 min

Während der Anteil des Extraktes (1,701 mg/mL) immer gleich blieb, variierten die Konzentrationen von Galangin (0,017 mg/mL - 0,020 mg/mL) und Kämpferol (0,018 mg/mL - 0,030 mg/mL). Das Endvolumen (Extrakt in Kombination mit Galangin und Kämpferol) ergab in Summe immer 1 mL. Der erste Versuch wurde in einem Mischungsverhältnis von 1 Teil Extrakt, 8 Teile Kämpferol und 1 Teil Galangin gemischt. Die weiteren 3 Wiederholungen wurden in einem anderen Verhältnis vermengt. 1 Teil Extrakt, 4,5 Teile Galangin, 4,5 Teile Kämpferol.

Berechnung des Hederacosid C [mg/ml]:

$$\frac{A1 * M * V}{A2 * 2,5}$$

A1 =	Peakfläche von Hederocosind C im Chromatogramm
M =	Einwaage des Standards als Droge [g]
V =	Verdünnungsfaktor wie oben angeführt
A2 =	Peakfläche der Standardlösung im Chromatogramm

3.3.3 Quantifizierung der Peptide in Holunderfrüchten

Viele Bestandteile der Holunderfrüchte sind seit langem bekannt. Viele Methoden wurden für ihre Quantifizierung bereits erstellt. Ziel bei diesem Experiment war es, den Gehalt der Peptide von Holunderfrüchten zu ermitteln. Vorarbeit im Rahmen vorangegangener Diplomarbeiten leisteten bereits Johanna Hellmayr, Birgit Semper und Anne Jilg (Hellmayr, 2012; Semper, 2012; Jilg, 2014)

Die Früchte von *Sambucus nigra* kamen für ca. 1h in den Gefrierschrank, um das Zerkleinern zu erleichtern. Nach dem Gefrieren wurden sie in einer Reibschale sorgfältigst verrieben.

Zuerst musste herausgefunden werden, welches Lösungsmittel am besten für die Extraktion geeignet ist und mit welcher Methode die höchste Ausbeute erzielt werden konnte. Die Probe wurde mit 3 verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert:

- 0,1%ige wässrige Ameisensäure
- 2%ige wässrige Ameisensäure
- Acetonitril / 0,1%ige Ameisensäure (1:1, v/v) (Ultraschall und Mazeration)

Um die Inhaltsstoffe optimal herauszulösen, wurden Versuche einerseits mittels Ultraschallbad und andererseits mittels Mazeration durchgeführt.

10,00 mg der verriebenen Probe wurden in Eppendorf Plastikgefäße eingewogen. Zu je einer Probe wurde 1,00 mL der 3 unterschiedlichen Lösungsmittel hinzugefügt. Die Probengefäße kamen für 15 min in das Ultraschallbad und anschließend für 5 min bei 13000 U/min in die Zentrifuge. Der Überstand wurde abpipettiert, der Rückstand nochmals mit 1,00 mL Lösungsmittel 15 min lang im Ultraschallbad extrahiert. Dies wurde solange durchgeführt, bis die Früchte erschöpfend extrahiert waren (Siehe Abbildung 26: Variation von 3 unterschiedlichen Extraktionsmitteln zur Austestung des optimalen Auszugsmittels, Seite 46). Die Extrakte wurden vereinigt und man erhielt ein Endvolumen von 3 mL.

Methoden

HPLC Parameter der Probe Holunderfrüchte:

Flussrate:	0,500 mL/min
Einspritzmenge:	5 µL
Säulentemperatur	55 °C

Gradient:

0 min	22,5 % Laufmittel B, 77,5% Laufmittel A
2 min	22,5 % Laufmittel B, 77,5% Laufmittel A
42 min	32,5 % Laufmittel B, 67,5% Laufmittel A
58 min	40,5 % Laufmittel B, 59,5% Laufmittel A
68 min	60,5 % Laufmittel B, 39,5% Laufmittel A
68,1 min	95% Laufmittel B, 5% Laufmittel A
78 min	95% Laufmittel B, 5% Laufmittel A
78,1 min	22,5% Laufmittel B, 77,5% Laufmittel A
88 min	22,5% Laufmittel B, 77,5% Laufmittel A

Interne Standards:

Acacetin	Retentionszeit 27,5 min
Chrysin	Retentionszeit 28,3 min
Tectochrysin	Retentionszeit 56,1 min

Als finale Methode wurde die Extraktion im Ultraschallbad mittels Acetonitril / 0,1%iger Ameisensäure (1:1, v/v) durchgeführt.

Die internen Standards Acacetin und Chrysin wurden in 1 mL Dimethylsulfoxid + 9 mL Methanol gelöst. Um Tectochrysin in Lösung zu bringen wurden 2 mL Dimethylsulfoxid +

Methoden

8 mL Methanol benötigt. Die Konzentration von Acacetin betrug 0,039 mg/mL, von Chrysin 0,052 mg/mL und von Tectochrysin 0,045 mg/mL.

Je 50 µL zweier Standards (Acacetin und Tectochrysin oder Chrysin und Tectochrysin) und 900 µL der Probe (Konzentration 3,00 mg/mL) wurden vereinigt und vermischt. Es wurden pro Standardkombination 3 Analysenläufe gemacht.

Berechnung der Konzentration der Peptide 1-13 (Siehe Abbildung 27, Seite 47):

$$\frac{A1 * M * V}{A2 * 10}$$

A1 = Peakfläche der jeweiligen Peptide im Chromatogramm

M = Einwaage der jeweiligen Standards [mg]

V = Verdünnungsfaktor Standards 1:20

A2 = Peakfläche der Standardlösung im Chromatogramm

4 Ergebnisse

4.1 Experimente mittels Fließinjektionsanalyse (FIA)

4.1.1 Versuch 1: Ermittlung des linearen Bereiches des CAD

Zu Beginn wurde eine Verdünnungsreihe mit Esculin Hydrat (siehe Seite 17) hergestellt und mittels Fließinjektionsanalyse gemessen. Einerseits galt es herauszufinden ob die gemessenen Werte eine Linearität aufweisen, andererseits wie richtig und präzise der Detektor auch kleinste Mengen detektieren kann. Die Nachweisgrenze wurde nicht ermittelt, aber die kleinste Verdünnung mit 0,2 µg/mL konnte noch korrekt quantifiziert werden. In Abbildung 7 (Seite 27) erkennt man einen linearen Trend im Konzentrationsbereich 0,2 µg/mL bis 20 µg/mL. Eine parabolische Abhängigkeit ist vor allem bei den Konzentrationen ab 20 µg/mL bis 100 µg/mL zu sehen. Jeder Datenpunkt der in Abbildung 7 (Seite 27) zu sehen ist, stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen dar.

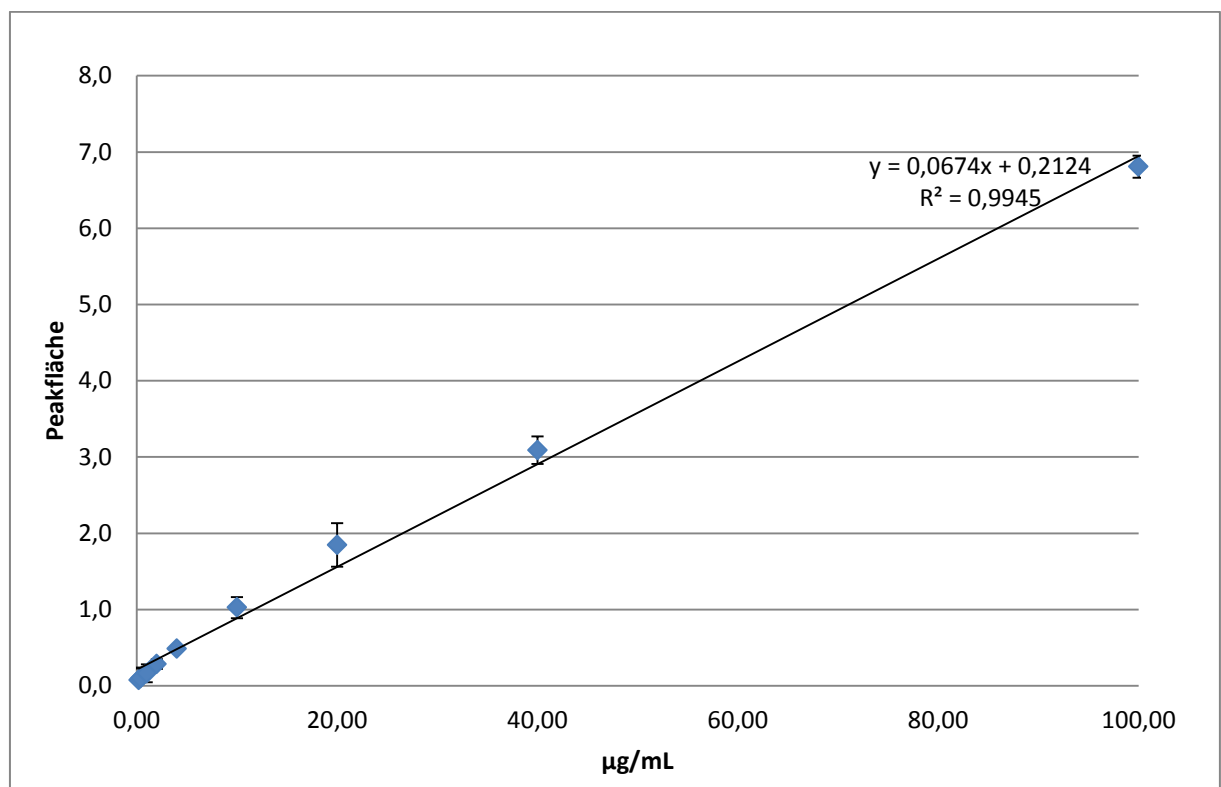


Abbildung 7: Response des Charged Aerosol Detectors beim Vermessen einer Verdünnungsreihe (Konzentrationsbereich von 0,2 µg/mL bis 100 µg/mL) von Esculin Hydrat

4.1.2 Versuch 2: Einfluss der Lösungsmittel-Zusammensetzung

Es wurden 3 Substanzen (Glutamin, Kaffeesäure und Esculin Hydrat) in 0,1%iger Ameisensäure / Acetonitril (1:1 v/v) gelöst. Die Ausgangskonzentration war 1 mg/mL. Diese Stammlösung wurde dann derart auf 1:10 verdünnt, sodass die resultierenden Lösungen einen Acetonitrilgehalt von 10-80% (in 10er Schritten, Rest auf 100% ist 0,1%ige Ameisensäure) aufwiesen.

In Abbildung 8 (Seite 29) wurde der Zusammenhang zwischen Lösungsmittel-Zusammensetzung und Peakflächen der oben genannten 3 Substanzen verglichen. Ein und dieselbe Reinsubstanz in der gleichen Konzentration ergibt mit einer unterschiedlichen Lösungsmittel-Zusammensetzung eine Erhöhung der Fläche bis um das Vierfache. Dies würde zu Problemen bei Quantifizierungen mittels interner Standards führen, die ein HPLC Trennungsverfahren mit Gradientenelution benötigen. Aus diesem Grund müssen mindestens 2 Standards verwendet werden, die bei unterschiedlichen Laufmittelkonzentrationen eluieren, damit die Menge des gesuchten Stoffes über die Peakfläche auch präzise berechnet und der Effekt des Lösungsmittels kompensiert werden kann. Durch diese Vorgehensweise berücksichtigt man den Anstieg der Peakflächen, der aufgrund des ACN Gehalts verursacht wird.

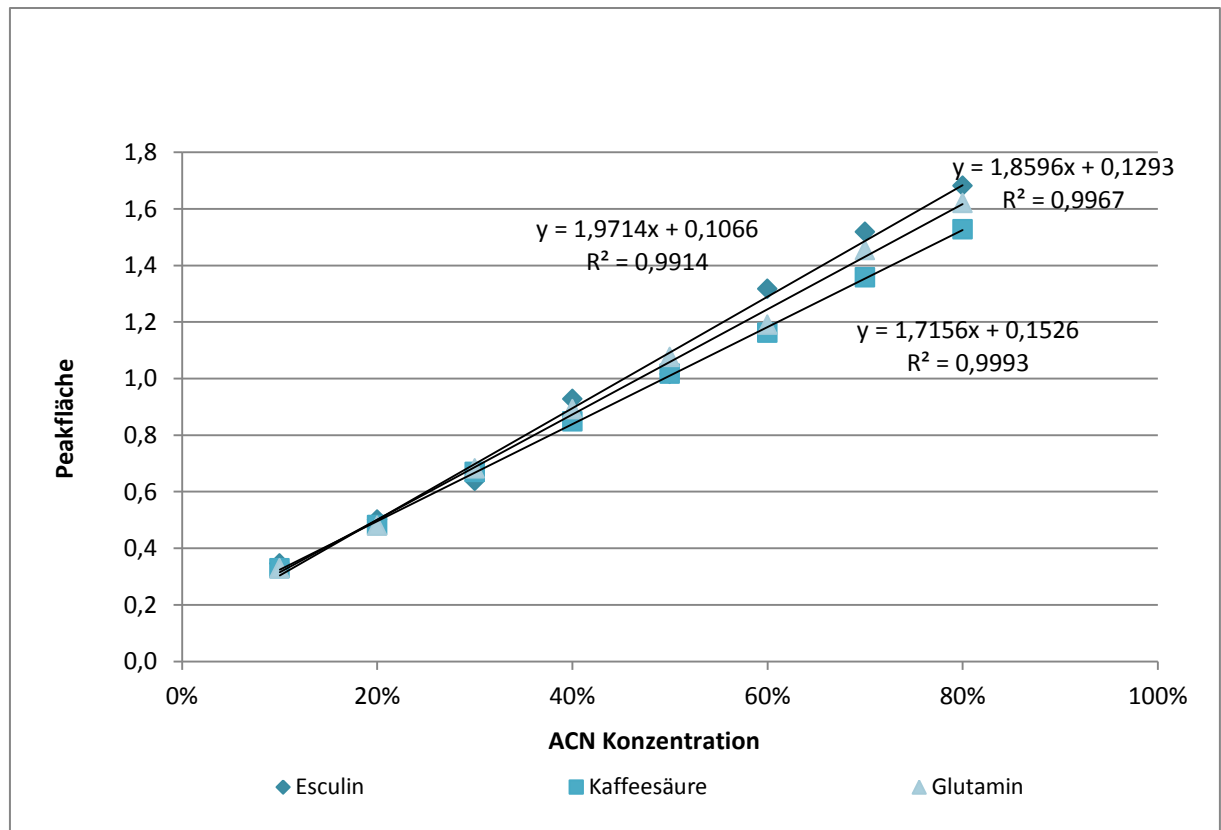


Abbildung 8: Einfluss der Lösungsmittel-Zusammensetzung auf den CAD-Response.

Verdünnung 0,1 mg/mL mit abweichender ACN-Konzentration 10-80%

4.1.3 Versuch 3: Vergleich unterschiedlicher Substanzklassen

Das Ziel dieses Versuches war es, die vom Hersteller angegebene Universalität des Charged Aerosol Detectors zu überprüfen. Dafür wurden unterschiedliche Reinsubstanzen der verschiedensten Substanzklassen miteinander verglichen.

1,00 mg von jeder Reinsubstanz (siehe Tabelle 2, Seite 13) wurde genau abgewogen und in 10 mL 0,1%iger Ameisensäure / Acetonitril (1:1, v/v) gelöst. Alle Peakflächen sind auf 1,00 mg Einwaage normiert. Aufgrund der teilweise geringen Menge an vorhandenen Substanzen wurde die Einwaage auf 1,00 mg beschränkt.

Die Anforderungen an die zu messenden Analyten, wie definiert hohe Reinheit und Verfügbarkeit, limitierte die Anzahl an Substanzen. Die folgenden Balkendiagramme (Abbildung 9 bis 18) stellen die Ergebnisse einiger Naturstoffklassen übersichtlich dar. Jeder Balken in den Diagrammen ist der errechnete Mittelwert aus mindestens 3

Messungen. Ganz rechts in jeder Abbildung ist der Mittelwert über alle Analyten der jeweiligen Substanzklasse zu sehen.

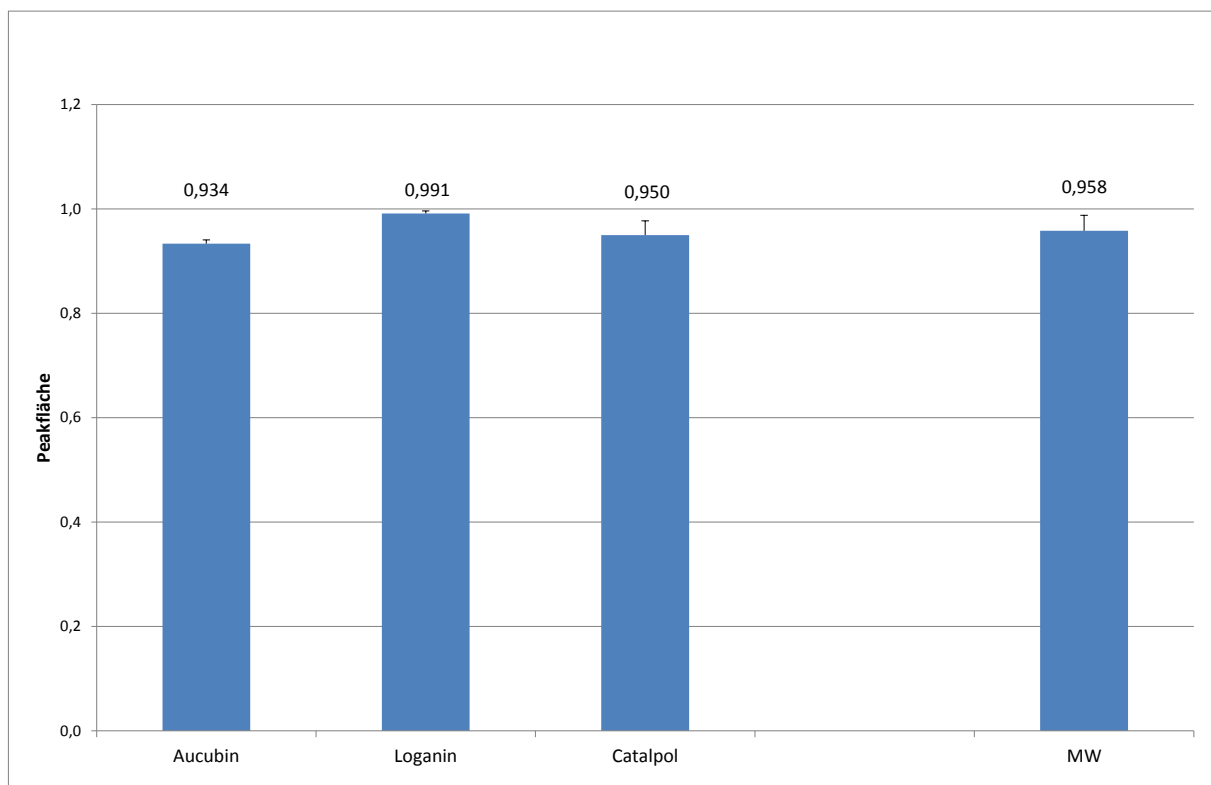


Abbildung 9: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Iridoide

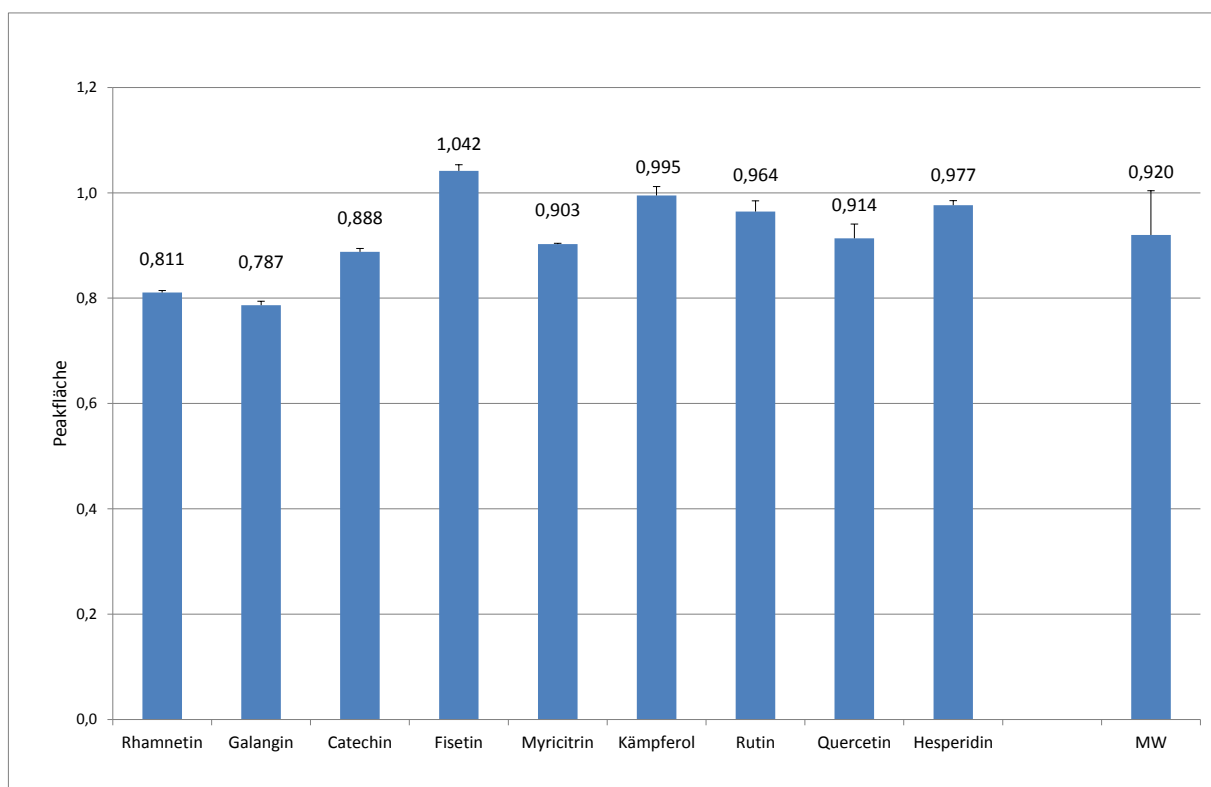


Abbildung 10: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Flavonoide

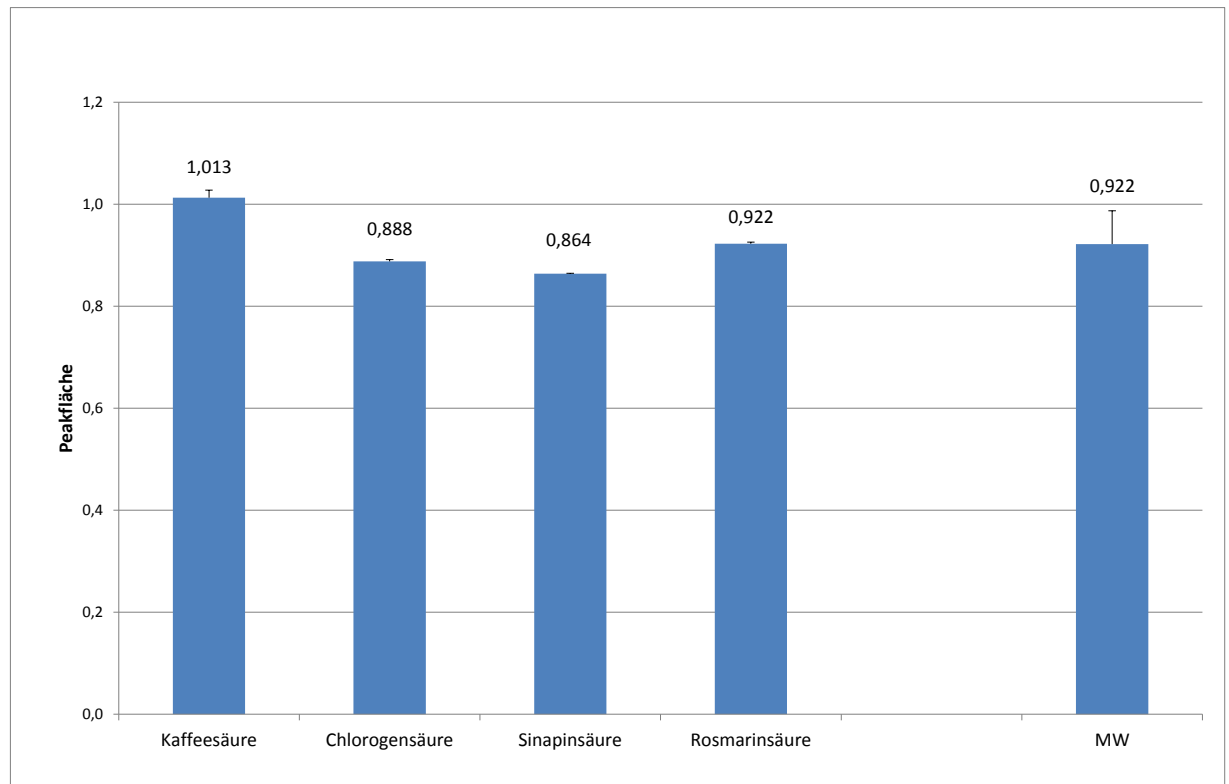


Abbildung 11: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Zimtsäure-Derivate

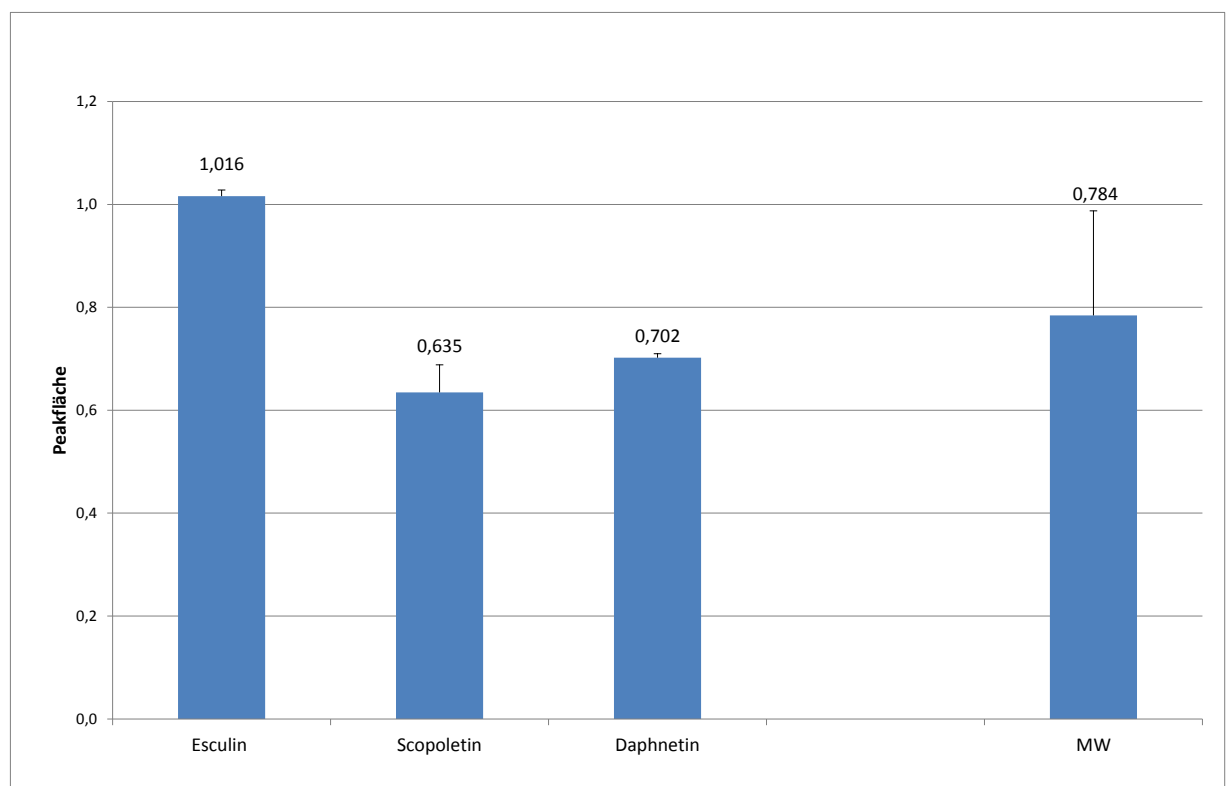


Abbildung 12: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Cumarine

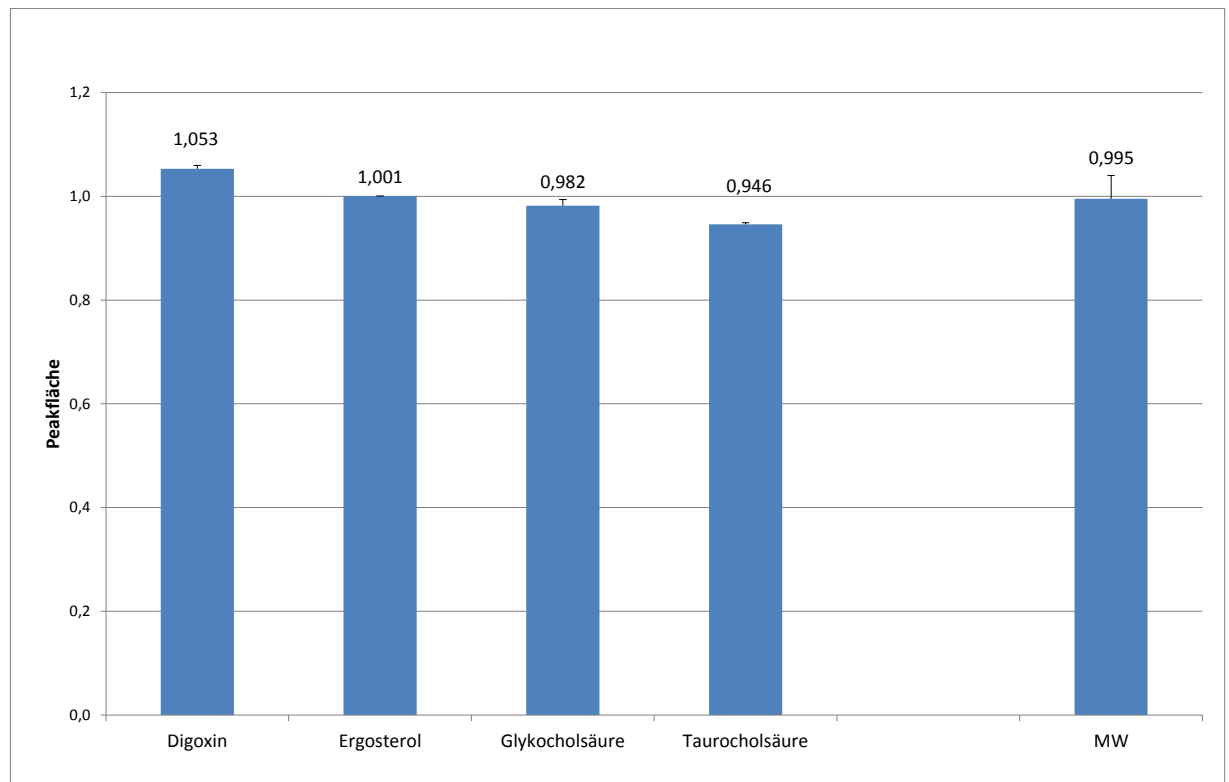


Abbildung 13: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Steroide

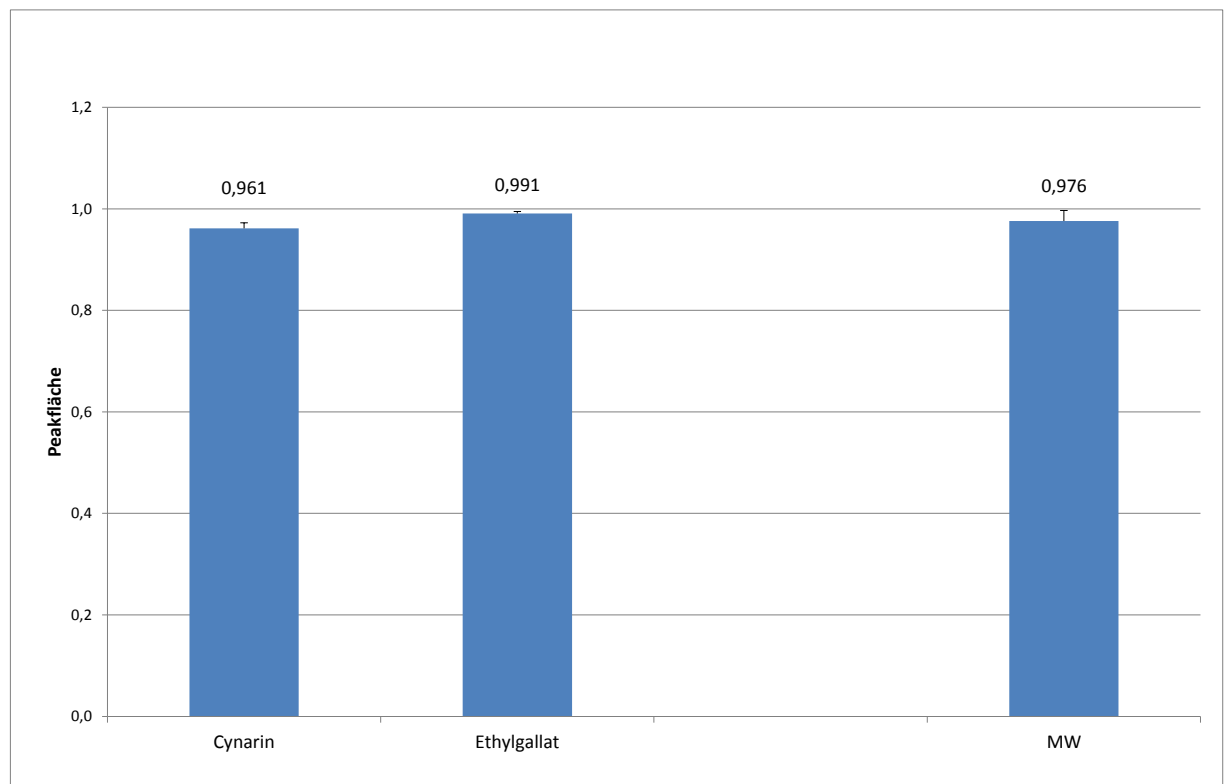


Abbildung 14: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Gerbstoffe

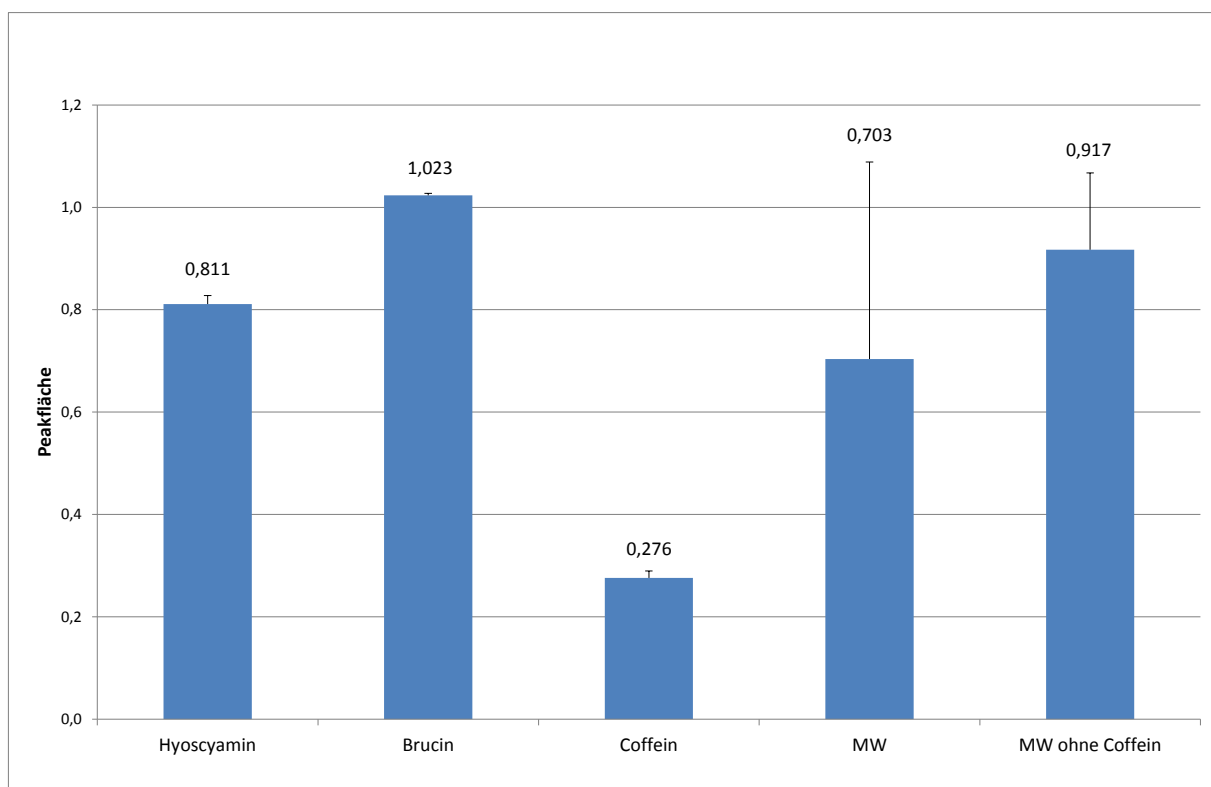


Abbildung 15: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Alkaloide

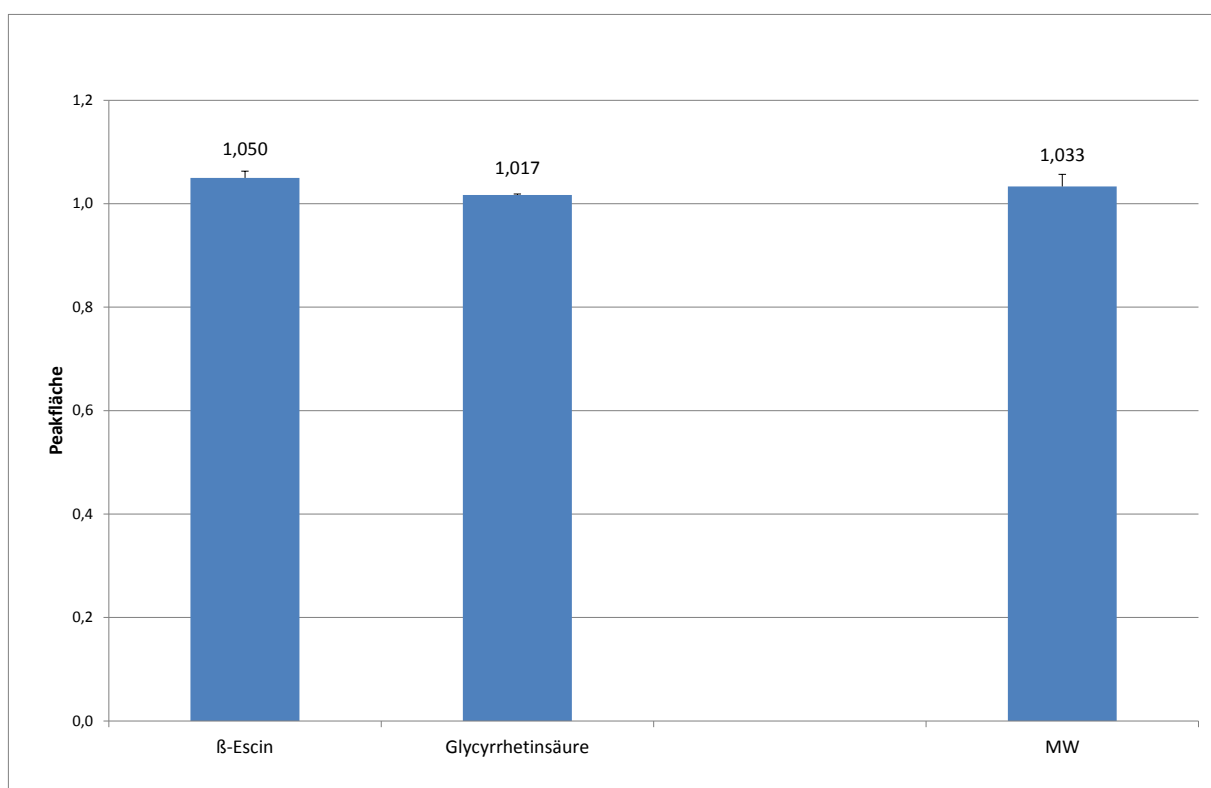


Abbildung 16: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Saponine

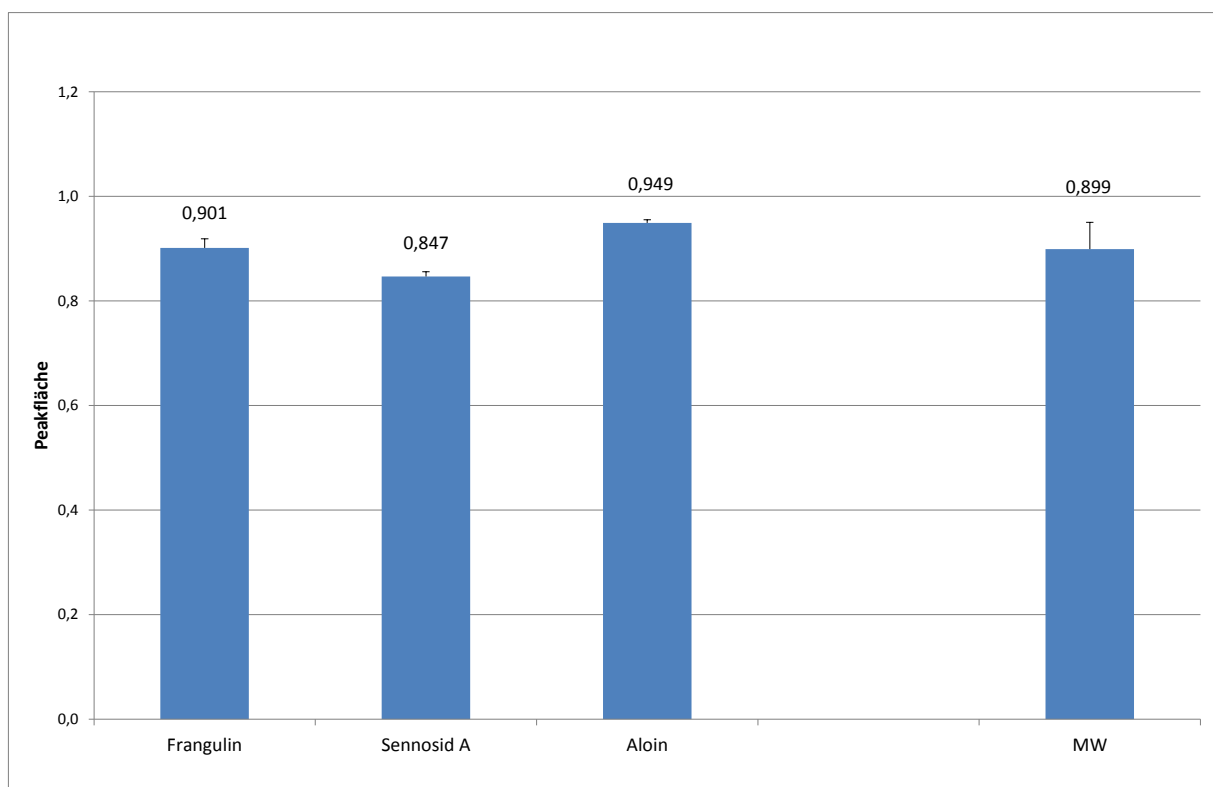


Abbildung 17: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Anthracen-Derivate

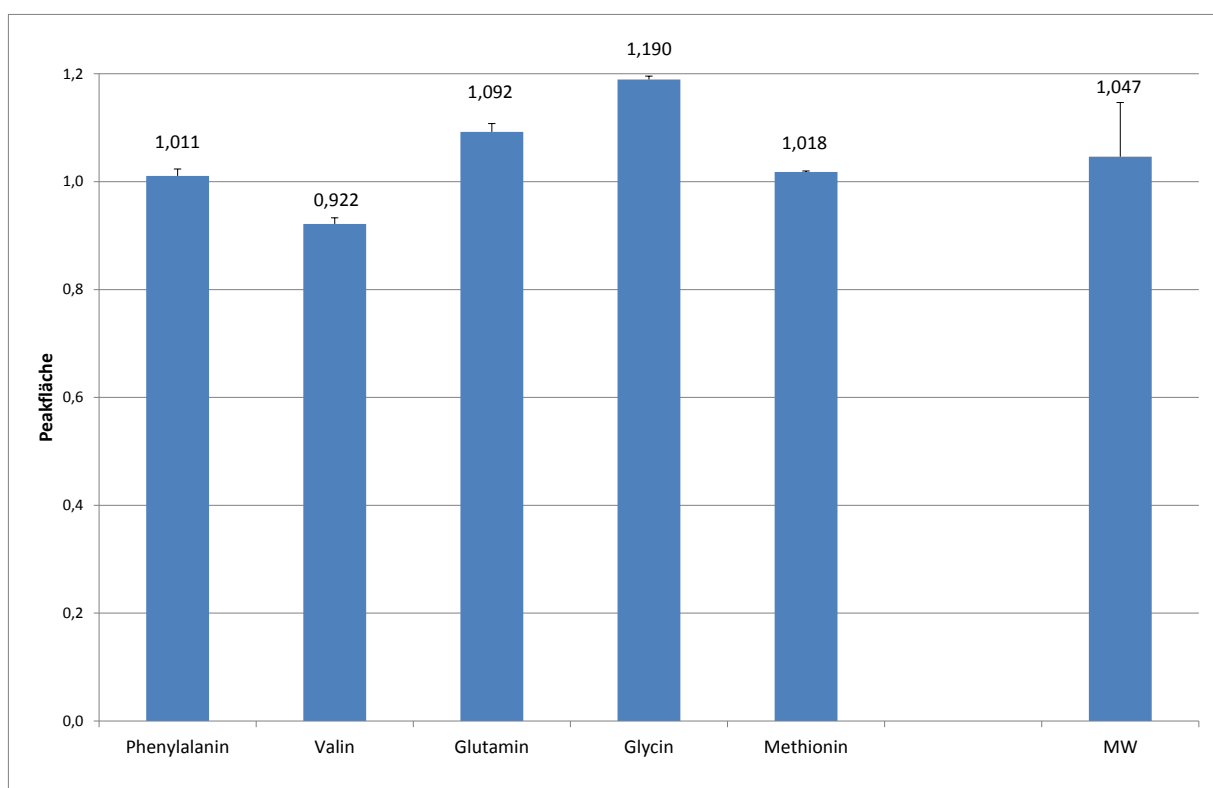


Abbildung 18: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Aminosäuren

Der Großteil der Messungen zeigt, wie erwartet, sehr ähnliche Werte für die verschiedenen Strukturen. Bei einigen Substanzen sind die Peakflächen jedoch aus unterschiedlichen Gründen deutlich abweichend.

Aus den Iridoid-Derivaten wurden Aucubin, Loganin und Catalpol ausgesucht und analysiert (siehe Abbildung 9, Seite 30). Der Mittelwert der Messungen beträgt 0,958 bei einer relativen Standardabweichung von 3,11%. Berücksichtigt man die Einwaage von nur 1 mg und den damit einhergehenden großen relativen Wägefehler, so kann man von einem sehr guten einheitlichen Ergebnis sprechen.

In Abbildung 10 (Seite 30) wurden die Peakflächen der Flavonoide dargestellt. Die relative Standardabweichung liegt bei 9,15% bei einem Mittelwert von 0,920. Im Vergleich zu den Iridoiden wurden hier erheblich mehr Substanzen gemessen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Peakflächen von Rhamnetin, Galangin und Catechin geringer ausfallen als die der anderen. Dies könnte auf verschiedenste Ursachen zurückzuführen sein. Wäge- und Verdünnungsfehler können nach mehrmaligen Wiederholungen ausgeschlossen werden, aber durch den Einfluss des Wasser- und/oder Lösungsmittel-Gehalts der Probe könnte es zu Abweichungen kommen. Die relative Standardabweichung würde ohne diese Werte bei 5,82% liegen, der Mittelwert ergibt eine Fläche von 0,955.

Weiters wäre zu erwähnen, dass bei Versuch 4, indem Quercetin, Kämpferol, und Galangin vor der Analyse getrocknet wurden, deren Peakflächen knapp um 1,0 herum lagen (siehe Abbildung 21, Seite 40). Wenn man das Ergebnis des vorgetrockneten Galangins und Quercetins berücksichtigt, würde man bei einem Mittelwert von 0,952, auf eine relative Standardabweichung von 5,45% kommen.

Die Peakflächen der Zimtsäure-Derivate sind in Abbildung 11 (Seite 31) abgebildet. Die relative Standardabweichung beträgt 7,08%, der Mittelwert ergibt eine Fläche von 0,922. Wie auch bei den Flavonoiden, sollte man hier hervorheben, dass die Resultate von Sinapinsäure, nach der Trocknung, signifikant höhere Werte liefern. Daher liegt die berichtigte relative Standardabweichung bei 6,0% und der Mittelwert bei 0,952.

In Abbildung 12 (Seite 31), sieht man auf den ersten Blick, dass die Peakflächen von Scopoletin und Daphnetin deutlich niedriger ausfallen als jene von Esculin. Grund dafür ist höchstwahrscheinlich, dass es sich bei den beiden Erstgenannten um Aglyka handelt, die wesentlich stärker flüchtig sind als das Glykosid Esculin (Bühning, 2011). Wie aus Herstellerangaben herauszulesen ist und aus dem Funktionsprinzip klar hervorgeht, kann der Charged Aerosol Detector für flüchtige Bestandteile nicht angewendet werden, bzw. zeigt er bei semi-flüchtigen Komponenten einen vergleichsweise zu geringen Response. Vermutlich sind daher die Werte um ein Viertel geringer. Das Glucosid Esculin ist nicht flüchtig, daher liegt die Peakfläche auch wie erwartet knapp um 1,0. Der Mittelwert von Scopoletin und Daphnetin beträgt 0,669. Wenn man den Wert des Esculins mitberechnet, dann kommt man auf einen Mittelwert von 0,784.

Die Peakflächen der Steroide ergeben einen Mittelwert von 0,995 und eine relative Standardabweichung von 4,48% (siehe Abbildung 13, Seite 32).

Bei den Gerbstoffen wurden 2 Substanzen getestet (Abbildung 14, Seite 32). Der Mittelwert ergibt 0,976. Die Abweichung vom Mittelwert des Cynarins und die des Ethylgallats ergibt +/- 1,51%. Es sollten auf jeden Fall noch weitere Substanzen vermessen werden, um das zufriedenstellende Ergebnis bestätigen zu können.

Alkaloide sind stickstoffhaltige Verbindungen, wobei einige von ihnen flüchtig sind. Bei diesem Experiment wurden 3 Vertreter getestet (siehe Abbildung 15, Seite 33). Dies ist zu wenig, um eindeutige Schlüsse daraus ziehen zu können. Die Tatsache, dass es sich bei Coffein um ein Wasserdampf-flüchtiges Alkaloid handelt, erklärt die sehr geringen Peakflächen (Löwig, 2011).

Hyoscyamin ist, wie Coffein, eine semi-flüchtige Substanz. Es kann davon ausgegangen werden, dass sie für die Detektion mittels CAD nicht geeignet ist (Löwig, 2011). Der Mittelwert von Hyoscyamin und Brucin beträgt 0,917. Die Abweichung vom Mittelwert des Hyoscyamins und die des Brucins beträgt +/- 11,57%.

Abbildung 16 (Seite 33) zeigt, dass mit den Saponin-Strukturen sehr gute Resultate erzielt wurden. Da es sich bei den Saponinen, wie auch bei den Steroiden, um Triterpene

handelt, bestätigt es die konstanten Ergebnisse der Steroid-ähnlichen Verbindungen. Der Mittelwert ergibt 1,033. Die Abweichung vom Mittelwert liegt bei β -Escin und der Glycyrrhetinsäure bei $\pm 1,60\%$.

Frangulin, Sennosid A und Aloin sind Reinstoffe, die aus der Gruppe der Anthracen-Derivate getestet wurden. Wie in Abbildung 17 (Seite 34) zu sehen, weisen auch diese Ergebnisse rund um die Peakfläche von 1,0 auf. Die relative Standardabweichung der Flächen liegt bei 5,25% bei einem Mittelwert von 0,899.

Die erhaltenen Ergebnisse der Aminosäuren wichen deutlich von den bisherigen ab (siehe Abbildung 18, Seite 34). Ausschließlich die Werte von Glycin und Glutamin lagen deutlich über 1,0. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist es immer noch unklar, wie es zu diesen Abweichungen kommen konnte, da die Ergebnisse reproduzierbar waren und definitiv nicht auf einen Wägefehler zurückzuführen sind. Es wäre sinnvoll, neue Substanzen zu kaufen und diese Versuche nochmals zu wiederholen. Aufgrund der hohen Werte liegt die relative Standardabweichung bei 9,58%, der Mittelwert der Flächen beträgt 1,047.

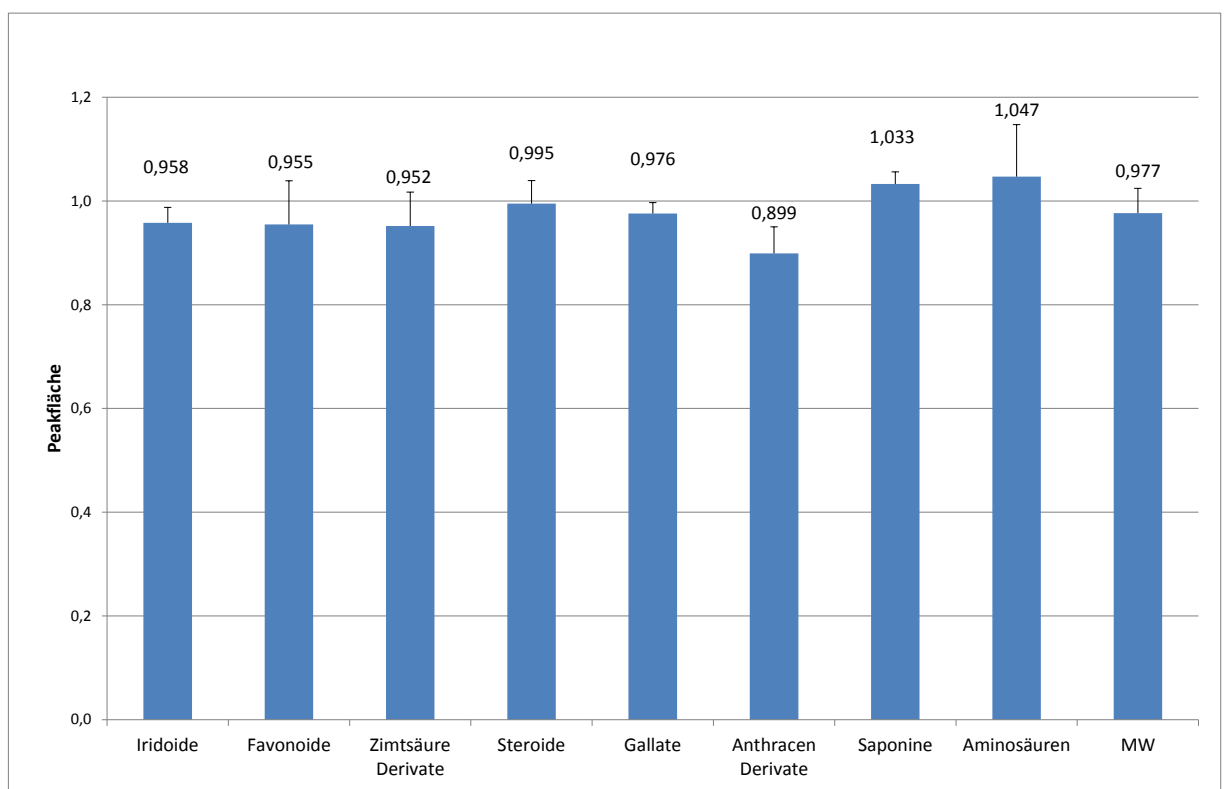


Abbildung 19: Vergleichende Grafik der Peakflächen-Mittelwerte der unterschiedlichen Substanzklassen (Detaillierte Angaben siehe Abbildung 9-18)

Die Abbildung 19 (Seite 37) verdeutlicht gut, dass die Arbeit mit dem Charged Aerosol Detector sehr gute Ergebnisse liefert. Die Universalität des CAD wird durch die fast einheitlichen Peakflächen nahe der 1,0-Marke bestätigt. Die Mittelwerte der semi-flüchtigen Substanzklassen (Cumarine und Alkaloide) wurden in dieser Grafik nicht berücksichtigt, da deren Peakflächen zu stark divergierten.

Die Standardabweichungen aller in Abbildung 19 dargestellten Substanzklassen sind relativ gering. Dies lässt darauf schließen, dass die physikochemischen Eigenschaften der Analyten kaum Einfluss auf den Response des CAD haben dürften. Jedoch spielen bei diesen Resultaten viele Einflussfaktoren eine Rolle. Dennoch ist es nur möglich, nicht-flüchtige Substanzen zu erfassen und zu detektieren. Die nicht flüchtigen Substanzklassen lieferten größtenteils einheitliche Werte, ausgenommen einer geringfügigen Erhöhung bei den Aminosäuren und eher geringen Peakflächen bei den Anthracen-Derivaten.

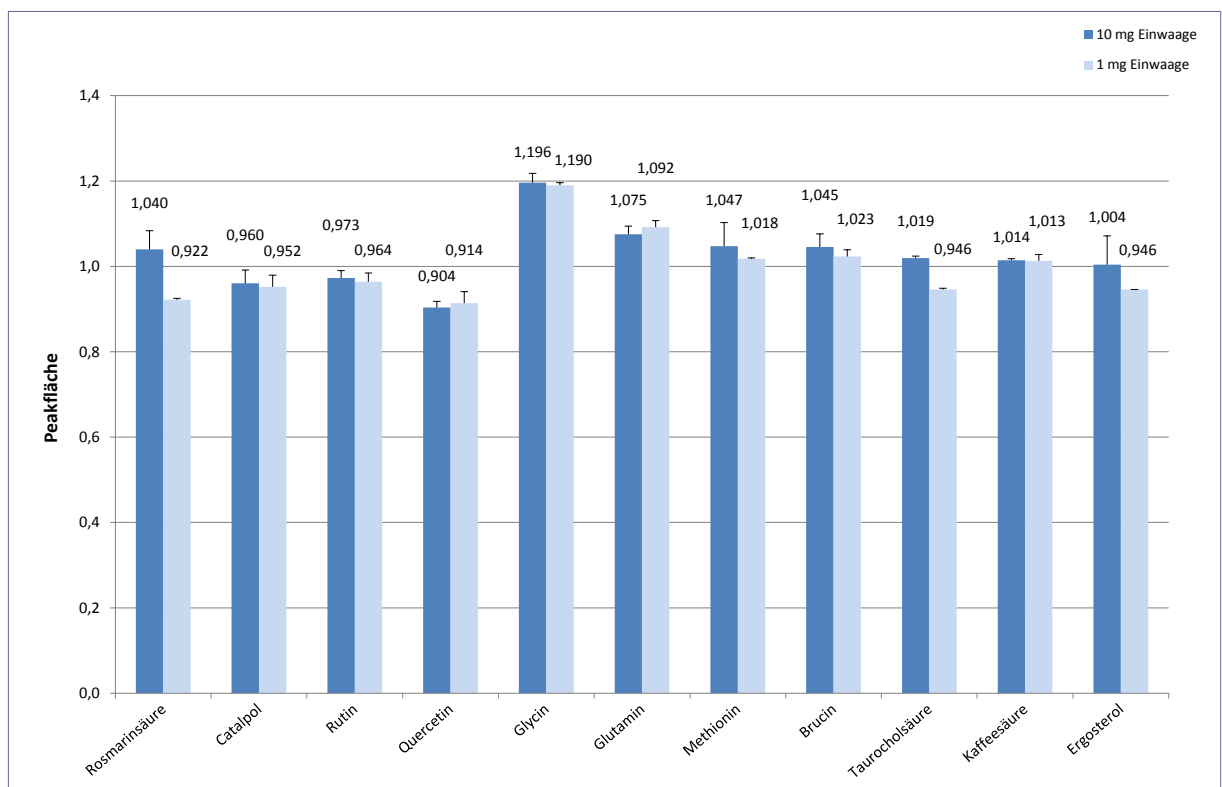


Abbildung 20: Vergleich der in Abbildung 19 dargestellten Substanzklassen bei zwei unterschiedlichen Einwaagen (1 mg und 10 mg)

Um den Einfluss des Wägefehlers auf die Streuung der Werte abzuschätzen, wurde mit 11 Substanzen, die in großen Mengen verfügbar waren, die Aufarbeitung mit einer Einwaage von 10,00 mg wiederholt. Auffallend, wie auch in Abbildung 18 (Seite 34) zu sehen ist, liegen die Resultate der Aminosäuren deutlich über der 1,00 Marke. Die relative Standardabweichung der Peakflächen (Einwaagen 10,00 mg) liegt bei 7,24%, der Mittelwert der Flächen bei 1,025. Wenn man den Wert des vorgetrockneten Quercetins (Abbildung 21, Seite 40) mit einbezieht, erhält man eine relative Standardabweichung von 6,07% und einen berichtigten Mittelwert von 1,035. Vergleicht man nun die Ergebnisse der in Abbildung 20 dargestellten Substanzen, so decken sich die Ergebnisse sehr gut. Die relative Standardabweichung bei 1,00 mg liegt bei einem Wert von 8,28% und der Mittelwert der Peakflächen bei 0,998. Daraus kann geschlossen werden, dass der Wägefehler nur einen relativ geringen Teil der Streuung der Werte ausmacht.

4.1.4 Versuch 4: Einfluss des Wasser/Lösungsmittel-Gehalts der Reinsubstanzen

Einige nicht flüchtige Substanzen, wie z.B. Galangin (Abbildung 10, Seite 30), zeigten eine deutlich geringere Peakfläche. Um die Ursache dafür herauszufinden, wurde Versuch 4 durchgeführt. Die Reinstoffe wurden aufbereitet, um noch gebundene Wasser- und Lösungsmittel-Reste zu entfernen. Quercetin, Sinapinsäure, Kämpferol und Galangin wurden im Trockenschrank bei 105°C 2 h lang getrocknet und anschließend zum Temperaturengleich für 1 h in den Exsikkator gelegt. Die so getrockneten Substanzen wurden genau zu je 10,00 mg abgewogen und in 0,1%iger Ameisensäure / Acetonitril (1:1, v/v) gelöst.

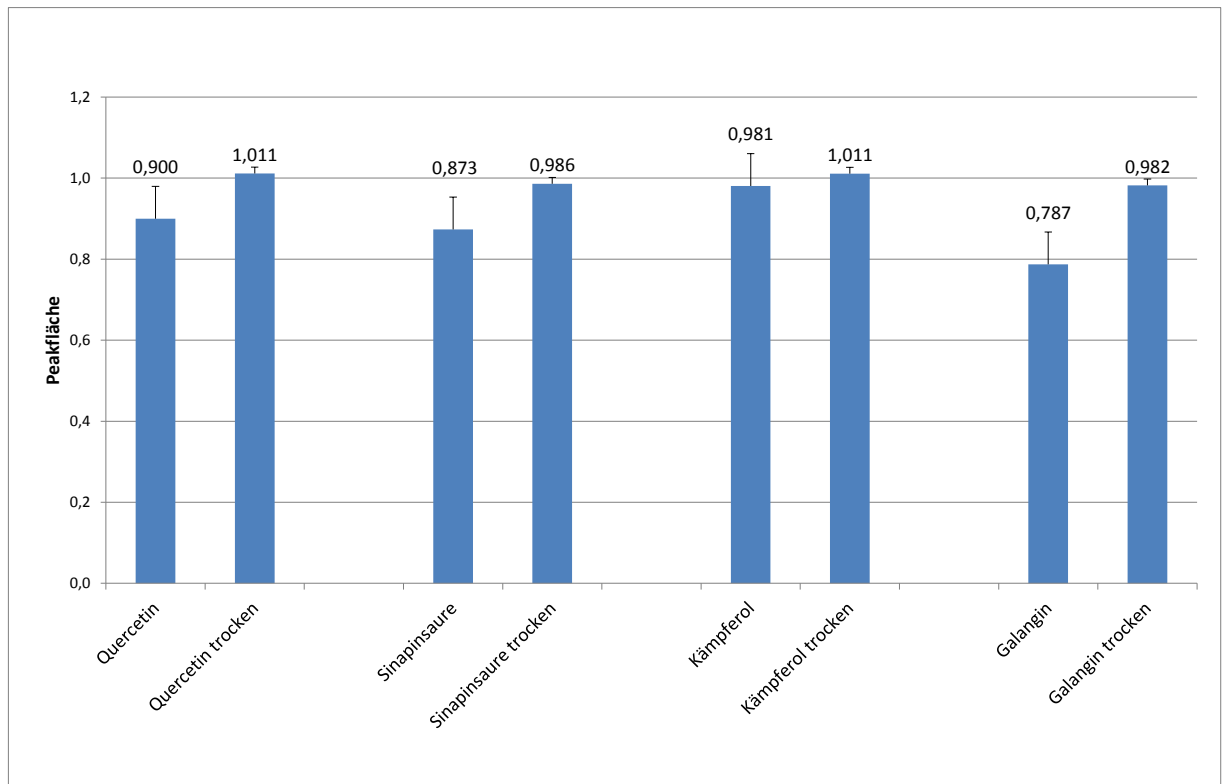


Abbildung 21: Mittels CAD gemessene Peakflächen für ausgewählte Reinsubstanzen vor und nach der Trocknung im Trockenschrank

Die mit der Vortrocknung einhergehende Verbesserung der Ergebnisse ist graphisch in Abbildung 21 (Seite 40) zu sehen. Bei allen Substanzen, insbesondere bei Galangin, wurden wesentlich bessere Werte, die knapp um 1,0 lagen, erhalten. Der Vergleich der relativen Standardabweichungen veranschaulicht dies sehr gut. Substanzen ohne Vorbehandlung ergaben Peakflächen im Mittelwert von 0,885 und eine relative Standardabweichung von 9,01%. Substanzen mit vorheriger zweistündiger Trocknung im Trockenschrank zeigten einen Mittelwert der Flächen von 0,998 und eine relative Standardabweichung von 1,59%. Daher ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass es für weitere Experimente mit dem Charged Aerosol Detector von Vorteil wäre, die Substanzen einer Vorbehandlung zu unterziehen.

Für thermolabile Verbindungen könnte man die Temperatur verringern und die Trocknungszeit verlängern. Es wäre von Interesse, diesen großen Einfluss auch an allen anderen Substanzen auszutesten. Möglicherweise würde es für viele Verbindungen nach der Trocknung deutlich geringere Abweichungen geben. In diesem Fall war dies nicht möglich, da zu wenig Menge der einzelnen Reinsubstanzen vorhanden war.

4.2 Experimente mittels HPLC

4.2.1 Versuch 5: Zusammenhang der Peakfläche mit der Laufmittel-Zusammensetzung

Bei diesem Experiment wurde der Zusammenhang der Peakfläche in Abhängigkeit der sich verändernden Laufmittelkonzentration im Rahmen einer HPLC-Trennung getestet. 17 Substanzen (siehe Tabelle 4, Seite 21) wurden hierfür verwendet. Die Einwaage betrug jeweils ca. 1,00 mg. Die Testanalyten wurden in 2 Mischungen aufgeteilt um eventuelle Peak-Überlappungen im Chromatogramm zu verhindern. Gelöst wurden die Reinstoffe mit 0,1%iger Ameisensäure / Acetonitril (1:1, v/v).

Primäres Ziel dieses Versuches war es, die Veränderung der Peakflächen bei unterschiedlichen Acetonitril-Konzentrationen festzustellen. Dies wurde zum Teil auch schon in Versuch 2: Einfluss der Lösungsmittel-Zusammensetzung ermittelt, allerdings nur mit 3 verschiedenen Verbindungen. Sekundäres Ziel war es, die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen zu ermitteln, um interne Standards bei den folgenden Methodenentwicklungen zu finden. Dazu wurden Mischung 1 und Mischung 2 (siehe Tabelle 4, Seite 21) mittels HPLC analysiert. Die entsprechenden Peakflächen und die dazugehörige Acetonitril-Konzentrationen sind in Abbildung 22, Seite 42 dargestellt.

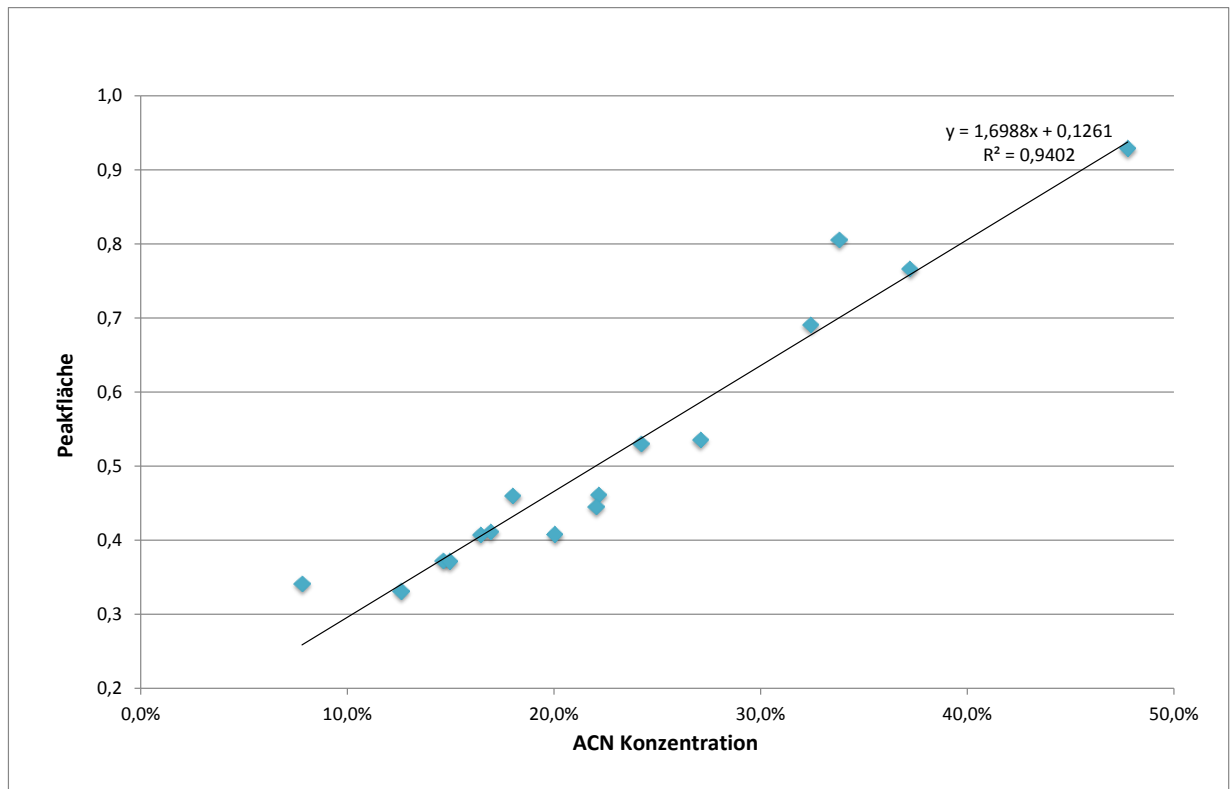


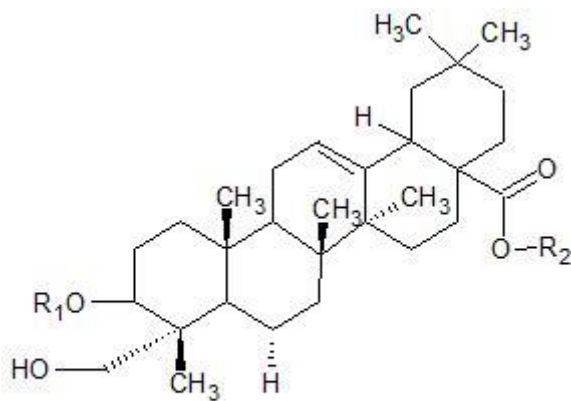
Abbildung 22: Zusammenhang der Peakflächen mit der ACN-Konzentration bei den in 2 Mischungen analysierten Reinsubstanzen (siehe Tabelle 4, Seite 21). Die Peakflächen sind auf die Einwaage von 1,00 mg normiert.

Anhand der Retentionszeiten und des Gradientenverlaufes kann man berechnen bei welcher ACN Konzentration die jeweilige Substanz eluiert wird. Der Verlauf der Geraden ist linear und proportional steigend zu dem Acetonitril-Gehalt.

4.2.2 Quantifizierung von Hederacosid C in Efeublättern

Hedera helix L. gehört der Familie der Araliaceae an. Der Efeu ist eine Kletterpflanze mit immergrünen Blättern, die bis zu 20 m hoch werden kann. Als Arzneidroge werden die 3- bis 5 eckig gelappten Blätter von nichtblühenden Sprossen verwendet.

Anwendung finden die Efeublätter bei Katarrhen der Luftwege, bei der symptomatischen Behandlung chronisch-entzündlicher Bronchialerkrankungen und bei Husten mit übermäßig starker Sekretion von viskösem Schleim (Rahfeld, 2011).



R1= Rha-Ara R2= -Glu-Glu-Rha

Abbildung 23: Struktur von Hederacosid C

Im Europäischen Arzneibuch wird die Gehaltsbestimmung von Hederacosid C, einem Triterpensaponin in den Efeublättern, mittels einer Lösung eines externen Standards unter Verwendung von HPLC-UV/Vis durchgeführt. Die Efeublätter müssen einen Mindestgehalt von 3,0% Hederacosid C, bezogen auf die getrocknete Droge, enthalten (EDQM, 2010).

Aufgrund der Tatsache, dass Hederacosid C kein ausgeprägtes chromophores System besitzt, was einer Detektion mittels UV/Vis Grenzen setzt, wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit die Gehaltsbestimmung mittels Charged Aerosol Detector und 2 internen Standards erarbeitet. Diese beiden Methoden, HPLC – CAD und die etablierte Methode des Arzneibuches, wurden anhand der Ergebnisse verglichen.

Nach intensivem Erproben wurde ein passender Gradientenverlauf ermittelt. Im Vergleich zum Gradienten des EuAB wurde die Elutionszeit verlängert und mit unterschiedlichen ACN-Konzentrationen gearbeitet.

Die schon zuvor vermessenen Substanzen (siehe Tabelle 4, Seite 21) wurden herangezogen, um 2 passende interne Standards, die bei unterschiedlichen Acetonitril-Konzentrationen vor und nach Hederacosid C eluieren, zu finden. Aufgrund der, in Versuch 5 (siehe Abbildung 22, Seite 42), ermittelten Retentionszeiten und der zeitlichen Möglichkeiten der Integration in den Gradienten-Verlauf, wurden Kämpferol und Galanjin als optimale interne Standards ausgewählt (siehe Abbildung 24, Seite 44).

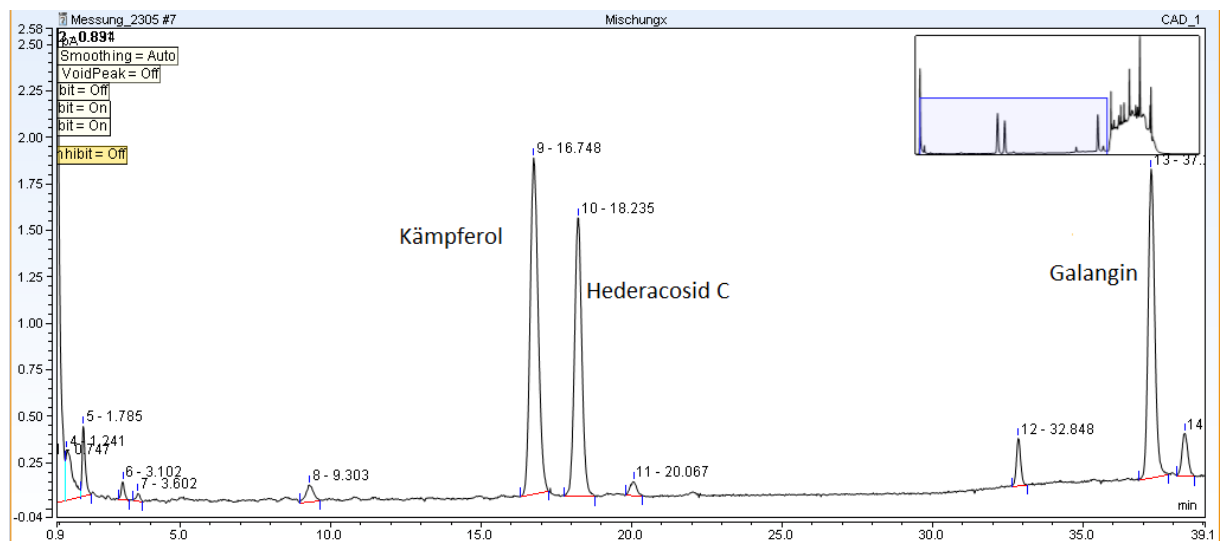


Abbildung 24: HPLC-CAD Chromatogramm des Efeublätter-Extraktes mit den internen Standards Kämpferol und Galangin (Gradientenverlauf siehe Methodenteil 3.3.2, Seite 22)

In diesem Fall ist es nicht zwingend notwendig den zweiten Standard (Galangin) mit einzubeziehen, da die ACN-Konzentration bei der Kämpferol eluiert (Retentionszeit 17,02 min, ACN 26,8%) ähnlich der ACN-Konzentration von Herderacosid C (Retentionszeit 18,29 min, ACN 27,2%) ist. Galangin würde eine Rolle spielen, wenn noch weitere Bestandteile aus dem Auszug zu quantifizieren wären, die bei einer höheren ACN-Konzentration eluieren.

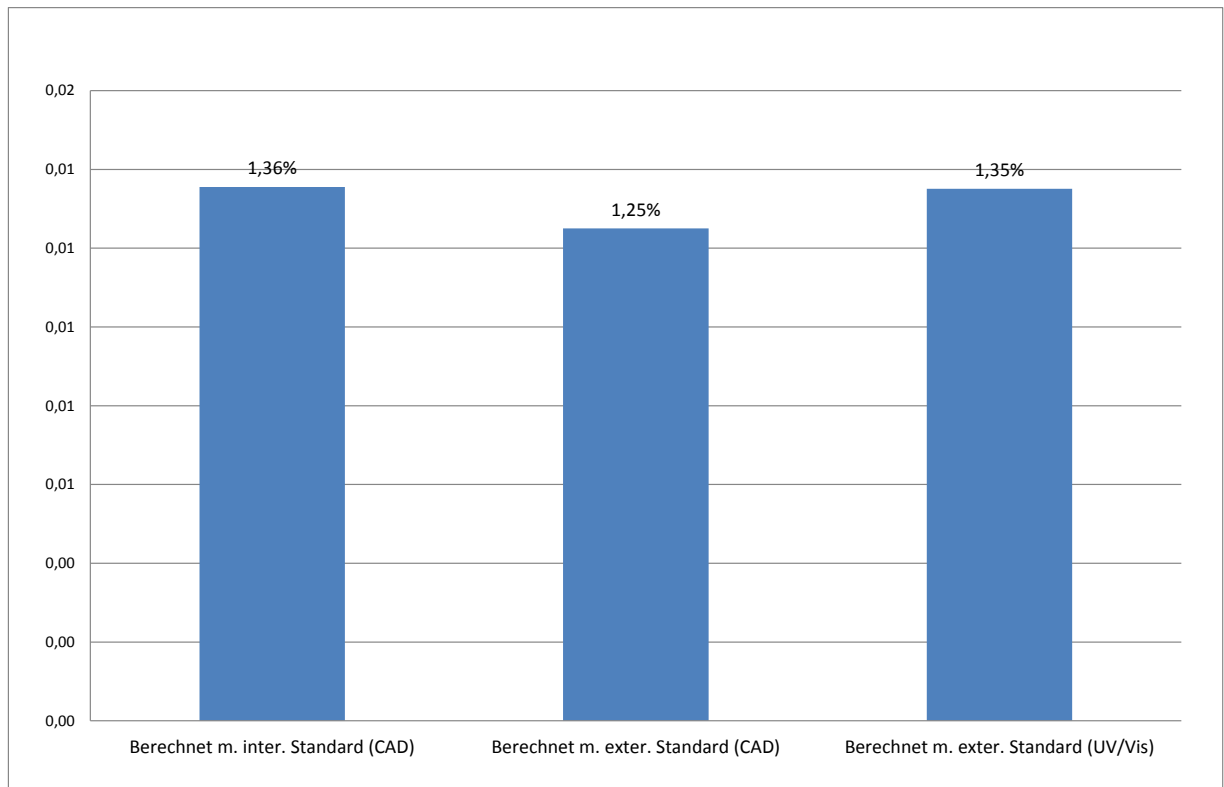


Abbildung 25: Vergleich der Ergebnisse von Hederacosid C, berechnet mit den internen Standards Kämpferol und Galangin und zusätzlich mit dem externen Standard anhand der UV/Vis und CAD Messung

Abbildung 25, (Seite 45) verdeutlicht, dass unabhängig von der Methode (Interner Standard gemessen mit CAD oder UV/Vis oder Externer Standard CAD) die Konzentration von Hederacosid C, fast idente Ergebnisse liefert.

4.2.3 Quantifizierung der Peptide in den Holunderfrüchten

Stammpflanze: *Sambucus nigra* L. (Schwarzer Holunder), gehört zur Familie der Adoxaceae. Der schwarze Holunder ist in ganz Europa, West- und Mittelasien heimisch. Die Steinbeeren werden meist aus Wildbeständen gesammelt.

Die Holunderbeeren ganz und als Saft werden zur Prophylaxe und Behandlung von Erkältungskrankheiten eingenommen. Selten findet die Droge noch Anwendung als Laxans und Diuretikum. Die Früchte enthalten verschiedenste Flavonoidglykoside, Anthocyanglykoside, Vitamin C und B sowie ätherisches Öl (Wichtl, 2008).

Ziel dieses Experimentes war es, den Gehalt der Peptide in den Holunderfrüchten zu bestimmen. Die Früchte des Schwarzen Holunders wurden, wie in 3.3.3 beschrieben, mittels Ultraschallbad und probeweise auch mittels Mazeration extrahiert. Um das optimale Menstruum zu finden, wurden 3 unterschiedliche Extraktionsmittel erprobt. Drei nacheinander folgende Extraktionen erwiesen sich als optimal. Bei den Vorversuchen wurde eine anschließende vierte Extraktion vorgenommen. Dabei stellte sich heraus, dass die Probe nach 3 Extraktionen erschöpfend extrahiert war.

- 0,1%ige wässrige Ameisensäure
- 2%ige wässrige Ameisensäure
- Acetonitril / 0,1%ige wässrige Ameisensäure (1:1, v/v)

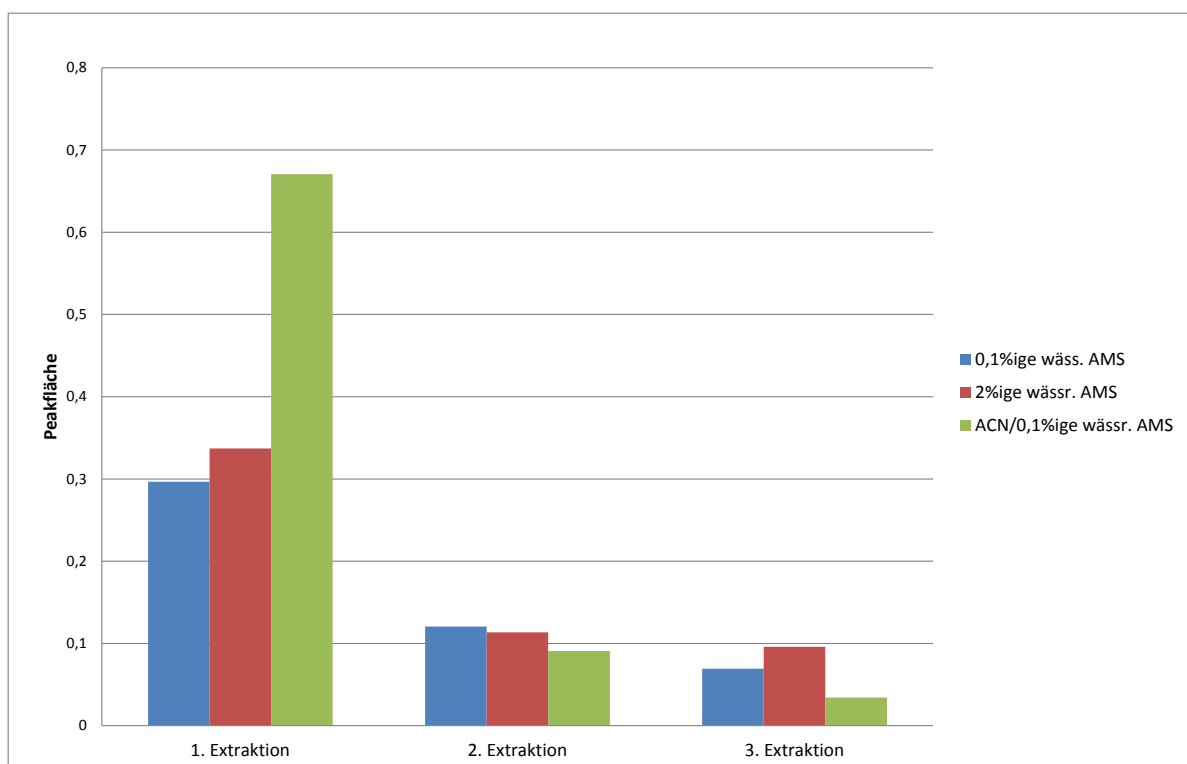


Abbildung 26: Variation von 3 unterschiedlichen Extraktionsmitteln zur Austestung des optimalen Auszugsmittels

In der Abbildung 26 (Seite 46) sind die Unterschiede der 3 Lösungsmittel zu sehen. Acetonitril / 0,1%ige wässrige Ameisensäure (1:1, v/v) hat im ersten Durchgang der Ultraschallbad-Extraktion mehr als die doppelte Ausbeute erzielt. Auffallend ist, dass mit diesem Gemisch nach dem zweiten Auszug schon fast erschöpfend extrahiert wurde. Diese

Mischung an Lösungsmitteln wurde auch für die Aufarbeitung mittels Mazeration verwendet. Die Ergebnisse waren fast ident mit der Ultraschallextraktion. Da man mit letzterer Extraktionsmethode viel weniger Zeit benötigt, wurde diese Variante gewählt. Da mit Acetonitril / 0,1%iger wässriger Ameisensäure (1:1, v/v) fast die doppelte Menge an Peptiden extrahiert werden konnte, wurde dieses Menstruum verwendet. In Summe ergaben die Auszüge der wässrigen Ameisensäuren die gleiche Ausbeute, wobei die 2%ige Ameisensäure ein wenig höhere Werte erzielte.

Im nächsten Schritt war es wesentlich, einen passenden Gradienten-Verlauf für die HPLC-Analyse zu finden. Die internen Standards sollten keine Peaks des Holunder Auszuges überlagern.

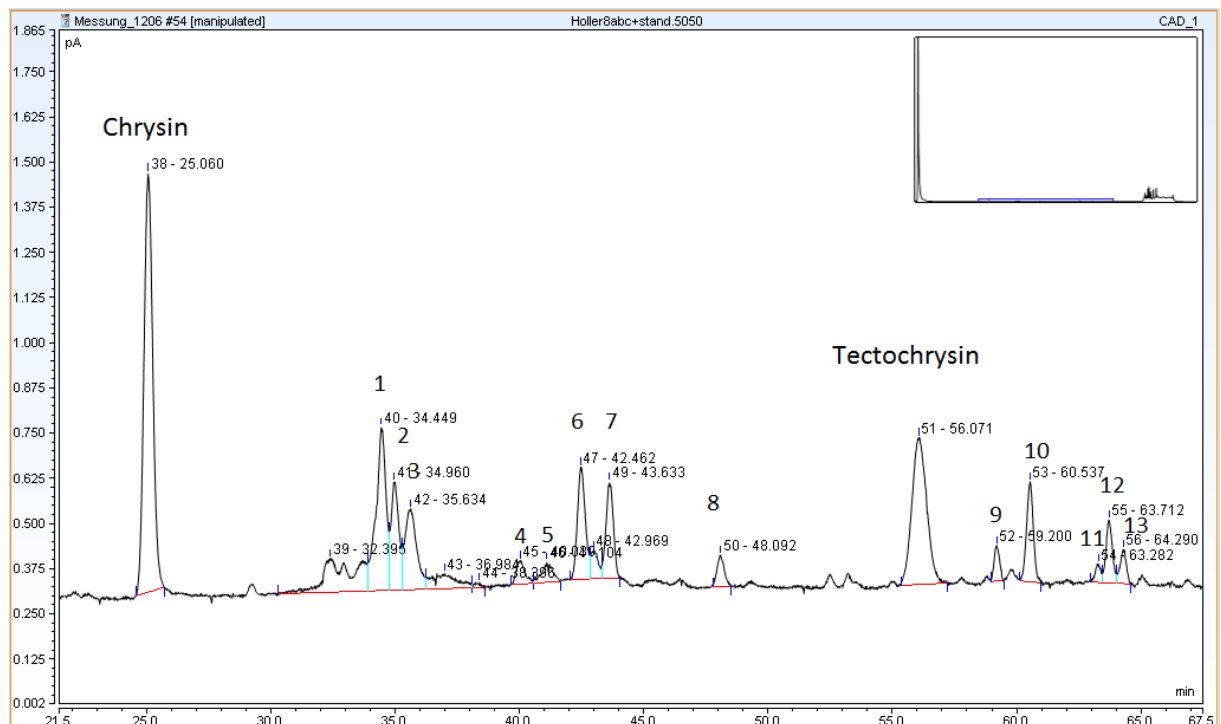


Abbildung 27: HPLC-CAD Chromatogramm der Peptide in Holunderfrüchten mit den internen Standards Chrysin und Tectochrysin (Gradientenverlauf siehe Methodenteil 3.3.3, Seite 24)

Eine Auswahl an unterschiedlichen Standards stand zur Verfügung. Da der erste interne Standard vor den zu quantifizierenden Peptiden eluieren sollte, kamen nur Chrysin, Acacetin und Kämpferol in Frage, da sie auch in guter Qualität und Reinheit zur Verfö-

gung standen. Das Sortiment für einen internen Standard, der zu einer späteren Zeit eluiert, war sehr gering. Zur Bestimmung konnte nur Tectochrysin angewendet werden. Aufgrund der passenden Retentionszeit ohne Peaküberlagerungen, wurden Chrysin und Tectochrysin ausgewählt. Aus der Abbildung 28 (Seite 48) ist ersichtlich, dass die Peakfläche des Chrysin deutlich höher ist als die des Tectochrysin. Aus den vorigen Versuchen (Abbildung 8, Seite 29) kann man aber schließen, dass mit steigender ACN-Konzentration auch die Peakfläche steigen muss. Da es bis zu diesem Zeitpunkt keine Alternative für das Tectochrysin gab, wurde nur das Chrysin gegen das Acacetin ausgetauscht. Daher wurde der Versuch mittels der Standards Acacetin und Tectochrysin wiederholt.

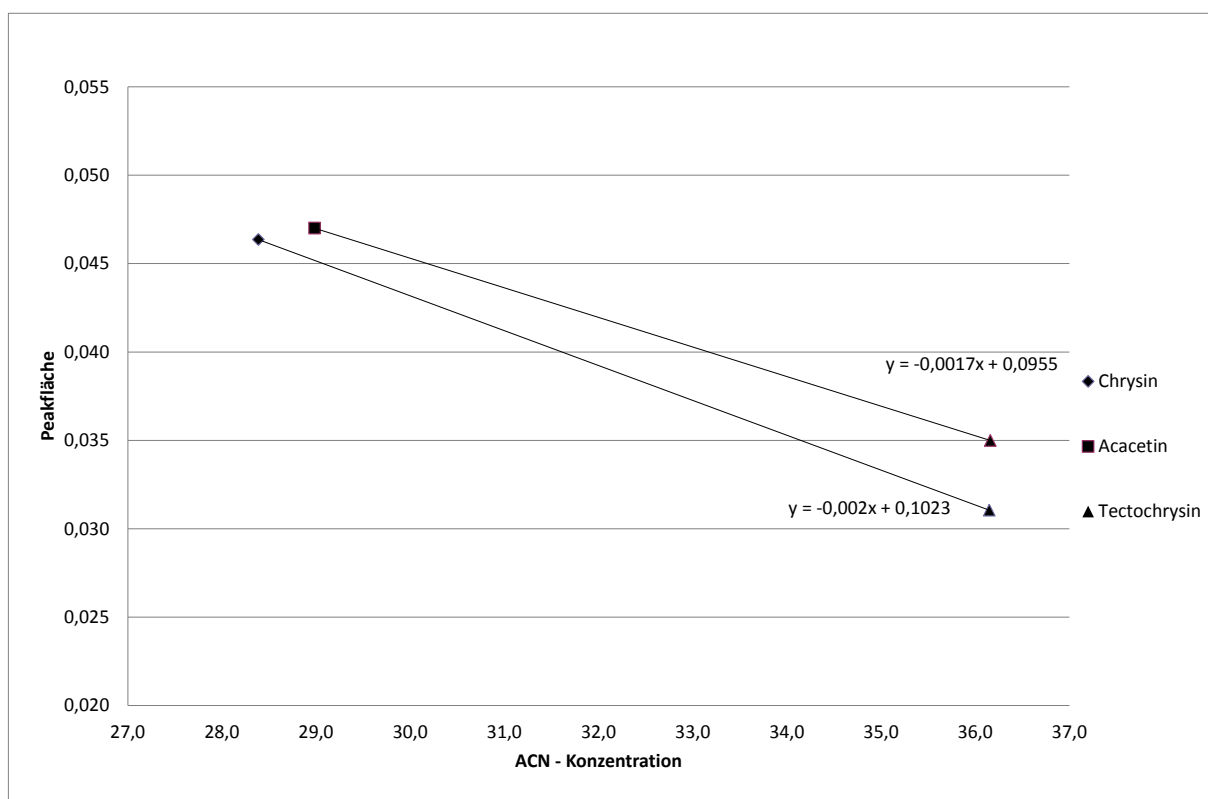


Abbildung 28: Vergleich der Peakflächen von Chrysin und Tectochrysin und der Peakflächen von Acacetin und Tectochrysin (HPLC-Parameter siehe Methodenteil 3.3.3, Seite 24)

Der Austausch der beiden Standards hat gezeigt, dass die Peakflächen von Acacetin und Chrysin fast ident sind. Für die Quantifizierung bedeutete dies, dass ein neuer Standard,

im Bereich der 36% ACN-Konzentration, anstelle der Tectochrysin gefunden werden muss. Besser wäre ein Standard, der nach der zweiten Peakgruppe (Peaks 9-13, siehe Abbildung 27, Seite 47) bei ca. 39% ACN-Konzentration eluiert.

Warum Tectochrysin sich nicht so verhält, wie der Großteil der anderen Substanzen, ist bis zu diesem Zeitpunkt noch unklar.

Bei der Ursachenforschung war der einzige Anhaltspunkt, dass sich die anderen Standards bereits in 1 mL Dimethylsulfoxid lösten und für Tectochrysin 2 mL benötigt wurden. Die Endkonzentration der Standards war hingegen dieselbe. Für die Detektion sollte dies keinen Unterschied ergeben. Im Nachhinein lässt sich daraus vermuten, dass Tectochrysin eventuell doch nicht vollständig gelöst wurde oder im Laufe der Analyse wieder ausgefallen ist. Auszuschließen ist das Problem der Lösungsmittel- oder Wasserrückstände (wie in Abbildung 21, Seite 40 zu sehen), da alle Standards bereits vor der Einwaage im Trockenschrank vorgetrocknet wurden.

Für die Gehaltsberechnung der Peptide in den Holunderfrüchten konnten nun mit dieser Erkenntnis die Standards Chrysin oder Acacetin verwendet werden. Wenn man bedenkt, dass die Peakflächen proportional zum Anstieg der ACN Konzentration steigen, sind die Ergebnisse für Peptide, die erst zu späteren Retentionszeiten eluieren, möglicherweise nicht exakt. Die Ergebnisse beinhalten durchaus einen erheblichen Fehler. Anhand der Geradengleichung von Glutamin (siehe Abbildung 8, Seite 29) konnte berechnet werden, dass der Anstieg von 27% auf 36% ACN eine Peakflächen-Erhöhung von 33,9 % ergibt.

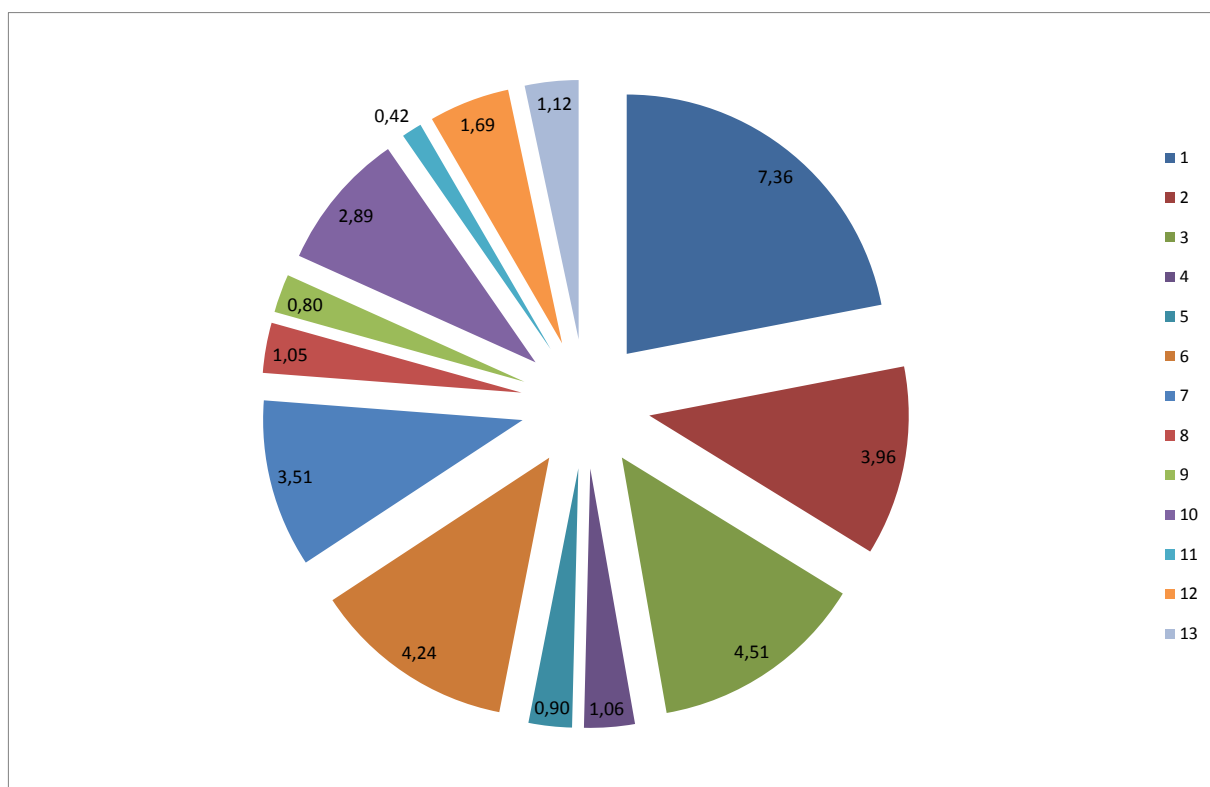


Abbildung 29: Quantifizierung der Peptide 1-13 (Zuordnung der Peptide siehe Abbildung 27, Seite 47) in den Holunderfrüchten, in mg/g Droge (Berechnet anhand des internen Standards Chrysin, HPLC-Parameter und Aufarbeitung siehe Methodenentwicklung 3.3.3, Seite 24)

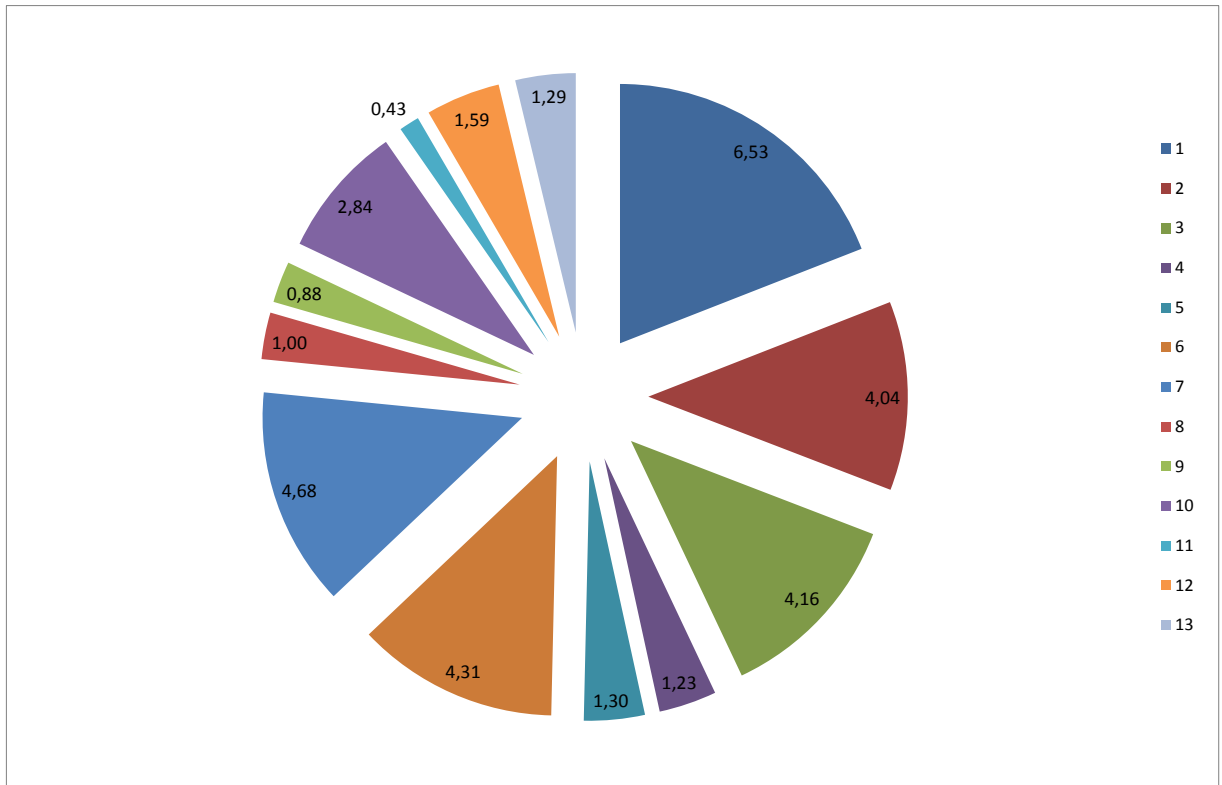


Abbildung 30: Quantifizierung der Peptide 1-13 (Zuordnung der Peptide siehe Abbildung 27, Seite 47) in den Holunderfrüchten, in mg/g Droge (Berechnet anhand des internen Standards Acacetin, HPLC-Parameter und Aufarbeitung siehe Methodenentwicklung 3.3.3, Seite 24)

In Abbildung 29 (Seite 50) und in Abbildung 30 (Seite 51) kann man den Gehalt der einzelnen Peptide in den Holunderfrüchten, in mg/g Droge, ablesen. Die Zuordnung welche Nummer zu welchem Peak gehört, findet man in der Abbildung 27, Seite 47. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

Die Gesamtkonzentration an Peptiden in den Holunderfrüchten entspricht ca. 32,7 mg/g Droge.

Tabelle 5: Quantifizierung der Peptide 1-13 (Zuordnung der Peptide siehe Abbildung 27, Seite 47). Die Ergebnisse sind Mittelwerte der Peakflächen aus 3 Messungen (Berechnet mittels internem Standard Acacetin, siehe Methodenentwicklung 3.3.3, Seite 24). Die Konzentration von Acacetin in der Verdünnung mit dem Extrakt ergibt 0,039 mg/mL.

Peak	Peakfläche	ACN-Gehalt	Konzentration mg/g Droge
Acacetin	0,368	29,0	
1	0,185	31,0	6,53
2	0,115	31,1	4,04
3	0,118	31,2	4,16
4	0,035	32,2	1,23
5	0,037	32,5	1,30
6	0,122	32,9	4,31
7	0,133	33,1	4,68
8	0,028	34,3	1,00
9	0,025	37,1	0,88
10	0,081	37,4	2,84
11	0,012	38,1	0,43
12	0,045	38,2	1,59
13	0,037	38,3	1,29

Tabelle 6: Quantifizierung der Peptide 1-13 (Zuordnung der Peptide siehe Abbildung 27, Seite 47). Die Ergebnisse sind Mittelwerte der Peakflächen aus 3 Messungen (Berechnet mittels internem Standard Chrysin, siehe Methodenentwicklung 3.3.3, Seite 24). Die Konzentration von Chrysin in der Verdünnung mit dem Extrakt ergibt 0,053 mg/mL.

Peak	Peakfläche	ACN-Gehalt	Konzentration mg/g Droge
Chrysin	0,492	28,4	
1	0,206	30,8	7,36

Ergebnisse

2	0,111	30,9	3,96
3	0,126	31,1	4,51
4	0,030	32,2	1,06
5	0,025	32,5	0,90
6	0,119	32,8	4,24
7	0,098	33,1	3,51
8	0,029	34,2	1,05
9	0,022	36,1	0,80
10	0,081	37,0	2,89
11	0,012	37,2	0,42
12	0,047	38,0	1,69
13	0,031	38,1	1,12

Man sieht in Abbildung 29 (Seite 50) und in Abbildung 30 (Seite 51), dass die Ergebnisse berechnet anhand der beiden unterschiedlichen Standards sehr gut korrelieren. Es sollte unbedingt noch ein Ersatz für den internen Standard Tectochrysin gefunden werden, damit die Resultate bzgl. des Acetonitril Einflusses berichtigt werden können.

5 Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war es, zu prüfen, ob eine universelle Quantifizierung von unterschiedlichen Substanzklassen mittels Charged Aerosol Detector (CAD) möglich ist und ob man bei analytisch schwierigen Arzneipflanzen den CAD als Alternative verwenden könnte. Daher wurden zu Beginn unterschiedliche Reinsubstanzen quantifiziert. Die Ergebnisse der verschiedenen Substanzklassen korrelierten sehr gut untereinander. Ausnahmen gab es bei flüchtigen bzw. semi-flüchtigen Substanzen, sowie bei den Aminosäuren. Um ein statistisch deutlicheres Bild zu bekommen, wäre es interessant den bisherigen Probenumfang zu erweitern.

Die vom Hersteller angegebenen Ergebnisse (siehe Abbildung 4, Seite 7), weisen eine relative Standardabweichung der Peakflächen von 10,7% auf. Bezugnehmend darauf, sind die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigt worden. Die relative Standardabweichung der nichtflüchtigen Substanzklassen lag bei 5% (siehe Abbildung 19, Seite 37).

Der Versuch zum Einfluss des Wasser- und Lösungsmittel-Restgehalts der Substanzen bestätigte, wie wichtig die Reinheit der internen Standards für die Richtigkeit und Genauigkeit der Ergebnisse ist. Durch die passende Aufarbeitung, wie das Vortrocknen, wurden deutlich bessere Resultate erzielt. Um bestmögliche Werte zu bekommen, sollte man sich überlegen CRM (Certified Reference Material) Standards zu verwenden. Bei dem Großteil der angewendeten Substanzen war die Reinheit, bezogen auf den Gehalt an Wasser bzw. Lösungsmittel, für exakte Quantifizierungen nicht ausreichend. Das Problem der meisten untersuchten Substanzen ist, dass die Reinheit als „HPLC Grade“ angegeben ist - dies bedeutet die Substanz wurde mittels HPLC - UV/VIS überprüft. Dadurch hat das Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Reinheit. Die Lösungsmittel werden evtl. selbst mit qNMR nicht erfasst (Johnson et al., 2013).

Die Experimente zum Einfluss der Lösungsmittel-Zusammensetzung zeigten, dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen Lösungsmittel-Zusammensetzung und Peakflächen gegeben ist. Ein- und dieselbe Reinsubstanz in der gleichen Menge ergibt mit einer Konzentrationsänderung des organischen Lösungsmittels von 10% auf 80% ein 4-fach erhöhtes Detektionssignal. Dies führt zu Problemen bei Quantifizierungen, die ein HPLC Tren-

nungsverfahren mit Gradientenelution benötigen. Aus diesem Grund müssen Standards verwendet werden, die bei unterschiedlichen Laufmittelkonzentrationen eluieren, damit die Menge des gesuchten Stoffes über die Peakfläche auch präzise berechnet werden kann.

Anschließend an die Vorversuche mit den Reinsubstanzen wurde anhand von 2 praktischen Beispielen, Holunderfrüchte und Efeublätter, der CAD angewendet. Die Bestimmung von Hederacosid C in den Efeublättern und von bioaktiven Peptiden in den Holunderfrüchten erfolgte durch die Vermessung der Extrakte.

Ziel der Bearbeitung der Efeublätter war es, die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung des Inhaltsstoffes Hederacosid C, erhalten mit dem internen Standard (CAD und UV/Vis) und dem externen Standard (CAD), zu vergleichen. Da die ermittelten Werte korrelierten, stellt die Quantifizierung mittels CAD und internen Standards eine mögliche Alternative zur Arzneibuch-Methode dar.

Bei der Quantifizierung der Peptide in den Früchten des Schwarzen Holunders wurden Acacetin, Chrysin und Tectochrysin als interne Standards verwendet. Der Standard Tectochrysin konnte nicht für die Berechnung miteinbezogen werden. Hier sollte eine andere Substanz als Alternative gefunden werden. Dennoch, kann man anhand der erzielten Ergebnisse (berechnet anhand der internen Standards Acacetin und Chrysin) deutliche Rückschlüsse auf den Gehalt der Peptide ziehen. Dafür lagen bis jetzt keine Daten vor. Die beiden Aufarbeitungen mit den unterschiedlichen Standards lieferten analoge Resultate.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Aufstockung der Substanzen-Bibliothek die Vermessung weiterer Reinstoffe ermöglichen und dadurch ein statistisch präziseres Bild liefern würde. Die Resultate haben gezeigt, dass die Quantifizierung mittels CAD eine gute Alternative zu den bisherigen Methoden darstellt. Der CAD bietet zudem eine geeignete Möglichkeit, um Analyten zu detektieren, die nicht mit HPLC – UV/Vis erfasst werden können.

6 Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit befasst sich mit der Quantifizierung von unterschiedlichen Substanzklassen mittels Charged Aerosol Detector (CAD). Mit den etablierten Quantifizierungsmethoden, wie z.B. UV-Vis und MS, werden nur Stoffe, die bestimmte Eigenschaften vorweisen, erfasst. Substanzen die diese Merkmale nicht beinhalten, können daher nur ungenügend bzw. nur mit erheblichem Mehraufwand und mit authentischen Standards detektiert werden. Die Herstellerfirma gibt an, dass genau diese Probleme mit dem Charged Aerosol Detector ausgemerzt werden können und eine universelle Quantifizierung jeglicher Substanzklassen damit leicht durchführbar ist.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden 55 Reinsubstanzen unterschiedlichster Strukturen bearbeitet. Diese Substanzen wurden, um die Einflüsse des Restwasser- bzw. Lösungsmittelgehalts ausschließen zu können, teilweise vorgetrocknet.

Mittels einer Verdünnungsreihe wurde die Linearität nachgewiesen, sowie auch eine Kalibrationsgerade ermittelt. Danach wurden die verschiedensten Substanzen mit dem CAD detektiert, um die vom Hersteller angepriesene Universalität zu überprüfen.

Der Großteil der Ergebnisse belegte die Universalität des Gerätes. Dennoch waren einige Substanzen dabei, die mit dem Gesamtbild nicht korrelierten. Es wurde festgestellt, dass der Lösungsmittel- und Wasserrückstand in den Substanzen, in einzelnen Fällen, zu erheblichen Ungenauigkeiten führt und eine Vortrocknung der thermostabilen Substanzen eine entscheidende Verbesserung der Resultate mit sich bringt.

Aus den Efeublättern und den Holunderfrüchten wurden Auszüge hergestellt, um die spezifischen Inhaltsstoffe mengenmäßig zu erfassen. Eine Kombination von Gradient und internen Standards wurde entwickelt, um eine Quantifizierung vornehmen zu können.

Bei der Quantifizierung von Hederacosid C aus den Efeublättern wurde ermittelt, ob vergleichbare Werte, mit der etablierten Methode aus dem Arzneibuch und der CAD Methode mittels internen Standards, erzielt werden können. Dabei wurde belegt, dass die Anwendung beider Detektoren (UV/Vis oder CAD) zu ähnlichen Ergebnissen führt.

Abschließend wurden die Peptide aus den Holunderfrüchten quantifiziert. Die internen Standards Acacetin und Chrysin lieferten analoge Ergebnisse. Die Resultate lieferten ein gutes Bild über den Gehalt an Peptiden in den Holunderfrüchten. Die Früchte beinhalten ca. 32,7 mg/g Peptide.

7 Abstract

This thesis deals with the quantification of different compound classes by using the Charged Aerosol Detector (CAD). Only substances with certain characteristics can be detected with established methods such as UV/Vis and MS. Compounds that do not possess such features cannot be detected properly or only with a very high effort. The manufacturing company indicates that these problems can be solved with the new charged aerosol detector.

Fifty-five pure substances with very different structures and physicochemical properties were processed for this thesis. Some of these compounds were dried to eliminate influences of the solvent or residual water. The linearity of the calibration was, as well, tested with a dilution series. Furthermore, the variety of substances was detected by the CAD in order to verify the universality advertised by the manufacturer. The majority of the results demonstrated the universality of the device. Nevertheless, some results of the substances didn't correlate with the overall picture. It was found that the residual solvent and water in the test compounds resulted in a significant inaccuracy. Drying the thermostables lead to a pivotal improvement.

Ivy leaf and elderberry extracts were prepared to quantify specific components. A combination of gradient elution and internal standards were developed to make the quantification possible. The experiment with Ivy leaves was performed to evaluate if the new CAD method, with its internal standards, is comparable to the established method in the European Pharmacopoeia. The results prove that, independent of which detector (UV / Vis or CAD) is used, similar results were obtained.

Finally, the peptides from elderberry were quantified. The internal standards, Acacetin and Chrysin, delivered similar results. Although the third standard Tectochrysin could not be used for the calculation, the results gave an adequate overview of the amounts of peptides in elderberries. The fruits contain approximately 32.7 mg/g peptides.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer HPLC Anlage	5
Abbildung 2: Die in dieser Arbeit verwendete HPLC-Anlage Dionex Ulitmate 3000 RSLC	5
Abbildung 3: Elektromagnetisches Spektrum	6
Abbildung 4: Messung unterschiedlicher Substanzklassen durch den Hersteller	7
Abbildung 5: Aufbau eines Charged Aerosol Detector	8
Abbildung 6: Vergleich Charged Aerosol Detektor mit UV/Vis Detektor und Massenspektrometer	10
Abbildung 7: Response des Charged Aerosol Detectors beim Vermessen einer Verdünnungsreihe (Konzentrationsbereich von 0,2 µg/mL bis 100 µg/mL) von Esculin Hydrat	27
Abbildung 8: Einfluss der Lösungsmittel-Zusammensetzung auf den CAD-Response. Verdünnung 0,1 mg/mL mit abweichender ACN-Konzentration 10-80%	29
Abbildung 9: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Iridoide.....	30
Abbildung 10: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Flavonoide	30
Abbildung 11: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Zimtsäure-Derivate.....	31
Abbildung 12: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Cumarine	31
Abbildung 13: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Steroide	32
Abbildung 14: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Gerbstoffe	32
Abbildung 15: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Alkaloide	33
Abbildung 16: Mittels CAD detektierte Peakflächen der Saponine	33
Abbildung 17: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Anthracen-Derivate	34
Abbildung 18: Mittels CAD ermittelte Peakflächen der Aminosäuren	34
Abbildung 19: Vergleichende Grafik der Peakflächen-Mittelwerte der unterschiedlichen Substanzklassen (Detaillierte Angaben siehe Abbildung 9-18)	37
Abbildung 20: Vergleich der in Abbildung 19 dargestellten Substanzklassen bei zwei unterschiedlichen Einwaagen (1 mg und 10 mg)	38
Abbildung 21: Mittels CAD gemessene Peakflächen für ausgewählte Reinsubstanzen vor und nach der Trocknung im Trockenschrank.....	40
Abbildung 22: Zusammenhang der Peakflächen mit der ACN-Konzentration bei den in 2 Mischungen analysierten Reinsubstanzen (siehe Tabelle 4, Seite 21). Die Peakflächen sind auf die Einwaage von 1,00 mg normiert.	42

Abbildung 23: Struktur von Hederacosid C	43
Abbildung 24: HPLC-CAD Chromatogramm des Efeublätter-Extraktes mit den internen Standards Kämpferol und Galangin (Gradientenverlauf siehe Methodenteil 3.3.2, Seite 22)	44
Abbildung 25: Vergleich der Ergebnisse von Hederacosid C, berechnet mit den internen Standards Kämpferol und Galangin und zusätzlich mit dem externen Standard anhand der UV/Vis und CAD Messung	45
Abbildung 26: Variation von 3 unterschiedlichen Extraktionsmitteln zur Austestung des optimalen Auszugsmittels	46
Abbildung 27: HPLC-CAD Chromatogramm der Peptide in Holunderfrüchten mit den internen Standards Chrysin und Tectochrysin (Gradientenverlauf siehe Methodenteil 3.3.3, Seite 24)	47
Abbildung 28: Vergleich der Peakflächen von Chrysin und Tectochrysin und der Peakflächen von Acacetin und Tectochrysin (HPLC-Parameter siehe Methodenteil 3.3.3, Seite 24)	48
Abbildung 29: Quantifizierung der Peptide 1-13 (Zuordnung der Peptide siehe Abbildung 27, Seite 46) in den Holunderfrüchten, in mg/g Droge (Berechnet anhand des internen Standards Chrysin, HPLC-Parameter und Aufarbeitung siehe Methodenentwicklung 3.3.3, Seite 24)	50
Abbildung 30: Quantifizierung der Peptide 1-13 (Zuordnung der Peptide siehe Abbildung 27, Seite 46) in den Holunderfrüchten, in mg/g Droge (Berechnet anhand des internen Standards Acacetin, HPLC-Parameter und Aufarbeitung siehe Methodenentwicklung 3.3.3, Seite 24)	51

9 Literaturverzeichnis

Adam, K., Becker, H., 2000. *Analytik biogener Arzneistoffe*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Almeling, S., Ilko, D., Holzgrabe, U., 2012. *Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 69: 50-63.

Bühning, U., 2011. *Praxis-Lehrbuch der modernen Heilpflanzenkunde*. Stuttgart: Karl F. Haug Verlag.

EDQM, 2010, Europäisches Arzneibuch ed. 8.0, Monographie: Efeublätter.

Gorecki, T., Lynen, F., Szucs, R., Sandra, P., 2006. *Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection*. Analytical Chemistry 78: 3186–3192.

Hellmayr, J., 2012. *Isolierung, Charakterisierung und Analytik von cysteinreichen Peptiden aus Sambucus nigra L.*. Universität Wien: Diplomarbeit.

Hesse, M., 2005. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Hooijschuur, E.W.J., Kientz, C., Brinkman, Th., 2000. *Potential of Flame Ionization Detection Coupled On-Line with Microcolumn Liquid Chromatography Using Aqueous Eluents and an Eluent-Jet Interface*. Journal of High Resolution Chromatography 23: 309-316.

Jilg, A., 2014. *Massenspektrometrische Strukturaufklärung cysteinreicher Peptide aus der Beere von Sambucus nigra L.*. Universität Wien: Diplomarbeit.

Johnson, D., Rettinger, M., Tarbox, T., Marek, B., Pogue, S., Dilek, I., Sreenivasan, U., 2013. *Development challenges in the preparation of solution-based phytochemical and vitamin certified reference materials*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 405: 4345–4352.

Löwig, C., 2011. *Allgemeine organische Chemie*. Charleston: Nabu Press.

Otto, M., 2000. *Analytische Chemie 2*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.

Rahfeld, B., 2011. *Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen*. Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag.

Semper, B., 2012. *Phytochemisches Screening auf Pflanzenpeptide in ausgewählten Drogen*. Universität Wien: Diplomarbeit.

Sinclair, I., Gallagher, R., 2008. *Charged Aerosol Detection: Factors for consideration in its use as a generic quantitative detector*. Chromatography Today 1: 5-9.

Thermo Scientific. http://www.dionex.com/en-us/webdocs/88701-Bro-Corona-ultraRS-BR70193_E.pdf. abgerufen 2014.

Vehovec, T., Obreza, A., 2010. *Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector*. Journal of Chromatography A 1217: 1549-1556.

Wichtl, M., 2008. *Teedrogen und Phytopharmaka*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Wipe, P., Werner, S., Twining, L.A., Kendall, C., 2007. *HPLC determinations of enantiomeric ratios*. Chirality 19: 5-9.

10 CURRICULUM VITAE

Lisa Steiner
Seestraße 5a
9583 Faak am See
0676/9544042



Geb: 24.04.1986, Villach
Familienstand: ledig

Ausbildung: 1992 – 1996 Volksschule 2 in Villach
1996 – 2000 Perau Gymnasium Villach
2000 – 2006 HAK Villach, Abschluss mit Matura
ab 2006 Studium der Pharmazie
2012 – 2014 Ausbildung Chinesische Diagnostik und Arzneitherapie
SS2013 praktische Arbeiten zur vorliegenden Diplomarbeit

Berufstätigkeit :

Ab Sommer 2001	Mithilfe in der Frühstückspension meiner Mutter am Faaker See
Seit April 2010	Angestellt bei Pension Erna
Aug. 2010	Angestellte Elisabeth Apotheke
Aug. 2011	Angestellte Elisabeth Apotheke
SS2012	Tutorin in Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung arzneistoffliefernder Organismen
WS2012	Tutorin an der FH für Molekulare Biotechnologie
SS2013	Tutorin in Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung arzneistoffliefernder Organismen
WS2013	Tutorin an der FH für Molekulare Biotechnologie
SS2014	Tutorin in Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung arzneistoffliefernder Organismen

Besondere Kenntnisse:

B-Führerschein
Englisch und Italienisch, Kleines Latinum
Sehr gute PC-Kenntnisse (Büroanwendungen und Spezialprogramme)
Tastschreiben
TCM Diagnostik und Arzneitherapie

Hobbys:

Schwimmen, Eishockey, Golf, Spazieren, Wandern, Backen

Faak am See, 10.02.2015