universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Aktivitätsgeleitete Fraktionierung von *Dryopteris filix-mas*

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Sarah Ismail
Matrikel-Nummer:	0200639
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek
Wien, im	Jänner 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung 1

1.1. Steckbrief: *Dryopteris filix-mas* 3

1.2. Volkstümliche Anwendung der Farne 5

2. Material und Methoden 9

2.1. Material 9

2.2. Methoden 9

2.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC) 10

2.2.2. Festphasenextraktion (SPE) 11

2.2.3. Hochleistungsflüssigchromatographie 11

2.2.4. Säulenchromatographie (SC) 12

2.2.5. Pharmakologische Untersuchungen 13

3. Ergebnisse 14

3.1. Herstellung des Dichlormethanextraktes 14

3.2. Abtrennung des Chlorophylls 14

3.3. Fraktionierung des vorgereinigten Extraktes 15

3.4. Charakterisierung der Fraktionen 17

3.4.1. Überprüfung der Fraktionen mittels HPLC 17

3.5. Weitere Fraktionierung 19

3.5.1. Säulenchromatographie an Sephadex 20

3.5.2. Fraktionierung und Charakterisierung der 100% Methanol-Fraktion 40

3.6. Ergebnisse der pharmakologische Untersuchungen 61

4. Zusammenfassung 65

5. Literaturverzeichnis 66

6. Abbildungsverzeichnis 67

7. Danksagung 70

1. Einleitung und Problemstellung

Zunächst soll die bearbeitete Pflanze stichwortartig vorgestellt werden.

1.1. Steckbrief: *Dryopteris filix-mas*

- **Name**: *Dryopteris filix-mas*

Der botanische Gattungsname Dryopteris kommt aus dem Griechischen. *Drys* bedeutet Eiche und *pteris* Farn; man gab ihm diesen Namen, da die Fiederblättchen oft eichenblattartig gebuchtet sind [1]. Er wird auch Gemeiner Wurmfarn, Waldfarn oder Männerfarn genannt.

- **Familie**: Dryopteridaceae (Wurmfarngewächse).

- **Vorkommen**:

Meist ist die Pflanze in der gemäßigten Zone Europas zu finden, in Asien und in Amerika, bevorzugt in schattigen Plätzen in Wäldern.

- **Beschreibung:**

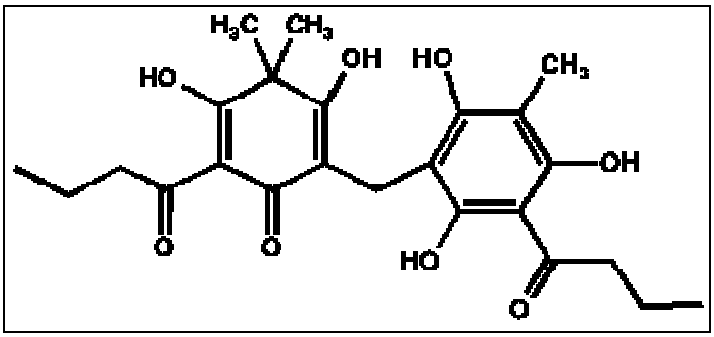
Wurmfarn wächst bis zu 1 m hoch und breitet seine Blätter trichterförmig aus. Die Blätter sind doppelt gefiedert und haben jeweils 20 - 35 Fiedern an der Mittelrippe. Auf den Blattunterseiten bilden sich von Juli - September die Sporen [1].

Es ist bekannt, dass aufgrund des Vorkommens der vielen Hybride und der Komplexität der Merkmale, die Systematik der vielen Farnarten nicht klar definiert ist.

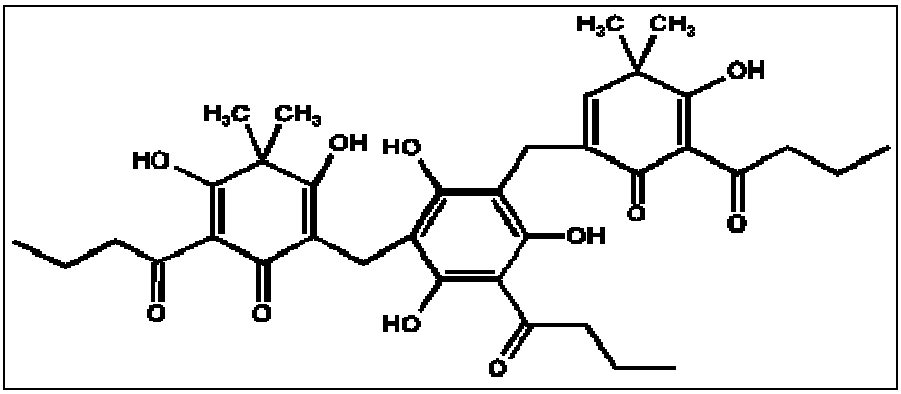
❖ **Bisher bekannte Inhaltstoffe:**

- *Phloroglucinole* (Filixsäuren, Flavaspidsäure) – größtenteils im Rhizom zu finden. Die chemischen Strukturen sind in **Abbildung 1** abgebildet [2].
- Polyensäuren (u.a. Hexadecatriensäure, Octadecatriensäure, Eicosatetraensäure, Eicosatriensäure, Eicosapentaensäure)
- *Flavonoide* (Kämpferol-3-O-glucosid, Quercetin-3-O-glucosid, Dryopterin)
- *Terpenoide*
- geringe Mengen *ätherisches Öl* (z.B. Nerolidol) Phytol, Palmitinsäure

Abbildung 1 Chemische Strukturen der Hauptinhaltstoffe



Flavaspidsäure



Filixsäure

- **Frühere medizinische Anwendung:**

Wie schon der Name Wurmfarn ausdrückt, wurde früher das Rhizom als Wurmmittel verwendet. Schon im Altertum war die Anwendung des Farnrhizoms als Antihelminthicum weit verbreitet.

Die Wirkung als Wurmmittel beruht auf der Lähmung der Muskulatur von Würmern, sodass diese sich von der Darmwand lösen, wodurch sie nach Gabe eines Laxans aus dem menschlichen Körper ausgeschieden werden können. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite und häufigen Intoxikationen, die sich u.a. in lokalen Reizerscheinungen im Gastrointestinal-Trakt äußern, aber auch zu Sehstörungen bis hin zur Erblindung führen können, ist die Anwendung als Wurmmittel heute obsolet [3,4].

1.2. Volkstümliche Anwendung der Farne

Ausgangspunkt für die wissenschaftlichen Arbeiten an Farnen war die im Rahmen zahlreicher Diplomarbeiten und einer Dissertation zusammengestellte „VOLKSMED- Datenbank“. Diese am Department für Pharmakognosie der Universität vorhandene Datensammlung beinhaltet die volkstümliche Anwendung diverser Heilpflanzen vor allem im ländlichen Bereich. In diese Datenbank kommen Farne an erster Stelle für die

Behandlung von Erkrankungen wie Rheuma oder Entzündungen vor. Die gesammelten Daten von Farnen beruhen ausschließlich auf äußerlicher Anwendung [5].

Es ergibt sich jedoch bei der volksmedizinischen Anwendung die Problematik, die darauf beruht, dass keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Farnarten getroffen wurde. Schon allein in Österreich gibt es ca. 50 Arten, wodurch sich die Frage stellt, welche konkrete Farnart die entsprechende antiphlogistische Wirkung zeigt.

Wie bereits erwähnt, zeigt sich die Bestimmung der einzelnen Farnarten mehr als kompliziert. Vor allem da mit der vorhandenen Bestimmungsliteratur die einzelnen Farnarten nur schwer zu unterscheiden sind.

Mit Ausnahme von *Dryopteris filix-mas*, denn dieser Farn kann gut von den anderen Arten unterschieden werden und ist auch aufgrund seiner weiten Verbreitung einfach zu beschaffen. Aus diesen Gründen wurde zunächst der Wurmfarn für die phytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen herangezogen.

Bereits in früheren Arbeiten [6,7] wurden verschiedene Extrakte mit unterschiedlicher Polarität hergestellt und anschließend auf die antiphlogistische Wirkung getestet.

Dabei handelte es sich um:

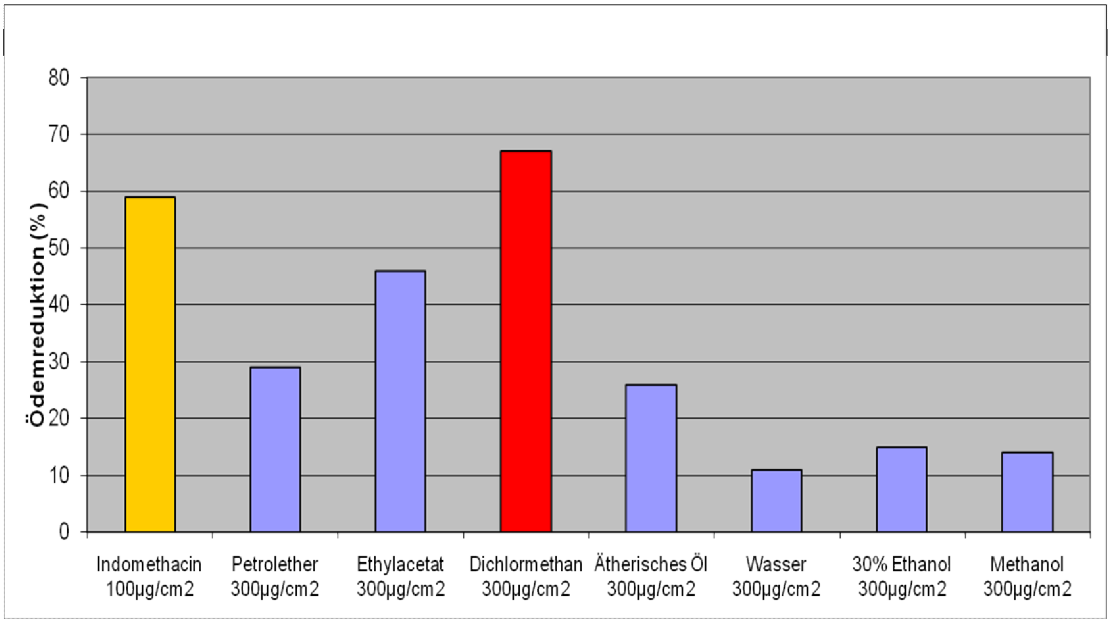
- Petrolether- Extrakt
- Ethylacetat- Extrakt
- Dichlormethan- Extrakt
- Ätherisches Öl aus der Wasserdampfdestillation
- Methanol- Extrakt
- 30% Ethanol- Extrakt
- Wasser- Extrakt

Die Extrakte wurden jeweils mit 100g Droge und 1000ml Extraktionsmittel am Ultraschallbad hergestellt.

Die Testung auf antiphlogistische Wirkung erfolgte zum einen mittels Testung an einem Makrophagen - Zellmodell und zum anderen an einem Tiermodell (Crotonöl-Mäuseohrtest; siehe Kapitel 2.2.5) [6].

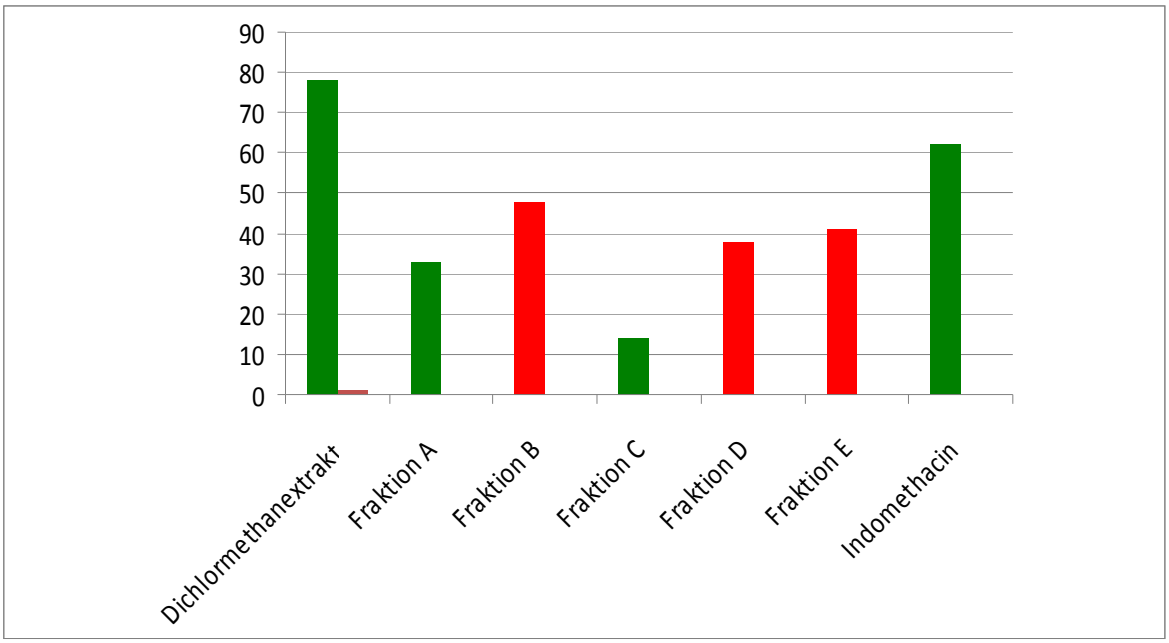
Wie **Diagramm 1** zeigt, wies das Dichlormethanextrakt im Vergleich zu Indomethacin (Positiv-Kontrolle), die größte antiphlogistische Wirkung auf.

Diagramm 1 Ergebnisse der Testung verschiedener Extrakte mittels Mäuseohrtest auf ihre antiphlogistische Wirkung



Aus diesem Grund beschloss man, den Dichlormethanextrakt weiter zu fraktionieren und pharmakologisch zu testen. Man entfernte das Chlorophyll und erhielt Fraktion A (Rückstand des vorgereinigten Extraktes) und Fraktion B (Reinextrakt). Mit Fraktion B wurde mittels Festphasenextraktion eine weitere Trennung durchgeführt (30%, 70% und 100% Methanol).
Es zeigte sich bei den Ergebnissen der pharmakologischen Testung, die im Rahmen einer Diplomarbeit erfolgte, dass Fraktion C (30% Methanol-Fraktion) kaum antiphlogistische Wirkung zeigt. Wobei Fraktion D (70% Methanol-Fraktion) und die Fraktion E (100% Methanol-Fraktion) jedoch sehr gute antiphlogistische Aktivität im Vergleich zu Indomethacin ergaben [7]. Diese Ergebnisse sind in **Diagramm 2** dargestellt.

Diagramm 2 Schematische Darstellung der einzelnen Fraktionen



Eine vorangegangene Diplomarbeit beschäftigte sich mit der 70% Methanol-Fraktion (D), bei der eine weitere Fraktionierung durchgeführt wurde [8]. Es wurden 7 Subfraktionen pharmakologisch untersucht geschickt. Es stellte sich heraus, dass nur 2 der Subfraktionen eine signifikante antiphlogistische Wirkung zeigten. Diese Vorgangsweise wird „bioassay guided" Fraktionierung genannt, wo eine Fraktionierung von der Testung der Aktivität begleitet wird, um schwach wirksame bzw. stark wirksame Fraktionen zu finden.

Aufgabe der vorliegenden Diplomarbeit war es, größere Mengen der 100% Methanol-Fraktion (E) herzustellen, und eine weitere Fraktionierung durchzuführen um Fraktionen zu finden, wo mögliche antiphlogistisch wirksame Inhaltstoffe angereichert sind.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Für die phytochemischen Untersuchungen wurde dieselbe Charge des Pflanzenmaterials, welches schon für vorherige Untersuchungen verwendet wurde, herangezogen. Dieses Pflanzenmaterial wurde im Oktober 2006 auf der Ebenwaldhöhe, Niederösterreich, gesammelt. Es konnte nach botanischen und anatomisch-morphologischen Untersuchungen festgestellt werden, dass es sich um *Dryopteris filix-mas* handelt. Es liegen entsprechende Herbarbelege im Herbarium des Departments für Pharmakognosie auf.

2.2. Methoden

In diesem Kapitel wird kurz auf die verschiedenen Parameter der chromatographischen, spektroskopischen und pharmakologischen Methoden eingegangen, die bei dieser Arbeit in Verwendung waren:

- Dünnschichtchromatographie (DC): Charakterisierung und Überprüfung der Extrakte und Fraktionen
- *Festphasenextraktion (SPE)*: Fraktionierung des Rohextrakts
- *Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)*: Überblick über Inhaltstoffe der Extrakte und Fraktionen
- *Säulenchromatographie*: Weitere Fraktionierung
- *Pharmakologische Untersuchung:* „Crotonöl-Mäuseohrödem-Test“

2.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Wir überprüften mit Hilfe der DC die einzelnen Fraktionen und Extrakte, um sie nach der Detektion mittels Laufverhalten und Färbung näher zu charakterisieren.

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden Kieselgel (KG) Fertigplatten als stationäre Phase gewählt. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Toluol, Ethylformiat und konzentrierter Ameisensäure. Dieses Gemisch ermöglichte eine gute Trennung der Extrakte und Fraktionen. Zur Detektion wurde „Naturstoff Reagens A“ verwendet, welches zur Erkennung von Flavonoiden und phenolischen Strukturen sehr gut geeignet ist. Die Intensität der einzelnen Banden konnte durch ein Nachbesprühen mit PEG 400 (Polyethylenglykol) verbessert werden. Nach einigen Minuten erfolgte die Detektion unter UV- Licht bei einer Wellenlänge von 366nm. Die entsprechenden Parameter für die DC sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Tabelle 1 Parameter für die Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase	KG 60 F254, Fertigplatten Merck, Schichtdicke: 0,25mm
Mobile Phase	Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure konz. (5+4+1)
Trennstrecke	8 cm
Detektion	Naturstoffreagenz A [1]: 1% alkoholische Lösung von Diphenylboroxyethylamin; mit PEG 400 nachbesprüht

2.2.2. Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) wurde eingesetzt, um das gewonnene Rohextrakt zu fraktionieren. Hierbei handelt es sich um eine Sonderform der Säulenchromatographie, die häufig zur Abtrennung von Begleitstoffen dient.

Durch die Festphasenextraktion kann man auch angereicherte Proben erhalten. Hierbei handelt es sich um einen physikalischen Extraktionsprozess, der zwischen einer festen und flüssigen Phase abläuft [9]. Die verwendeten Parameter sind in **Tabelle 2** zusammengestellt.

Tabelle 2 Parameter für die Festphasenextraktion (SPE)

Stationäre Phase	Varian Mega Bond Elut C18, 5000mg, 20ml
Mobile Phase	30%, 70% und 100% Methanol
Auftragemenge	Ca. 250mg gereinigter Extrakt in 1,5ml Dichlormethan
Elutionsmenge	je 5 Reservoirvolumina

2.2.3. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Um einen Überblick über die Inhaltstoffe des Extrakts und der einzelnen Fraktionen zu erhalten, wurde die HPLC verwendet. Als Detektion wurde ein Diode Array Detektor (DAD) verwendet, wodurch die entsprechenden UV-Spektren zu den Peaks erhalten werden konnten. Die Parameter der HPLC sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

Tabelle 3 Parameter HPLC

Stationäre Phase	Licrospher 100 RP-18; 4 x 250mm Korngröße 5 µm
Mobile Phase	Acetonitril/Wasser (pH 2,8) abgesäuert mit Trifluoressigsäure (TFA)
Pumpe	Shimadzu LC-20 AD
Autosampler	Shimadzu SIL-10 AD
Detektion	Shimadzu SPD-M20A, 254nm, 285nm, 340nm
Software	LC-Solution Version 1.21 SP1
Flussrate	1ml/min
Einspritzvolumen	30 µl
Gradient	Acetonitril/Wasser, Gradient 0 - 100% Acetonitril in 100 min

2.2.4. Säulenchromatographie (SC)

Für Vorversuche mit der 100% Methanol Fraktion, welche während der vorhergehenden Diplomarbeit hergestellt wurde [8], als auch für die Fraktionierung der 100% Methanol-Fraktion, die während der Arbeit zu dieser Diplomarbeit hergestellt wurde, verwendeten wir Sephadex LH- 20 als stationäre Phase.

Bei Sephadex handelt es sich um Dextran, welches mit Epichlorhydrin quervernetzt wird. Durch Hydroxypropylierung wird eine zusätzliche Lipophilisierung erreicht, welche das Trennen von lipophilen Substanzgemischen nach Grössenausschluß- und Adsorptionseffekten mit organischen Lösungsmitteln ermöglicht (Sephadex LH-20) [10].

Die verwendeten Parameter werden in **Tabelle 4** beschrieben.

Tabelle 4 Parameter für Säulenchromatographie

	Säule A (Vorversuche)	Säule B (Fraktionierung)
Stationäre Phase	Sephadex LH-20 vorgequollen in 100% Methanol	Sephadex LH-20 vorgequollen in 100% Methanol
Säulenmaße	Länge: 80 cm Durchmesser: 0,8cm	Länge: 120 cm Duchmesser:1,5cm
Mobile Phase	100% Methanol	100% Methanol
Fraktionen	9 / je 10ml	30 / je 5ml

2.2.5. Pharmakologische Untersuchungen

Zur Prüfung der antiphlogistischen Wirkung der einzelnen Fraktionen wurde der Crotonöl- Mäuseohrödem-Test angewendet. Dieser ist ein pharmakologischer Test, welcher am Dipartimento die Materiali e delle Risorse Naturali, Università degli Studi di Trieste (Italien) durch Herrn Dr. Sosa durchgeführt wurde.

Es handelt sich hierbei um ein Prüfverfahren, bei dem am Mäuseohr durch ein bestimmtes ätherisches Öl, das Crotonöl (CO), eine Entzündung hervorgerufen wird. Dabei werden 15µl einer Lösung von CO in Aceton auf die Innenseite der Ohren von männlichen CD-1 Mäusen aufgebracht, wodurch es zu einer Ödembildung kommt. Die zu prüfenden Extrakte und Fraktionen werden ebenfalls in Aceton gelöst und am Ohr aufgebracht, wobei das 2. Ohr unbehandelt bleibt. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Ödemreduktion (Abnahme des Gewichts) im Vergleich zum unbehandelten Ohr. Als Positivkontrolle wird Indomethacin verwendet [4].

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung des Dichlormethanextraktes

In der Einführung wurde schon erwähnt, dass der Dichlormethanextrakt die größte antiphlogistische Wirkung im pharmakologischen Testsystem ist.
Für die Herstellung des Extrakts wurden 100g Droge in einer elektrischen Drogenmühle mit der Siebgröße 0,75mm vermahlen. Die pulverisierte Droge wurde mit 1000ml Dichlormethan versetzt und 30 min am Ultraschallbad extrahiert. Die entstandene dunkelgrüne Lösung wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei ca. 45°C zur Trockene gebracht.
Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, um eine erschöpfende Extraktion zu gewährleisten.
Auf diese Weise wurden insgesamt 1000g Droge verarbeitet, um genug Material zur Verfügung zu haben. Wir erhielten ca. 41g des dunkelgrün gefärbten Rohextraktes. Dieser konnte nun weiter verarbeitet werden.

3.2. Abtrennung des Chlorophylls

Es stellte sich bei den ersten Überprüfungen des Rohextrakts mittels DC heraus, dass Chlorophyll einen großen Anteil des Rohextrakts ausmacht und so alle weiteren phytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen stören würden.
Daher war die Abtrennung von Chlorophyll nötig. Diese erfolgte mit der Flüssig – Flüssig – Verteilung mit Dichlormethan und einer Methanol – Wasser Mischung.
Diese Methode wurde schon bei einigen vorangehenden Diplomarbeiten erfolgreich angewendet [8].

In einer Mischung aus 150ml Dichlormethan und weiteren 150ml einer Mischung aus Wasser/Methanol (1:1) wurde 1g Rohextrakt gelöst. Das erhaltene Zweiphasen-System wurde am Rotationverdampfer unter vermindertem Druck und bei ca. 45°C eingeengt, sodass alle unlöslichen Begleit- und Ballaststoffe in die Methanol-Wasser Phase ausfielen und somit leicht abfiltriert werden konnten. Zur gleichen Zeit wurden die restlichen Inhaltstoffe angereichert. Das Filtrat war noch leicht trüb und wurde deshalb nochmals filtriert.
Das gelbe nur mehr sehr schwach trübe Filtrat stand nun für spätere dünnschichtchromatographische Untersuchungen zur Verfügung (siehe **Abbildung 2**).

Auf diese Weise wurden 41g des Rohextraktes gereinigt, wodurch wir 3,45g des gereinigten Extraktes erhielten.

3.3. Fraktionierung des vorgereinigten Extraktes

Da uns die Abtrennung des Chlorophylls gelang, konnten wir uns nun der Fraktionierung des gereinigten Extraktes mittels Festphasenextraktion zuwenden. Aufgrund guter Erfahrung vorhergehender Diplomarbeiten wurden hierfür verschiedene Konzentrationen von Methanol (30%, 70%, 100%) verwendet [7].
Wir lösten je ca. 250mg des gereinigten Extraktes in 1,5ml Dichlormethan und trugen die Lösung auf die Kartusche auf. Das Dichlormethan wurde dann soweit abgesaugt bis die Kartusche trocken war.
Eluiert wurde jeweils mit 5 Reservoirvolumina 30%, 70% und 100% Methanol. Die weiteren Parameter sind in Tabelle 2 (Kapitel 2.2.2) angeführt.

Die Fraktionen wurden in verschiedene Gefäße gesammelt und zeigten schon hinsichtlich ihrer Farbe Unterschiede:

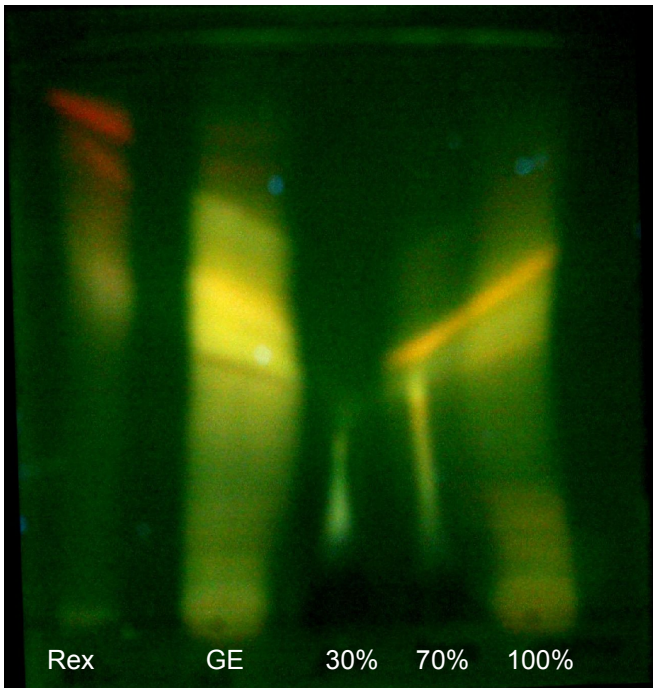
30% Fraktion → leicht gelb
70% Fraktion → gelb – orange
100% Fraktion → gelb mit Grünstich

Die einzelnen Fraktionen wurden unter verminderten Druck bei 45 °C bis zur Trockene eingedampft und dünnschichtchromatographisch überprüft. Gleichzeitig konnte die Reinigung des Rohextraktes vom Chlorophyll kontrolliert werden und ein guter Vergleich der einzelnen Fraktionen hergestellt werden (**Abbildung 2**).

Die Ausbeuten der Fraktionen waren:

30% Methanol-Fraktion → 0,69 g
70% Methanol-Fraktion → 1,28 g
100% Methanol-Fraktion → 1,41 g

Abbildung 2 Überprüfung der **SPE – Fraktionen** bei 366nm nach Besprühen



Rex: Rohextrakt
GE: gereinigter Extrakt
30%: 30% Fraktion
70%: 70% Fraktion
100%: 100% Fraktion

3.4. Charakterisierung der Fraktionen

Um uns einen Überblick über das Inhaltsstoffmuster der Fraktionen 30%, 70% und 100% zu verschaffen, wurden die Fraktionen mittels HPLC überprüft und verglichen. In einer vorangehenden Diplomarbeit wurden bereits diese Fraktionen mittels GC überprüft, daher wurde dieser Schritt in dieser Arbeit übersprungen [8].

3.4.1. Überprüfung der Fraktionen mittels HPLC

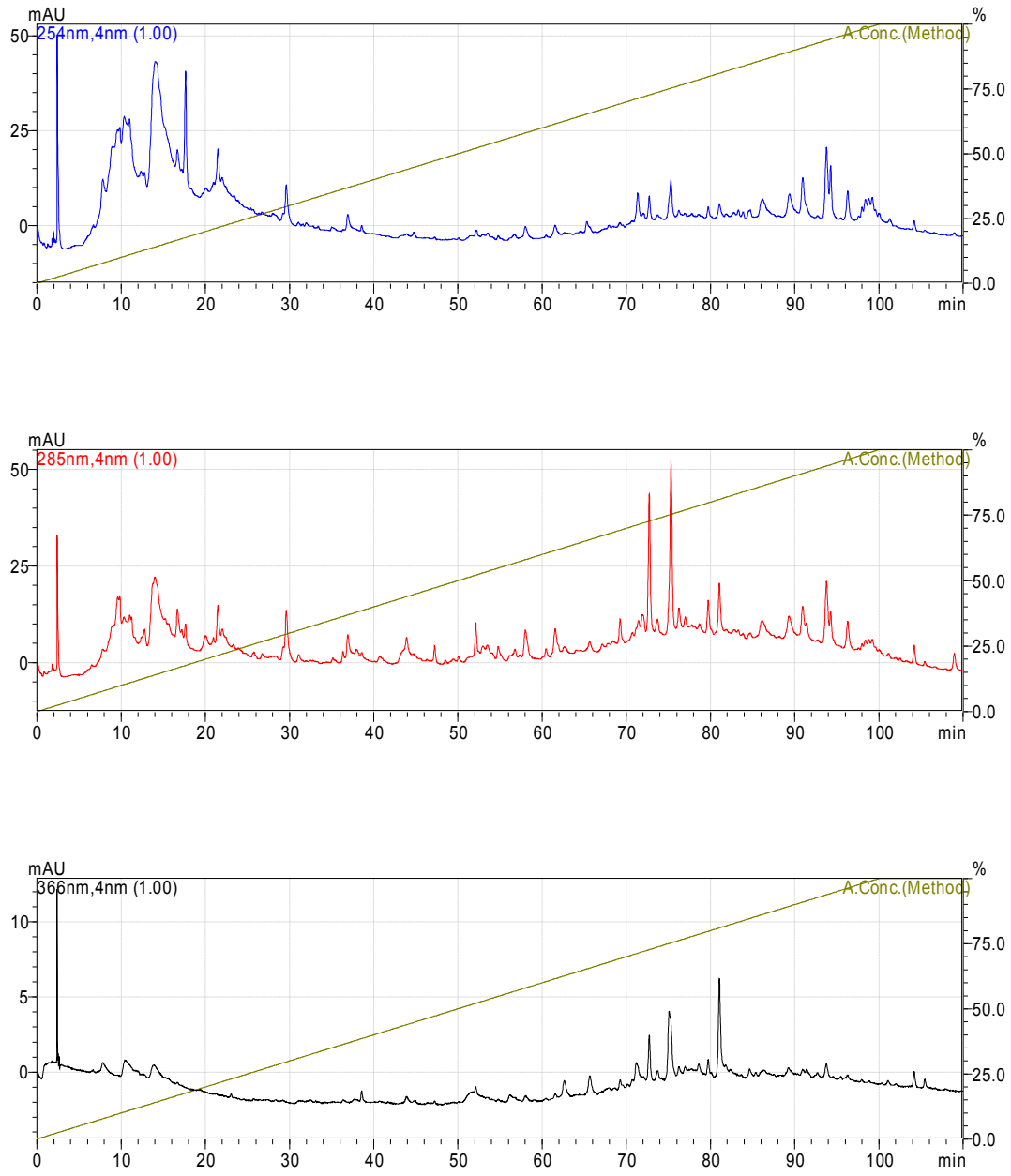
Wir wählten die analytische HPLC um einen ersten Überblick über das Inhaltstoffmuster zu bekommen. Eine Mischung aus Acetonitril und Wasser (pH 2,8) mit einer Flussrate von 1ml/min wurde als mobile Phase verwendet. Die weiteren Parameter sind in der **Tabelle 3** (Kapitel 2.2.3) angegeben. Wir wählten für die Detektion der Fraktionen Chromatogramme folgende Wellenlängen: - 254 nm

- 285 nm
- 340 bzw. 366 nm

In den vorhergehenden Diplomarbeiten zeigte sich, dass diese Wellenlängen für die Detektion der Unterschiede in den einzelnen Fraktionen, am besten geeignet sind. Man nahm hier von den größten Peaks ein UV-Spektrum auf.

Im Besonderen wurde versucht, die Zusammensetzung der 100% Methanol-Fraktion herauszufinden. Dabei wurde festgestellt, dass diese anders als die 30% und 70% Methanol-Fraktionen keine Hauptkomponenten, jedoch sehr viele Komponenten in geringer Konzentration enthält. Daher wurden bei dieser Fraktion keine UV- Spektren aufgenommen [8].
Abbildung 3 zeigt die HPLC Analyse der 100% Methanol-Fraktion bei mehreren Wellenlängen.

Abbildung 3 HPLC Chromatogramme der SPE Fraktion mit **100% Methanol**



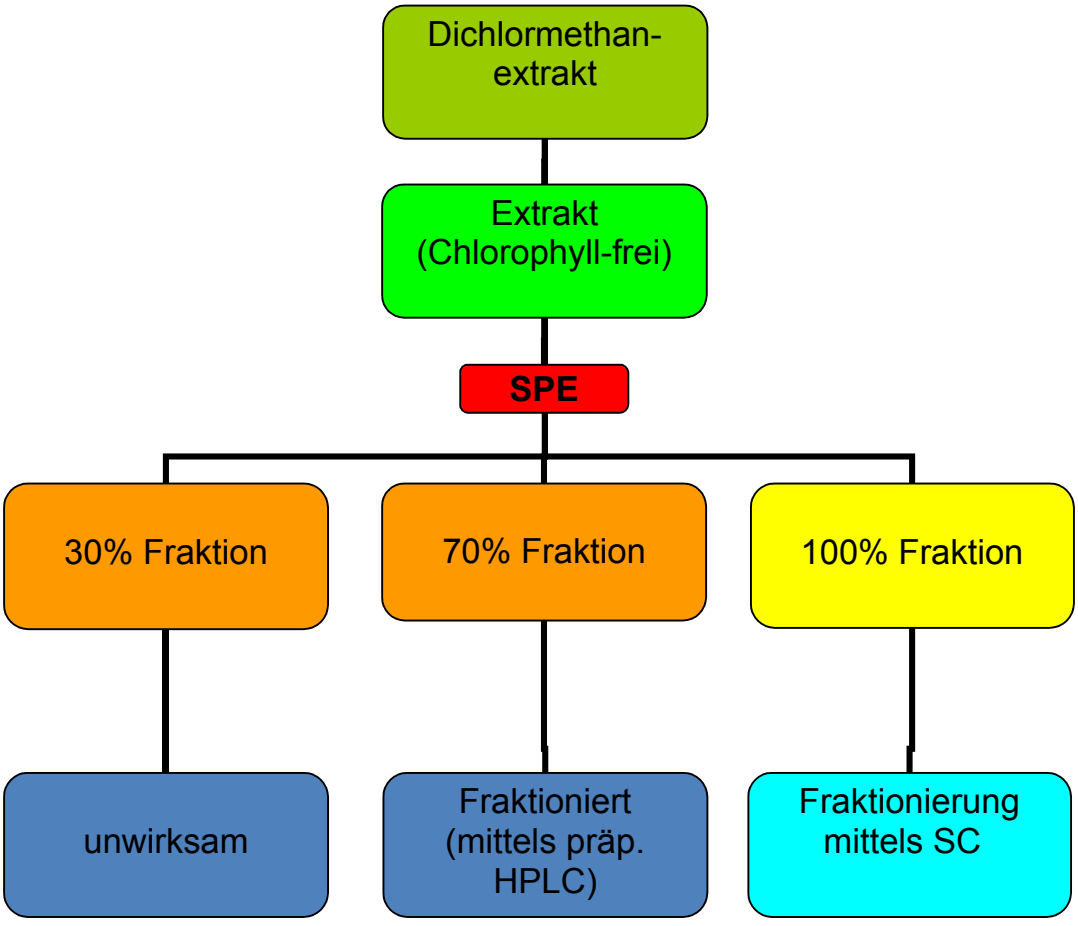
3.5. Weitere Fraktionierung

In einer vorangegangenen Diplomarbeit [7] wurden die 30%, 70% und 100% Methanol-Fraktionen pharmakologisch getestet. Die Ergebnisse zeigten für die 70% und die 100% Methanol-Fraktionen eine gute antiphlogistische Wirkung. In der Diplomarbeit [8] wurde zumindest die 70% Methanol-Fraktion mittels präparativer HPLC aufgearbeitet.

Ziel meiner Diplomarbeit war es, die 100% Methanol-Fraktion zu bearbeiten. Da diese Fraktion sehr viele Komponenten in geringer Konzentration und keine Hauptkomponenten enthielt, schien die Aufarbeitung mittels HPLC nicht sinnvoll. Deshalb versuchten wir, eine Auftrennung mittels Gelchromatographie zu erzielen.

In **Abbildung 4** wird nochmals ein Überblick über die bisherigen Arbeitsschritte dargestellt.

Abbildung 4 Überblick



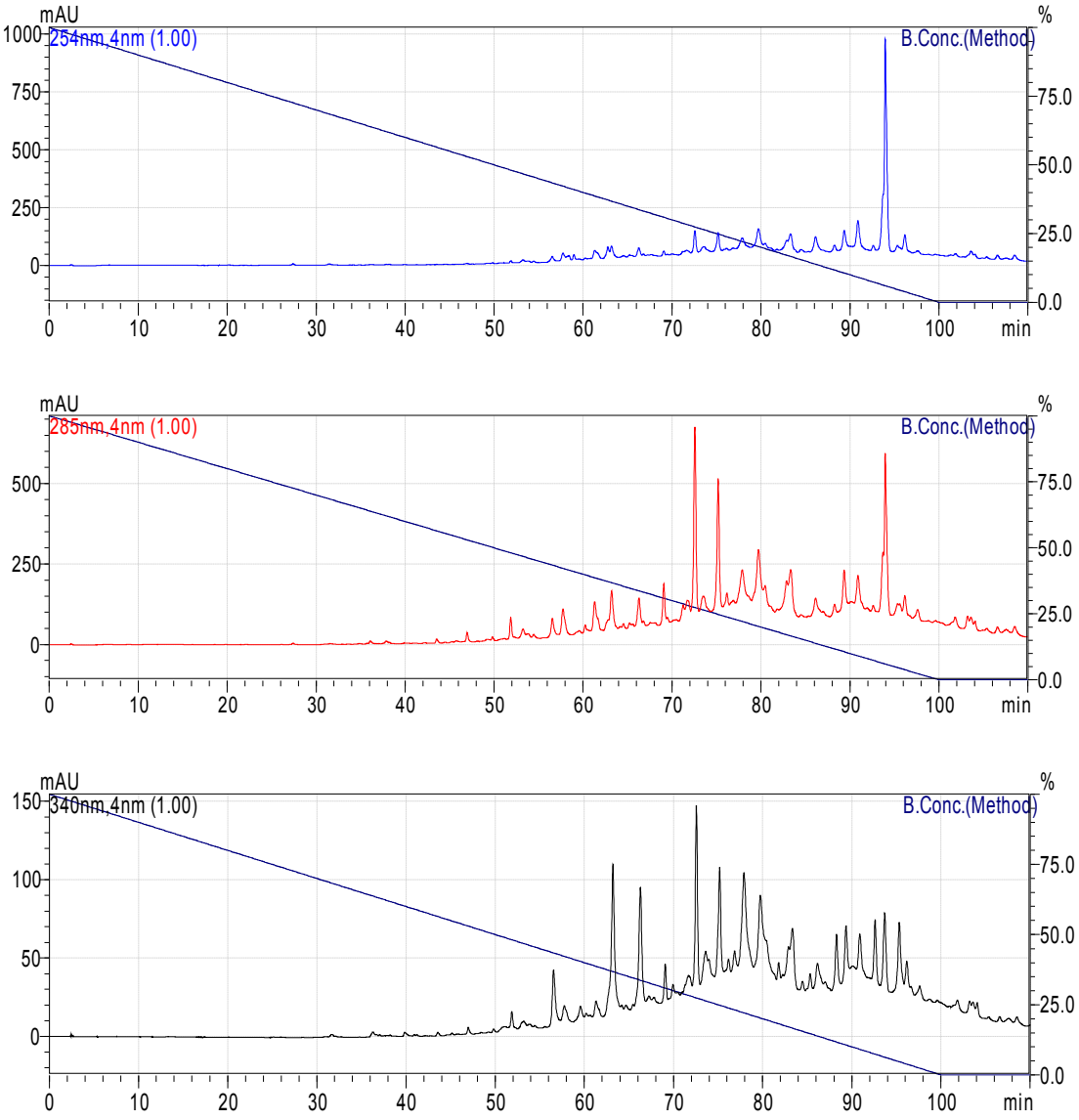
3.5.1. Säulenchromatographie an Sephadex

Um eine optimale Fraktionierung zu gewährleisten, führten wir mehrere Vorversuche mit der 100% Methanol-Fraktion durch, welche in einer vorangegangnen Diplomarbeit hergestellt wurde. Bei dieser Fraktion konnte mittels präparativer HPLC keine Substanzanreicherung erzielt werden.

Deshalb sollte eine andere Methode für die Fraktionierung der 100% Methanol-Fraktion ausgearbeitet werden [8].
Säulenchromatographie an Sephadex war die Methode der Wahl, da diese chromatographische Methode in anderen Diplomarbeiten [7] zu erfolgreichen Ergebnissen geführt hat.
Anschließend analysierten wir die Fraktionen mittels HPLC, wobei immer unser bewährtes System verwendet wurde (Tabelle 3, Kapitel 2.2.3.).

In **Abbildung 5** sieht man HPLC Chromatogramme der 100% Methanol-Fraktion [7], welche für die Vorversuche verwendet wurde.

Abbildung 5 HPLC Chromatogramme der 100% Methanol Fraktion für Vorversuche zur Auftrennung mittels Gelchromatographie



In den Vorversuchen sollten die Flussrate und die Menge des Lösungsmittels optimiert werden.
Dazu quollen wir Sephadex LH-20 in Methanol vor. Weitere Parameter sind in Kap. 2.2.5. unter Säule A angeführt. Als Elutionsmittel wurde 100%iges Methanol eingesetzt. Uns standen etwa 0,5g der 100% Methanol-Fraktion für Vorversuche zur Verfügung. Bei unserem ersten Versuch lösten wir ca. 0,2 g in Methanol, trugen die entstandene braune Lösung auf die Säule auf und eluierten mit Methanol.
Wir sammelten Fraktionsgrößen bei einem Zeitintervall von 20 min und einer Tropfengeschwindigkeit von 0,5ml/min. Wir bekamen insgesamt 7 Sub-Fraktionen, welche unterschiedliche Farben aufwiesen.

- Sub-Fraktion 1 – Hellrosa
- Sub-Fraktion 2 – Rosa
- Sub-Fraktion 3 – sehr helles Gelb
- Sub-Fraktion 4 – bräunlich Gelb
- Sub-Fraktion 5 – Braun
- Sub-Fraktion 6 – helles Braun
- Sub-Fraktion 7 – fast farblos

Um zu erfahren, ob eine zufriedenstellende Trennung gelungen ist, wurden die einzelnen Fraktionen mittels HPLC überprüft.
In den nächsten Abbildungen sieht man, dass dies nicht ganz gelungen ist, da die meisten Komponenten in Fraktion 2 angereichert waren.
Die **Abbildung 6** bis **12** zeigen HPLC Chromatogramme der sieben Sub-Fraktionen

Abbildung 6 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 1

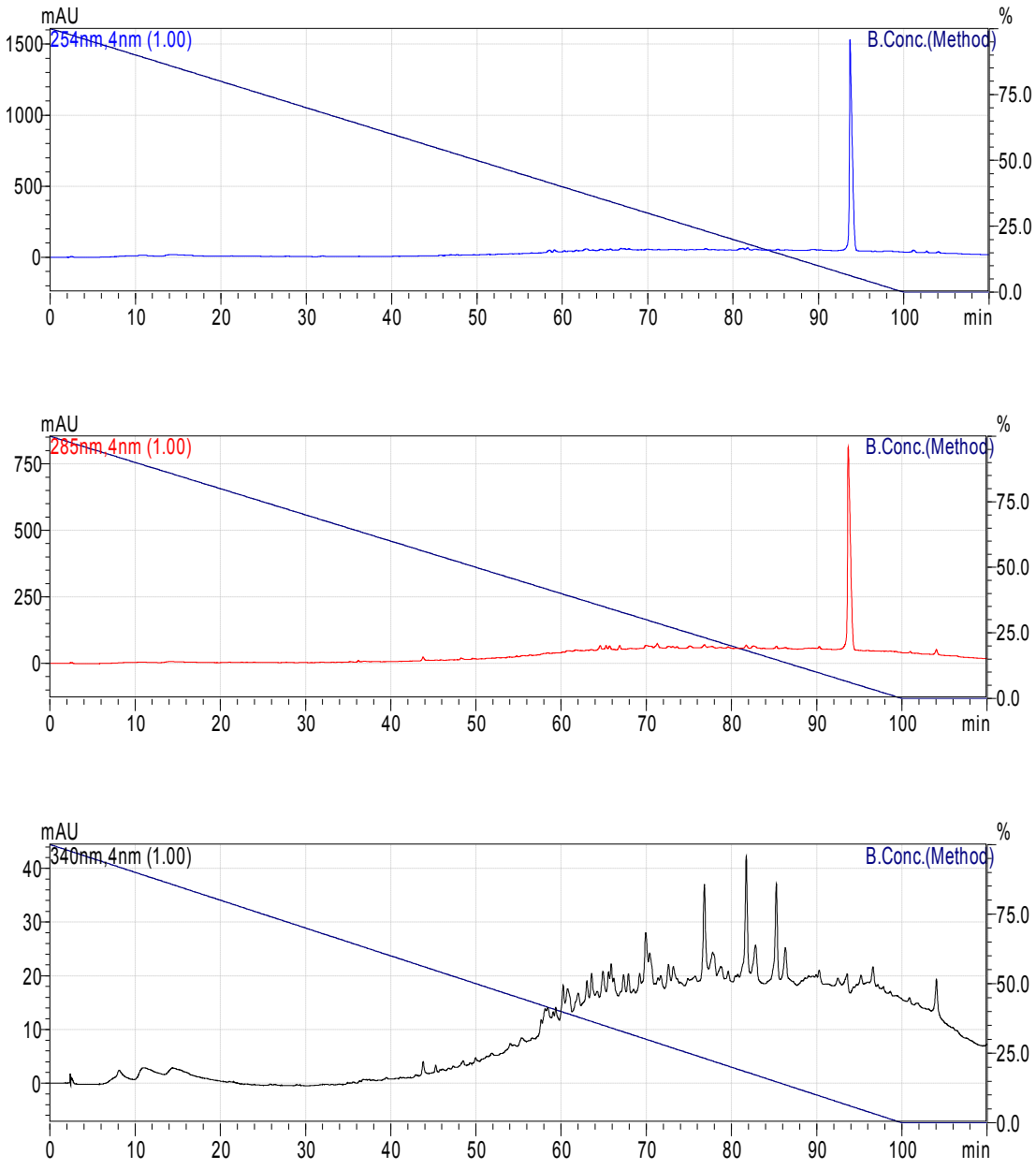


Abbildung 7 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 2

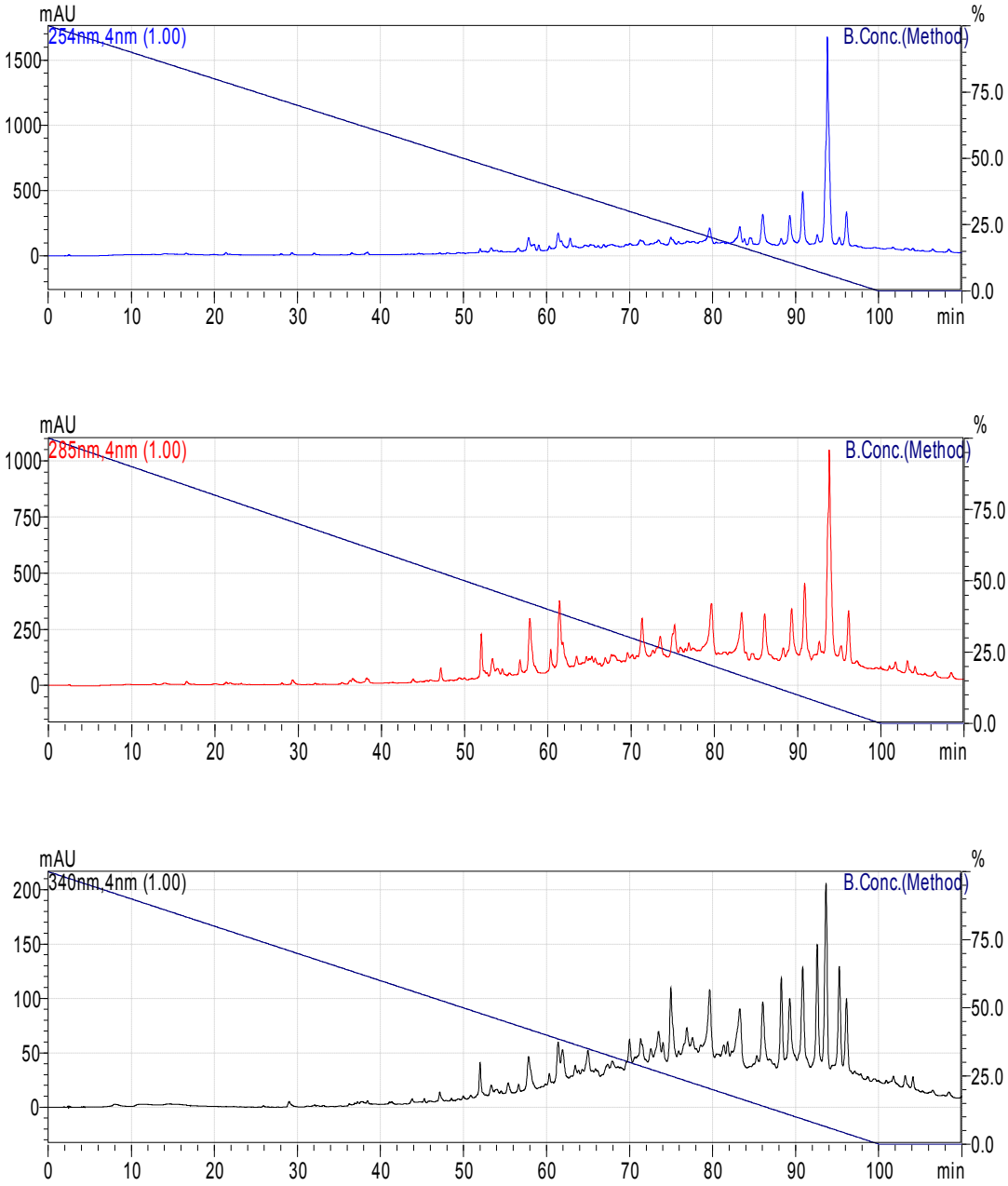


Abbildung 8 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 3

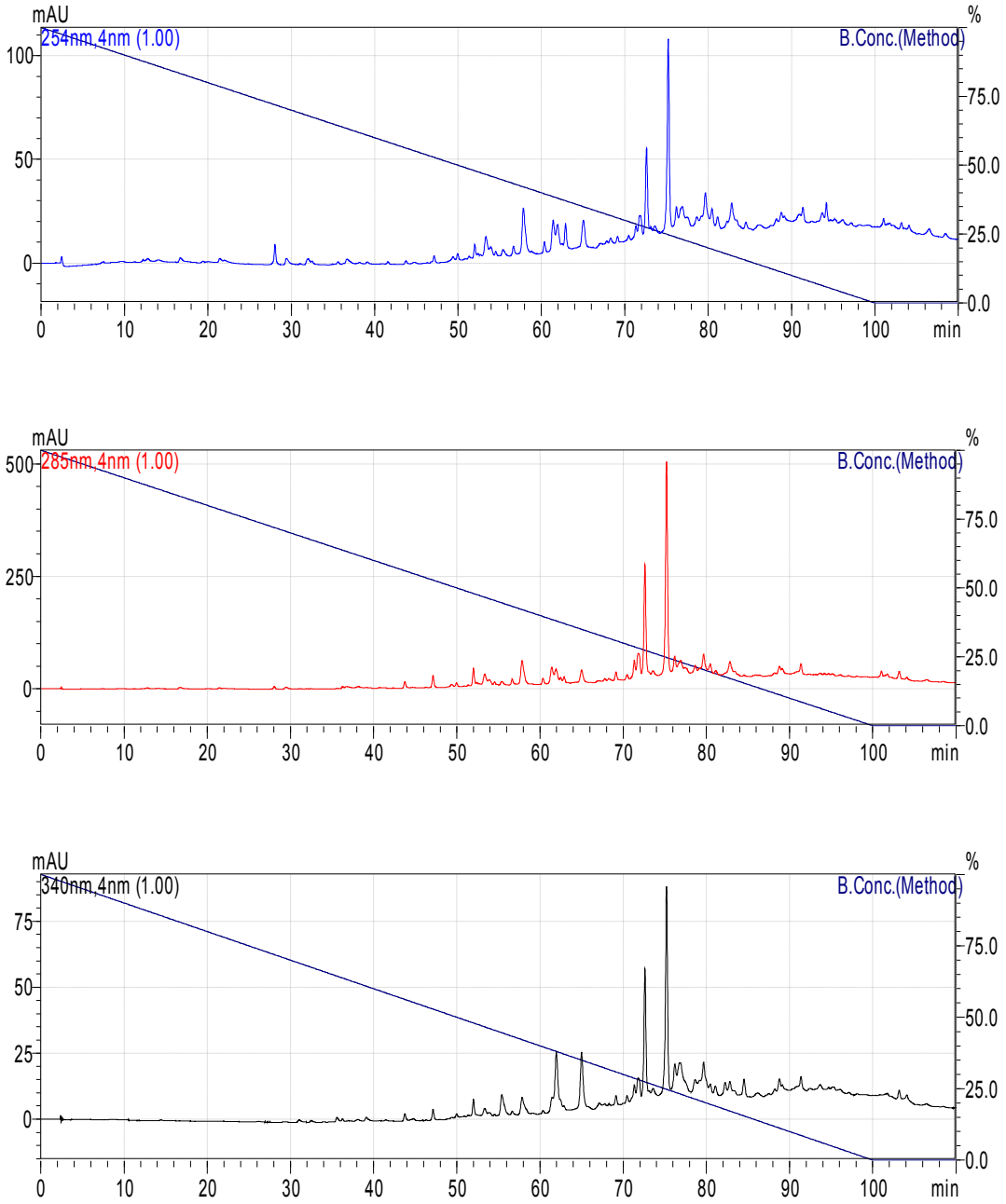


Abbildung 9 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 4

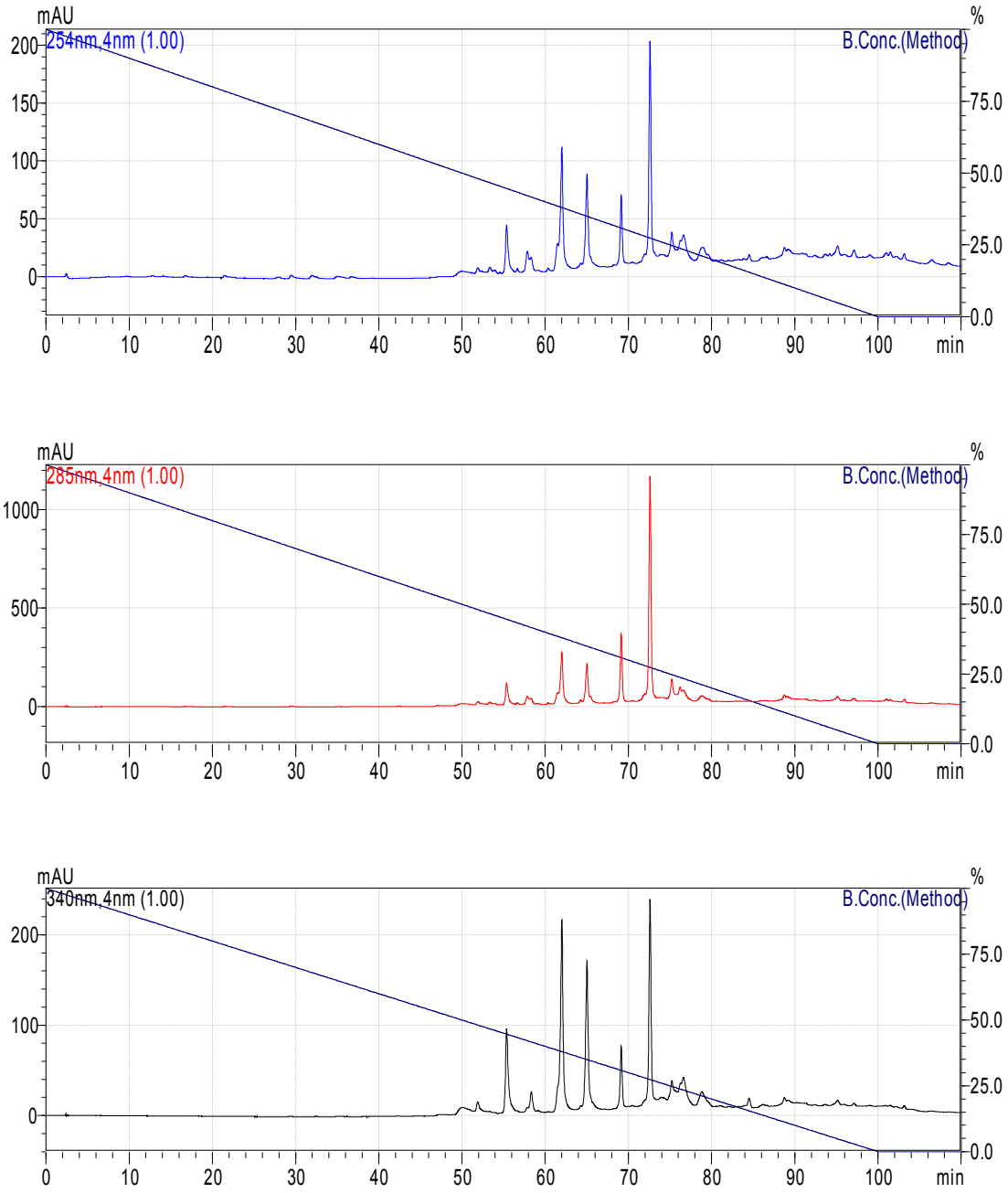


Abbildung 10 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 5

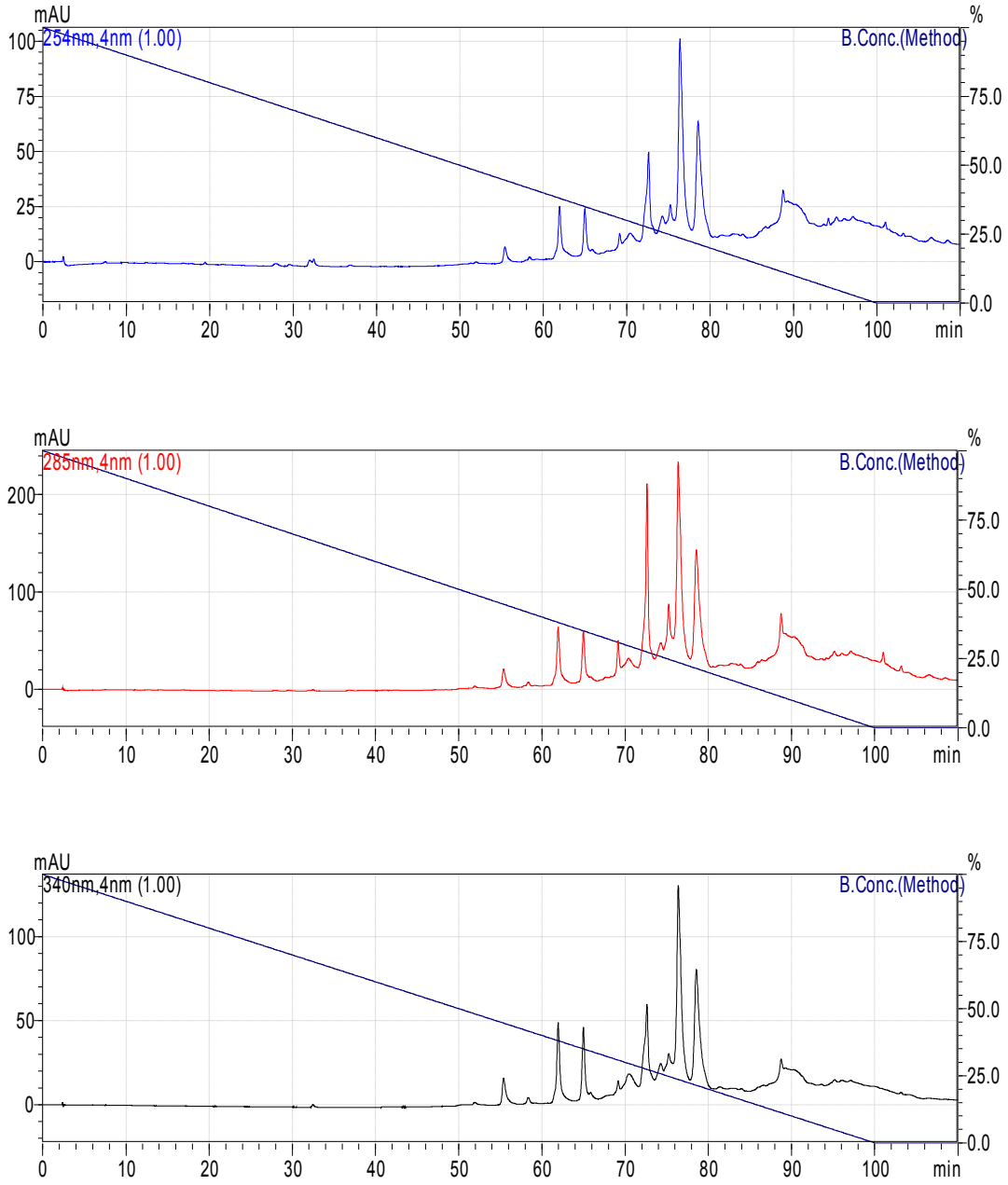


Abbildung 11 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 6

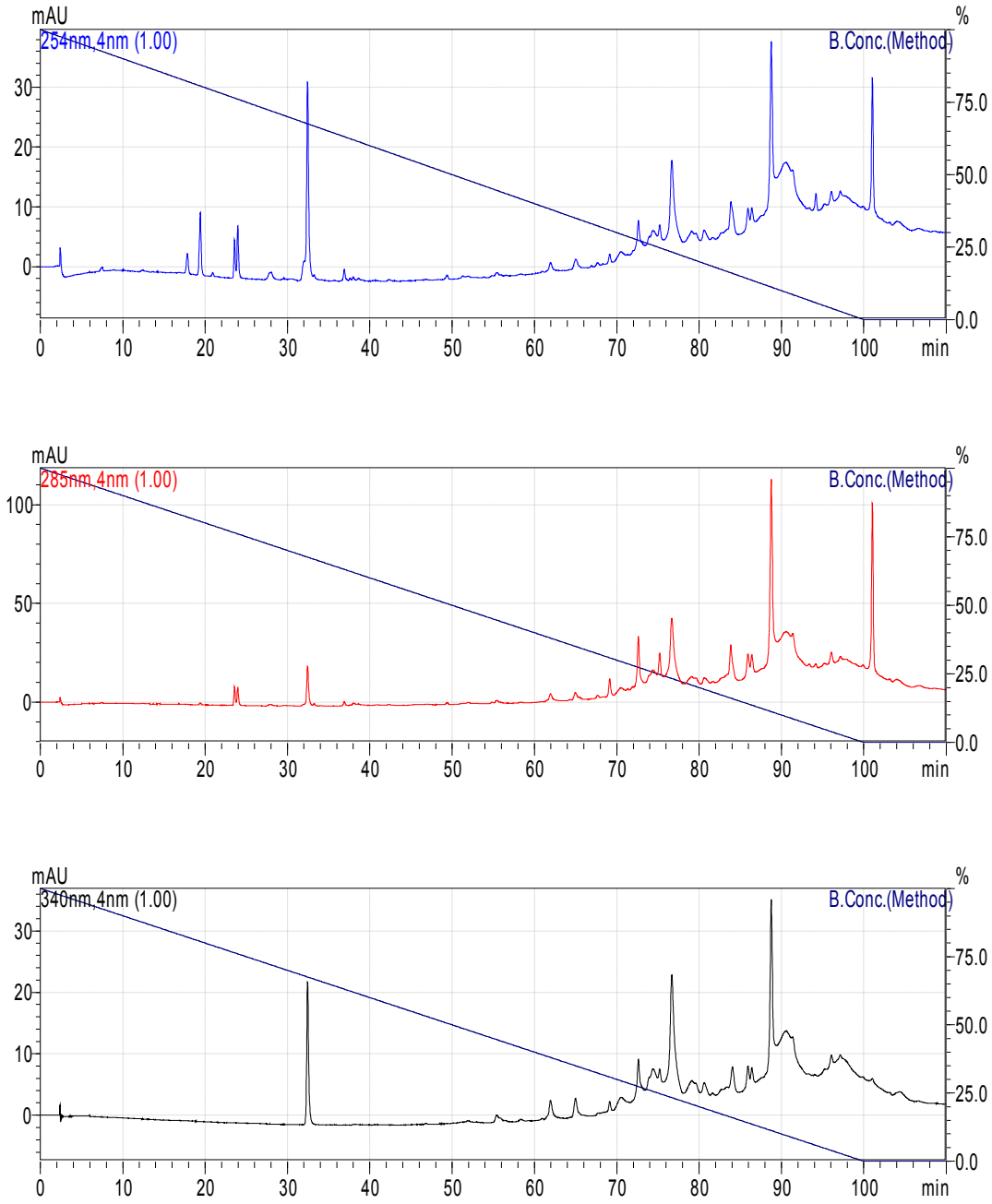
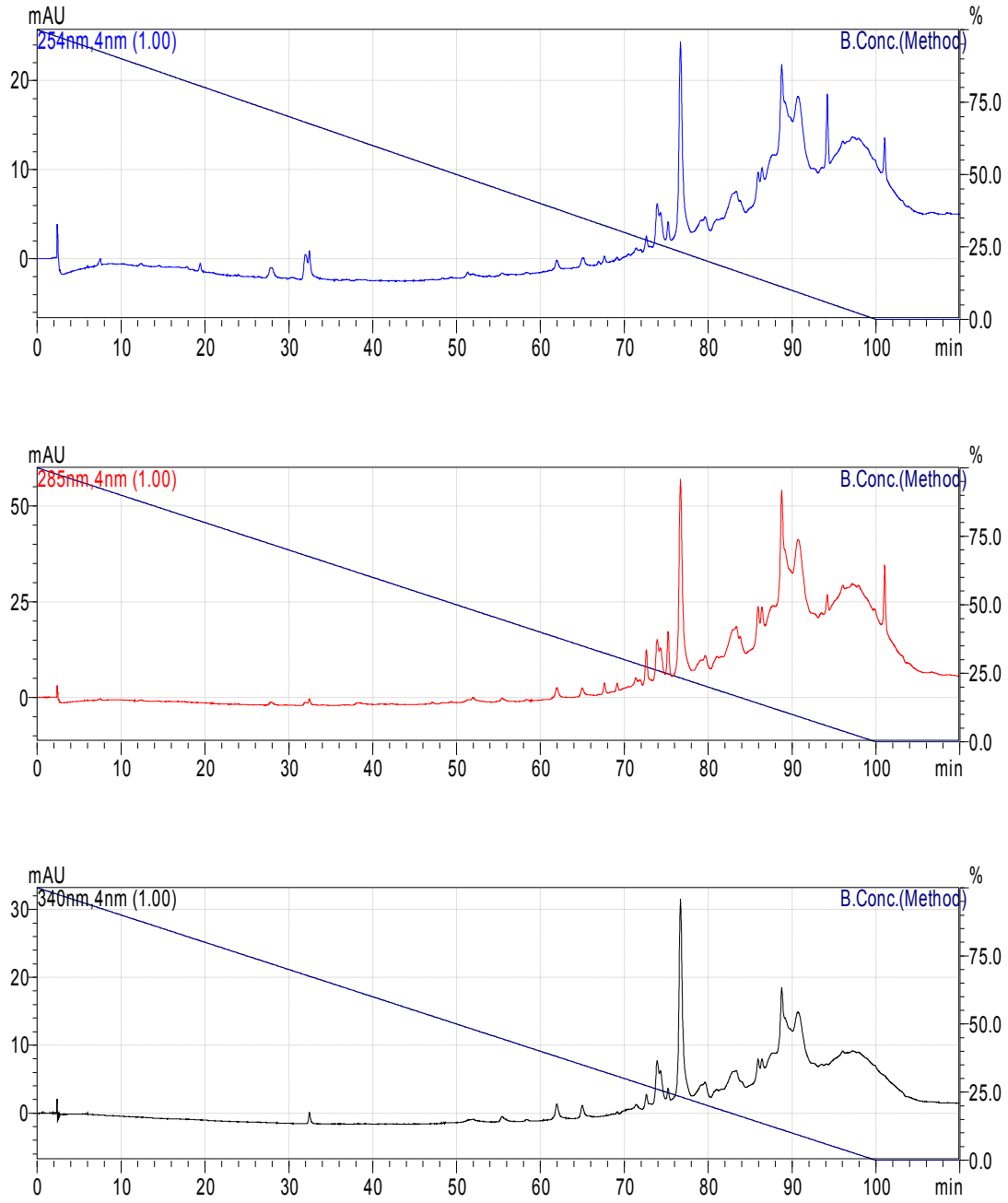


Abbildung 12 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 7



Die 7 Sub-Fraktionen wurden unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, dadurch standen uns ca. 60mg der Fraktion 2 zur Verfügung. Sub-Fraktion 2 wurde des Weiteren mittels Säulenchromatographie fraktioniert, um eine bessere Trennung zu erreichen. Sie wurde in 1,5ml Methanol gelöst, aber nur 0,5 ml wurden auf dieselbe Säule aufgetragen. Zur Elution wurde ebenfalls Methanol eingesetzt. Bei diesem Versuch wurde das Zeitintervall von 20min auf 5min verkürzt, um eine bessere Trennung zu gewährleisten. Dadurch erhielten wir 9 Unterfraktionen von Sub-Fraktion 2.
Da die Farbe der Sub-Fraktion 2 Rosa war, bewegte sich das Farbschema der Unterfraktionen zwischen hellem Gelb und hellem Rosa.

Wie in den **Abbildungen 13** bis **21** erkennbar, ist eine gute Auftrennung und Substanzanreicherung in den einzelnen Unterfraktionen von Sub-Fraktion 2 gelungen.
Deshalb wurde diese Methode für die Aufarbeitung der neu hergestellten 100% Methanol- Fraktion verwendet.

Abbildung 13 HPLC Chromatogramme der 1. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

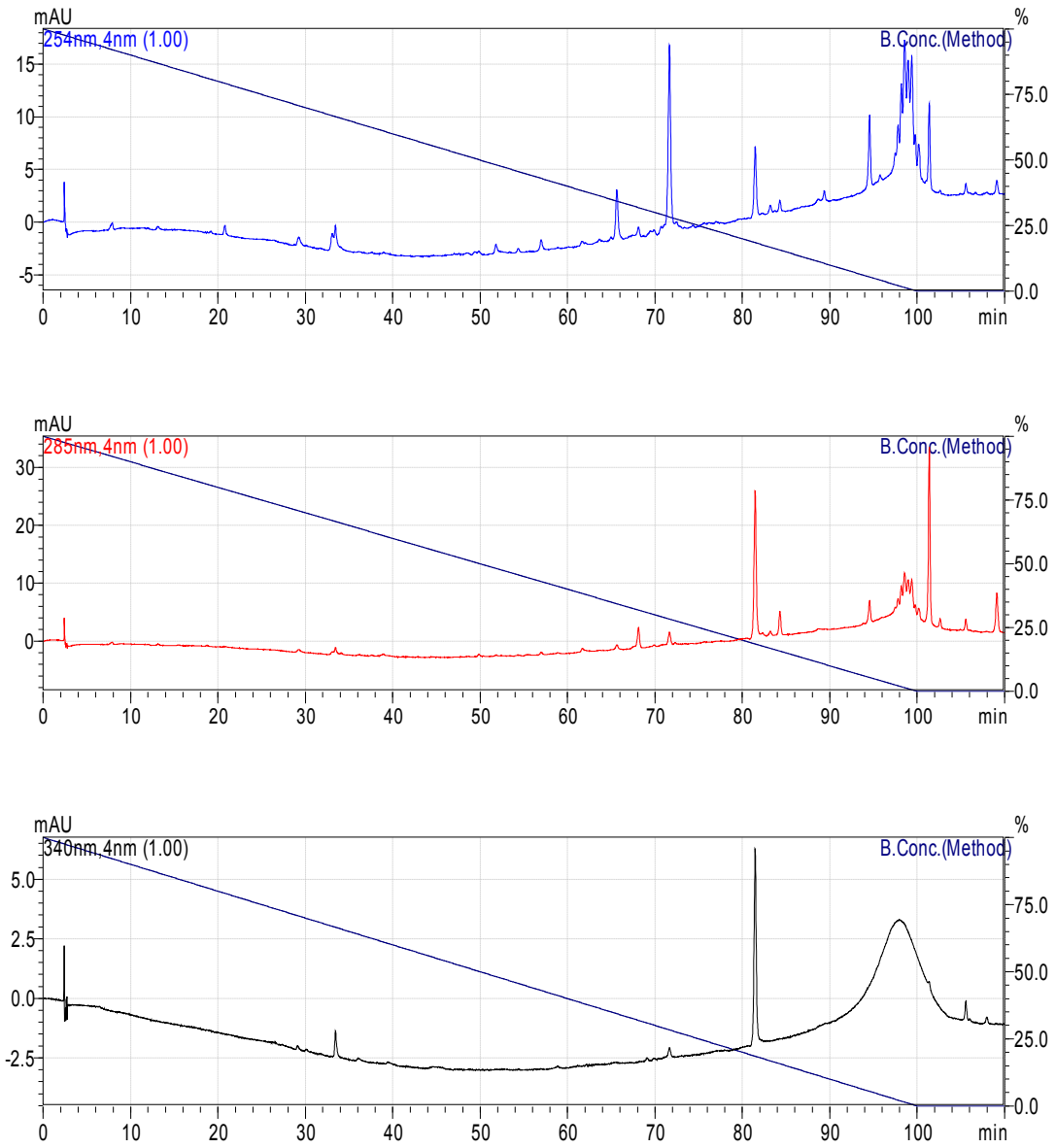


Abbildung 14 HPLC Chromatogramme der 2. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

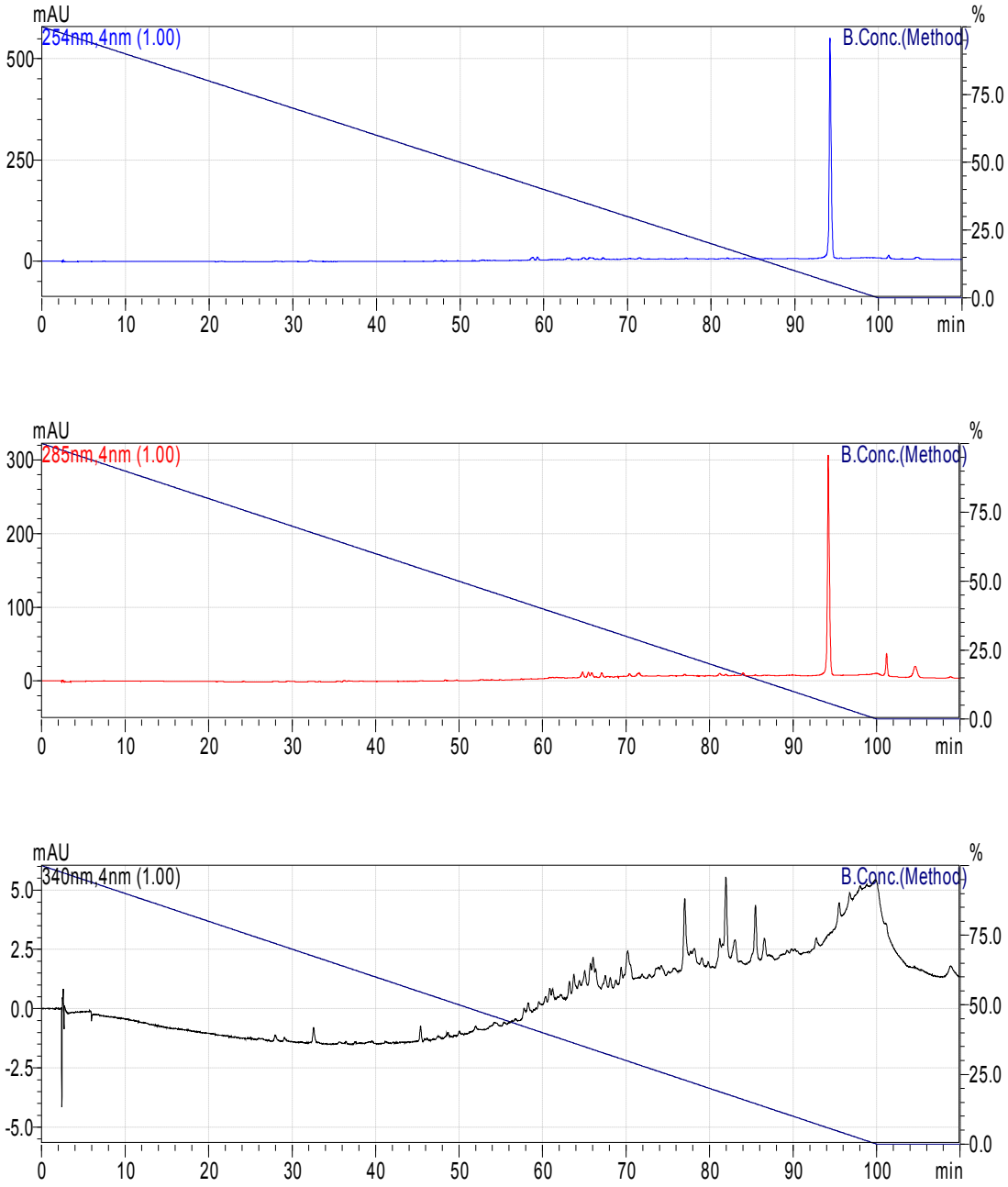


Abbildung 15 HPLC Chromatogramme der 3. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

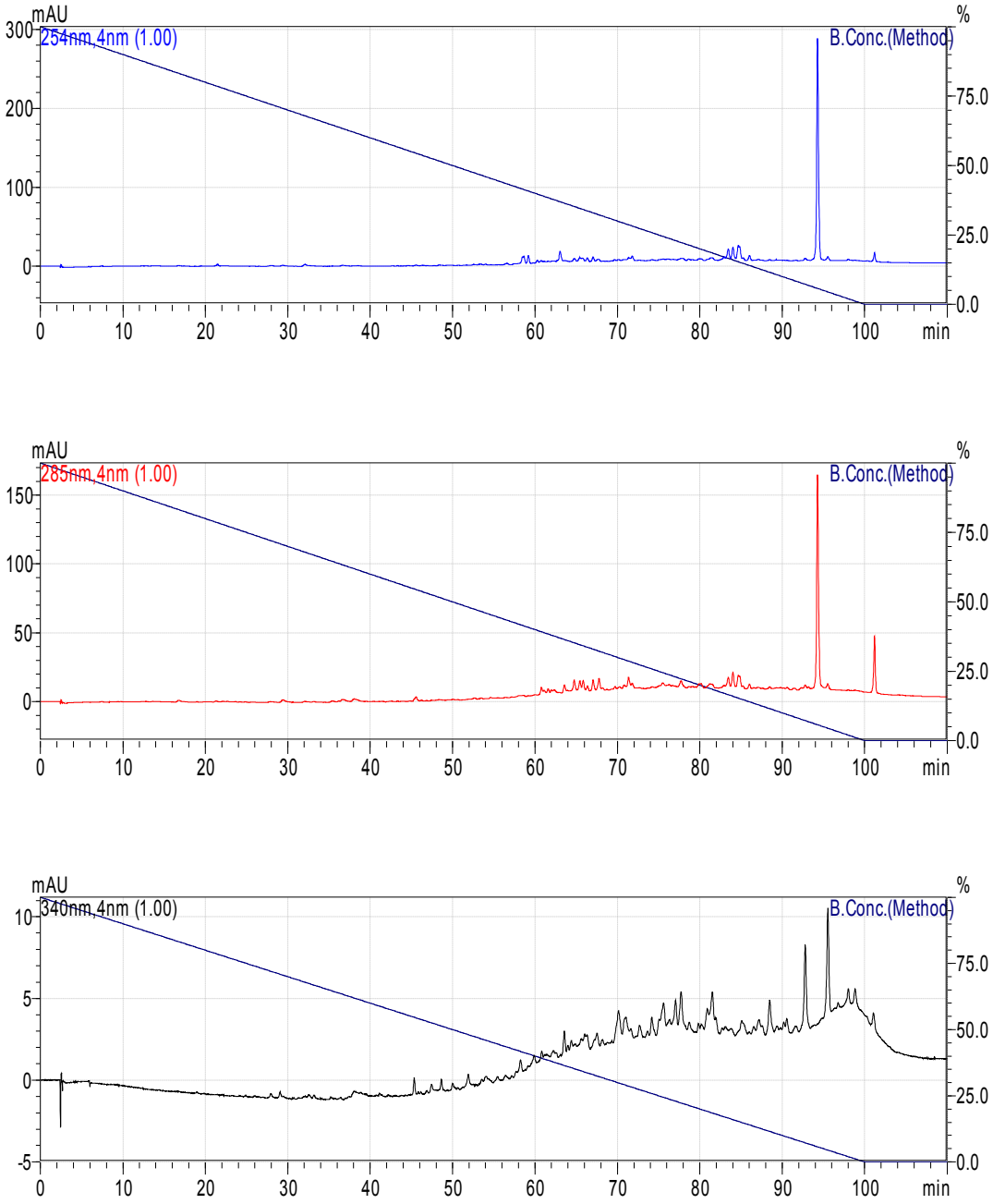


Abbildung 16 HPLC Chromatogramme der 4. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

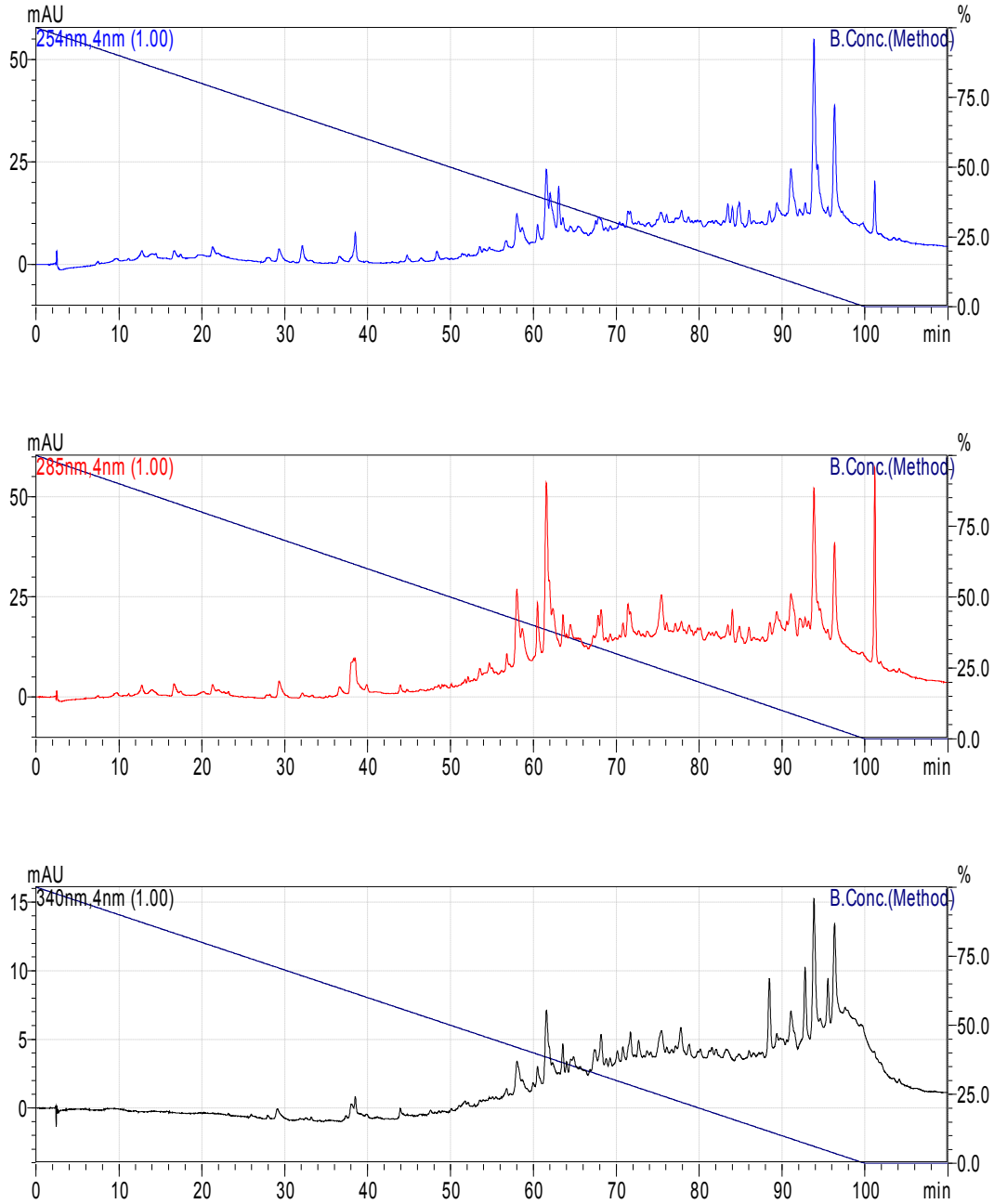


Abbildung 17 HPLC Chromatogramme der 5. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

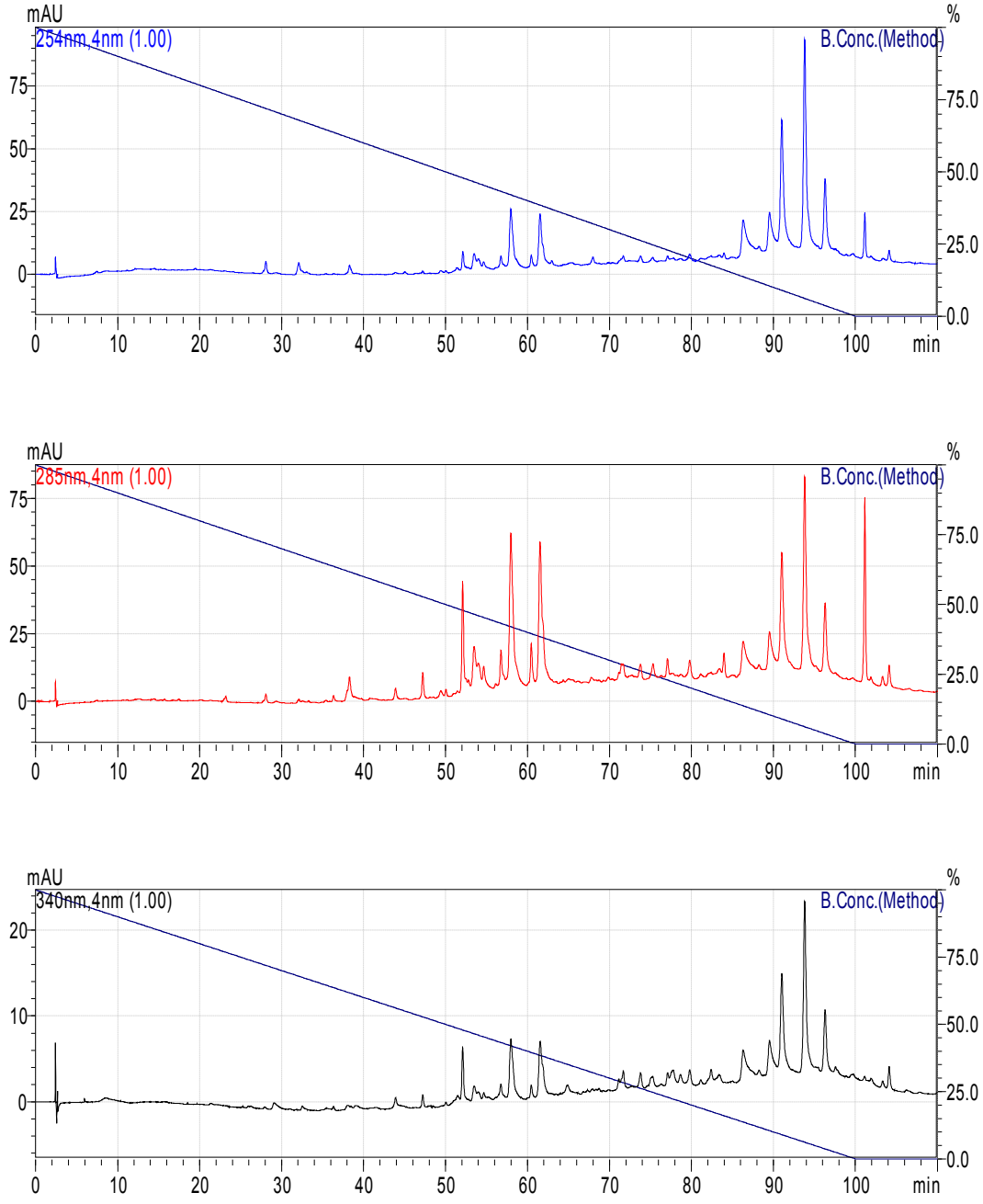


Abbildung 18 HPLC Chromatogramme der 6. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

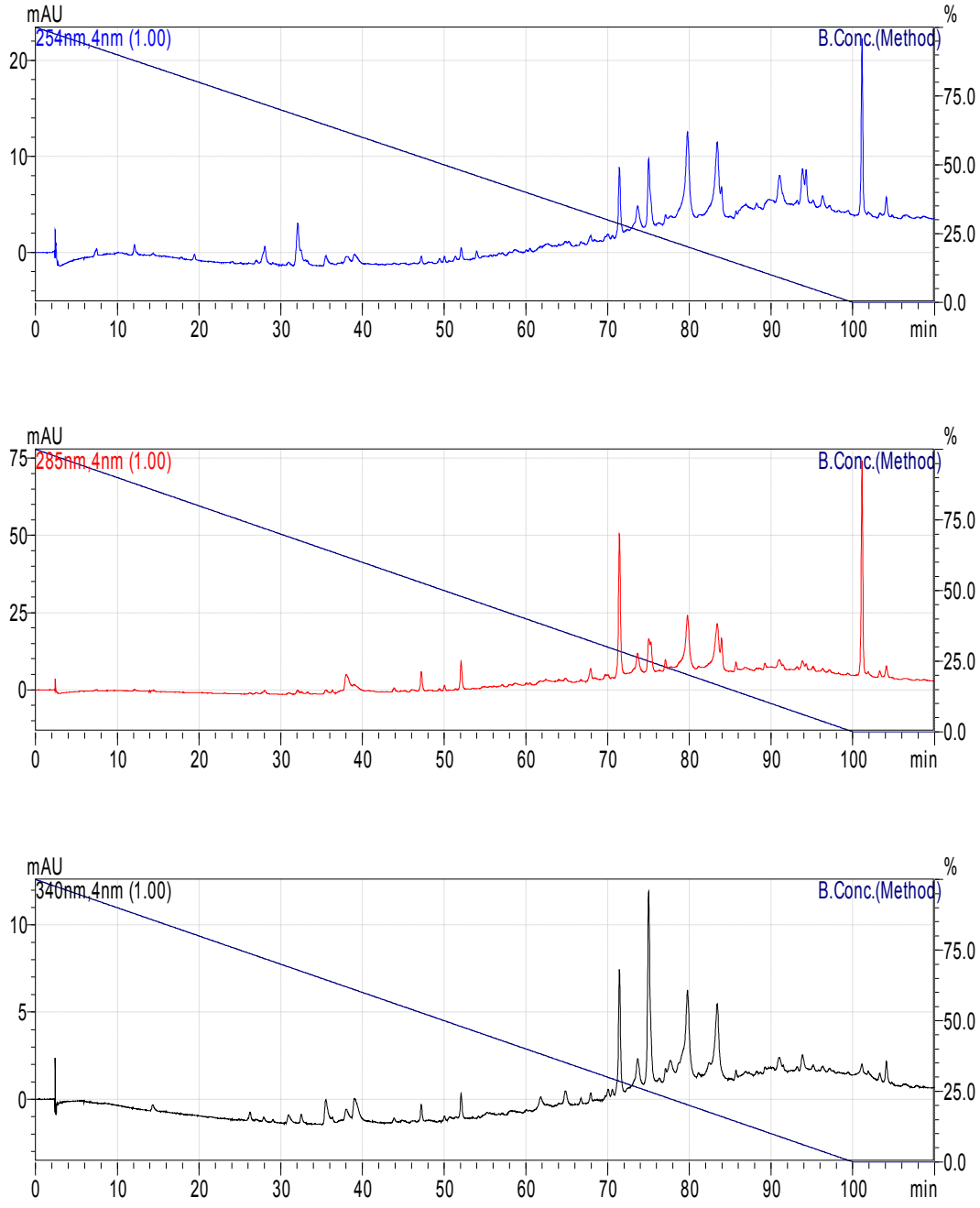


Abbildung 19 HPLC Chromatogramme der 7. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

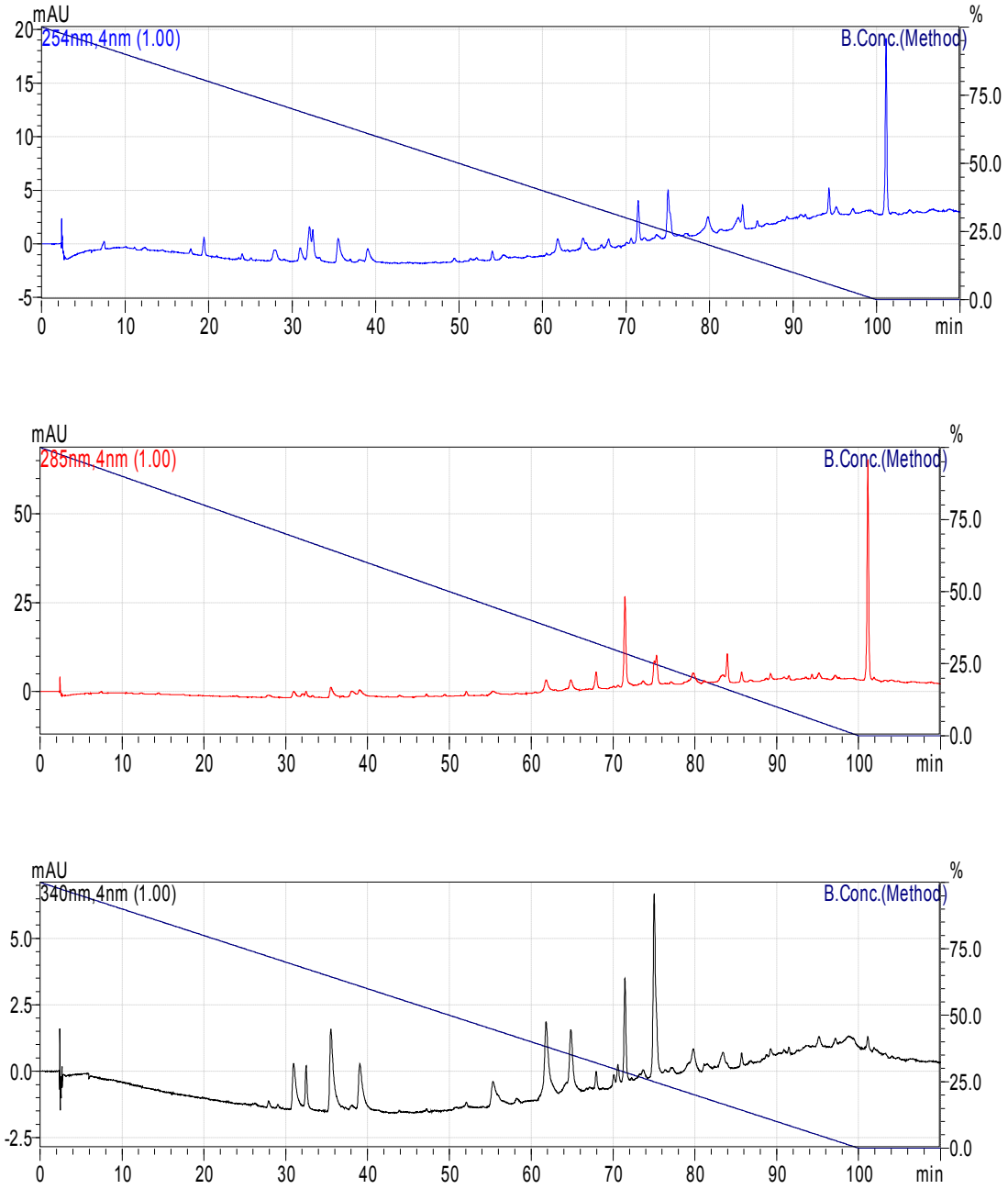


Abbildung 20 HPLC Chromatographie der 8. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

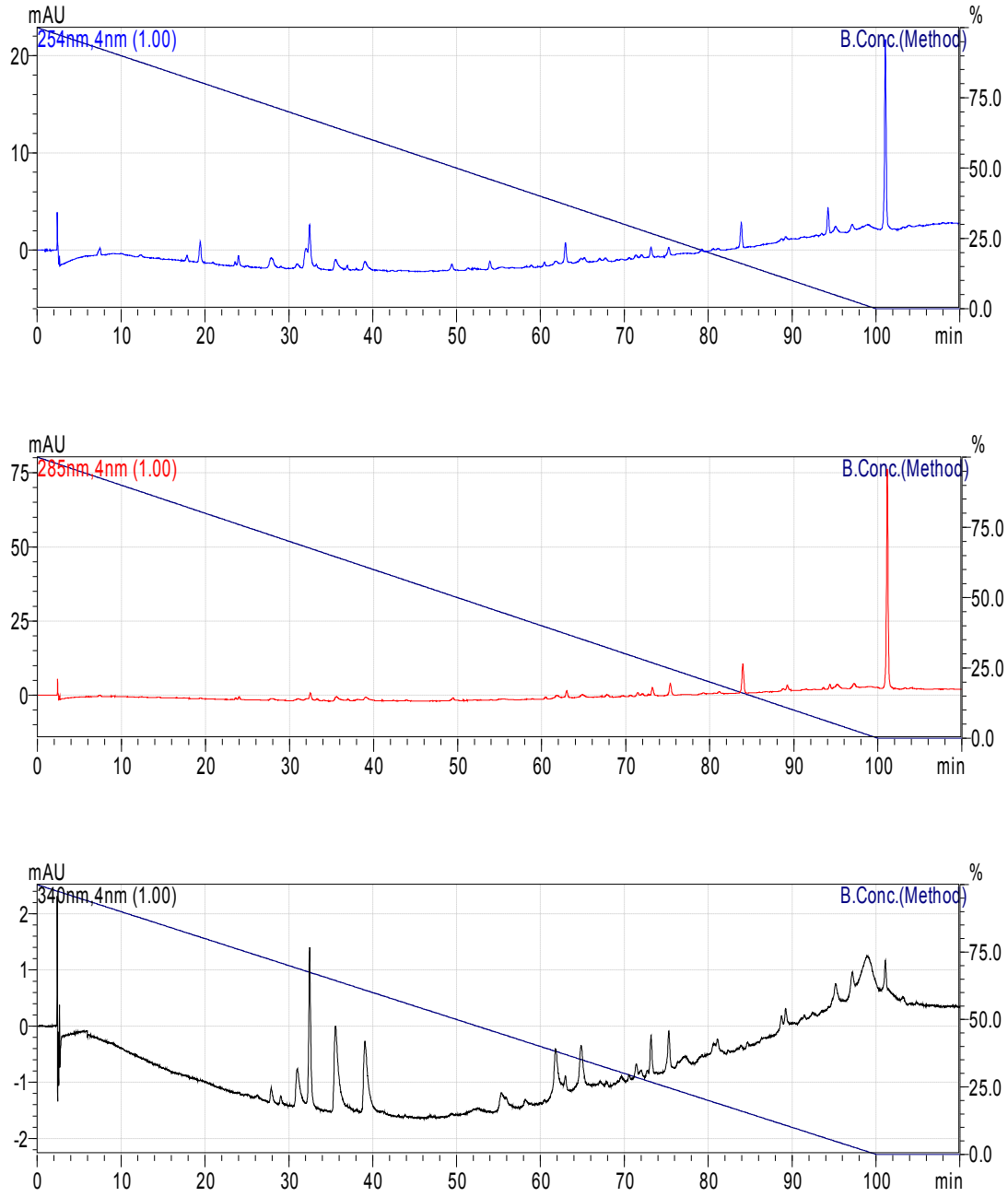
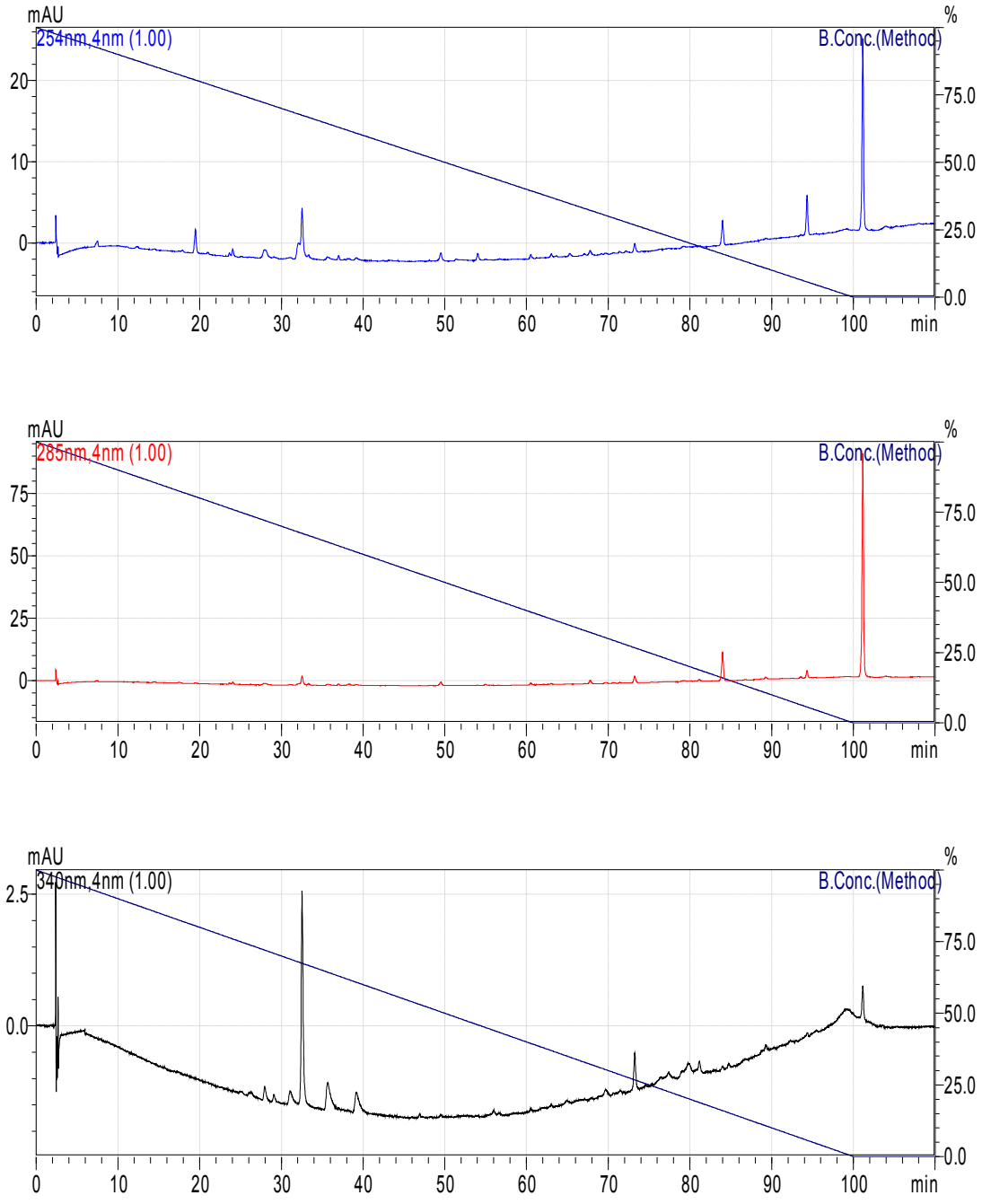


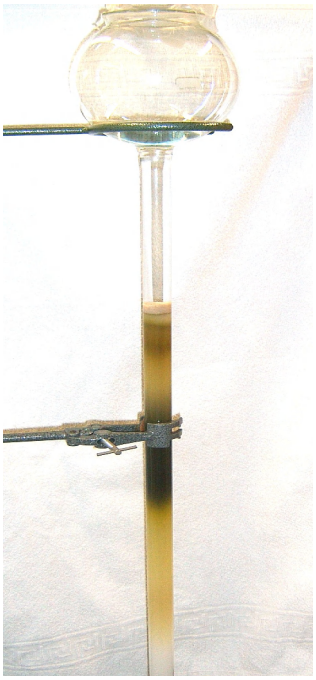
Abbildung 21 HPLC Chromatographie der 9. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2



3.5.2. Fraktionierung und Charakterisierung der 100% Methanol-Fraktion

Für die Fraktionierung der 100% Methanol-Fraktion wurde erneut Sephadex LH-20 in Methanol vorgequollen und in die etwas größere Säule gefüllt (**Abbildung 22**). Weitere Parameter sind in Kap. 2.2.5. unter Säule B angeführt.

Abbildung 22 Säulenchromatographie [7] an Sephadex zur Auftrennung der 100% Methanol-Fraktion



Die Ausbeute der 100% Methanol-Fraktion betrug wie schon erwähnt, 1,41g. Diese Menge war viel zu groß, um sie in einem Durchlauf auf die Sephadex-Säule aufzutragen. Deshalb wurde beschlossen, diese in 3 Durchläufen zu fraktionieren, indem je 440mg in 100% Methanol gelöst wurden. Die dadurch entstandenen braunen Lösungen wurde auf die Säule aufgetragen und mittels Methanol eluiert.

Leider erhielten wir nicht immer gleich viele und gleich große Fraktionen. Die Fraktionsmengen variierten zw. 29 und 37 Subfraktionen. Das

Farbschema der Sub-Fraktionen war entsprechend der Vorversuche und variierte zwischen Gelb, Orange, Rosa und Rot. Alle Sub-Fraktionen wurden unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Ausgesuchte Sub-Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC zur Kontrolle der Trennung und Substanzanreicherung herangezogen. Anhand von HPLC Chromatogrammen konnte erkannt werden, dass sowohl die Trennung der Peaks, als auch die Substanzanreicherung erfolgreich waren. Bei manchen Sub-Fraktionen konnte festgestellt werden, dass diese viele Substanzen in sehr geringen Mengen enthielten (**Abbildung 26**).

In den folgenden **Abbildungen 23** bis **33** sind ausgewählte HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktionen nach Auftrennung der 100% Methanol-Fraktion zu sehen, welche die Anreicherung der Substanzen demonstrieren.

Abbildung 23 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 1

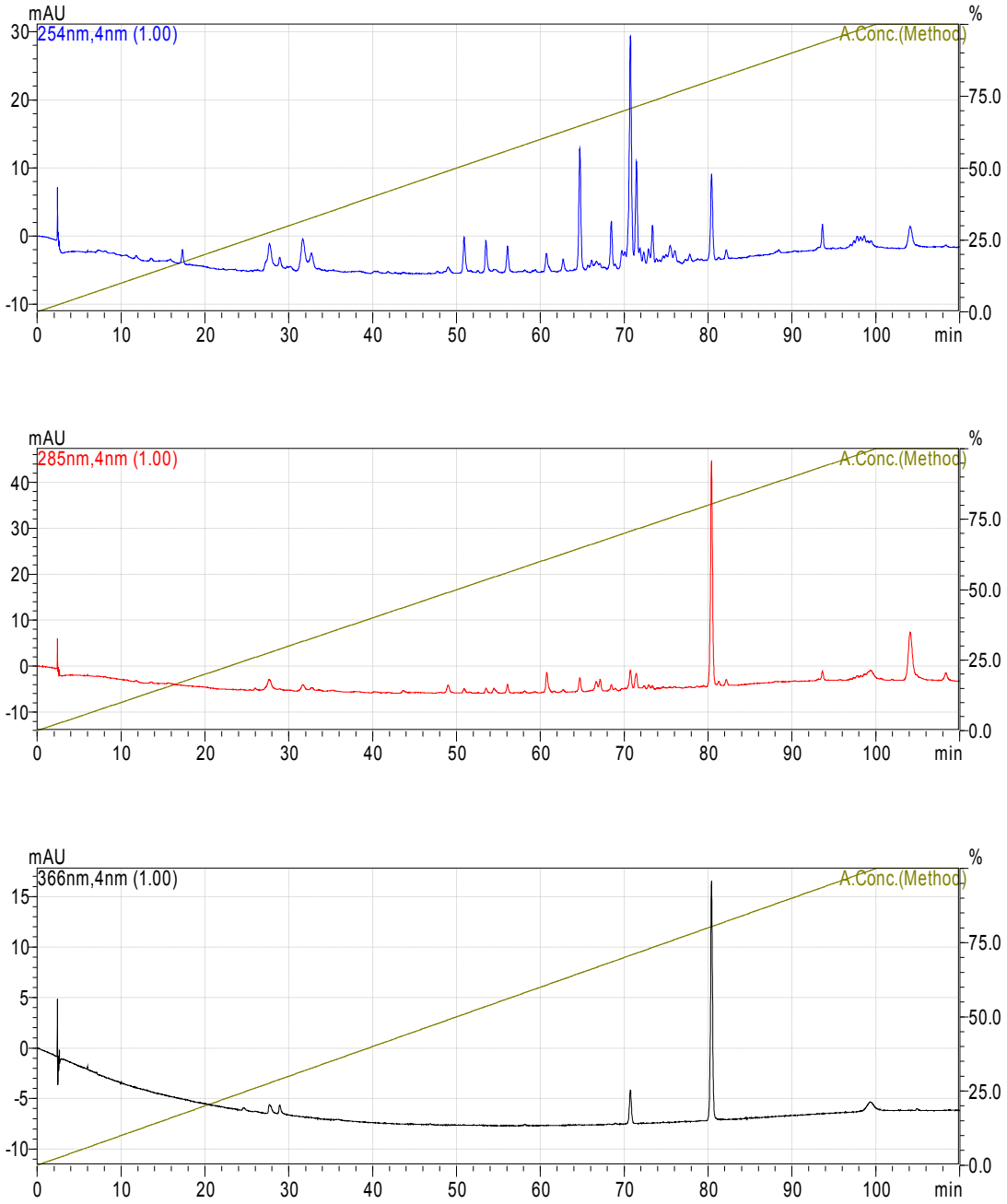


Abbildung 24 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 3

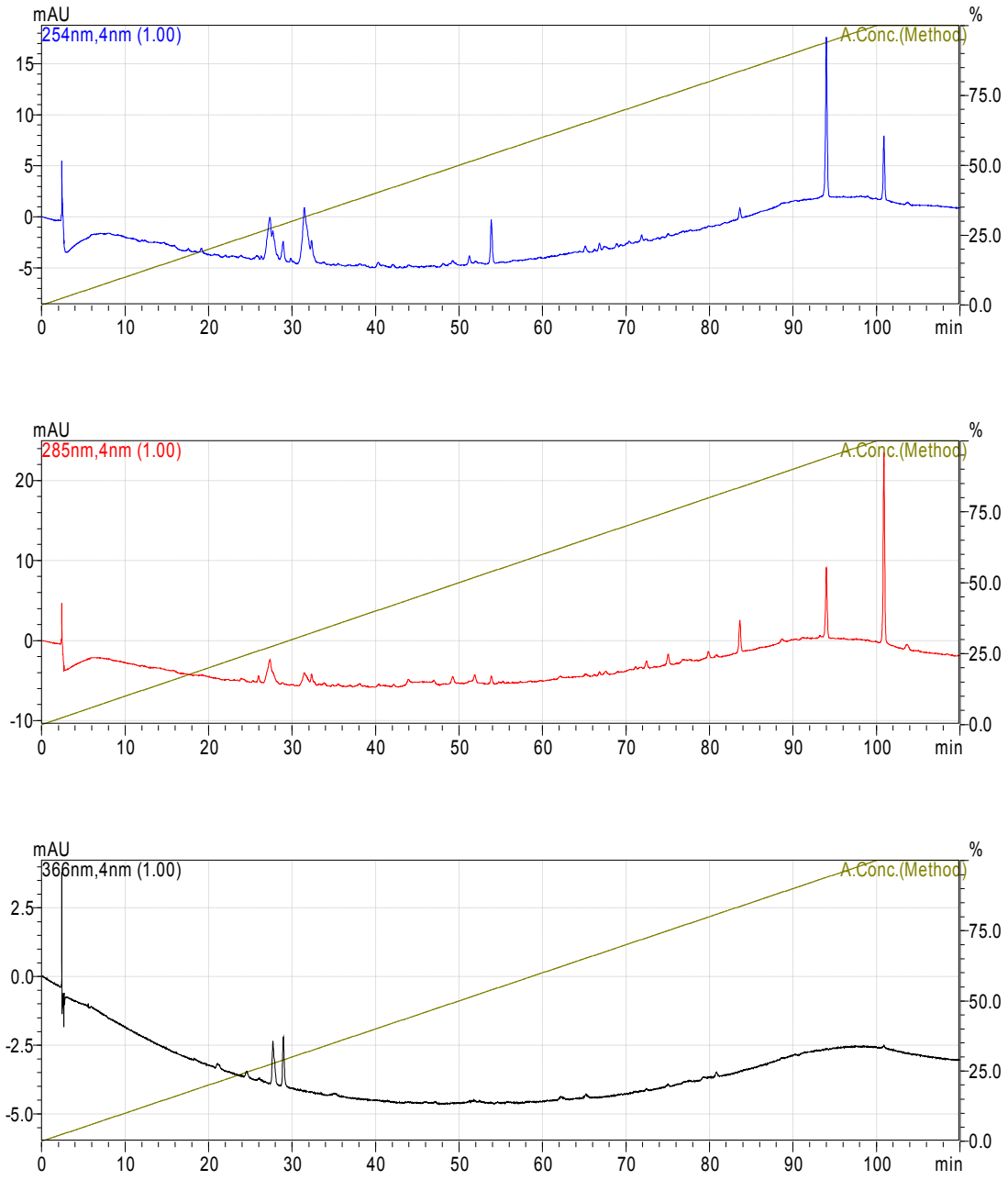


Abbildung 25 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 8

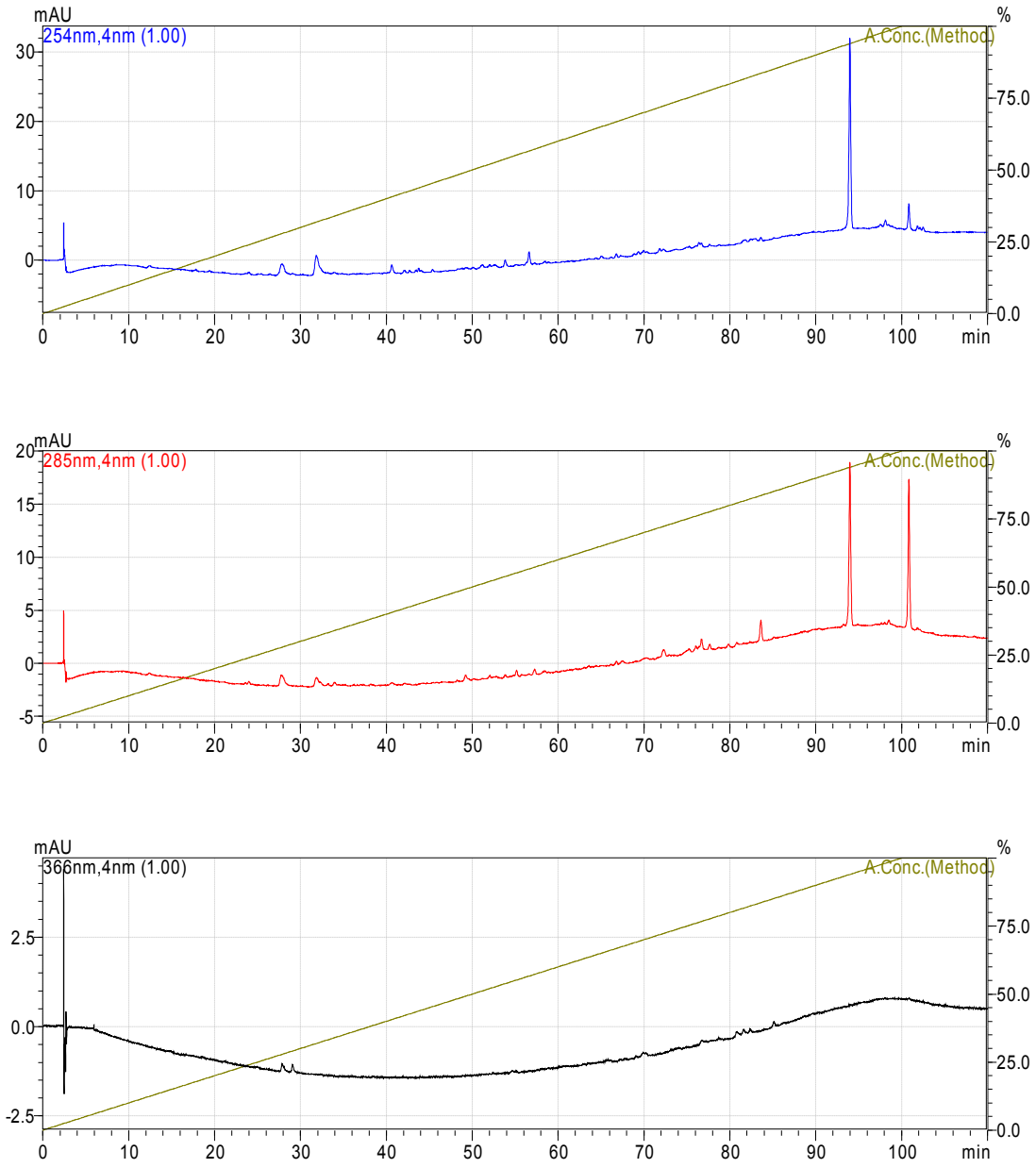


Abbildung 26 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 10

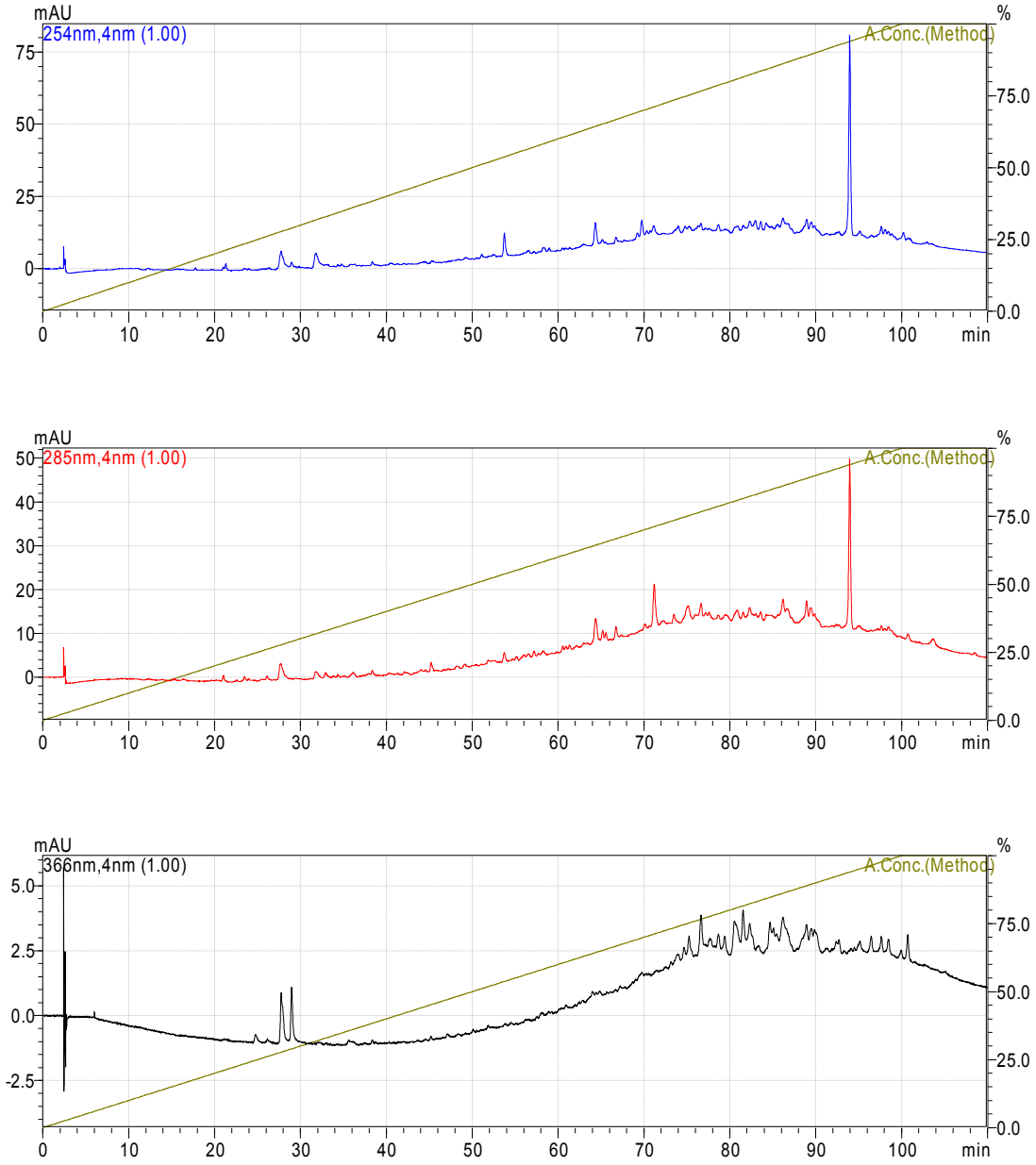


Abbildung 27 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 14

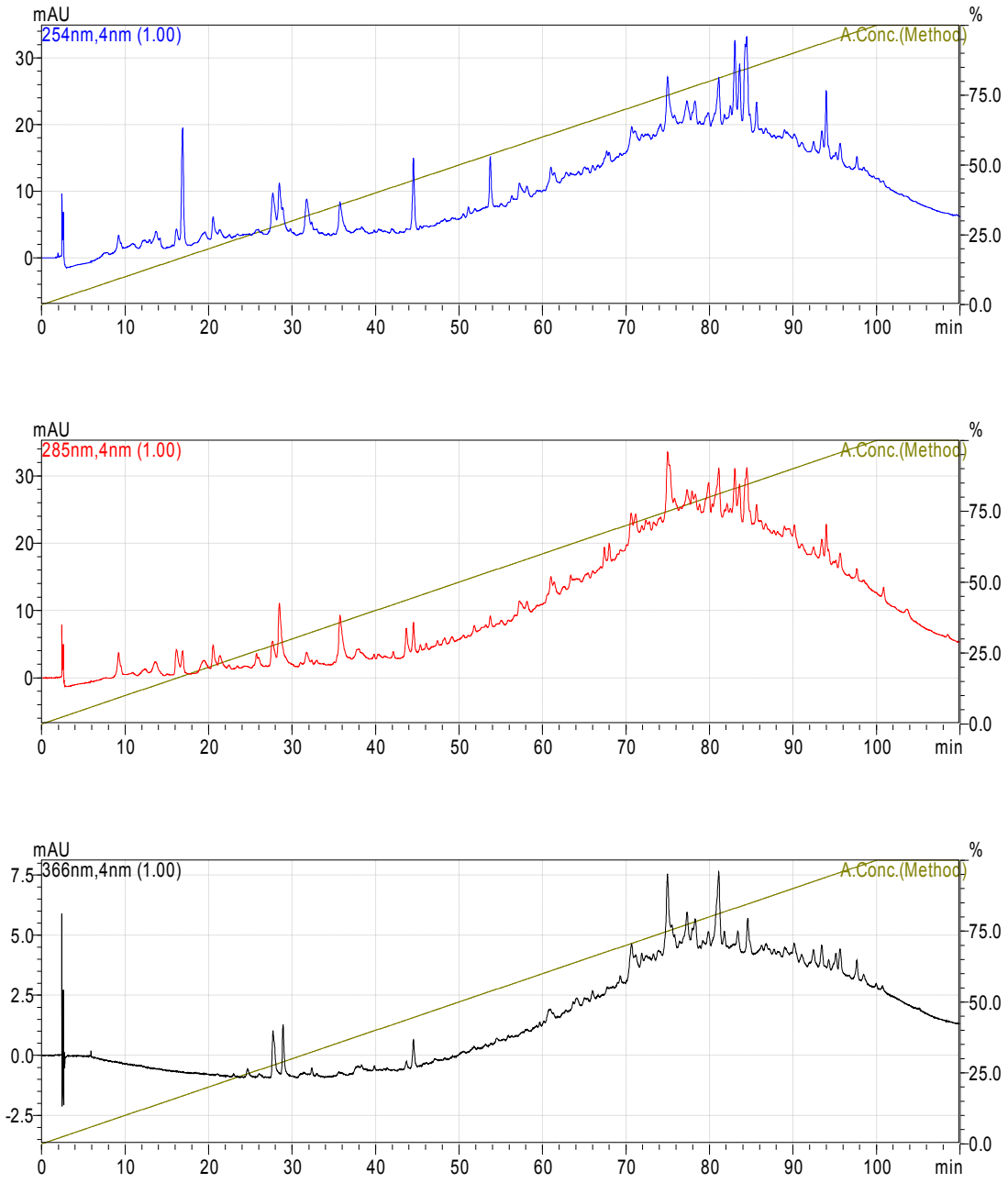


Abbildung 28 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 16

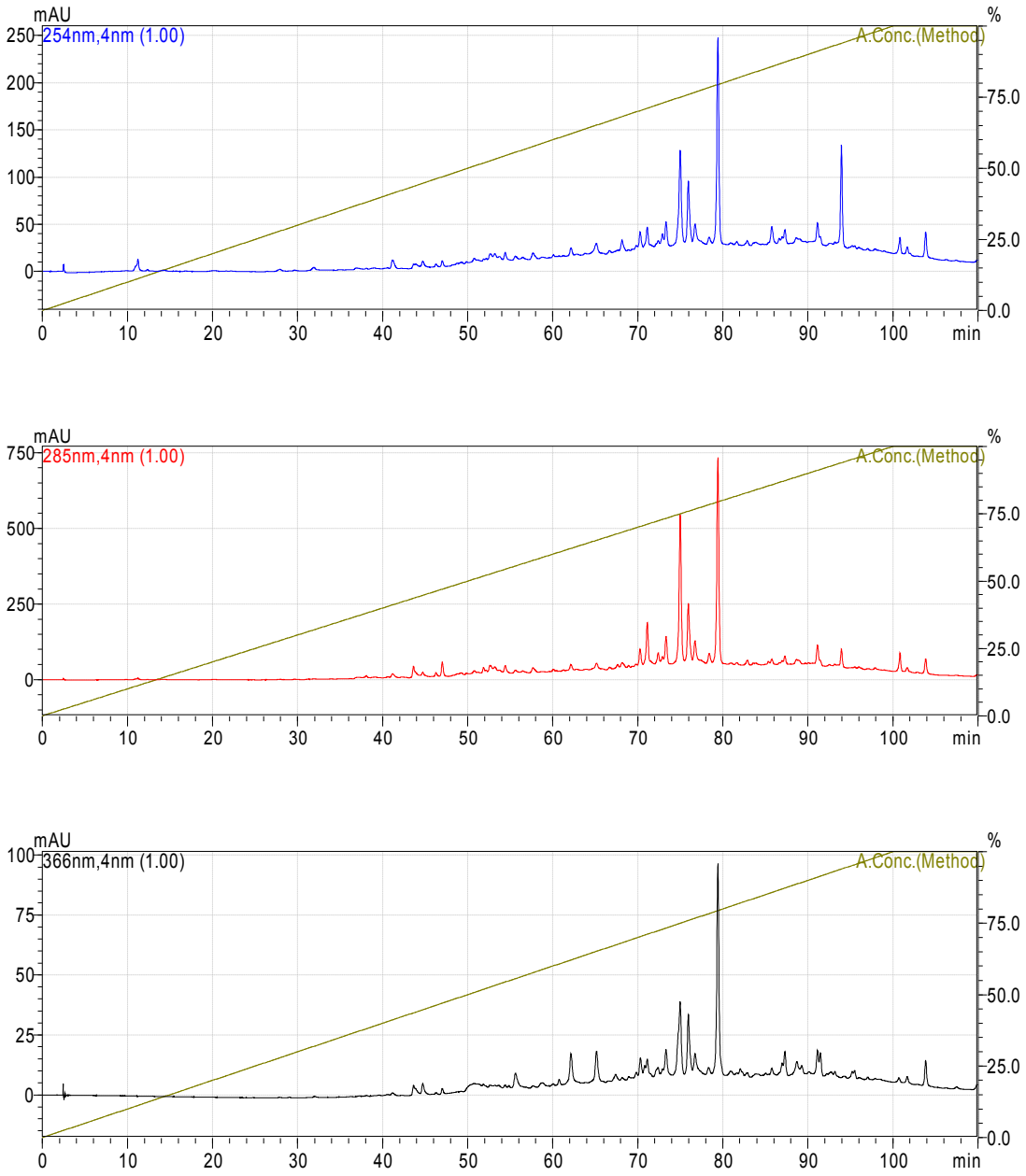


Abbildung 29 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 18

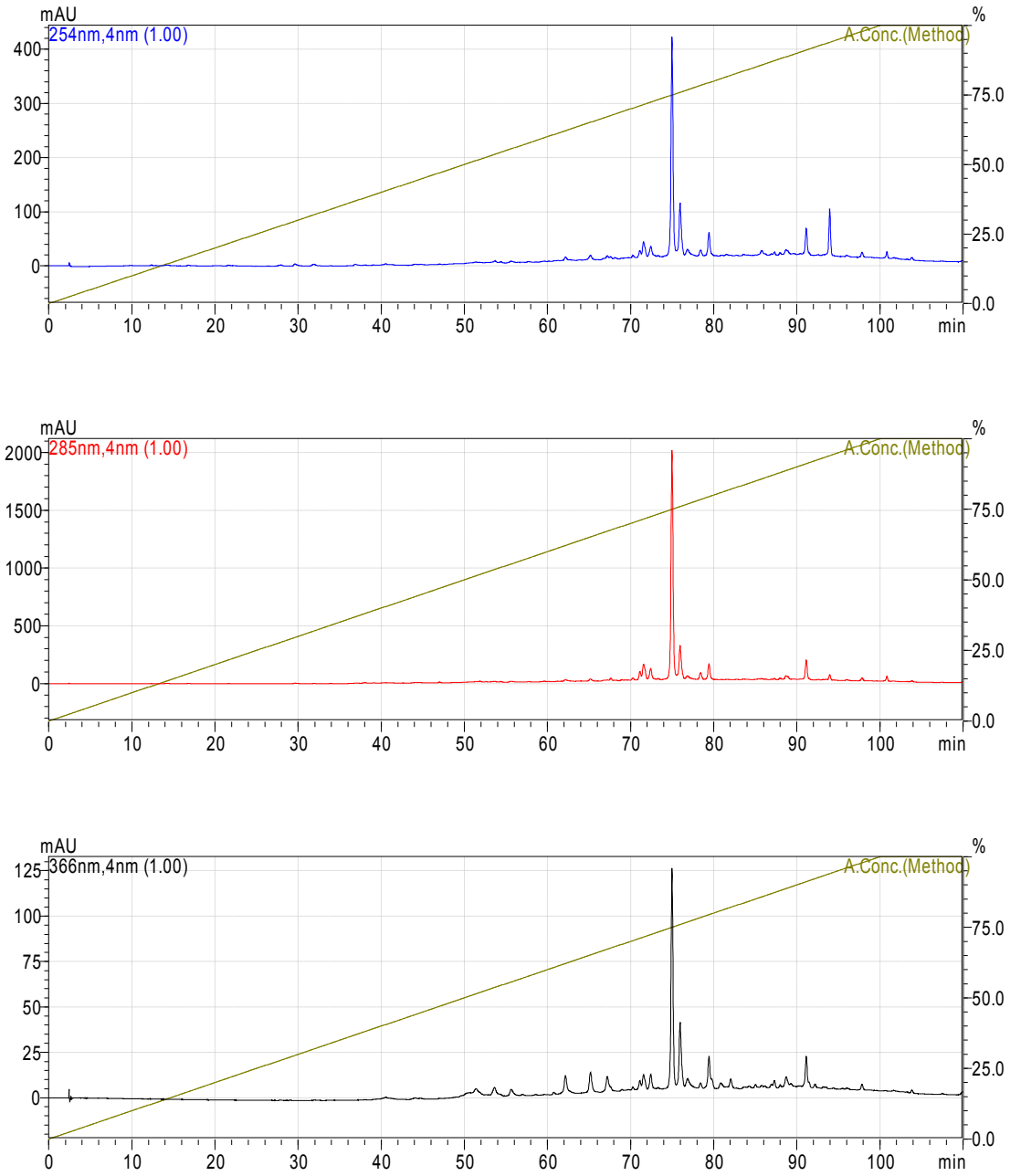


Abbildung 30 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 22

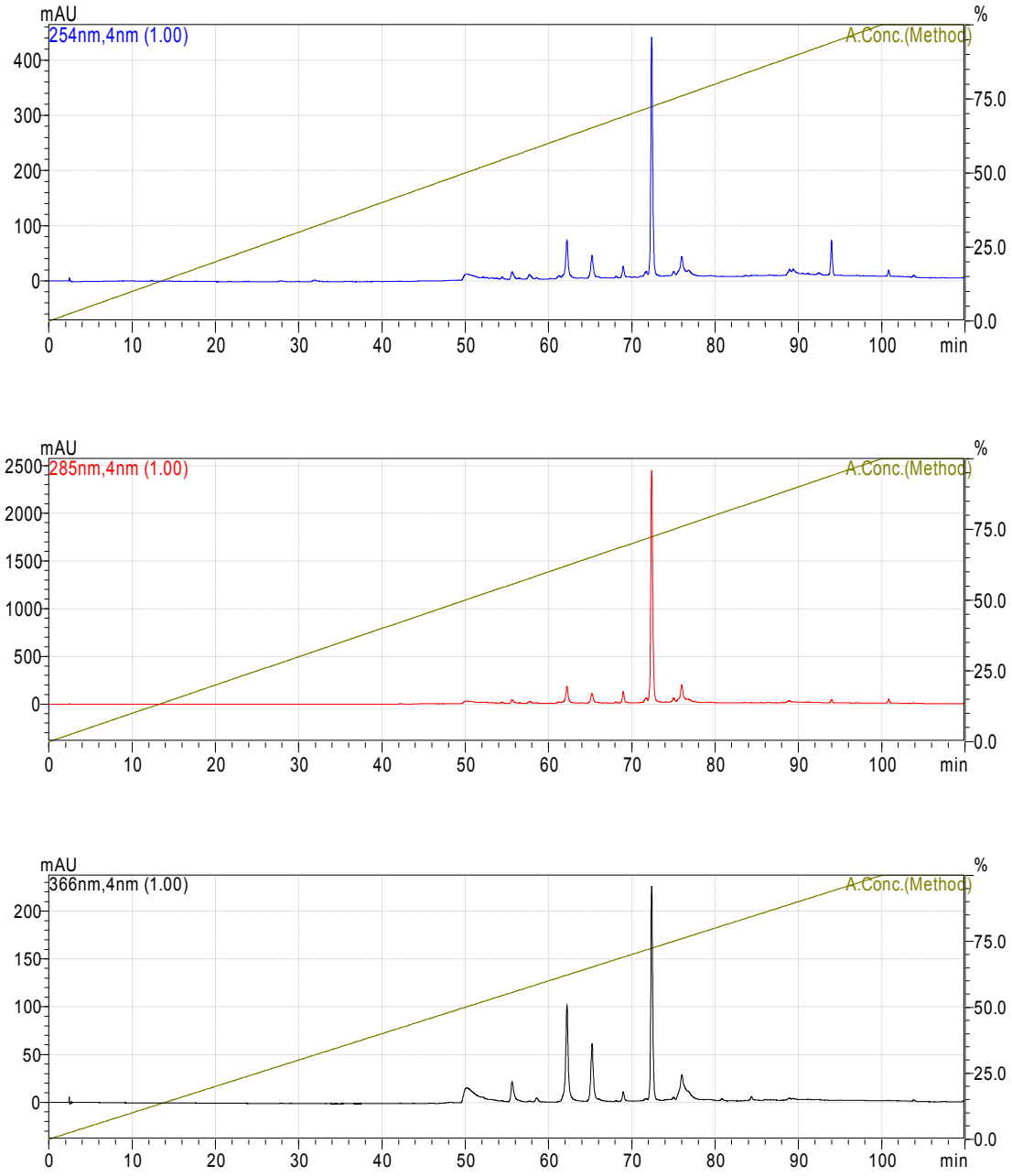


Abbildung 31 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 26

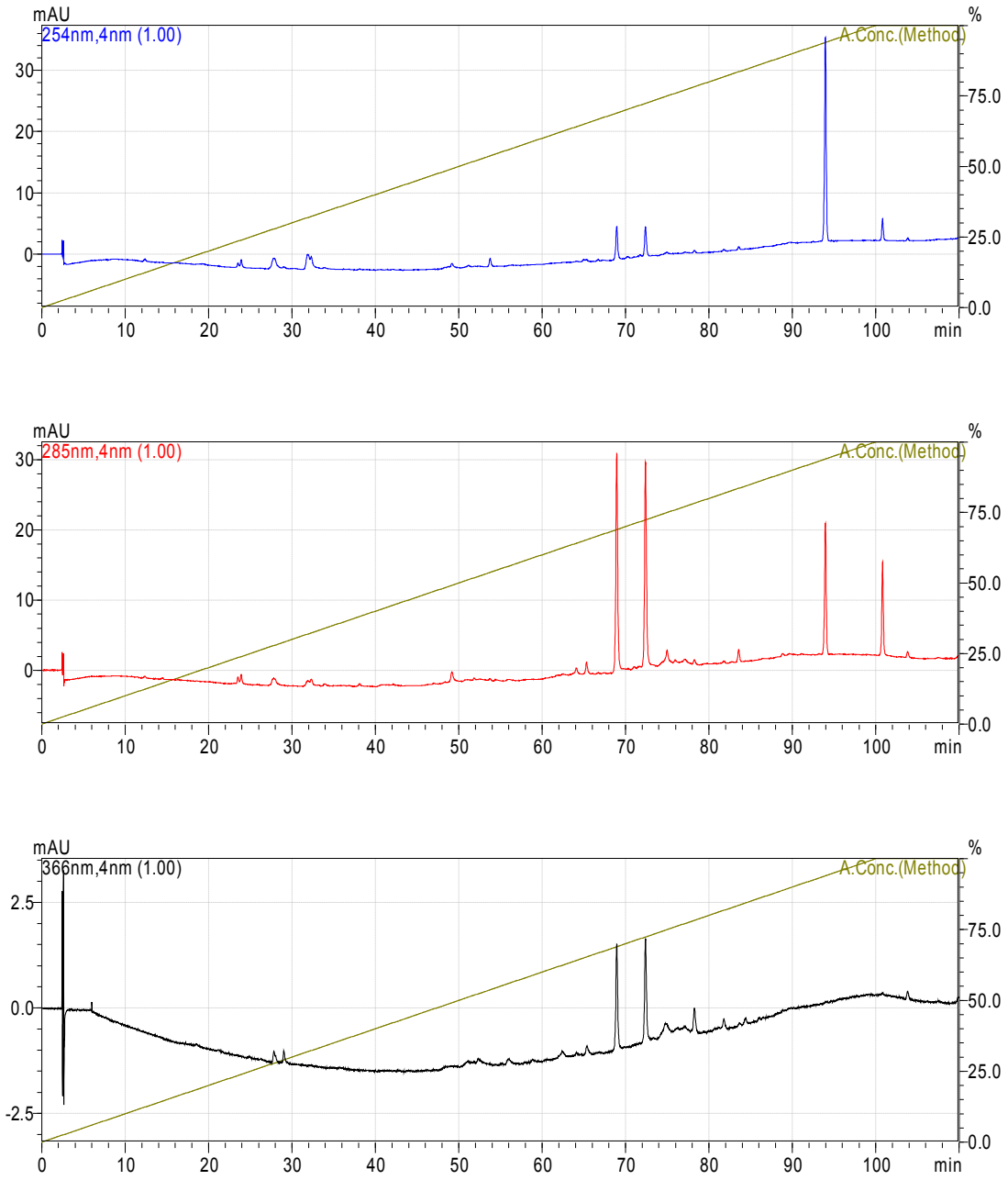


Abbildung 32 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 31

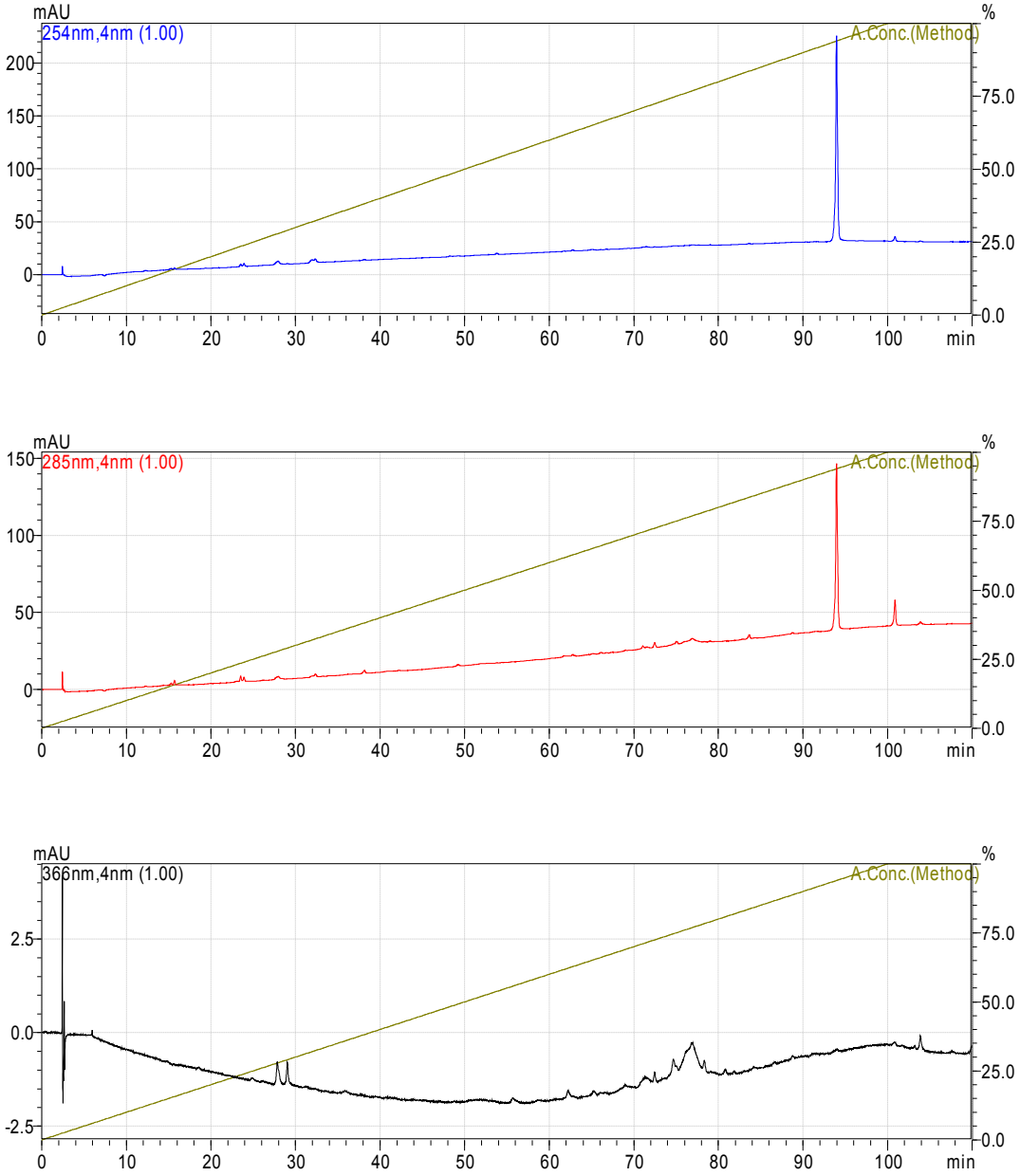
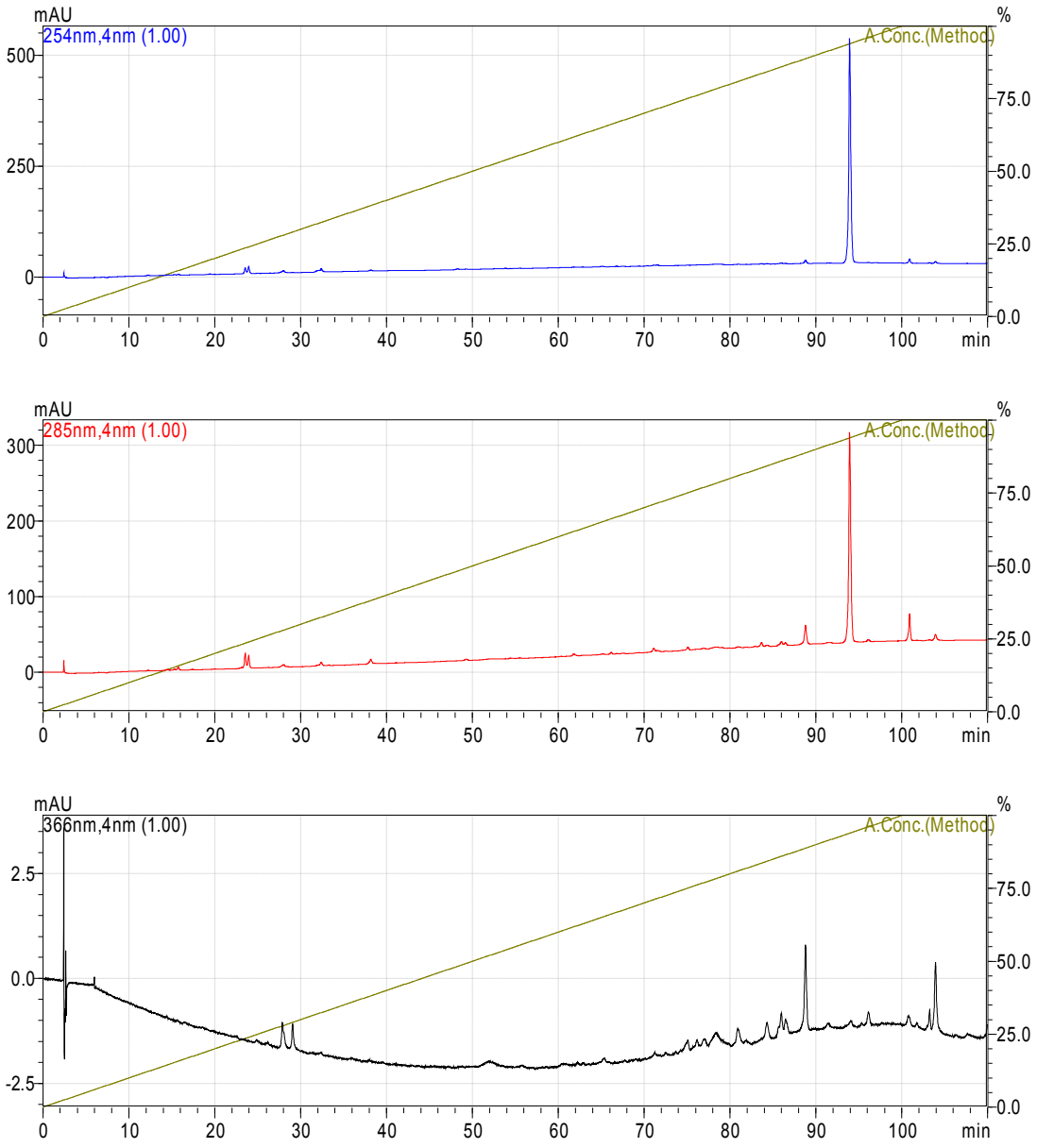


Abbildung 33 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 34



Zur Charakterisierung der Inhaltstoffe der Sub-Fraktionen, aber auch um ein komplettes Bild zu erhalten, wurden ausgewählte Sub-Fraktionen der drei Durchläufe mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Dafür wurde das bewährte System verwendet (**Tabelle 1**, Kapitel 2.2.1). In den **Abbildungen 34** und **35** sieht man Beispiele für die gelungene Trennung.

Abbildung 34 DC der SPE- Fraktion mit 100% Methanol mit ausgewählten Sub-Fraktionen (S= Sub-Fraktion)

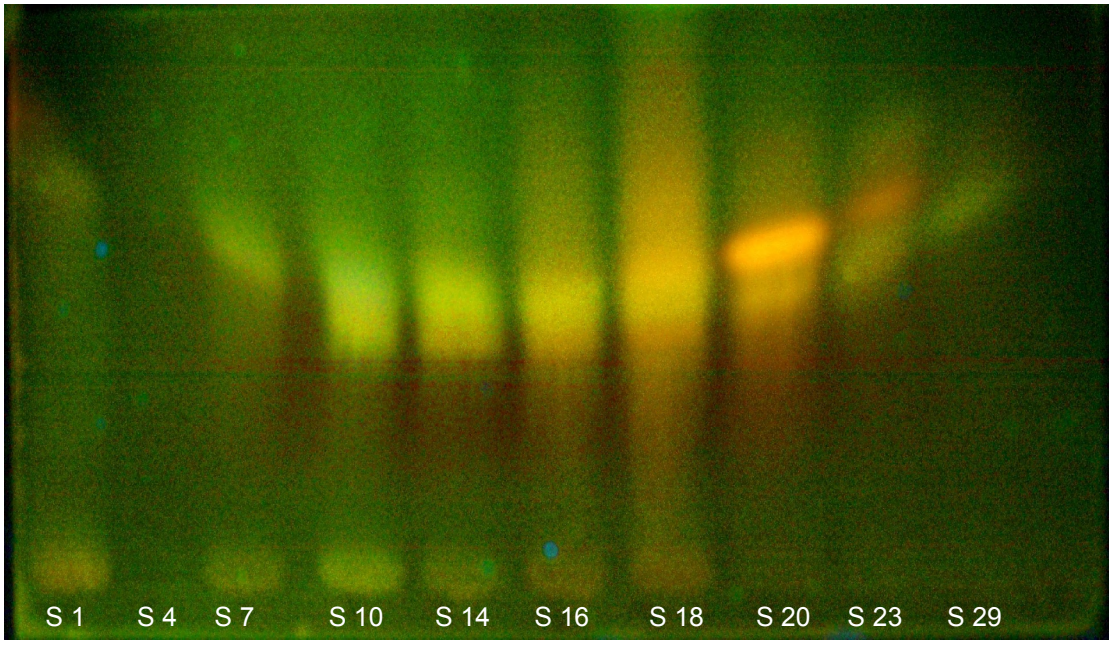
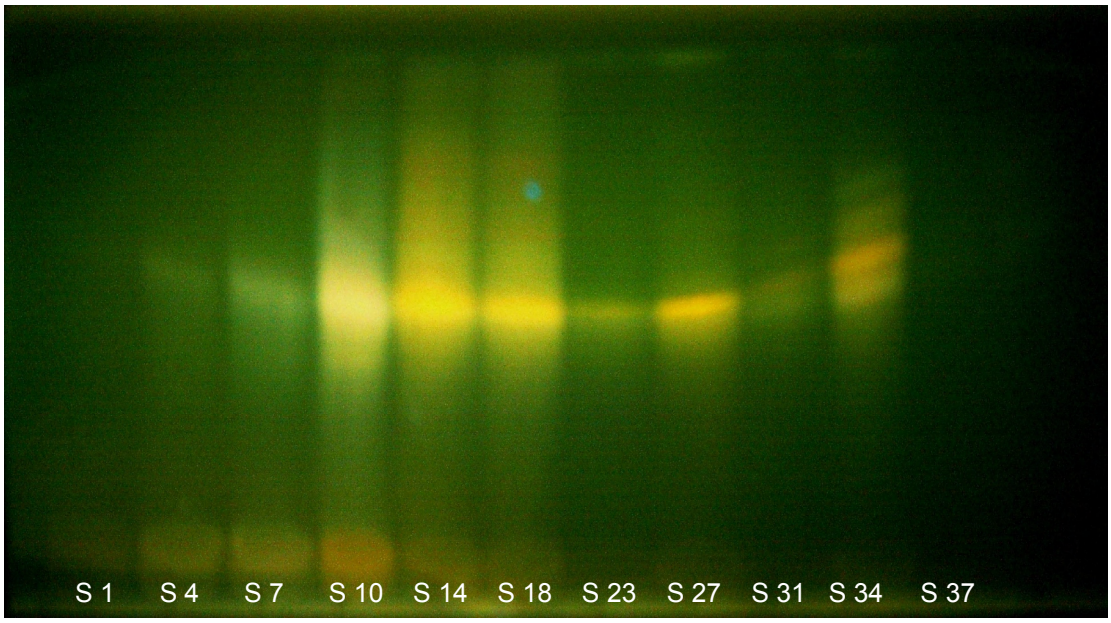


Abbildung 35 DC der SPE- Fraktion mit 100% Methanol mit ausgewählten Sub-Fraktionen (S= Sub-Fraktion)



Nach Abschluss der Säulenchromatographie an Sephadex konnte festgestellt werden, dass die Auftrennung der Substanzen erfolgreich verlaufen war. Die Sub-Fraktionen lagen jedoch in großer Menge vor. Daher mussten wir mit Hilfe der HPLC Chromatogramme und der durchgeführten Dünnschichtchromatogramme die einzelnen Sub-Fraktionen der 3 Durchläufe nach Ähnlichkeit der Inhaltstoffe vereinigen. Dieser Schritt war für die Pharmakologische Untersuchung essentiell, damit insgesamt weniger Fraktionen mit jeweils ausreichenden Mengen zur Verfügung gestellt werden konnten.

Zur näheren Charakterisierung wurden die 6 Sub-Fraktionen, die schließlich erhalten werden konnten, mittels HPLC nachgeprüft bevor sie zum Crotonöl-Mäuseohr-Ödem-Test geschickt wurden.

Ausbeuten der Sub-Fraktionen für die pharmakologische Prüfung:

Sub-Fraktion A : 154,32 mg
Sub-Fraktion B : 151,39 mg
Sub-Fraktion C : 172,76 mg
Sub-Fraktion D : 157,42 mg
Sub-Fraktion E : 46,99 mg
Sub-Fraktion F : 20,74 mg

Die **Abbildungen 36** bis **41** zeigen durchgeführte HPLC Analysen der 6 Sub-Fraktionen.

Abbildung 36 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion A

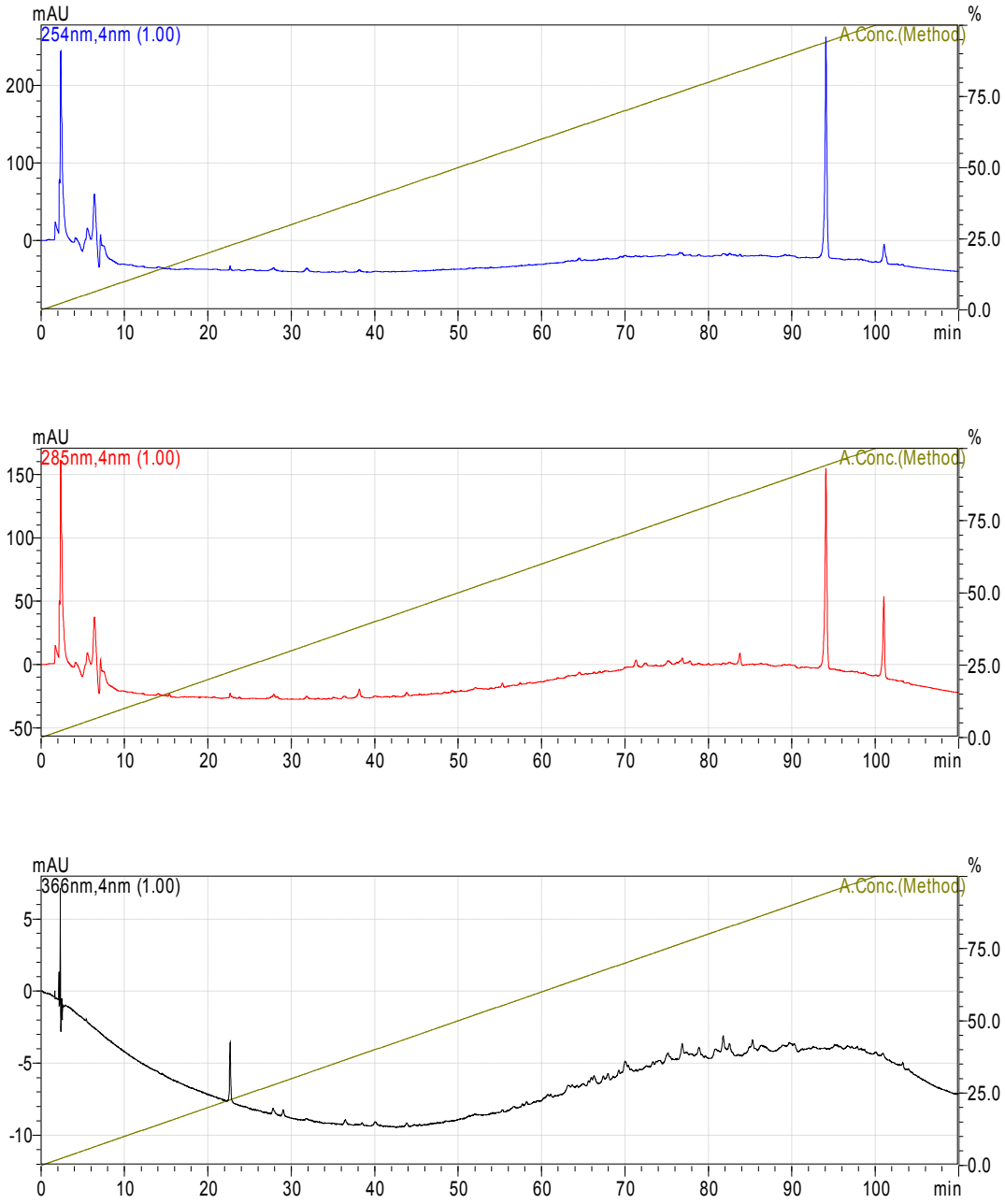


Abbildung 37 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion B

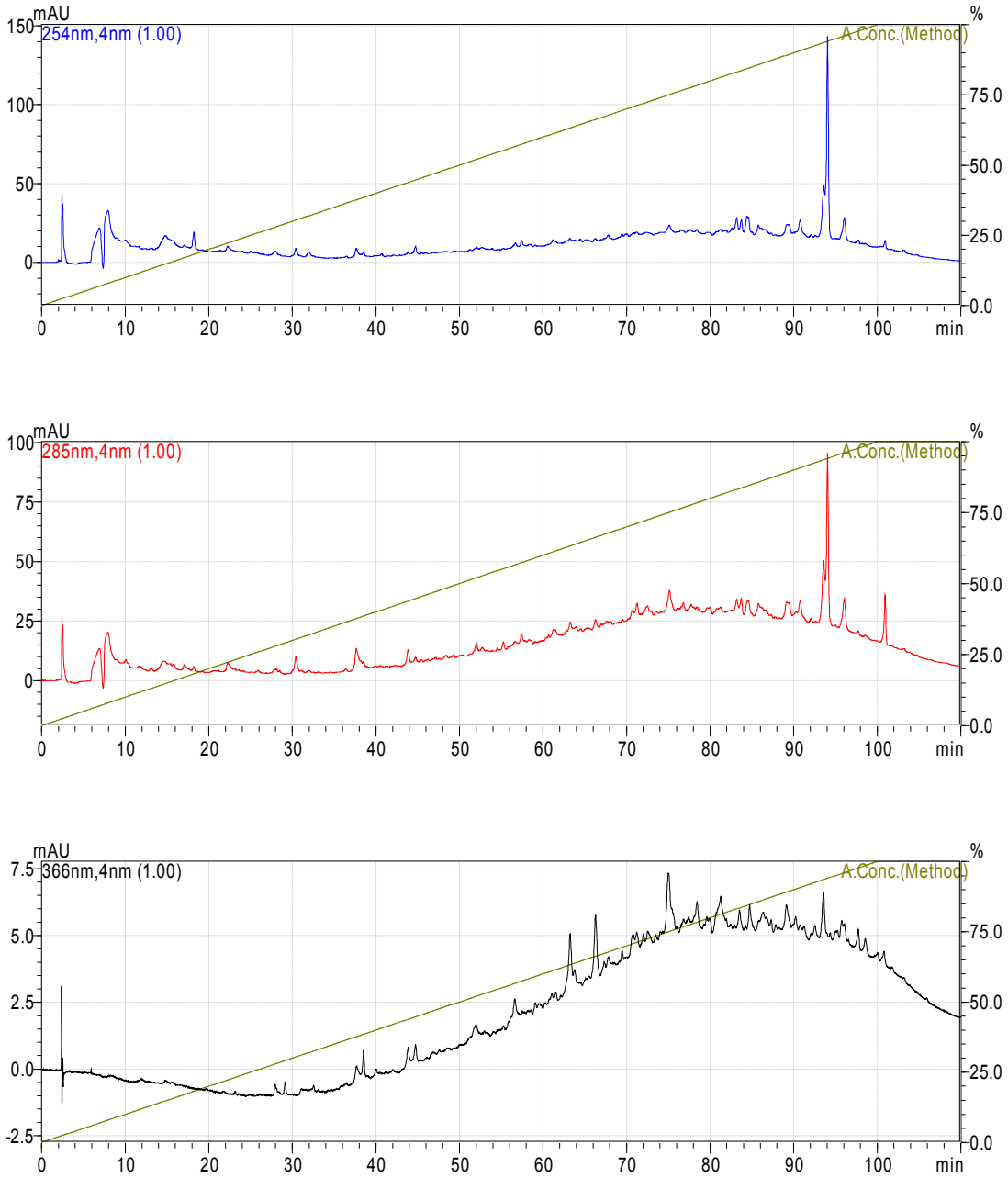


Abbildung 38 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion C

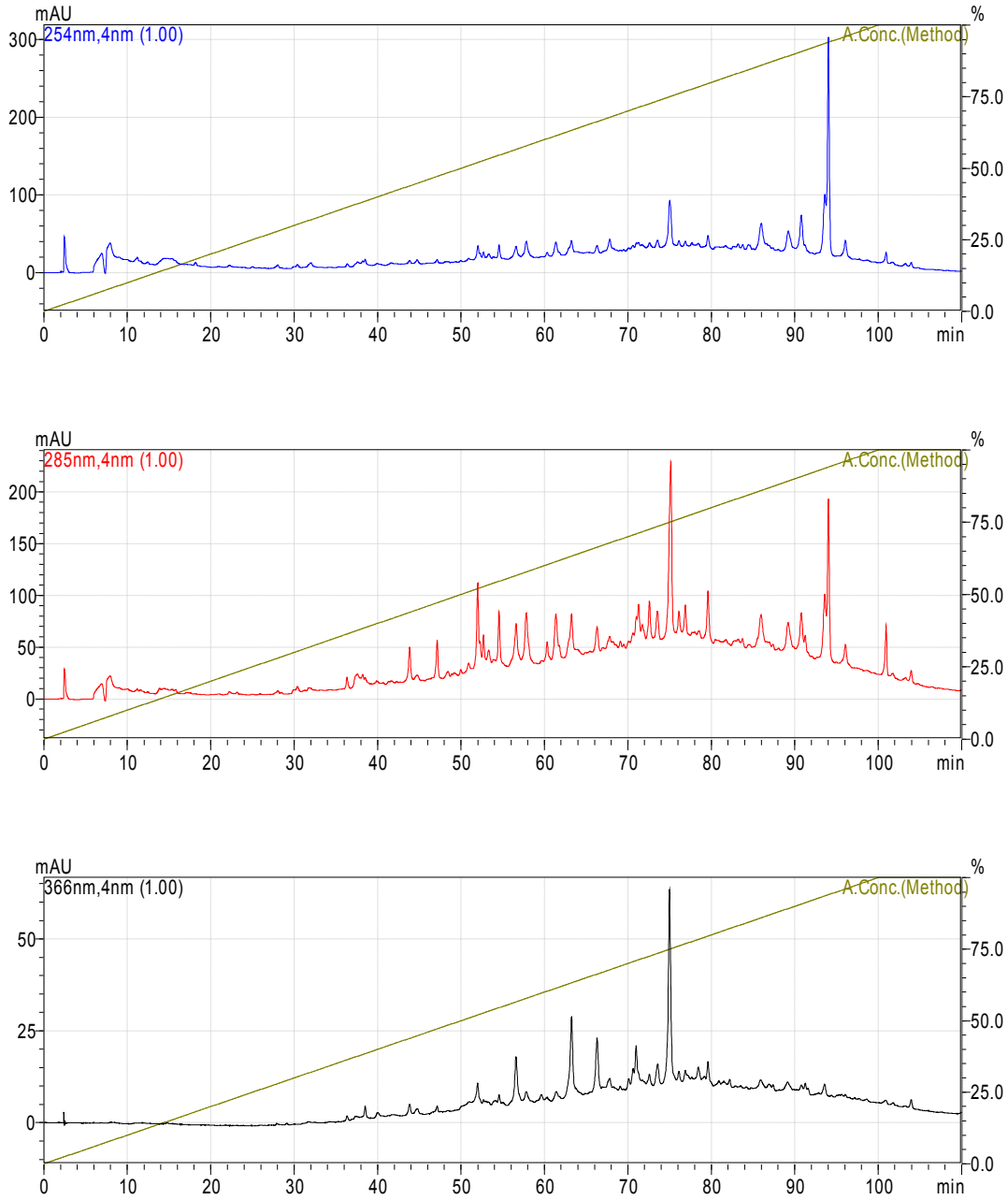


Abbildung 39 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion D

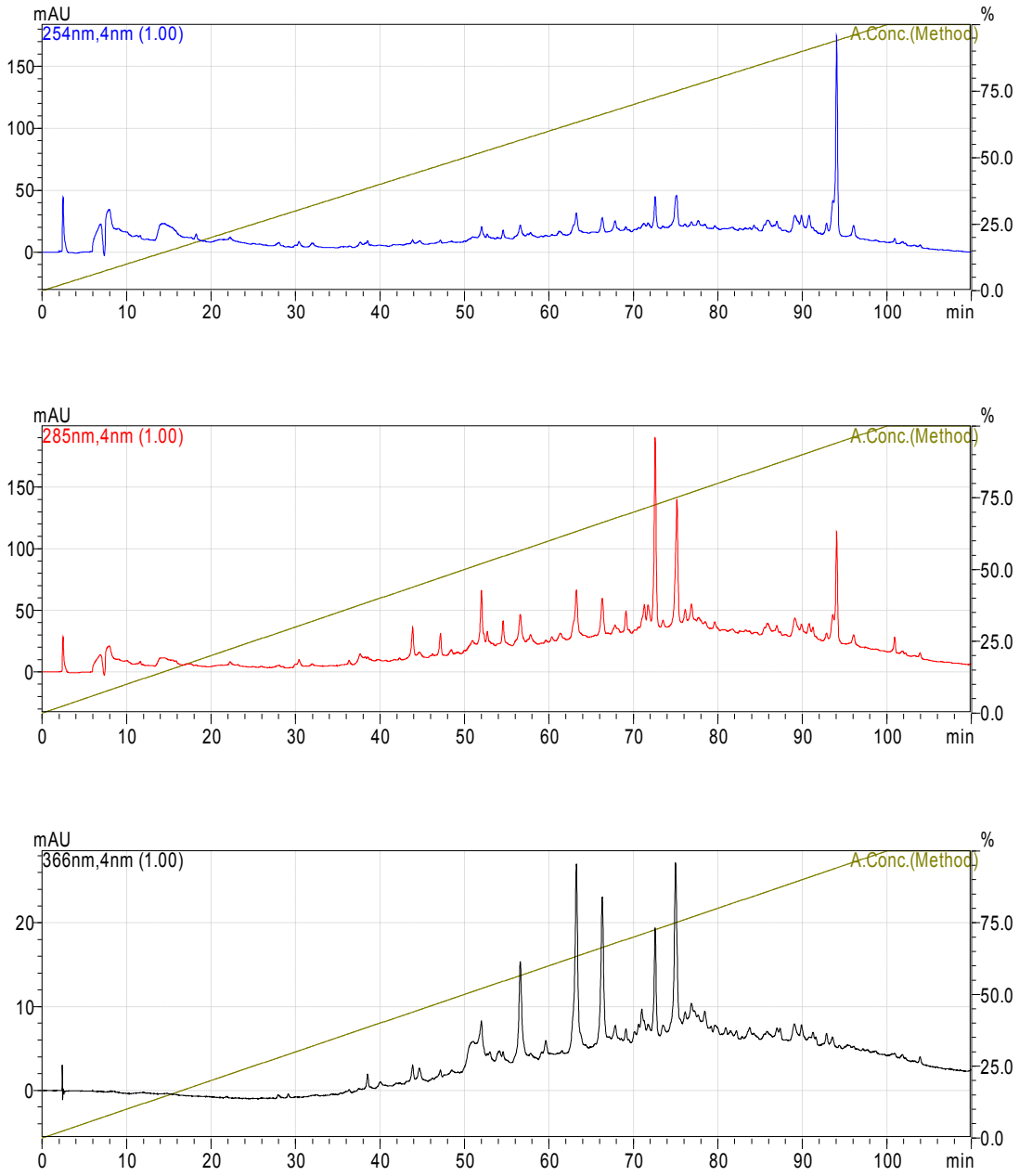


Abbildung 40 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion E

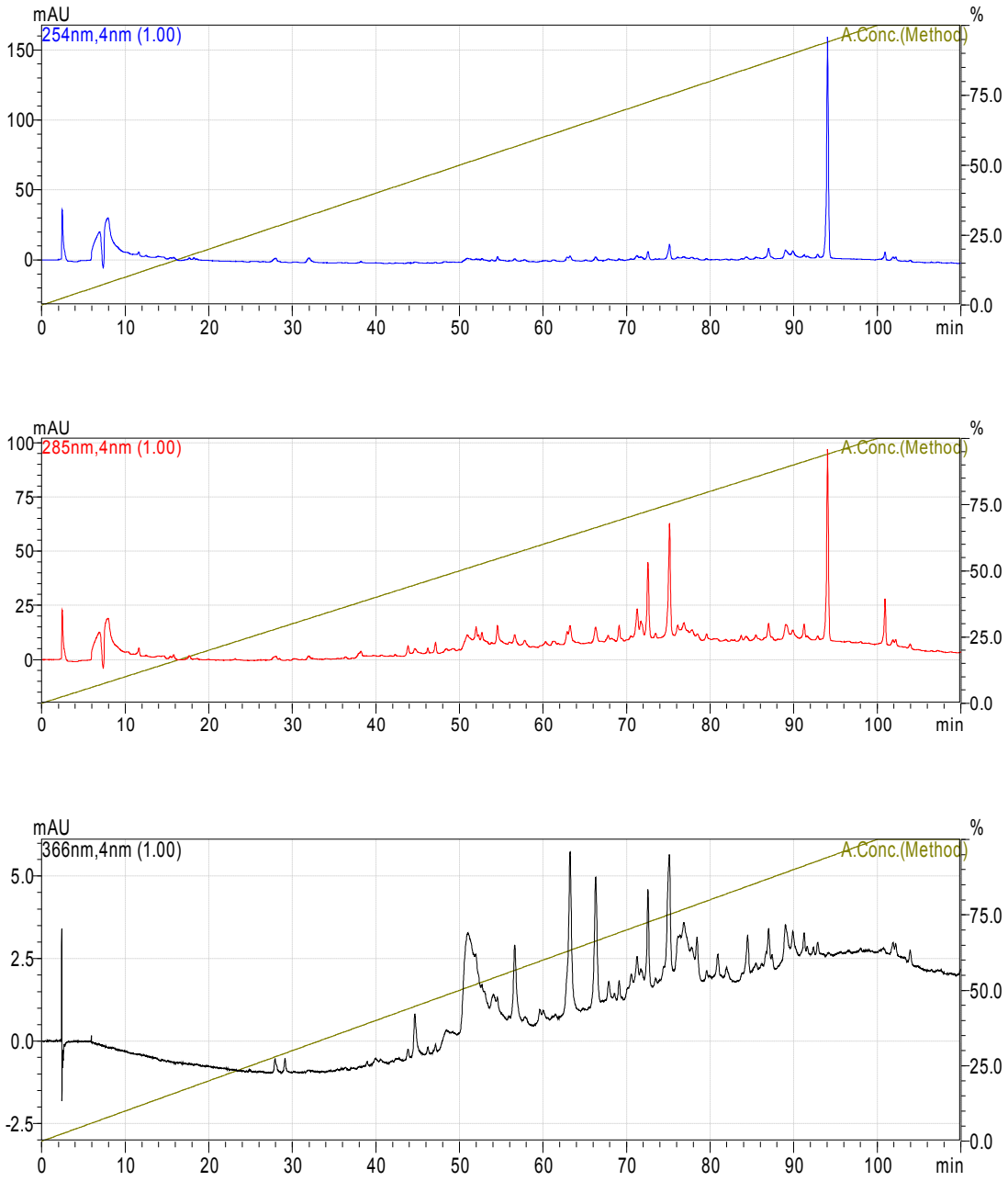
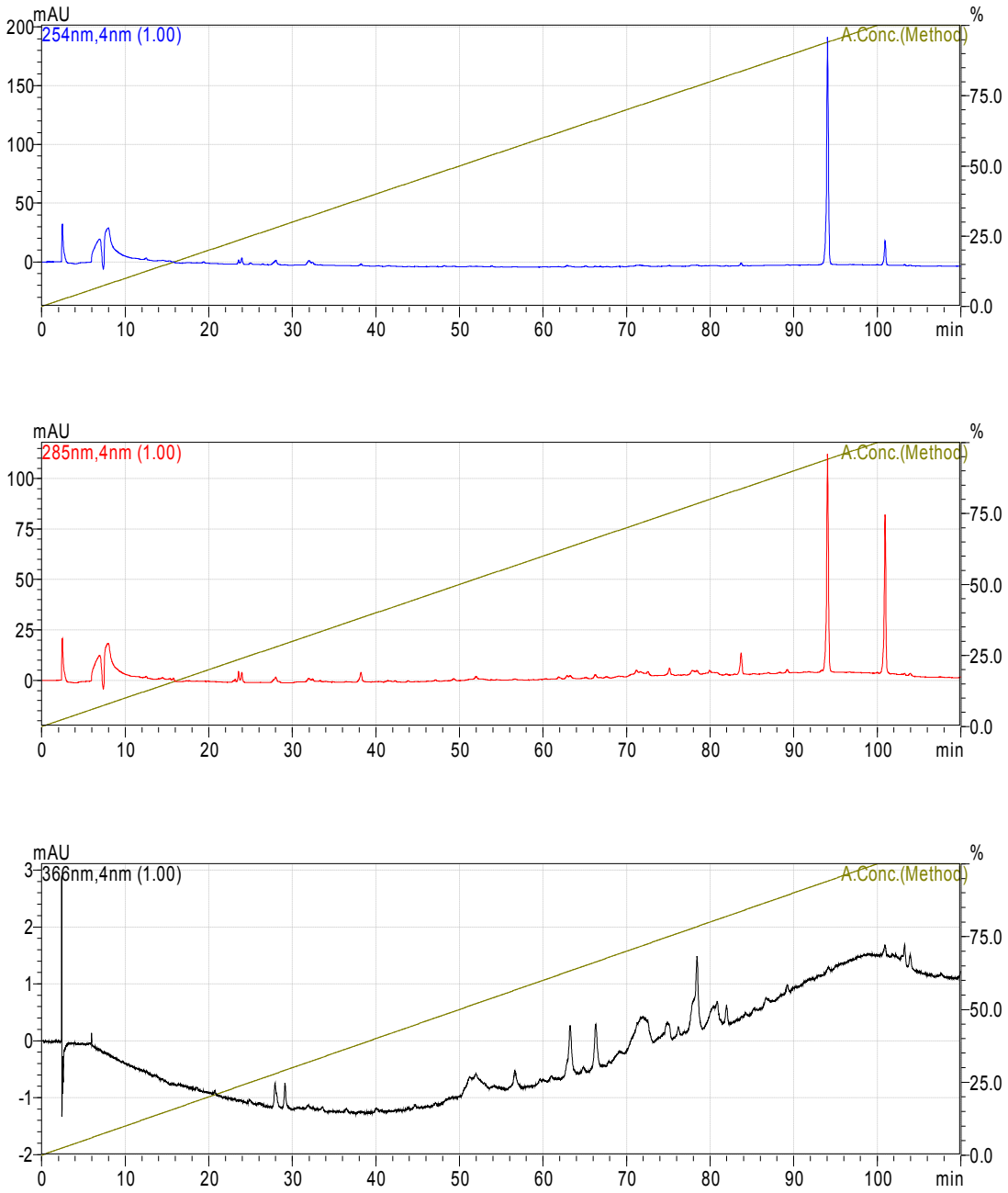


Abbildung 41 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion F



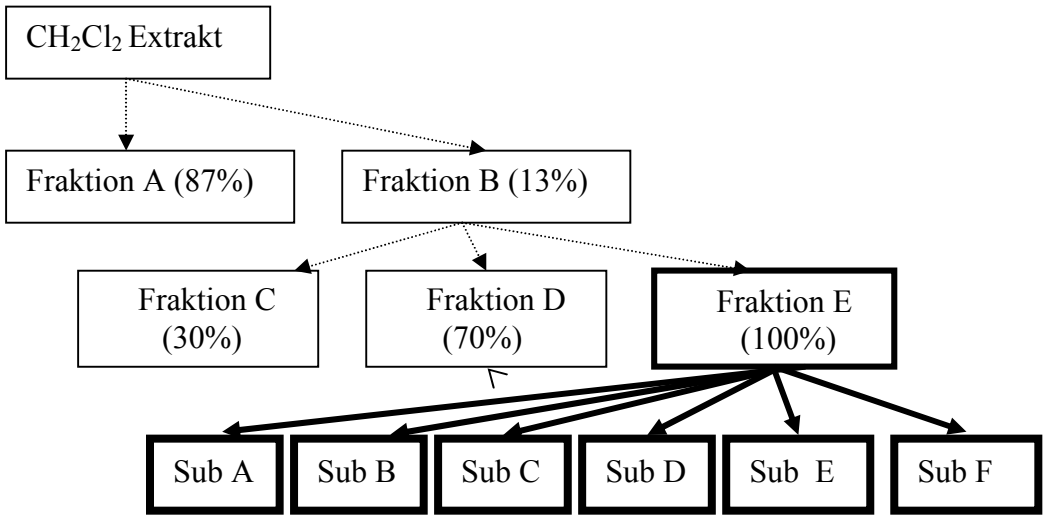
3.6. Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen

Zunächst soll eine kurze Zusammenfassung der bisherigen Arbeitsschritte zum besseren Verständnis der folgenden Testergebnisse gegeben werden.

Anfangs wurde festgestellt, dass der Dichlormethanextrakt hinsichtlich antiphlogistischer Wirkung am aktivsten ist. Nach Aufreinigung dieses Extrakts (1000mg) erhielt man Fraktion A (870mg) und Fraktion B (130mg). Fraktion B erwies sich als die viel aktivere Fraktion und wurde daher mittels SPE in Fraktion C (30% Methanol), Fraktion D (70% Methanol) und Fraktion E (100% Methanol) weiterfraktioniert. Es zeigte sich dass, Fraktionen D und E viel aktiver waren as Fraktion C. Fraktion D wurde bereits in der vorhergehenden Arbeit weiterfraktioniert und pharmakologisch getestet. Man fand 2 aktive Sub-Fraktionen. Fraktion E wurde in der vorliegenden Diplomarbeit mittels Säulenchromatographie weiterfraktioniert und 6 Sub-Fraktionen konnten erhalten werden (**Abbildung 42**).

Sub-Fraktion A (154 mg): ca.15 % der 100% Fraktion
Sub-Fraktion B (151 mg): ca.15 % der 100% Fraktion
Sub-Fraktion C (162 mg): ca.16 % der 100% Fraktion
Sub-Fraktion D (157 mg): ca.16 % der 100% Fraktion
Sub-Fraktion E (47 mg): ca. 5 % der 100% Fraktion
Sub-Fraktion F (21 mg): ca. 2 % der 100% Fraktion

Abbildung 42 Darstellung des Fraktionierungsschemas



Da die Sub-Fraktionen im Vergleich zu Fraktion E mengenmäßig zu klein waren, wurden jeweils die Sub-Fraktionen A + B, C + D und E + F vereinigt und gemeinsam pharmakologisch getestet.

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass Fraktion E mit ca. 41%, im Gegensatz zu Fraktion D mit ca. 61%, ein bisschen weniger aktiv ist [7,8]. Dies wurde bei unserer Untersuchung bestätigt, wo eine Ödemreduktion von 44% für Fraktion E erhalten wurde. Die vereinigten Sub-Fraktionen zeigten jedoch entgegen unserer Erwartungen keine spezielle entzündungshemmende Wirkung.

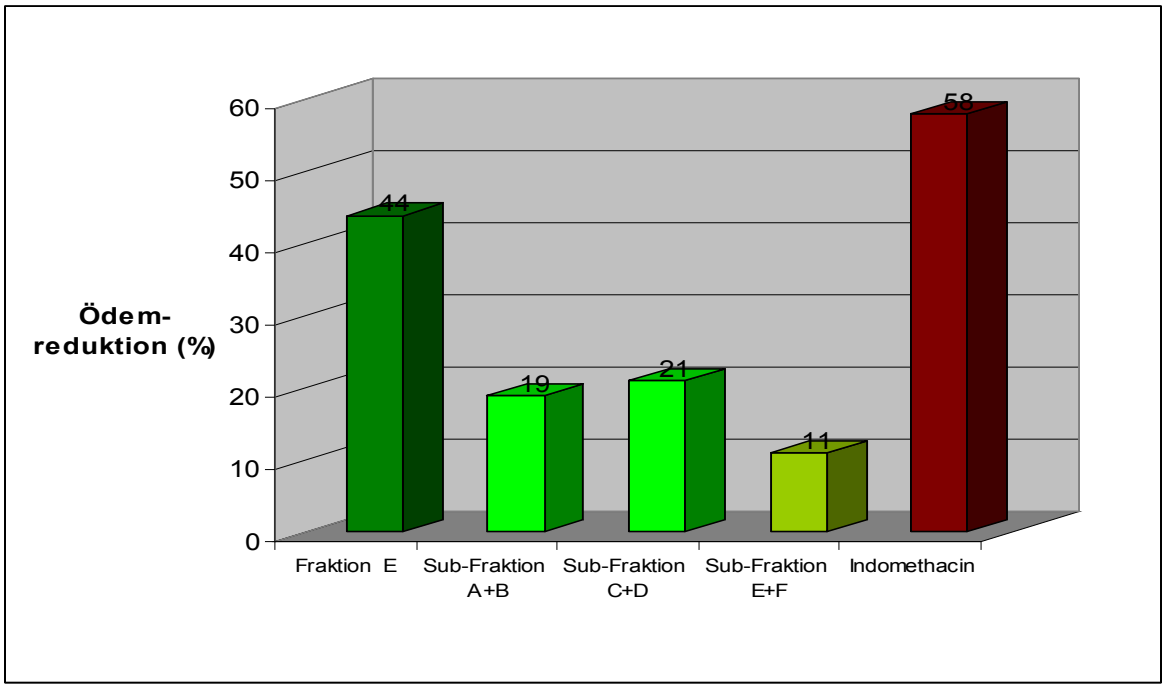
Die Sub-Fraktionen A+B und C+D erzielten eine Ödemreduktion von 19% bzw. 21%.

Eine noch geringere, fast bedeutungslose antiphlogistische Wirkung zeigte Sub-Fraktion E+F mit 11% (**Tabelle 5** und **Abbildung 43**).

Tabelle 5 Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchung an Fraktion E

Substanz	Anzahl der Tiere	Dosis (µg/cm^2)	Ödem (mg) Mean ± S.E.	% Red.
Kontrolle	10	--	7.2 ± 0.3	--
Fraktion E	10	140	4.0 ± 0.2*	44
Sub-Fraktion A + B	10	21+21°	5.8 ± 0.4*	19
Sub-Fraktion C + D	10	22+22°	5.7 ± 0.2*	21
Sub-Fraktion E + F	10	7+3°	6.4 ± 0.4	11
Indomethacin	10	100	3.0 ± 0.3*	58

Abbildung 43 Graphische Darstellung der pharmakologischen Testergebnisse



Mit diesen Ergebnissen der pharmakologischen Testung kann die Fraktionierung des Dichlormethanextraktes vorläufig abgeschlossen werden. Durch diese Untersuchungen gemeinsam mit vorangegangenen Diplomarbeiten konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen Substanzen mit antiphlogistischer Wirkung angereichert vorliegen. Als nächster Schritt muss eine Identifizierung der Inhaltstoffe erfolgen. Diese Analyse muss jedoch folgenden Diplomarbeiten vorbehalten sein.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit befasste man sich mit der Isolierung der antiphlogistisch wirksamen Fraktionen aus *Dryopteris-filix-mas*.

Ausgehend von vorangehenden Arbeiten [6,7,8] wurde das getrocknete Pflanzenmaterial gemahlen und ein Dichlormethanextrakt hergestellt. Dieser musste zum Weiterfraktionieren von Chlorophyll befreit werden. Der gereinigte Extrakt wurde mittels SPE (Festphasenextraktion) weiterfraktioniert und es wurde eine 30%, 70% und 100% Methanol-Fraktion erhalten. Aus vorhergehenden Diplomarbeiten [7] war bekannt, dass die 30% Methanol-Fraktion sehr schwach, die 70% und 100% Methanol-Fraktionen jedoch stark entzündungshemmend wirken. Die 70% Methanol-Fraktion wurde bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit weiterfraktioniert, die 100% Methanol-Fraktion wurde in der vorliegenden Diplomarbeit mittels Säulenchromatographie weiter aufgetrennt. Die erhaltenen Sub-Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch als auch mittels analytischer HPLC analysiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels des Mäuse-Ohr-Ödem-Tests auf antiphlogistische Wirkung geprüft.
Gemeinsam mit den vorangegangenen Diplomarbeiten konnte damit gezeigt werden, in welchen Fraktionen aus dem Wurmfarn antiphlogistisch wirksame Inhaltsstoffe angereichert vorliegen.

5. Literaturverzeichnis

[1] adaptiert von: http://www.botanikus.de/Botanik3/Ordnung /Wurmfarn/wurmfarn.html

[2] adaptiert von: http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/ systematik/6_droge/filici-r.htm

[3] Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis; Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Band 6, 5.Auflage, Springer-Verlag

[4] Farne und Farnverwandte, Morphologie, Systematik, Biologie; Kramer, Schneller, Wollenweber; Georg Thieme Verlag (1995)

[5] Gerlach S.; Dissertation, Universität Wien, in Vorbereitung?

[6] Tremesberger M.; Diplomarbeit, Universität Wien (2007)

[7] Sommergruber M.; Diplomarbeit, Universität Wien (2007)

[8] Ritter N.; Diplomarbeit, Universität Wien (2008)

[9] Analytik biogener Arzneistoffe, Pharmazeutische Biologie; Band 4, 1.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (2000)

[10] adaptiert von: http://miami.uni-muenster.de/servlets/ DerivateServlet/ Derivate-13/Material%20 und%20Methoden.pdf

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Chemische Strukturen der Hauptinhaltstoffe

Diagramm 1 Ergebnisse der Testung verschiedener Extrakte mittels Mäuseohrtest auf ihre antiphlogistische Wirkung

Diagramm 2 Schematische Darstellung der einzelnen Fraktionen

Tabelle 1 Parameter für die Dünnschichtchromatographie

Tabelle 2 Parameter für die Festphasenextraktion (SPE)

Tabelle 3 Parameter HPLC

Tabelle 4 Parameter für Säulenchromatographie

Abbildung 2 Überprüfung der **SPE – Fraktionen** bei 366nm nach Besprühen

Abbildung 3 HPLC Chromatogramme der SPE Fraktion mit **100% Methanol**

Abbildung 4 Überblick

Abbildung 5 HPLC Chromatogramme der 100% Methanol Fraktion für Vorversuche zur Auftrennung mittels Gelchromatographie

Abbildung 6 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 1

Abbildung 7 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 2

Abbildung 8 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 3

Abbildung 9 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 4

Abbildung 10 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 5

Abbildung 11 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 6

Abbildung 12 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion 7

Abbildung 13 HPLC Chromatogramme der 1. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

Abbildung 14 HPLC Chromatogramme der 2. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

Abbildung 15 HPLC Chromatogramme der 3. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

Abbildung 16 HPLC Chromatogramme der 4. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2

Abbildung 17 HPLC Chromatogramme der 5. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2
Abbildung 18 HPLC Chromatogramme der 6. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2
Abbildung 19 HPLC Chromatogramme der 7. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2
Abbildung 20 HPLC Chromatographie der 8. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2
Abbildung 21 HPLC Chromatographie der 9. Unterfraktion von Sub-Fraktion 2
Abbildung 22 Säulenchromatographie [7] an Sephadex zur Auftrennung der 100% Methanol-Fraktion
Abbildung 23 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 1
Abbildung 24 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 3
Abbildung 25 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 8
Abbildung 26 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 10
Abbildung 27 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 14
Abbildung 28 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 16
Abbildung 29 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 18
Abbildung 30 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 22
Abbildung 31 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 26
Abbildung 32 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 31
Abbildung 33 HPLC Chromatogramm der Subfraktion 34
Abbildung 34 DC der SPE- Fraktion mit 100% Methanol mit ausgewählten Sub-Fraktionen (S= Sub-Fraktion)
Abbildung 35 DC der SPE- Fraktion mit 100% Methanol mit ausgewählten Sub-Fraktionen (S= Sub-Fraktion)
Abbildung 36 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion A
Abbildung 37 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion B
Abbildung 38 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion C
Abbildung 39 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion D
Abbildung 40 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion E
Abbildung 41 HPLC Chromatogramme der Sub-Fraktion F
Abbildung 42 Darstellung des Fraktionierungsschemas

Tabelle 5 Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchung an Fraktion E

Abbildung 43 Graphische Darstellung der pharmakologischen Testergebnisse

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2008 bis Juni 2008 am Department der Pharmakognosie der Universität Wien.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Univ. Prof. V. Dirsch, die mir den Arbeitsplatz am Department der Pharmakognosie der Universität Wien zur Verfügung stellte.

Mein besonderer Dank gilt aber vor allem meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Dr. G. Reznicek. Immer wenn man ihn brauchte, war er zur Stelle und half mir bei meinen „großen“ Problemen weiter.

Bei Univ. Prof. J. Jurenitsch, Frau Ao. Univ. Prof. Dr. S. Glasl, Astrid und Oliver möchte ich mich herzlich bedanken. Bei benötigtem Rat war immer einer parat.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir während des ganzen Studiums Halt geboten und immer motiviert haben.
Bei meinen Freunden Hoda El-Samahi, Tamima Al-Zaher und Heba El-Bana bedanke ich mich für ihre Unterstützung und dem Ertragen meiner Launen und Stimmungen während des Studiums, was sicher nicht immer leicht fiel - vielen vielen Dank.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	**ISMAIL Sarah**
Adresse:	Bernoullistr. 4/31/16 1220 Wien, Austria
Geburtsdatum:	23. Mai 1984
Geburtsort:	Wien, Österreich
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Eltern:	Mohamed Ismail, Geschäftsmann Afaf Ismail, Agrar-Ingenieurin

Ausbildung:

09/ 1991 – 06/ 1994	Volksschule Natorpgasse Wien
09/ 1994 – 06/ 2002	Bernoulli Gymnasium, Wien
06/ 2002	Matura
Seit 10/ 2002	Studium der Pharmazie, Universität Wien April 2008 bis Juni 2008 praktische Arbeit zur vorliegenden Diplomarbeit

Berufserfahrung: Management (Einzelhandel - Freyung 6)

Wien, im Januar 2009