



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Chemische Untersuchungen eines Passionsblumenkrautextraktes

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Nina Mayer
Matrikel-Nummer:	0303236
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Wien, im Juli 2009

Danksagung

Frau Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch, dem Vorstand des Departments für Pharmakognosie, möchte ich für die Ermöglichung der praktischen Durchführung meiner Diplomarbeit danken.

Ich bedanke mich herzlichst bei Frau a. o. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn für die interessante Themenstellung und die hervorragende Betreuung.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Hanspeter Kählig für die NMR-Messungen.

Großer Dank gilt meiner Kollegin und Freundin Dipl. Ing. Mira Krasteva für ihre Unterstützung und große Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen aller Art. Danke!

Ich möchte mich auf diesem Weg auch bei meinen Freundinnen und Studienkolleginnen Maria Kundračiková, Barbara Ranftl und Tamara Brumnik bedanken, die meine Studienzeit sehr bereichert haben und vor allem in den letzten zwei Jahren meines Studiums eine große Unterstützung für mich waren.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich immer unterstützt und ermutigt haben. Ich weiß, dass ihr immer für mich da seid - Danke!

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHCl ₃	Chloroform
conc.	konzentriert
DC	Dünnschichtchromatographie
EF	Einzelfraktion
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GF	Gesamtfraktion
H ₂ O	Wasser
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p.A.	pro analysi
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
PhEur	Pharmacopoea Europaea
ppm	parts per million
R _f	Retentionsfaktor
SC	Säulenchromatographie
SF	Sammelfraktion
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VLC	Vacuum Liquid Chromatography

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Einleitung und Problemstellung	2
2.1	Botanische Beschreibung von <i>Passiflora incarnata</i> L.....	2
2.2	Medizinische Verwendung von <i>Passiflora incarnata</i> L.....	2
2.3	Inhaltsstoffe	3
2.4	Problemstellung.....	5
3	Material und Methoden	6
3.1	Material.....	6
3.1.1	Passionsblumenkrautextrakt.....	6
3.1.2	Fraktionen einer vorangegangenen Diplomarbeit	6
3.1.3	Passionsblumenkraut.....	6
3.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	6
3.2.1	Stationäre und mobile Phasen	6
3.2.2	Detektionsmethoden.....	7
3.2.2.1	Detektion mittels Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	7
3.2.2.2	Detektion mittels Naturstoffreagenz A und PEG.....	7
3.2.2.3	Detektion mittels ethanolischer Kaliumhydroxid-lösung	7
3.3	Vacuum liquid chromatography (VLC).....	7
3.4	Säulenchromatographie (SC).....	8
3.5	Präparative Dünnschichtchromatographie	8
3.6	¹ H-NMR-Spektroskopie.....	9
4	Ergebnisse	10
4.1	Dünnschichtchromatographische Untersuchung des Passionsblumenkrautextraktes ..	10
4.1.1	Flavonoide.....	10
4.1.2	Cumarine.....	11
4.1.3	Alkaloide.....	12

4.2	Vorversuch zur Fraktionierung des Extraktes.....	13
4.2.1	SC 1 (VLC).....	13
4.3	Vergleich von SF 1, SF 2 und SF 8 der SC 1 mit Fraktionen vorangegangener Auftrennungen	17
4.4	Aufarbeitung des Passionsblumenkrautextraktes.....	18
4.4.1	Fraktionierung des Extraktes	19
4.4.2	SC 2	22
4.4.3	SC 3	24
4.5	Auftrennung von Fraktionen einer vorangegangenen Diplomarbeit	26
4.5.1	Dünnschichtchromatographische Überprüfung.....	26
4.5.2	SC 4	28
4.5.3	SC 5	32
4.6	Aufarbeitung der Droge	34
4.6.1	Fraktionierung der Droge.....	34
4.6.1.1	Aufreinigung von F 3.3	36
4.6.1.2	Aufreinigung von F 3.1	37
4.6.2	SC 6	39
4.6.3	Weitere Aufreinigung von SF 8 und SF 9 der SC 6.....	41
4.6.4	SC 7	42
4.6.5	SC 8	44
4.7	Präparative Dünnschichtchromatographie	45
4.8	¹H-NMR-Spektroskopie.....	46
5	Diskussion der Ergebnisse	48
6	Zusammenfassung.....	50
7	Literaturverzeichnis.....	51
8	Tabellenverzeichnis.....	52
9	Abbildungsverzeichnis	53
	Curriculum vitae	55

1 Abstract

Die Anwendung des Passionsblumenkrautes zur Therapie von nervösen Spannungs- und Unruhezuständen sowie von Einschlafstörungen hat sich seit langem bewährt. Einer indischen Arbeitsgruppe gelang es, im Rahmen einer Bioassay-geleiteten Untersuchung aus *Passiflora incarnata* L. ein trisubstituiertes Benzoflavon zu isolieren. Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war, dieses trisubstituierte Benzoflavon aus einem zur Verfügung gestellten Passionsblumenkrautextrakt zu isolieren und dessen chemische Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Passionsblumenkrautextrakt mittels verschiedener chromatographischer Methoden auf das Vorliegen des Benzoflavons (Substanz X) untersucht. Die Fraktionen, in denen Substanz X angereichert werden konnten, lagen in sehr geringen Mengen vor und waren nicht frei von störenden Begleitstoffen. Es wurde deshalb sowohl mit Fraktionen einer vorangegangenen Diplomarbeit als auch mit Passionsblumenkraut weitergearbeitet. Trotz zahlreicher, zeitaufwändiger Aufreinigungsschritte mittels Säulenchromatographie sowie der Anwendung präparativer Dünnschichtchromatographie war die Reindarstellung und die spektroskopische Bestätigung der Struktur des trisubstituierten Benzoflavons nicht möglich.

Passionflower herb has been used to treat anxiety and nervousness as well as insomnia for long. A research group from India succeeded in the isolation of a trisubstituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* L. by bioactivity-directed fractionation. The objective of this thesis was to isolate the tri-substituted benzoflavone from a provided Passionflower extract and to clarify its chemical structure by NMR spectrometry. The Passionflower extract was studied for the benzoflavone (substance X) by using different chromatographic methods. The fractions which contained the compound were only available in small quantity and they were not free from interfering constituents. Subsequently, the work was continued with fractions derived from a previous thesis and with Passionflower herb. Despite of numerous, time-consuming separations by column chromatography and the use of preparative thin layer chromatography the isolation in a pure form and the spectroscopic confirmation of the tri-substituted benzoflavone was not possible.

2 Einleitung und Problemstellung

2.1 Botanische Beschreibung von *Passiflora incarnata* L.

Passionsblumenkraut besteht aus den getrockneten oberirdischen Teilen der Pflanze *Passiflora incarnata* L., der Passionsblume. Die Gattung *Passiflora* umfasst rund 500 Arten und stellt damit den größten Vertreter der Familie der Passifloraceae dar [1]. *Passiflora incarnata* L. ist eine kletternde Staude, deren Höhe mehrere Meter erreichen kann. Die Blätter sind tief geteilt, die interessanten weißvioletten Blüten sind der Grund für die Namensgebung. Mit dem Aussehen der fädigen Nebenkrone, der Staubblätter und Narben, wurde die Leidensgeschichte Christi assoziiert. Die Passionsblume ist in den tropischen bis subtropischen Gebieten Nord-, Mittel- und Südamerikas heimisch. Drogenimporte stammen heute größtenteils aus den USA und Indien [2]. Einige Arten, besonders *Passiflora edulis* Sims, werden wegen ihrer essbaren und wohlschmeckenden Früchte, den Maracujas, kultiviert [1].

Abbildung 1: Blüte der *Passiflora incarnata* L. [3]



2.2 Medizinische Verwendung von *Passiflora incarnata* L.

Das Passionsblumenkraut wird aufgrund seiner sedativen und anxiolytischen Eigenschaften in der Phytotherapie eingesetzt. Indikationen sind nervöse Spannungs- und Unruhezustände sowie Einschlafstörungen [4,5]. Passiflorae herba und daraus her-

gestellte Extrakte werden in erster Linie in Form von Kombinationspräparaten angewendet, wobei vor allem Kombinationen mit Baldrian, Hopfen und Melisse verbreitet sind [6]. Monopräparate des Passionsblumenkrautes sind selten, weshalb kaum klinische Studien dazu vorliegen. Erst in letzter Zeit wurden einzelne Untersuchungen am Menschen veröffentlicht, in welchen die anxiolytischen Effekte von *Passiflora incarnata* L. bestätigt werden konnten. Weiters liegen einige in-vivo-Studien an Nagetieren vor, aus welchen sedative und anxiolytische Effekte von wässrig-alkoholischen Extrakten des Passionsblumenkrautes abgeleitet werden konnten [7].

Abbildung 2: Passionsblume mit Frucht [8]



2.3 Inhaltsstoffe

Hauptinhaltsstoffe der Passionsblume sind Flavonoide. Komponenten der Flavonoidfraktion sind fast ausschließlich C-Glykosylflavone des Apigenins und des Luteolins. Diese können bis zu einem Gehalt von 3% in der Droge vorliegen. Laut PhEur sind mindestens 1,5%, berechnet als Vitexin, vorgeschrieben. Abhängig von der Herkunft des Passionsblumenkrautes gibt es hier große quantitative Unterschiede. Als Hauptkomponenten wurden nachgewiesen: Isovitexin-2“-O-glucosid, Isovitexin, Isoorientin-2“-O-glucosid, Isoorientin, Schaftosid, Isoschaftosid, Swertisin, Vicenin-2. In der Regel überwiegen die Glykosylflavone mit einer Glykosylbindung in Position 6. Bei der Qualitätskontrolle von Passiflora-Phytopharmaka eignen sich C-Glykosylflavone als Leitsubstanzen. Daneben kommen in der Droge Spuren von ätherischem Öl sowie Mono-, Oligo- und Polysaccharide, wie z.B. Arabinogalactan, vor. Auch Glykoproteine mit Prolin, Glutaminsäure, γ -Aminobuttersäure und Isoleucin wurden nachgewiesen [6].

Abbildung 3: Flavonoide in *Passiflora incarnata* L. [6]

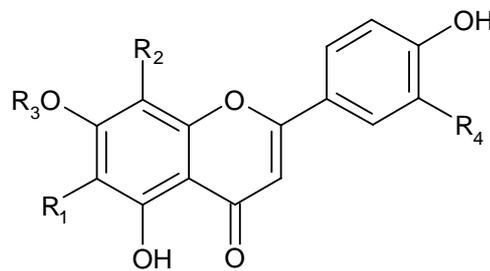


Tabelle 1: Flavonoide in *Passiflora incarnata* L. [6]

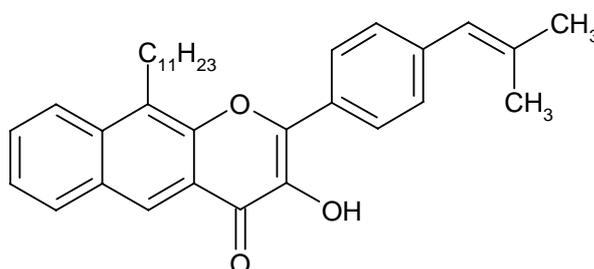
Glykosylflavone	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Isovitexin	Glc	H	H	H
Isoorientin	Glc	H	H	OH
Isovitexin-2''-O-glucosid	Soph	H	H	H
Isoorientin-2''-O-glucosid	Soph	H	H	OH
Schaftosid	Glc	Ara	H	H
Isoschaftosid	Ara	Glc	H	H
Swertisin	Glc	H	CH ₃	H
Vitexin	H	Glc	H	H
Orientin	H	Glc	H	OH
Vicenin-2	Glc	Glc	H	H
Glc = β-D-Glucopyranose; Soph = Sophorose; Ara = α-L-Arabinopyranose				

Als mögliche Wirksubstanzen des Passionsblumenkrautes wurden in der Vergangenheit unter anderem β-Carbolinalkaloide wie Harmol, Harmalol und Harman vermutet. In der Droge waren jedoch nur Mengen von unter 1 ppm nachweisbar, Konzentrationen, die die Effekte der Droge nicht bewirken können. Weiters wurde das γ-Pyron Maltol einige Zeit als potentieller Wirkstoff angesehen. Dieses liegt aber ebenfalls nur in sehr geringen Mengen in der Droge vor und kann daher nicht für die Wirkung verantwortlich sein [7]. Welche Inhaltsstoffe der Passionsblume also für die sedativen und anxiolytischen Eigenschaften verantwortlich sind, war weiterhin unklar.

2.4 Problemstellung

Im Rahmen einer Bioassay-geleiteten Untersuchung konnte eine indische Arbeitsgruppe für eine Fraktion eines methanolischen Extraktes aus *Passiflora incarnata* L. eine signifikante anxiolytische Wirkung nachweisen. Das dünnschichtchromatographische Profil dieser Fraktion zeigte zwei deutliche Banden unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm. Unter Verwendung von Kieselgel als stationärer Phase und von Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1) als mobiler Phase waren eine helltürkise Bande bei R_f ca. 0,69 und eine blaue Bande bei R_f ca. 0,65 sichtbar. Der Vergleich mit bekannten Inhaltsstoffen aus *Passiflora incarnata* L. zeigte keine Übereinstimmungen [9]. Der aktive Inhaltsstoff dieser Fraktion wurde als trisubstituiertes Benzoflavon beschrieben. Es wurde jedoch nur eine Teilstruktur veröffentlicht (siehe Abbildung 4), die komplette chemische Struktur des Benzoflavons wurde aus patentrechtlichen Gründen nicht publiziert [1].

Abbildung 4: Teilstruktur des Benzoflavons [1]



Diese Substanz wurde pharmakologisch weitergehend untersucht auf die Vermeidung von Entzugserscheinungen bei Abhängigkeit von psychotropen Substanzen wie Morphin, Alkohol, Nicotin, Cannabinoiden und Benzodiazepinen. Anhand von in-vivo Versuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung von Abhängigkeit und Toleranz verlangsamt und Entzugserscheinungen verringert werden [1].

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, ein zur Verfügung gestelltes Passionsblumenkrautextrakt (siehe 3.1.1) auf gleiche Weise wie Dhawan et al. [9] zu fraktionieren und das trisubstituierte Benzoflavon daraus zu isolieren. Weiters sollte mittels NMR-Spektroskopie die chemische Struktur detailliert untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Passionsblumenkrautextrakt

Ein Trockenextrakt aus *Passiflorae herba* PhEur (Extr. *Passiflorae e herb. spir. sicc.*; Sonderqualität Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde von der Firma Merck bereitgestellt. Als Auszugsmittel dieses Trockenextraktes hatte Ethanol 50% (V/V) gedient.

3.1.2 Fraktionen einer vorangegangenen Diplomarbeit

Es wurden weitere Fraktionen, die im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit [10] hergestellt worden waren, untersucht.

3.1.3 Passionsblumenkraut

Neben dem Extrakt wurde auch eine Handelsdroge von Passionsblumenkraut (Dr. Peithner KG Wien) untersucht.

3.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

3.2.1 Stationäre und mobile Phasen

Stationäre Phasen I. Kieselgel 60 F₂₅₄ - Fertigplatten Merck
Schichtdicke 0,25 mm

Mobile Phasen:

- A. Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton
(13+4+2+1)
- B. Ethylacetat – Ameisensäure conc. – Essigsäure conc. –
Wasser (100+11+11+27)
- C. Toluol – Ether – Essigsäure (1+1+0,1), Oberphase
- D. Chloroform – Methanol – Ammoniak 10%
(80+40+1,5)

Mobile Phasen:	E. Ethylacetat – Ameisensäure conc. – Essigsäure conc. – Wasser (100+6+6+2)
	F. n-Pentan – Ethylacetat (85+15)

3.2.2 Detektionsmethoden

3.2.2.1 Detektion mittels Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

85 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure werden vorsichtig gemischt. Nach dem Abkühlen werden 0,5 ml Anisaldehyd zugesetzt. Nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens wird 5-10 min. bei 110°C getrocknet. Die Detektion erfolgt bei Tageslicht.

3.2.2.2 Detektion mittels Naturstoffreagenz A und PEG

Es wird mit 1%iger methanolischer Naturstoffreagenz A - Lösung (=Diphenylbor-säure-2-aminoethylester) und 5%iger ethanolischer Polyethylenglykol 400 - Lösung besprüht. Detektion erfolgt unter UV-Licht der Wellenlänge 365 nm. Flavonoid-Derivate zeigen hellgelbe bis hellgrüne Fluoreszenz.

3.2.2.3 Detektion mittels ethanolischer Kaliumhydroxid-lösung

Die DC-Platte wird mit 5%iger ethanolischer Kaliumhydroxidlösung besprüht. Detektion erfolgt unter UV-Licht der Wellenlänge 365 nm. Cumarine werden als blau fluoreszierende Zonen detektiert.

3.3 Vacuum liquid chromatography (VLC)

Durch Anlegen eines Vakuums an die Säule lassen sich in kurzer Zeit große Extraktmengen fraktionieren. Das zu trennende Extrakt wurde in Methanol gelöst und mit der vierfachen Menge an Kieselgel aufgeschlämmt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Extrakt trocken auf die stationäre Phase aufgebracht.

Abbildung 5: Vacuum liquid chromatography



Stationäre Phase: ICN Silica 60 A

Mobile Phase: Chloroform-Methanol-Gemische steigender Polarität bis zu Methanol – Wasser (1+1)

3.4 Säulenchromatographie (SC)

Ausgewählte Fraktionen wurden nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung mittels Säulenchromatographie weiter aufgetrennt. Ziel war die Anreicherung und Reinigung der enthaltenen Verbindungen. Als stationäre Phasen wurden Kieselgel (ICN Silica 60 A) oder Sephadex[®] LH-20 verwendet. Als mobile Phase dienten verschiedene Lösungsmittel bzw. -gemische. Die verwendete stationäre Phase und die Zusammensetzung der mobilen Phase sind im jeweiligen Kapitel angegeben. Es wurde jede fünfte oder zehnte Fraktion mittels DC untersucht. Die Fraktionen wurden entsprechend ihrer Zusammensetzung zu Sammelfractionen vereinigt.

3.5 Präparative Dünnschichtchromatographie

Ausgewählte Sammelfractionen der Säulenchromatographie wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie weiter aufgereinigt. Die Fraktionen wurden mit dem Auftraggerät TLC-Applicator AS 30 (Desaga, Wiesloch, Deutschland) strichförmig

auf Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten der Firma Merck (Schichtdicke 0,25 mm) aufgetragen und mit dem Fließmittelgemisch Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1) entwickelt. Die unter UV_{365nm} sichtbaren, blau fluoreszierenden Zonen wurden markiert und vorsichtig abgekratzt. Zur Elution der Substanzen vom Kieselgel wurde je 2-mal ca. 20 ml Chloroform zugesetzt und 10 min. im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde das Kieselgel mittels Zentrifugation abgetrennt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

3.6 ¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Messungen wurden auf einem BRUKER Avance DRX 600 NMR-Spektrometer durchgeführt. Folgende Ausrüstung wurde verwendet:

5mm TBI Probenkopf mit xyz-Gradientenspule oder 5mm QNP Probenkopf mit z-Gradientenspule, automatische Tuning und Matching Einheit.

Messfrequenz 600.13 MHz

Temperaturstabilisierung mit BCU05, Messtemperatur 300 K

Software Topspin 1.3

4 Ergebnisse

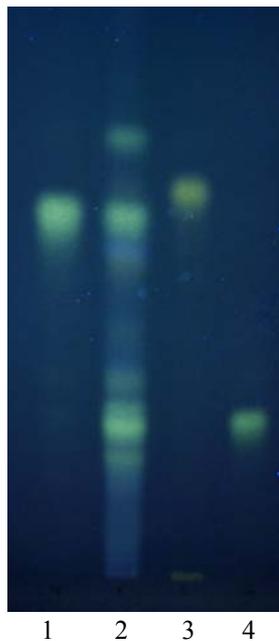
4.1 Dünnschichtchromatographische Untersuchung des Passionsblumenkrautextraktes

Vor der Fraktionierung des Passionsblumenkrautextraktes wurde mittels DC auf verschiedene Stoffgruppen getestet. Dazu wurden 10 mg des Extraktes in 1,5 ml Methanol gelöst und jeweils 20 µl davon strichförmig aufgetragen. Von den Vergleichssubstanzen wurden jeweils 1 mg in 100 µl Methanol gelöst und davon 5 µl aufgetragen.

4.1.1 Flavonoide

Das Flavonoidmuster wurde in einem geeigneten Fließmittelsystem untersucht.

Abbildung 6: DC-Vergleich mit Flavonoiden



Bahn	Aufgetragene Substanz
1	Isovitexin
2	Extrakt
3	Orientin
4	Isoschaftosid

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase B: Ethylacetat – Ameisensäure conc. – Essigsäure conc. – Wasser (100+11+11+27)

Detektion: Naturstoffreagenz A / PEG

In Abbildung 6 (siehe Seite 10) ist zu sehen, dass als Hauptkomponenten im Extrakt die Flavonoide Isovitexin, Isoschaftosid und Schaftosid enthalten sind. Daneben ist bei R_f ca. 0,77 auch Vitexin sichtbar. Gelbfluoreszierende Luteolinglykosyle wurden nur in sehr niedrigen Konzentrationen detektiert.

4.1.2 Cumarine

Da von Cumarinen in *Passiflora incarnata* L. berichtet wurde [1], wurde das Extrakt auch auf diese Substanzklasse untersucht. Dazu wurde das Extrakt mit Cumarin und Herniarin in der DC verglichen.

Abbildung 7: DC-Vergleich mit Cumarin und Herniarin



Bahn	Aufgetragene Substanz
1	Cumarin
2	Extrakt
3	Herniarin

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase C: Toluol – Ether (1+1)

Detektion: 5%ige ethanolische Kaliumhydroxidlösung

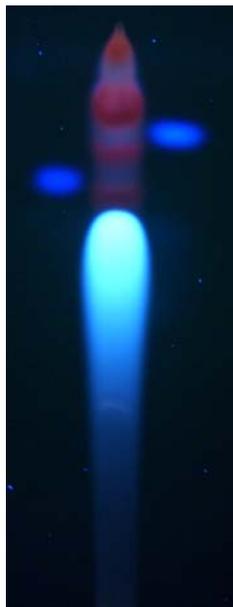
In Abbildung 7 ist zu sehen, dass weder Cumarin noch Herniarin im Extrakt nachzuweisen sind. Aus dem Fehlen blau fluoreszierender Zonen im Chromatogramm des Extraktes kann abgeleitet werden, dass keine anderen freien Cumarine im Extrakt vorhanden sind.

4.1.3 Alkaloide

Um festzustellen, ob das Extrakt Spuren von Harman-Alkaloiden enthält, erfolgte eine Aufarbeitung zur Anreicherung von Alkaloiden und die DC-Kontrolle. Dazu wurden 100 mg Extrakt mit 20 ml verdünnter Salzsäure versetzt und 15 min. mit Ultraschall behandelt. Das Extrakt wurde abfiltriert und die Lösung mit konzentriertem Ammoniak auf einen pH-Wert von 9-10 eingestellt. Es wurde 3-mal mit je 15 ml Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformphase unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 100µl Chloroform gelöst und davon 30µl dünn-schichtchromatographisch untersucht. Von den Vergleichssubstanzen Harmin und Harman wurde jeweils eine methanolische Lösung der Konzentration 0,5 mg/ml hergestellt und davon 5µl aufgetragen.

Abbildung 8: DC-Vergleich mit Harmin und

Harman unter UV $_{366\text{ nm}}$



1 2 3

Bahn	Aufgetragene Substanz
1	Harmin
2	Extrakt nach Aufbereitung
3	Harman

Abbildung 9: DC-Vergleich des Extraktes vor

und nach Aufbereitung unter UV $_{366\text{ nm}}$



1 2

Bahn	Aufgetragene Substanz
1	Ursprüngliches Extrakt
2	Extrakt nach Aufbereitung

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase D: Chloroform – Methanol – Ammoniak 10% (80+40+1,5)

Aus Abbildung 8 (siehe Seite 12) geht hervor, dass die Alkaloide Harmin und Harman im Extrakt kaum nachweisbar sind. Auf der Bahn des Extraktes ist eine intensiv hellblau fluoreszierende Zone bei R_f ca. 0,64 zu sehen. Da diese im ursprünglichen Extrakt nicht zu sehen ist (siehe Abbildung 9, Seite 12), wird angenommen, dass es sich um eine Verbindung handelt, die auf die Aufbereitung des Extraktes zurückzuführen ist.

4.2 Vorversuch zur Fraktionierung des Extraktes

20 g des Passionsblumenkrautextraktes (siehe 3.1.1, Seite 6) wurde weitgehend nach dem Schema von Dhawan et al. [7] aufgearbeitet. Ziel war eine erschöpfende Extraktion mit den Lösungsmitteln 1-Butanol, Petrolether und Chloroform. Dazu wurde das Extrakt 5-mal mit je 10 ml 1-Butanol versetzt und 20 min. mit Ultraschall behandelt. Das Gemisch wurde mittels Zentrifugation getrennt, der Überstand abpipettiert und unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Auf gleiche Weise wurde das Extrakt anschließend mit 5-mal je 10 ml Petrolether und 5-mal je 20 ml Chloroform behandelt. Der Rückstand F 1.4 wurde getrocknet und mittels Vacuum liquid chromatography in SC 1 aufgetrennt.

Tabelle 2: Fraktionierung des Extraktes im Rahmen des Vorversuchs

Fraktion	Lösungsmittel	Mengen
F 1.1	1-Butanol	360 mg
F 1.2	Petrolether	55 mg
F 1.3	Chloroform	169 mg
F 1.4	Rückstand	19 g

4.2.1 SC 1 (VLC)

Durchmesser: 5 cm

Füllhöhe: 16 cm

Stationäre Phase: 152 g ICN Silica 60 A

Mobile Phase: siehe Tabelle 3, Seite 14

Aufgetragen: 18,9 g Fraktion F 1.4

4. Ergebnisse

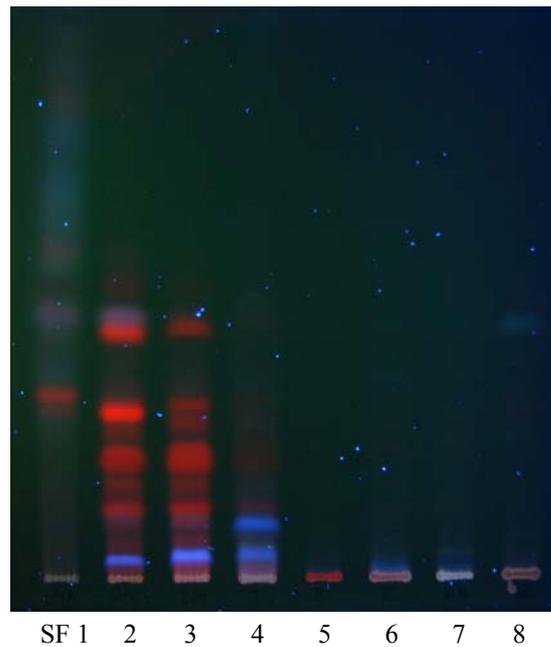
Tabelle 3: Mobile Phasen von SC 1 (VLC)

Mobile Phase	Zusammensetzung	Volumen	Erhaltene Fraktionen
1	CHCl ₃	5x300 ml	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5
2	CHCl ₃ - MeOH (95+5)	3x300 ml	2.1, 2.2, 2.3
3	CHCl ₃ - MeOH (90+10)	3x300 ml	3.1, 3.2, 3.3
4	CHCl ₃ - MeOH (85+15)	3x300 ml	4.1, 4.2, 4.3
5	CHCl ₃ - MeOH (70+30)	4x300 ml	5.1, 5.2, 5.3, 5.4
6	CHCl ₃ - MeOH (30+70)	3x300 ml	6.1, 6.2, 6.3
7	MeOH - H ₂ O (1+1)	3x300 ml	7.1, 7.2, 7.3

Nach dünn-schichtchromatographischer Kontrolle im System Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1) wurden folgende Sammelfraktionen gebildet:

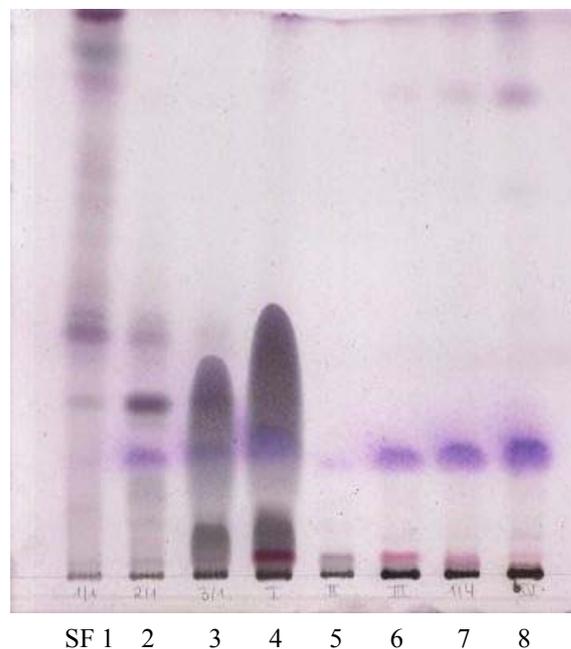
Tabelle 4: Sammelfraktionen von SC 1 (VLC)

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge
1	1.1	10,6 mg
2	1.2	13,6 mg
3	1.3	84,6 mg
4	1.4 + 1.5 + 2.1	65,3 mg
5	2.2 + 2.3 + 3.1	104,6 mg
6	3.2 + 3.3	69,6 mg
7	4.1	19,8 mg
8	4.2 + 4.3	184,9 mg
9	5.1	74,3 mg
10	5.2	303,7 mg
11	5.3 + 5.4 + 6.1	827,5 mg
12	6.2 + 6.3 + 7.1	3,51 g
13	7.2 + 7.3	10,73 g

Abbildung 10: DC der Sammelfractionen 1-8 von SC 1 (VLC) unter UV_{366 nm}

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Abbildung 11: DC der Sammelfractionen 1-8 von SC 1 (VLC) nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

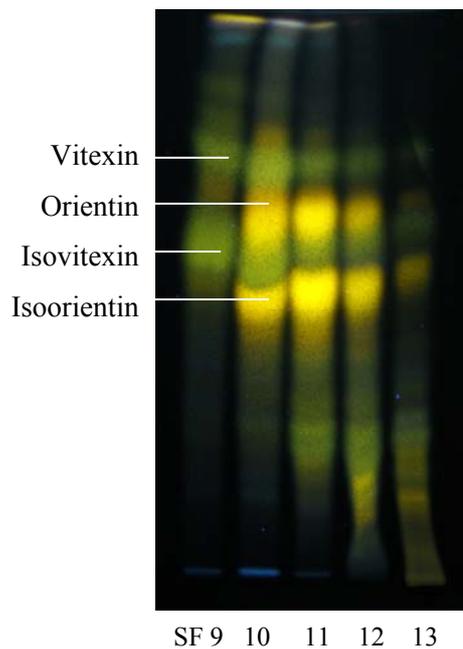
Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

Unter UV waren in den SF 1, 2 und 8 bei R_f ca. 0,46 leicht blau fluoreszierende Banden zu erkennen. Bei den Hauptkomponenten in SF 2 und 3 handelte es sich um rot fluoreszierende Chlorophylle. Es wurde anschließend mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens besprüht, um nicht fluoreszierende Begleitstoffe sichtbar zu machen. Dabei zeigten sich in SF 3 und 4 besonders hohe Anteile an Ballaststoffen. Die Zusammensetzung der polaren Fraktionen wurde im DC-System für Flavonoide überprüft.

Abbildung 12: DC der Sammelfraktionen 9-13 von SC 1 (VLC)



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase B: Ethylacetat – Ameisensäure conc. – Essigsäure conc. – Wasser (100+11+11+27)

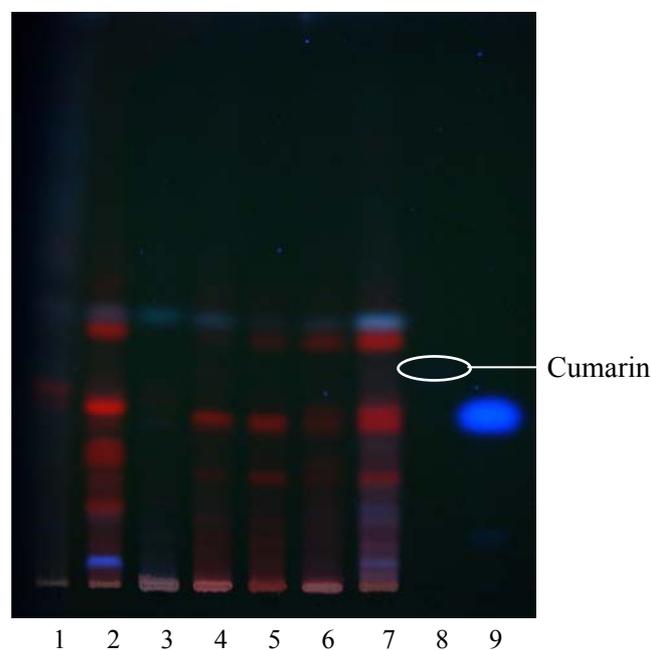
Detektion: Naturstoffreagenz A / PEG

Die Flavonoide waren in den SF 9-12 stark angereichert. Es konnten in SF 9 überwiegend Vitexin und Isovitexin detektiert werden. SF 10-12 enthielten neben diesen Flavonoiden auch deutliche Anteile von Orientin und Isoorientin.

4.3 Vergleich von SF 1, SF 2 und SF 8 der SC 1 mit Fraktionen vorangegangener Auftrennungen

Die Sammelfractionen 1, 2 und 8 von SC 1 (VLC) zeigten leicht blau fluoreszierende Banden. Diese SF wurden mit vier verschiedenen Fraktionen verglichen, die im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit entstanden waren [11]. Diese 4 Fraktionen (W1-W4) unterschiedlichen Reinheitsgrades zeigten ebenfalls eine blau fluoreszierende Bande bei R_f ca. 0,46. Ziel war es festzustellen, ob es sich um die gleiche Substanz handelt. Weiters wurde mit Cumarin und Herniarin verglichen.

Abbildung 13: DC-Vergleich der SF 1, 2 und 8 von SC 1 mit Fraktionen einer vorangegangenen Diplomarbeit [11] unter UV_{366 nm}



Bahn	Aufgetragene Substanz
1	SC 1 / SF 1
2	SC 1 / SF 2
3	SC 1 / SF 8
4	W 1
5	W 2
6	W 3
7	W 4
8	Cumarin
9	Herniarin

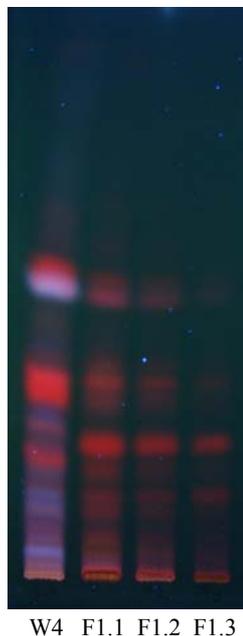
Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der blau fluoreszierenden Bande der Fraktionen W1-W4 und der Sammelfractionen 1, 2 und 8 der SC 1 um die gleiche Substanz mit R_f ca. 0,46 handelt. Bei der Verbindung handelte es sich weder um Cumarin noch um Herniarin.

Um sicher zu stellen, dass in den Fraktionen F 1.1, F 1.2 und F 1.3 (siehe 4.2, Seite 13) diese blau fluoreszierende Bande nicht enthalten ist, wurden diese mit der Fraktion W 4 verglichen.

Abbildung 14: DC-Vergleich der Fraktionen F 1.1, F 1.2 und F 1.3 mit W 4 unter UV_{366 nm}



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Die DC zeigte, dass die Substanz in F 1.1 und F 1.2 nur in sehr geringer Menge auftrat und damit eine weitere Auftrennung dieser Fraktionen nicht sinnvoll war.

4.4 Aufarbeitung des Passionsblumenkrautextraktes

Da die Mengen der Fraktionen, die die gesuchte Substanz enthielten, sehr gering waren und die Fraktionen komplexe Zusammensetzung zeigten, wurde nochmals eine größere Menge an Extrakt aufgearbeitet.

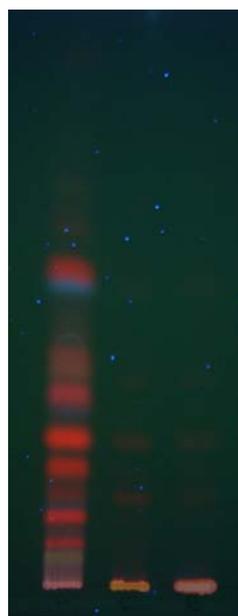
4.4.1 Fraktionierung des Extraktes

Die Reihenfolge der Extraktionsmittel wurde bei dieser Fraktionierung im Vergleich zum Vorversuch (siehe 4.2, Seite 13) abgeändert. Es wurde nach steigender Polarität in der Reihenfolge mit Petrolether, Chloroform und 1-Butanol extrahiert. Dazu wurden 50 g Extrakt 3-mal mit je 150 ml Petrolether versetzt und 20 min. mit Ultraschall behandelt. Das Gemisch wurde durch Zentrifugation getrennt, der Überstand abpipetiert und unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Auf gleiche Weise wurde das Extrakt anschließend mit 6-mal je 150 ml Chloroform und 6-mal je 150 ml 1-Butanol behandelt. Bei der Zentrifugation des Gemisches von Extrakt und Chloroform konnte nicht vollständig getrennt werden. Der Überstand blieb trüb, weshalb die Ausbeute des Chloroformauszugs F 2.2 sehr hoch war (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: 1. Fraktionierung des Extraktes

Bezeichnung	Lösungsmittel	Mengen (g)
F 2.1	Petrolether	0,38
F 2.2	Chloroform	6,98
F 2.3	1-Butanol	0,50
F 2.4	Rückstand	41,79

Abbildung 15: DC-Kontrolle von F 2.1, F 2.2 und F 2.3 unter UV_{366 nm}



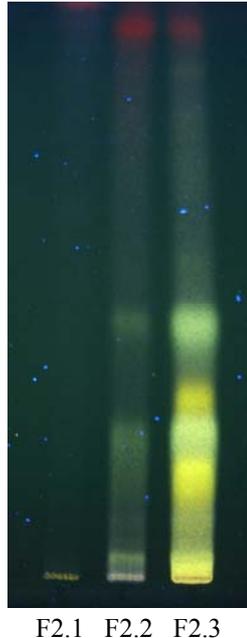
F2.1 F2.2 F2.3

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Die DC-Kontrolle zeigte, dass die gesamten apolaren Inhaltsstoffe des Extraktes in die Petroletherfraktion übergegangen sind. In dieser Fraktion war die gesuchte blau fluoreszierende Bande bei einem R_f -Wert von ca. 0,53 zu sehen (siehe Abbildung 15, Seite 19).

Abbildung 16: DC von F 2.1, F 2.2 und F 2.3 unter Verwendung der mobilen Phase E



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase E: Ethylacetat – Ameisensäure conc. – Essigsäure conc. – Wasser (100+6+6+2)

Detektion: Naturstoffreagenz A / PEG

Aus Abbildung 16 geht hervor, dass in den Fraktionen F 2.2 und F 2.3 polare Anteile des Extraktes enthalten waren.

Der Petroletherauszug F 2.1 wurde mit SF 2 von SC 1 und einer Fraktion aus einer vorangegangenen Diplomarbeit [11] (W4) verglichen, um zu überprüfen, ob es sich bei den in diesen Fraktionen enthaltenen blau fluoreszierenden Banden um die gleiche Substanz handelte.

Abbildung 17: DC-Vergleich von F 2.1 mit SF 2 von SC 1 und W4 unter UV_{366 nm}

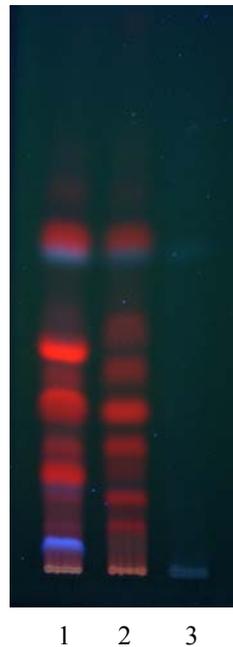


Abbildung 18: DC-Vergleich von F 2.1 mit SF 2 von SC 1 und W4 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens



Bahn	Aufgetragene Substanz
1	SC 1 / SF 2
2	F 2.1
3	W4

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass die in diesen Fraktionen enthaltenen blau fluoreszierenden Banden gleiches chromatographisches Verhalten aufwiesen. Nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens war in F 2.1 eine breite graue Zone von Ballaststoffen sichtbar.

4. Ergebnisse

Um die Ausbeute der blaufluoreszierenden Komponente zu erhöhen, wurden nochmals 50 g des Extraktes mit Petrolether extrahiert. Dazu wurden 50 g Extrakt 5-mal mit je 250 ml Petrolether versetzt und 20 min. im Ultraschallbad behandelt. Das Gemisch wurde mittels Zentrifuge getrennt, der Überstand abpipettiert und unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Es wurden 429 mg Fraktion 3.1 erhalten. Eine weitere Aufarbeitung dieser Extraktportion erfolgte nicht, da die gesuchte Substanz ausschließlich mit Petrolether angereichert werden konnte.

4.4.2 SC 2

Die beiden Petroletherfraktionen F 2.1 und F 3.1 wurden vereinigt und 784 mg davon mittels Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 aufgetrennt. Sephadex LH-20 wurde als stationäre Phase gewählt, um die in den Petroletherauszügen enthaltenen, eventuell phenolischen, Begleitstoffe abzutrennen.

Durchmesser: 3 cm

Füllhöhe: 25 cm

Stationäre Phase: Sephadex LH-20

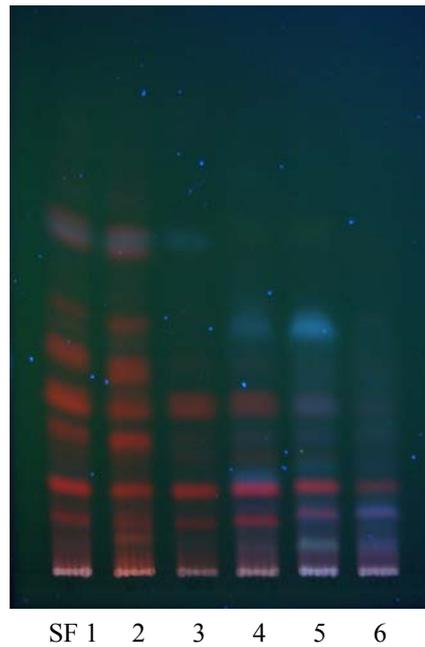
Mobile Phase: Ethylacetat

Aufgetragen: 784 mg Fraktion F 2.1 und F 3.1

Es wurden 90 Fraktionen zu je ca. 5 ml/30 min. gesammelt.

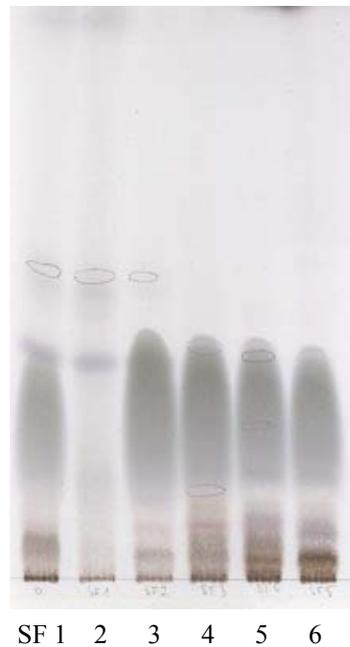
Tabelle 6: Sammelfraktionen von SC 2

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1 - 7	153
2	8 - 12	425
3	13 - 17	31
4	18 - 22	5
5	23 - 33	3
6	34 - 90	12

Abbildung 19: DC der Sammelfractionen von SC 2 unter UV_{366 nm}

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Abbildung 20: DC der Sammelfractionen von SC 2 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

4. Ergebnisse

Abbildung 19 (siehe Seite 23) zeigte, dass die gesuchte blau fluoreszierende Bande, Substanz X, bei einem R_f -Wert von ca. 0,61 in SF 1 und 2 enthalten war. In SF 4 und 5 war eine weitere blau fluoreszierende Substanz bei einem R_f -Wert von ca. 0,44 enthalten. Nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens war zu erkennen, dass in SF 2 relativ geringe Anteile an Ballaststoffen enthalten waren.

4.4.3 SC 3

Um SF 2 der SC 2 weiter aufzureinigen, wurde diese mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgetrennt. Als mobile Phase wurde Petrolether-Ethylacetat-Aceton (13+2+1) verwendet. Dieses Gemisch zeigte im DC-Vergleich zu dem Gemisch Petrolether-Toluol-Ethylacetat-Aceton (13+4+2+1) eine etwas bessere Auftrennung.

Durchmesser: 2 cm

Füllhöhe: 85 cm

Stationäre Phase: ICN Silica 60 A

Mobile Phase: Petrolether – Ethylacetat – Aceton (13+2+1)

Aufgetragen: 429 mg SF 2 der SC 2

Es wurden 150 Fraktionen zu je ca. 10 ml/30 min. gesammelt.

Tabelle 7: Sammelfraktionen von SC 3

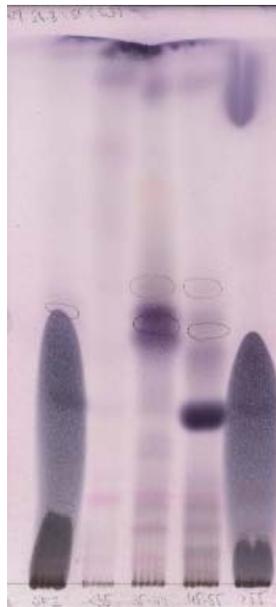
Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1 - 34	12
2	35 - 44	4
3	45 - 55	5
4	56 - 150	408

Abbildung 21: DC der Sammelfractionen von SC 3 unter UV_{366 nm}

GF SF 1 2 3 4

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Abbildung 22: DC der Sammelfractionen von SC 3 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

GF SF 1 2 3 4

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

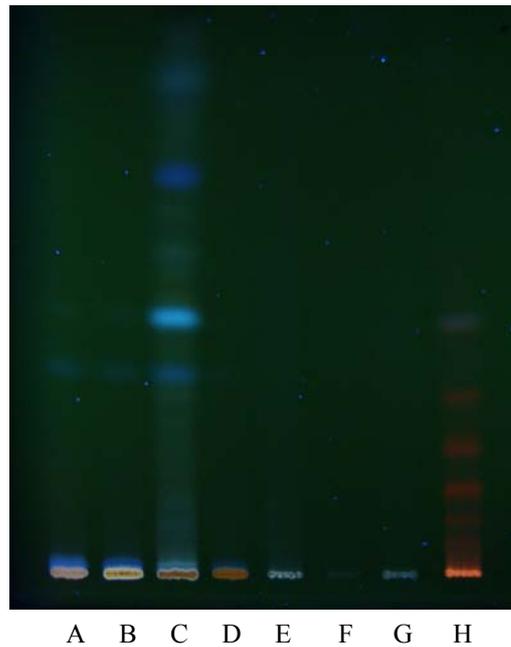
Substanz X war in SF 2 angereichert. Das in der Gesamtfraktion rot fluoreszierende Chlorophyll wurde weitgehend abgetrennt. Nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens ist zu erkennen, dass die Abtrennung des Großteils der Begleitstoffe gelungen ist. Diese waren in SF 4 enthalten. In SF 2 wurden jedoch neben Substanz X noch mehrere andere Komponenten detektiert. Aufgrund der geringen Fraktionsmenge von 4 mg erfolgte keine weitere Auftrennung dieser Fraktion.

4.5 Auftrennung von Fraktionen einer vorangegangenen Diplomarbeit

4.5.1 Dünnschichtchromatographische Überprüfung

Es wurden Fraktionen untersucht, die im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit hergestellt worden waren [10]. Diese Fraktionen (A-R) stammten aus *Passiflorae herba* und wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln hergestellt. Weitere Fraktionen waren Ergebnis aus verschiedenen säulenchromatographischen Trennvorgängen. Die Fraktionen wurden auf das Vorhandensein von Substanz X dünnschichtchromatographisch untersucht und aufgrund der dünnschichtchromatographischen Voruntersuchung und der zur Verfügung stehenden Menge ausgewählt.

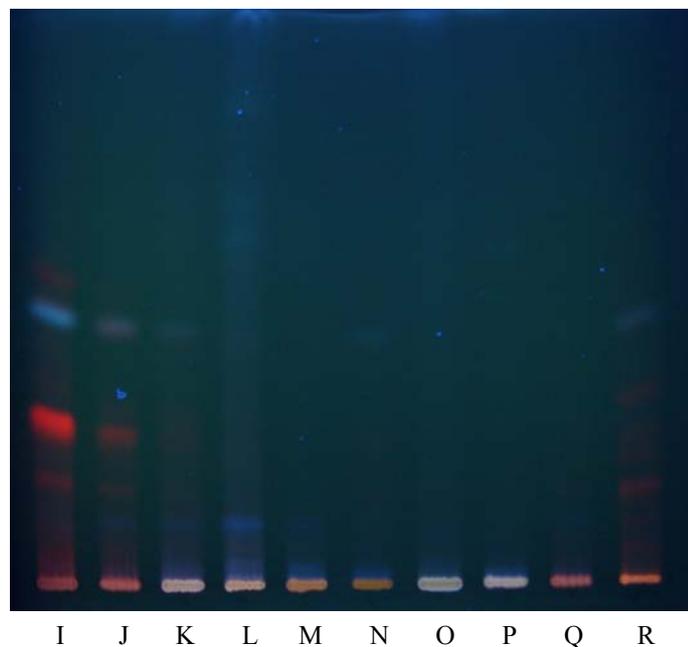
Abbildung 23: DC-Überprüfung von Fraktionen aus vorangegangener Diplomarbeit unter UV_{366 nm}



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Abbildung 24: DC-Überprüfung von Fraktionen aus vorangegangener Diplomarbeit unter UV_{366 nm}



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Fraktion C zeigte mehrere blau fluoreszierende Banden. Diese Fraktion wurde deshalb mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (siehe 4.5.2, SC 4) weiter aufgetrennt. Die Fraktionen I, J und K zeigten Ähnlichkeit zu SF 1 von SC 1 (siehe 4.2.1, Seite 13). Diese Fraktionen wurden vereinigt und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (siehe 4.5.3, SC 5, Seite 32) aufgetrennt.

Tabelle 8: Mengen der Fraktionen C, I, J und K

Fraktion	Menge (mg)
C	856
I	1900
J	594
K	166
Summe	2660

4.5.2 SC 4

Durchmesser: 2 cm

Füllhöhe: 85 cm

Stationäre Phase: ICN Silica 60 A

Mobile Phase: Petrolether – Ethylacetat – Aceton (13+2+1)

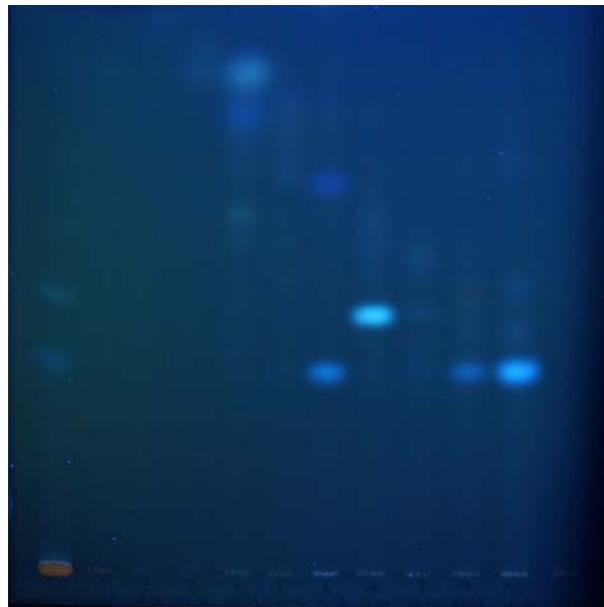
Aufgetragen: 856 mg Fraktion C

Es wurden 105 Fraktionen zu je ca. 6 ml/30 min. gesammelt.

Da die Fraktionskontrolle zeigte, dass alle blau fluoreszierenden Komponenten der aufgetragenen Fraktion bis Fraktion 75 bereits eluiert wurden, erfolgte nach Fraktion 105 keine weitere Elution.

Tabelle 9: Sammelfractionen von SC 4

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1 - 27	8,7
2	28 - 31	4,5
3	32 - 36	7,8
4	37 - 42	0,9
5	43 - 46	0,5
6	47 - 56	1,9
7	57 - 59	1,8
8	60 - 62	2,1
9	63 - 67	2,5
10	68 - 74	2,1
11	75 - 105	10

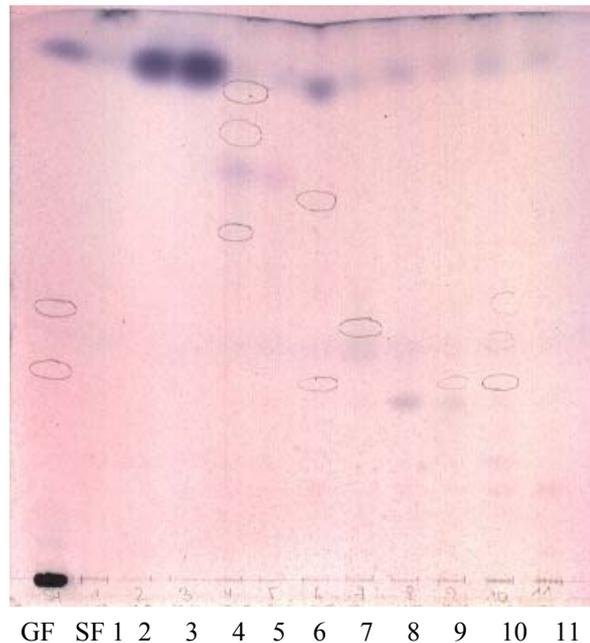
Abbildung 25: DC der Sammelfractionen von SC 4 unter UV₃₆₆ nm

GF SF 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Abbildung 26: DC der Sammelfractionen von SC 4 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens



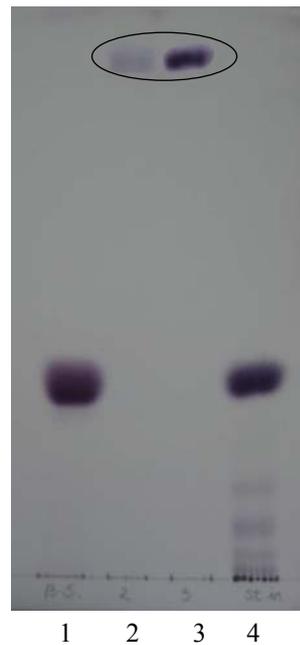
Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

In Abbildung 25 (siehe Seite 29) ist zu sehen, dass die zwei blau fluoreszierenden Banden der Gesamtfraktion in den Sammelfractionen 6, 7, 9 und 10 angereichert wurden. Weiters waren in Sammelfraktion 4 bei R_f ca. 0,8 und 0,88 zwei schwach blau fluoreszierenden Banden zu erkennen. Nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens war zu sehen, dass in den Sammelfractionen 7, 9 und 10 nur geringe Anteile an Begleitsubstanzen enthalten waren, während Sammelfraktion 6 neben den beiden blau fluoreszierenden Komponenten auch größere Anteile einer terpenoiden Substanz bei R_f ca. 0,87 aufwies. Sammelfractionen 7 und 10 der SC 4 wurden mittels NMR-Spektroskopie untersucht (siehe 4.8, Seite 46). Die Fractionen 2 und 3 enthielten eine violett anfärbbare Substanz bei R_f ca. 0,91 in chromatographisch einheitlicher Form. Aufgrund der Färbung nach Detektion wurde ein dünnschichtchromatographischer Vergleich mit Sterolen gemacht.

Abbildung 27: DC-Vergleich von SF 2 und SF 3 mit Sterolen



Bahn	Aufgetragene Substanz
1	β -Sitosterol
2	SC 4 / SF 2
3	SC 4 / SF 3
4	Stigmasterin

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase F: n-Pentan – Ethylacetat (85+15)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

Mittels DC konnte eindeutig ausgeschlossen werden, dass es sich bei SF 2 und SF 3 der SC 4 um die Sterole β -Sitosterol und Stigmasterin handelt. Aufgrund des großen Unterschieds in der Polarität dürfte die Substanz in SF 2 und 3, Substanz Y, auch keine Ähnlichkeit mit weiteren Sterolen wie z.B. Cholesterol haben. Daher sollte die Struktur der Verbindung mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (siehe 4.8, Seite 46).

4.5.3 SC 5

Durchmesser: 2 cm

Füllhöhe: 85 cm

Stationäre Phase: ICN Silica 60 A

Mobile Phase: Petrolether – Ethylacetat – Aceton (13+2+1)

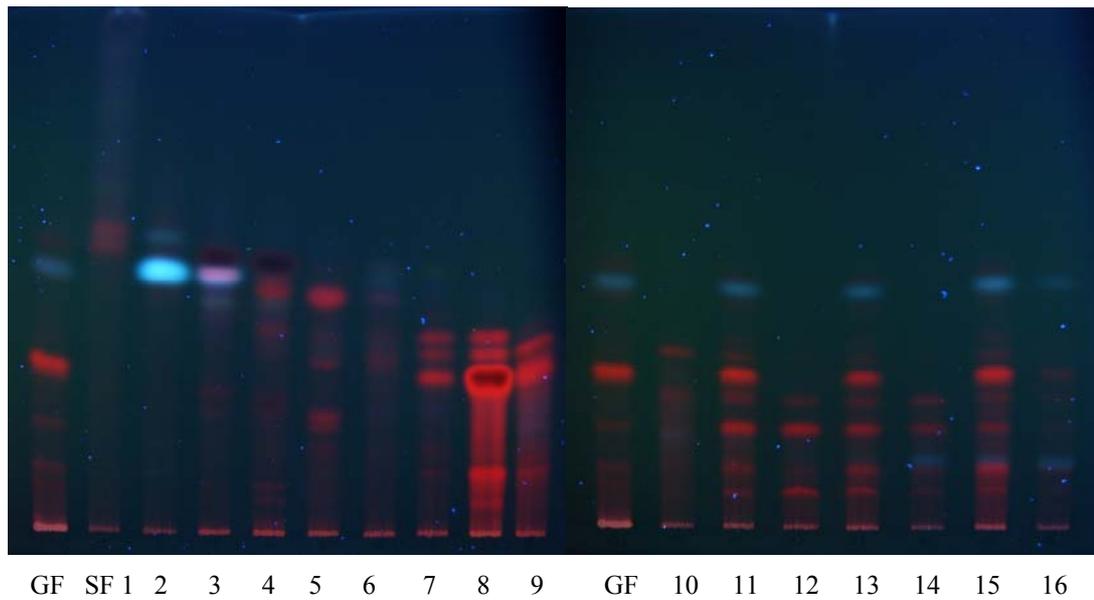
Aufgetragen: 2660 mg Fraktionen I, J, K

Es wurden 170 Fraktionen zu je ca. 6 ml/30 min. gesammelt.

Da die Fraktionskontrolle zeigte, dass alle blau fluoreszierenden Komponenten der aufgetragenen Fraktionen bis Fraktion 170 bereits eluiert waren, erfolgte nach Fraktion 170 keine weitere Elution.

Tabelle 10: Sammelfraktionen von SC 5

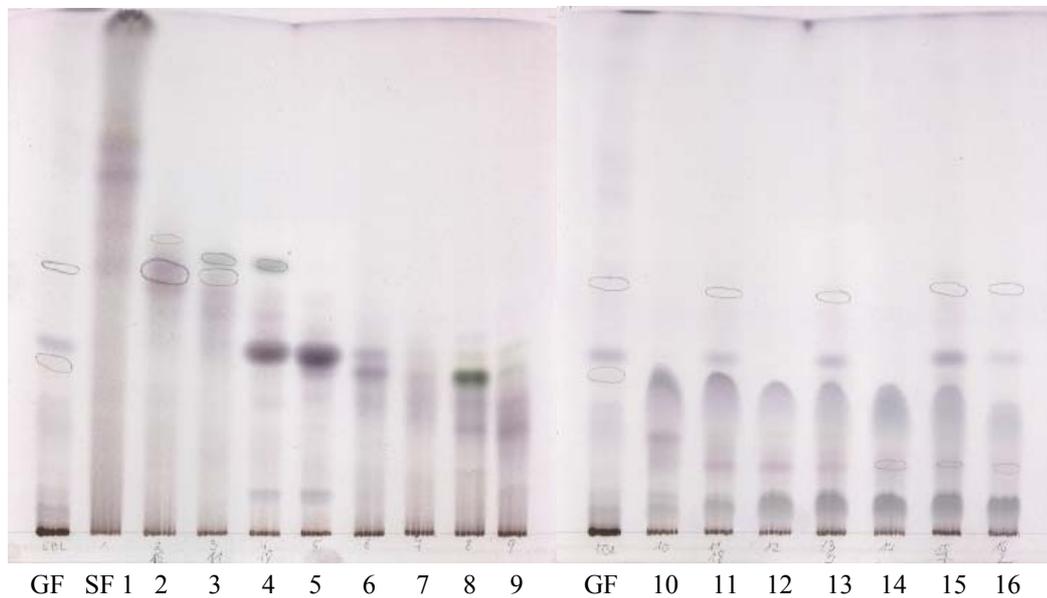
Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1 - 42	121,8
2	43 - 47	16,6
3	48 - 52	11,7
4	53 - 57	18,5
5	58 - 62	17,8
6	63 - 67	8,5
7	68 - 72	6,9
8	73 - 82	12,2
9	83 - 103	13,9
10	104 - 117	17,7
11	118 - 128	18,1
12	129 - 137	8,0
13	138 - 142	3,7
14	143 - 152	7,9
15	153 - 157	7,4
16	158 - 170	2,8

Abbildung 28: DC der Sammelfractionen von SC 5 unter UV_{366 nm}

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Abbildung 29: DC der Sammelfractionen von SC 5 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

In Abbildung 28 (siehe Seite 33) ist zu sehen, dass die blau fluoreszierende Bande der Gesamtfraktion größtenteils in SF 2 enthalten war. Weiters waren leicht blau fluoreszierende Banden in SF 11, 13 und 15 zu sehen. Es ist gut gelungen, das störende Chlorophyll abzutrennen, welches als stark rot fluoreszierende Zonen vor allem in SF 7, 8 und 9 zu erkennen war. Nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens wurde deutlich, dass SF 2 noch immer kleinere Anteile störender Begleitstoffe enthielt und Substanz X nicht in reiner Form vorlag.

4.6 Aufarbeitung der Droge

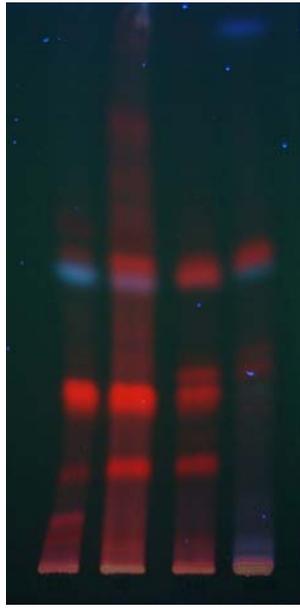
Da sowohl in den Aufarbeitungen des Extraktes, als auch in den Fraktionen einer vorangegangenen Diplomarbeit nur geringe Mengen der gesuchten Substanz X nachzuweisen waren, wurde mit Passionsblumenkraut weitergearbeitet.

4.6.1 Fraktionierung der Droge

210 g Passionsblumenkraut (PhEur) wurden pulverisiert und anschließend 4-mal mit je 1500 ml Petrolether extrahiert. Es wurde bei jeder Extraktion eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, der Drogenrückstand abgenutscht und das Lösungsmittel zur Trockene gebracht. Auf gleiche Weise wurde die Droge 4-mal mit je 1500 ml Chloroform und weiters 3-mal mit je 1500 ml 1-Butanol extrahiert. Die drei erhaltenen Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch überprüft.

Tabelle 11: Fraktionierung der Droge

Fraktion	Lösungsmittel	Mengen (g)
F 3.1	Petrolether	6,74
F 3.2	Chloroform	4,25
F 3.3	1-Butanol	8,20

Abbildung 30: DC von F 3.1, F 3.2 und F 3.3 unter UV_{366 nm}

W4 F 3.1 F 3.2 F 3.3

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Abbildung 31: DC von F 3.1, F 3.2 und F 3.3 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

W4 F 3.1 F 3.2 F 3.3

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

Substanz X war in F 3.3 enthalten ist. Auch in F 3.1 war auf gleicher Höhe eine blauviolett fluoreszierende Bande zu erkennen. In Abbildung 31 (siehe Seite 35) ist zu sehen, dass F 3.3 weniger unerwünschte Begleitstoffe enthielt als F 3.1.

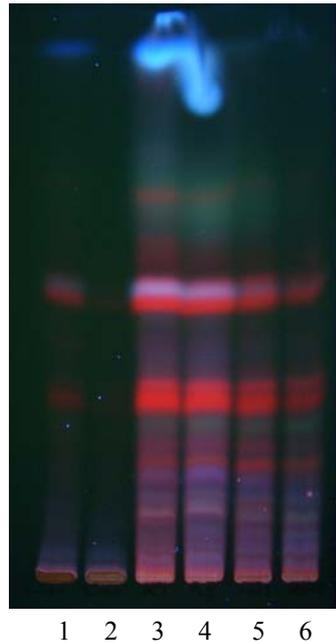
Um F 3.3 und F 3.1 weiter aufzureinigen, wurden beide Fraktionen jeweils mit einem noch apolareren Lösungsmittel extrahiert, um die unerwünschten apolaren Begleitstoffe zu entfernen.

4.6.1.1 Aufreinigung von F 3.3

Fraktion F 3.3 (8,2 g) wurde 2-mal mit je 100 ml Petrolether versetzt und 30 min bei 30 °C im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde zentrifugiert und der Überstand zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde weiters 2-mal mit je 100 ml n-Heptan versetzt und ebenfalls 30 min bei 30 °C im Ultraschallbad behandelt, zentrifugiert und der Überstand zur Trockene gebracht. Die zwei erhaltenen Petrolether-Auszüge, F 3.3 / PE 1 und F 3.3 / PE 2, und die zwei n-Heptan-Auszüge, F 3.3 / Heptan 1 und F 3.3 / Heptan 2, wurden anschließend dünnschichtchromatographisch überprüft.

Tabelle 12: Aufreinigung von F 3.3 mit Petrolether und n-Heptan

Fraktion	Lösungsmittel	Mengen (mg)
F 3.3 / PE 1	Petrolether	595
F 3.3 / PE 2	Petrolether	69
F 3.3 / Heptan 1	n-Heptan	43
F 3.3 / Heptan 2	n-Heptan	23

Abbildung 32: DC nach Aufreinigung von F 3.3 unter UV_{366 nm}

Bahn	Aufgetragene Substanz
1	F 3.3
2	F 3.3 / Rückstand
3	F 3.3 / PE 1
4	F 3.3 / PE 2
5	F 3.3 / Heptan 1
6	F 3.3 / Heptan 2

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

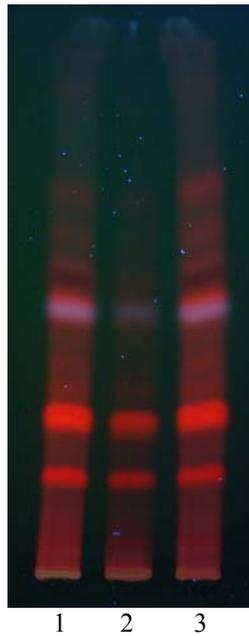
Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

In Abbildung 32 ist zu sehen, dass im Rückstand von Fraktion F 3.3 nach der Extraktion mit Petrolether und Heptan die blau fluoreszierende Substanz X nicht mehr enthalten war. Der Großteil der Verbindung war in den zwei Petrolether-Auszügen zu finden. Geringere Mengen auch in den n-Heptan-Auszügen.

4.6.1.2 Aufreinigung von F 3.1

Fraktion F 3.1 (6,74 g) wurde mit 100 ml n-Heptan versetzt und 30 min. bei 30 °C im Ultraschallbad behandelt. Es wurde zentrifugiert und der Überstand zur Trockene gebracht. Die Fraktion hatte sich zum Großteil im n-Heptan gelöst, der Eindampfrückstand des Überstandes betrug 5,79 g.

Abbildung 33: DC nach Aufreinigung von F 3.1 unter UV_{366 nm}



Bahn	Aufgetragene Substanz
1	F 3.1
2	F 3.1 / Rückstand
3	F 3.1 / Heptan

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

In der DC-Kontrolle zeigte sich, dass die gesuchte blau fluoreszierende Bande zum größten Teil im n-Heptan-Auszug enthalten war.

Durch die Extraktion mit apolaren Lösungsmitteln waren aus den Fraktionen F 3.1 und F 3.3 gewisse Anteile an polaren Begleitstoffen entfernt worden. Zur Isolierung von Substanz X erfolgten weitere säulenchromatographische Trennschritte.

Um die Ausbeute an Substanz X zu erhöhen, wurden die erhaltenen Petrolether-, und Heptan-Auszüge vereinigt. Weitere aufgereinigte Fraktionen, die die gesuchte blau fluoreszierende Bande aufwiesen, wurden hinzugefügt (siehe Tabelle 13, Seite 39) und es wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel weiter aufgereinigt.

4.6.2 SC 6

Tabelle 13: Fraktionen, die mittels SC 6 aufgetrennt wurden

Bezeichnung	Menge (mg)
F 3.3 / PE 1	595
F 3.3 / PE 2	69
F 3.3 / Heptan 1	43
F 3.3 / Heptan 2	23
F 3.1 / Heptan	5790
F 3.1 / Rest	910
SF 8 der SC 1	185
SF 1 der SC 2	153
W 2, W 3	372

Säulenbeschreibung:

Durchmesser: 2,5 cm

Füllhöhe: 85 cm

Stationäre Phase: ICN Silica 60 A

Mobile Phase: Petrolether – Ethylacetat – Aceton (13+2+1)

Aufgetragen: 8,14 g (Zusammensetzung siehe Tabelle 13)

Es wurden 125 Fraktionen zu je ca. 10 ml/30 min. gesammelt.

Da die Fraktionskontrolle zeigte, dass alle blau fluoreszierenden Komponenten der aufgetragenen Fraktionen bis Fraktion 105 bereits eluiert waren, erfolgte nach Fraktion 125 keine weitere Elution.

Tabelle 14: Sammelfraktionen von SC 6

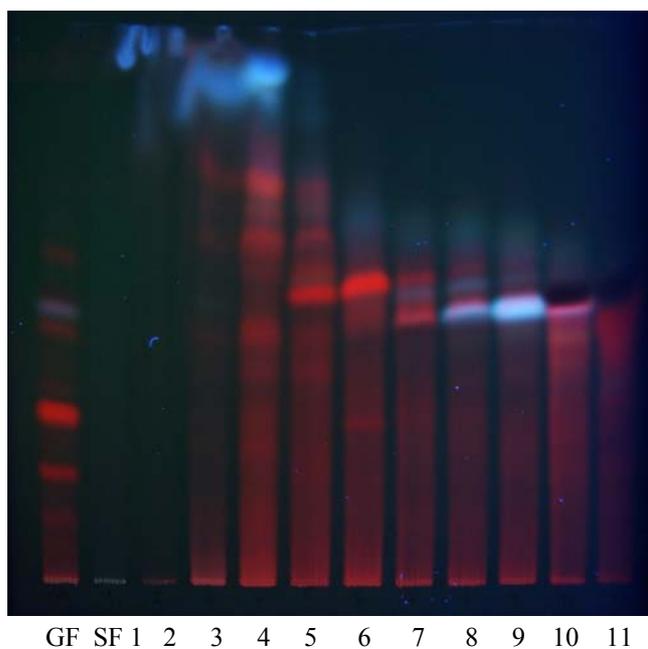
Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1 - 23	11
2	24 - 47	1822
3	48 - 58	423
4	59 - 63	185
5	64 - 72	222

4. Ergebnisse

Fortsetzung der Tabelle 14

Sammelfraktion	Einzelfaktionen	Menge (mg)
6	73 - 82	127
7	83 - 87	72
8	88 - 92	61
9	93 - 98	118
10	99 - 104	163
11	105 - 113	185
12	113 - 125	221

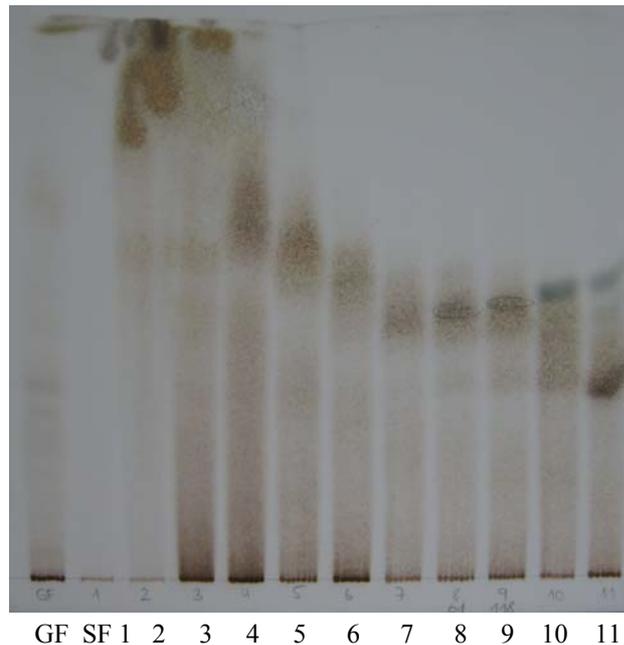
Abbildung 34: DC der Sammelfraktionen von SC 6 unter UV_{366 nm}



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Abbildung 35: DC der Sammelfractionen von SC 6 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

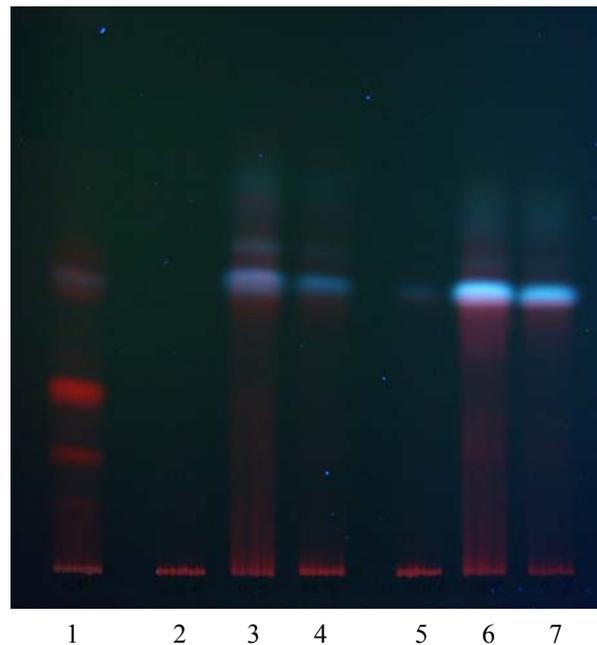
Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens

Durch SC 6 konnten große Mengen an polaren Begleitstoffen abgetrennt werden. Außerdem waren hohe Anteile blau fluoreszierender apolarer Komponenten in SF 1, 2 und 3 entfernt worden. Substanzen des Chlorophyll-Typs waren besonders in SF 4, 5, 6 und 7 detektierbar. Substanz X war in SF 8 und 9 angereichert. Nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens war zu sehen, dass diese Fraktionen noch immer Anteile störender Begleitstoffe enthielten.

4.6.3 Weitere Aufreinigung von SF 8 und SF 9 der SC 6

SF 8 und SF 9 der SC 6 wurden jeweils 2-mal mit 5 ml Petrolether versetzt und 15 min. im Ultraschallbad behandelt. Es wurde zentrifugiert und der Überstand zur Trockene gebracht. Aus 61 mg SF 8 konnten nur wenige polare Begleitstoffe entfernt werden, es resultierten insgesamt 56 mg SF 8 / PE 1 und SF 8 / PE 2. Die aus SF 9 (118 mg) abgetrennte Menge an polaren Ballaststoffen war etwas höher, SF 9 / PE 1 und SF 9 / PE 2 enthielten insgesamt 96 mg der ursprünglichen Fraktion.

Abbildung 36: DC nach Aufreinigung von SF 8 und SF 9 der SC 6 unter UV_{366 nm}



Bahn	Aufgetragene Substanz
1	GF SC 6
2	SF 8 Rückstand
3	SF 8 / PE 1
4	SF 8 / PE 2
5	SF 9 Rückstand
6	SF 9 / PE 1
7	SF 9 / PE 2

Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Die Petrolether-Auszüge von SF 8 wurden mittels Säulenchromatographie an Sephadex weiter aufgereinigt. Ebenso wurden die Petrolether-Auszüge von SF 9 weiter aufgereinigt.

4.6.4 SC 7

Durchmesser: 1,5 cm

Füllhöhe: 55 cm

Stationäre Phase: Sephadex LH-20

Mobile Phase: Ethylacetat

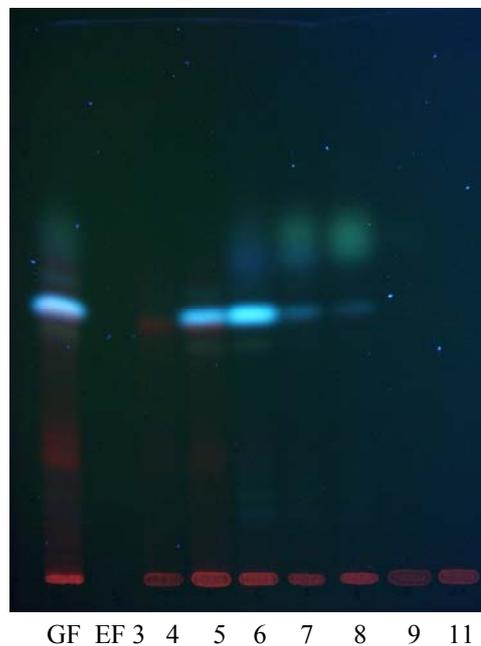
Aufgetragen: 96 mg SF 9 / PE 1 und SF 9 / PE 2

Es wurden 34 Fraktionen zu je ca. 4 ml/30 min. gesammelt.

Tabelle 15: Sammelfraktionen von SC 7

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1 - 4	12,9
2	5	58,6
3	6	6,8
4	7 - 8	4,7
5	9 - 34	12,2

Abbildung 37: DC ausgewählter Einzelfraktionen von SC 7 unter UV_{366 nm}



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

Durch SC an Sephadex wurden in den Einzelfraktionen 5 und 6 der Großteil von Substanz X angereichert, wobei in beiden Fraktionen am Start noch deutliche Anteile von polaren Ballaststoffen detektiert wurden.

4.6.5 SC 8

Durchmesser: 1,5 cm

Füllhöhe: 55 cm

Stationäre Phase: Sephadex LH-20

Mobile Phase: Ethylacetat

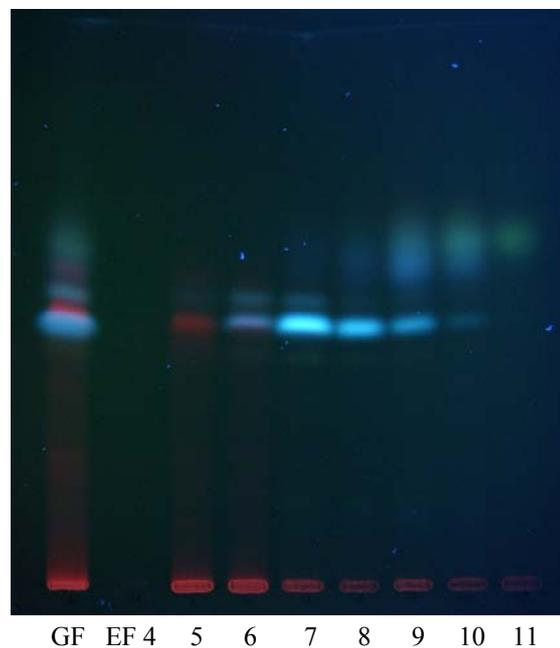
Aufgetragen: 56 mg SF 8 / PE 1 und SF 8 / PE 2

Es wurden 15 Fraktionen zu je ca. 2 ml/15 min. gesammelt.

Tabelle 16: Sammelfraktionen von SC 8

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1 - 5	15,5
2	6 - 7	24,2
3	8 - 9	2,4
4	10 - 15	6,0

Abbildung 38: DC ausgewählter Einzelfraktionen von SC 8 unter UV_{366 nm}



Stationäre Phase I: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten

Mobile Phase A: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

In Einzelfraktion 7 war die höchste Konzentration von Substanz X enthalten, auch in den Einzelfraktionen 6, 8, und 9 wurde die Verbindung detektiert. Es wurden deshalb Einzelfraktion 6 und 7, sowie 8 und 9 vereinigt. SF 2 und 3 der SC 8 wurden mittels präparativer DC weiter aufgereinigt.

4.7 Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur Abtrennung von letzten Anteilen von Begleitstoffen wurden folgende Fraktionen, die Substanz X aufwies mittels präparativer Dünnschichtchromatographie weiter aufgereinigt:

Tabelle 17: Fraktionen für die präparative Dünnschichtchromatographie

Fraktion	Menge (mg)
SC 5 / SF 2	16,6
SC 7 / SF 2	58,6
SC 8 / SF 2	24,2
SC 8 / SF 3	2,4

Die Fraktionen wurden mit einem Auftragegerät strichförmig auf Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten aufgetragen und entwickelt. Die blau fluoreszierende Zone, die Substanz X enthielt, wurde jeweils abgekratzt und vom Kieselgel eluiert.

Abbildung 39: Präparative DC von Fraktion

SC 8 / SF 3 unter UV_{366 nm}



Abbildung 40: isolierte Substanz X nach

präparativer DC



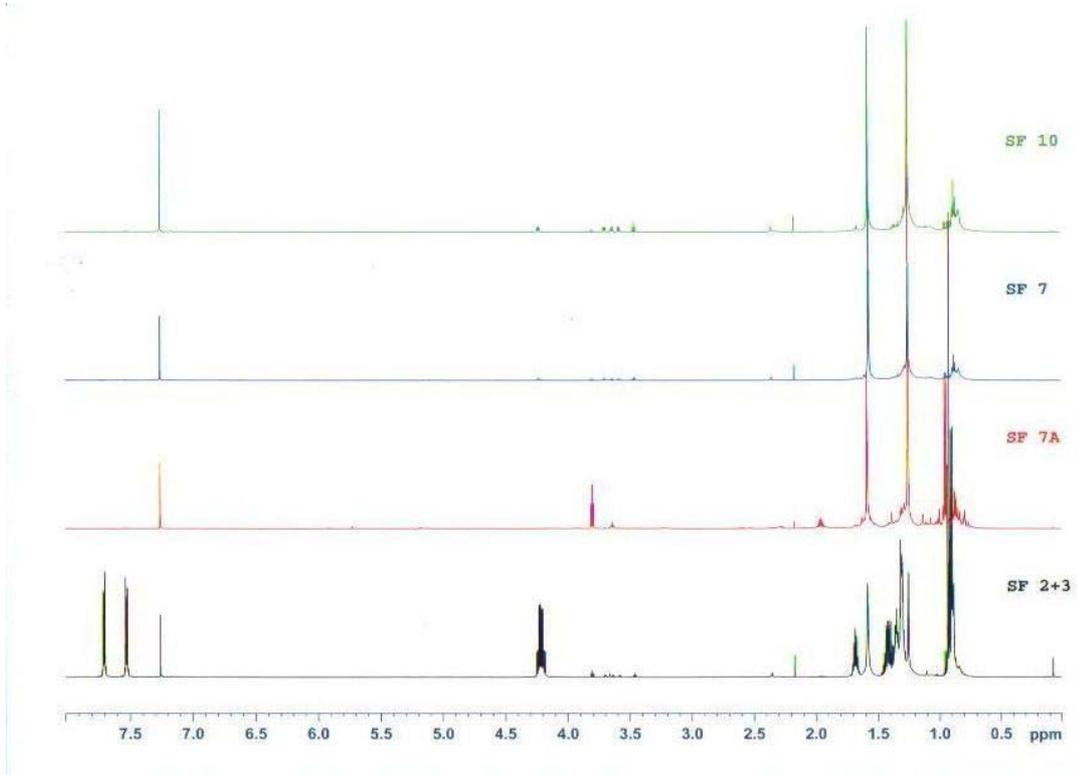
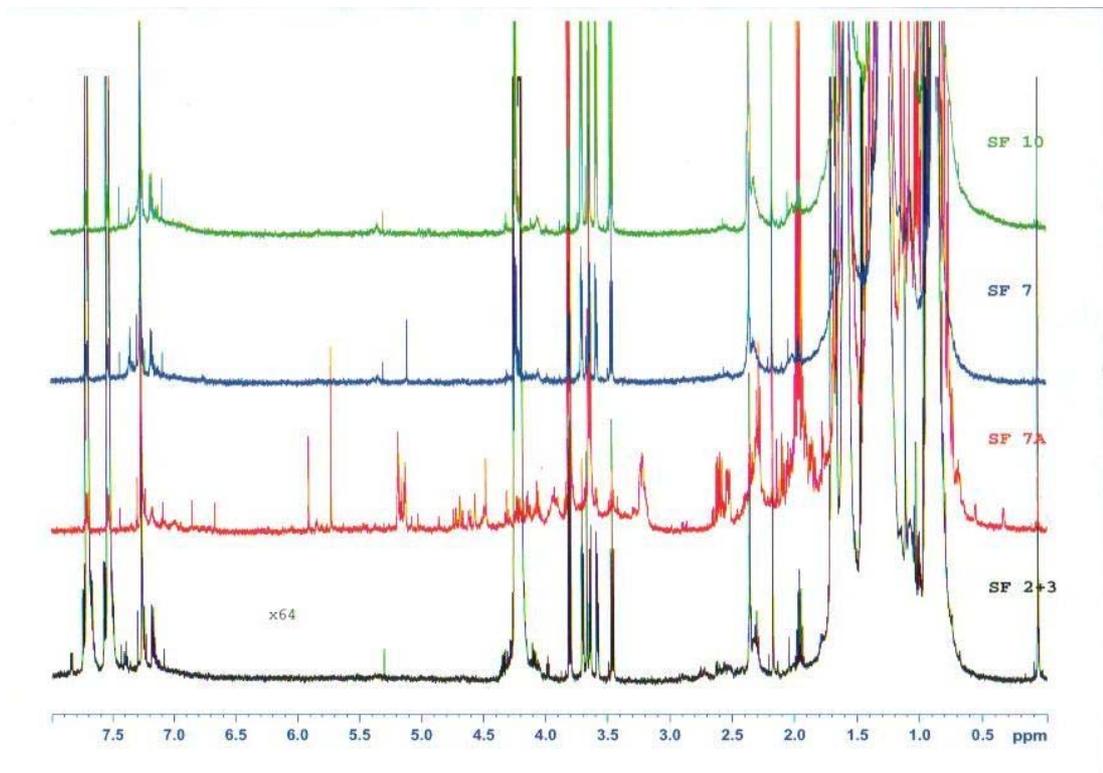
Die mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigten Fraktionen wurden vereinigt. Um Bindemittel aus dem Kieselgel zu entfernen, wurde die Fraktion in Ethylacetat gelöst und über eine Sephadex-Säule (Durchmesser: 5 mm, Füllhöhe: 7 cm) filtriert. Nach DC-Kontrolle standen 3,3 mg aufgereinigte Substanz X zur Verfügung.

4.8 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Aus Aufarbeitung mittels wiederholter SC, Verteilung und präparativer DC resultierten insgesamt vier Substanzen in chromatographisch einheitlicher Form. Es standen 1,1 mg der Substanz X (SC 4 / SF 7) und 4,2 mg der Substanz Y (SC 4 / SF 2+3) zur Verfügung. Weiters wurden SF 10 der SC 4 (2,4 mg) und Substanz X nach präparativer DC (3,3 mg) mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. In der Spektroskopie stellte sich heraus, dass alle vier Komponenten hohe Anteile an Weichmachern enthielten, weshalb keine Strukturaufklärung mittels NMR möglich war.

Tabelle 18: Bezeichnung der Proben für $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Fraktion	Bezeichnung der Probe
SC 4 / SF 10	SF 10
SC 4 / SF 7 (Substanz X)	SF 7
präp. DC (Substanz X)	SF 7A
SC 4 / SF 2+3 (Substanz Y)	SF 2+3

Abbildung 41: ^1H -NMR-Spektrum der vier IsolateAbbildung 42: ^1H -NMR-Spektrum der vier Isolate, x64

5 Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war, aus einem Passionsblumenkrautextrakt das von Dhawan et al. [9] beschriebene trisubstituierte Benzoflavon zu isolieren.

Im Rahmen eines Vorversuchs wurden 20 g des Passionsblumenkrautextraktes mit 1-Butanol (F 1.1), Petrolether (F 1.2) und Chloroform (F 1.3) extrahiert. Der Rückstand (F 1.4) wurde mittels Vacuum liquid chromatography an Sephadex aufgetrennt (siehe 4.2, Vorversuch zur Fraktionierung des Extraktes). Die Sammelfraktion, die die gesuchte Substanz enthielt, lag in sehr geringer Menge vor.

Es wurden anschließend insgesamt etwa 100 g des Passionsblumenkrautextraktes mit Petrolether extrahiert. Der erhaltene Petroletherauszug wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel weiter aufgereinigt (siehe 4.4.2, SC 2). Die Sammelfraktion, in der Substanz X angereichert werden konnte, wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel weiter aufgetrennt (siehe 4.4.3, SC 3). Es resultierte dabei eine Sammelfraktion von 4 mg, in der die gesuchte Substanz X angereichert vorlag.

Im weiteren Zuge dieser Arbeit wurden Fraktionen, die im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit [10] hergestellt worden waren, auf das Vorhandensein der unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm blau fluoreszierenden Substanz X untersucht. Fraktionen, in denen diese Verbindung in der dünnschichtchromatographischen Überprüfung detektierbar war, wurden vereinigt und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgetrennt (siehe 4.5.2, SC 4 und 4.5.3, SC 5). Aus SC 4 resultierten drei Isolate in chromatographisch einheitlicher Form. Eine Strukturaufklärung mittels NMR war aufgrund des hohen Anteils an Weichmachern für diese Komponenten nicht möglich.

Da in den Aufarbeitungen des Extraktes und in den Fraktionen der vorangegangenen Diplomarbeit nur geringe Mengen der gesuchten Substanz X nachzuweisen waren, wurde mit 210 g Passionsblumenkraut weitergearbeitet. Verschiedene aufgereinigte Fraktionen des Petroletherauszugs und des 1-Butanolauszugs wurden vereinigt. Weitere Fraktionen, die Substanz X enthielten, wurden hinzugefügt. Die vereinigten Fraktionen wurden mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgetrennt (siehe

4.6.2, SC 6). Es resultierten 2 Sammelfractionen, in denen Substanz X angereichert werden konnte. Diese wurden mittels Verteilung und präparativer Dünnschichtchromatographie aufgereinigt. Aus einer weiteren Fraktion (SF 2 der SC 5, siehe 4.5.3, SC 5), in der Substanz X angereichert vorlag, wurde diese mittels präparativer Dünnschichtchromatographie isoliert. Insgesamt resultierten 3,3 mg Substanz X. Die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie war ebenfalls aufgrund des hohen Anteils an Weichmachern nicht möglich.

6 Zusammenfassung

Die Anwendung des Passionsblumenkrautes zur Therapie von nervösen Spannungs- und Unruhezuständen sowie von Einschlafstörungen hat sich seit langem bewährt. Doch trotz der Bedeutung von *Passiflora incarnata* L. als Sedativum und Anxiolytikum ist wenig über die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe und den Wirkmechanismus bekannt.

Einer indischen Arbeitsgruppe gelang es, im Rahmen einer Bioassay-geleiteten Untersuchung aus einer signifikant anxiolytisch wirkenden Fraktion eines methanolischen Extraktes aus *Passiflora incarnata* L., ein trisubstituiertes Benzoflavon zu isolieren.

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war, dieses trisubstituierte Benzoflavon (Substanz X) aus dem zur Verfügung gestellten Passionsblumenkrautextrakt zu isolieren und dessen chemische Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufzuklären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Passionsblumenkrautextrakt mittels verschiedener chromatographischer Methoden auf das Vorliegen des Benzoflavons untersucht. Die unter UV₃₆₆ blau fluoreszierende Substanz X konnte in einer Reihe von Fraktionen angereichert werden. Allerdings lagen diese Gemische in sehr geringen Mengen vor und waren nicht frei von störenden Begleitstoffen. Im weiteren Zuge wurde deshalb sowohl mit Fraktionen einer vorangegangenen Diplomarbeit [10] als auch mit Passionsblumenkraut weitergearbeitet. Trotz zahlreicher Aufreinigungsschritte mittels Säulenchromatographie unter Verwendung verschiedener stationärer und mobiler Phasen sowie der Anwendung präparativer Dünnschichtchromatographie war die Reindarstellung von Substanz X nicht möglich. Aufgrund der intensiv blauen Fluoreszenz wirkten die Isolate chromatographisch einheitlich. Die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie machte jedoch deutlich, dass Begleitstoffe, die weder Fluoreszenz oder Fluoreszenzlöschung zeigten noch mit dem universellen Detektionsreagens Anisaldehyd-Schwefelsäure anfärbbar waren, in den Isoalten enthalten waren. Trotz des hohen experimentellen Aufwandes war eine spektroskopische Identifizierung des trisubstituierten Benzoflavons nicht möglich.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Dhawan K, Dhawan S, Sharma A: Passiflora: a review update. Journal of Ethnopharmacology 2004; 94: 1-23.
- [2] Wichtl M: Teedrogen und Phytopharmaka. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2009
- [3] www.passionflowers.co.uk, besucht am 6.2.2009
- [4] Kommission E des BGA: Monographie Passiflorae herba. BAnz Nr. 223 v. 30.11.1985 und Nr. 50 v. 13.3.1990
- [5] ESCOP Monographs. 2nd Edition. European Scientific Cooperative on Phytotherapy; Stuttgart, New York: Thieme 2003; 359-364.
- [6] Hänsel R, Sticher O: Pharmakognosie Phytopharmazie. Springer Verlag, Heidelberg, 2007
- [7] Krenn L: Aktuelles über Passiflora incarnata. Zeitschrift für Phytotherapie 2006; 27: 47-50.
- [8] www.apotheke-am-holzweg.de, besucht am 6. 2. 2009
- [9] Dhawan K, Kumar S, Sharma A, Anti-anxiety studies on extracts of Passiflora incarnata L. Journal of Ethnopharmacology 2001; 78: 165-170.
- [10] Ludovacz B: Chemische Untersuchung von Passiflora incarnata. Diplomarbeit Universität Wien 2004
- [11] Amberger W: Chemische Untersuchung von Passiflora incarnata hinsichtlich Inhaltsstoffen mit Benzoflavonstruktur. Diplomarbeit Universität Wien 2008

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Flavonoide in <i>Passiflora incarnata</i> L. [6]	4
Tabelle 2: Fraktionierung des Extraktes im Rahmen des Vorversuchs.....	13
Tabelle 3: Mobile Phasen von SC 1 (VLC)	14
Tabelle 4: Sammelfraktionen von SC 1 (VLC).....	14
Tabelle 5: 1. Fraktionierung des Extraktes.....	19
Tabelle 6: Sammelfraktionen von SC 2	22
Tabelle 7: Sammelfraktionen von SC 3	24
Tabelle 8: Mengen der Fraktionen C, I, J und K.....	28
Tabelle 9: Sammelfraktionen von SC 4	29
Tabelle 10: Sammelfraktionen von SC 5	32
Tabelle 11: Fraktionierung der Droge.....	34
Tabelle 12: Aufreinigung von F 3.3 mit Petrolether und n-Heptan.....	36
Tabelle 13: Fraktionen, die mittels SC 6 aufgetrennt wurden.....	39
Tabelle 14: Sammelfraktionen von SC 6	39
Tabelle 15: Sammelfraktionen von SC 7	43
Tabelle 16: Sammelfraktionen von SC 8	44
Tabelle 17: Fraktionen für die präparative Dünnschichtchromatographie.....	45
Tabelle 18: Bezeichnung der Proben für ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	46

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blüte der <i>Passiflora incarnata</i> L. [3]	2
Abbildung 2: Passionsblume mit Frucht [8]	3
Abbildung 3: Flavonoide in <i>Passiflora incarnata</i> L. [6]	4
Abbildung 4: Teilstruktur des Benzoflavons [1]	5
Abbildung 5: Vacuum liquid chromatography	8
Abbildung 6: DC-Vergleich mit Flavonoiden	10
Abbildung 7: DC-Vergleich mit Cumarin und Herniarin	11
Abbildung 8: DC-Vergleich mit Harmin und Harman unter UV _{366 nm}	12
Abbildung 9: DC-Vergleich des Extraktes vor und nach Aufbereitung unter UV _{366 nm}	12
Abbildung 10: DC der Sammelfractionen 1-8 von SC 1 (VLC) unter UV _{366 nm}	15
Abbildung 11: DC der Sammelfractionen 1-8 von SC 1 (VLC) nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	15
Abbildung 12: DC der Sammelfractionen 9-13 von SC 1 (VLC)	16
Abbildung 13: DC-Vergleich der SF 1, 2 und 8 von SC 1 mit Fractionen einer vorangegangenen Diplomarbeit [11] unter UV _{366 nm}	17
Abbildung 14: DC-Vergleich der Fractionen F 1.1, F 1.2 und F 1.3 mit W 4 unter UV _{366 nm}	18
Abbildung 15: DC-Kontrolle von F 2.1, F 2.2 und F 2.3 unter UV _{366 nm}	19
Abbildung 16: DC von F 2.1, F 2.2 und F 2.3 unter Verwendung der mobilen Phase E	20
Abbildung 17: DC-Vergleich von F 2.1 mit SF 2 von SC 1 und W4 unter UV _{366 nm}	21
Abbildung 18: DC-Vergleich von F 2.1 mit SF 2 von SC 1 und W4 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	21
Abbildung 19: DC der Sammelfractionen von SC 2 unter UV _{366 nm}	23
Abbildung 20: DC der Sammelfractionen von SC 2 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	23
Abbildung 21: DC der Sammelfractionen von SC 3 unter UV _{366 nm}	25
Abbildung 22: DC der Sammelfractionen von SC 3 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	25
Abbildung 23: DC-Überprüfung von Fractionen aus vorangegangener Diplomarbeit unter UV _{366 nm}	27
Abbildung 24: DC-Überprüfung von Fractionen aus vorangegangener Diplomarbeit unter UV _{366 nm}	27
Abbildung 25: DC der Sammelfractionen von SC 4 unter UV _{366 nm}	29
Abbildung 26: DC der Sammelfractionen von SC 4 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	30
Abbildung 27: DC-Vergleich von SF 2 und SF 3 mit Sterolen	31
Abbildung 28: DC der Sammelfractionen von SC 5 unter UV _{366 nm}	33
Abbildung 29: DC der Sammelfractionen von SC 5 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	33
Abbildung 30: DC von F 3.1, F 3.2 und F 3.3 unter UV _{366 nm}	35

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: DC von F 3.1, F 3.2 und F 3.3 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	35
Abbildung 32: DC nach Aufreinigung von F 3.3 unter UV _{366 nm}	37
Abbildung 33: DC nach Aufreinigung von F 3.1 unter UV _{366 nm}	38
Abbildung 34: DC der Sammelfractionen von SC 6 unter UV _{366 nm}	40
Abbildung 35: DC der Sammelfractionen von SC 6 nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens	41
Abbildung 36: DC nach Aufreinigung von SF 8 und SF 9 der SC 6 unter UV _{366 nm}	42
Abbildung 37: DC ausgewählter Einzelfractionen von SC 7 unter UV _{366 nm}	43
Abbildung 38: DC ausgewählter Einzelfractionen von SC 8 unter UV _{366 nm}	44
Abbildung 39: Präparative DC von Fraktion SC 8 / SF 3 unter UV _{366 nm}	45
Abbildung 40: isolierte Substanz X nach präparativer DC	45
Abbildung 41: ¹ H-NMR-Spektrum der vier Isolate	47
Abbildung 42: ¹ H-NMR-Spektrum der vier Isolate, x64	47

Curriculum vitae

Name: Nina Mayer
Geburtsdatum: 26. Juli 1985
Geburtsort: Wien
Eltern: Prof. Mag. Erwin Mayer
Mag. Siegrun Mayer (geb. Zlöbl)

Ausbildung

1991 - 1995 Volksschule Notre Dame de Sion, Wien 7
1995 - 2003 Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium
Albertgasse, Wien 8
Schulzweig Gymnasium
Juni 2003 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg
Oktober 2003 Beginn des Studiums der Pharmazie an der
Universität Wien
August 2007 3-wöchige TCM-Exkursion nach Peking
„Chinesische Arzneipflanzen und Drogen der TCM“
Jänner 2008 - Juni 2008 Praktische Arbeit der Diplomarbeit am Department
für Pharmakognosie der Universität Wien
Oktober 2008 - Jänner 2009 Tutoriumsauftrag am Department für Pharmakognosie

Praktika

2004 - 2008 Apotheke „Zum heiligen Ulrich“, Wien 7
(während des Sommers jeweils für 4 Wochen)