



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Chemische Untersuchungen des Passionsblumenkrautextraktes KY 705 P

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasser: Martin Holbik
Matrikel-Nummer: 0403835
Studienrichtung: Pharmazie
Betreuerin: Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Wien, im März 2010

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei dieser Gelegenheit zunächst bei meiner Familie bedanken: Ihr habt mir mein Studium ermöglicht, mich immer unterstützt - aber stets ausreichend Freiraum gelassen, meinen Weg selbst zu gehen.

Dem Vorstand des Departments für Pharmakognosie, Frau. Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch danke ich für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Department durchzuführen.

Ich möchte mich bei Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung meiner Arbeit herzlich bedanken.

Ebenfalls hervorheben möchte ich Frau Dipl. Ing. Stanimira Krasteva für Ihre Hilfsbereitschaft, Geduld sowie die vielen Anregungen im Rahmen meiner praktischen Arbeit.

Danke an die Merck Selbstmedikation GmbH (Deutschland) für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

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

Zu guter Letzt möchte ich mich meinen Freunden, Studienkollegen und anderen lieben Menschen bedanken, die mich im Lebensabschnitt Studium begleitet, ermutigt, unterstützt, herausgefordert sowie menschlich als auch in der Sache weitergebracht haben...

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ASR	Anisaldehyd Schwefelsäure-Reagens
ButOH	n-Butanol
BZF	Benzoflavon
CDCl ₃	Deuteriochloroform
Ch.	Charge
conc.	konzentriert
DAD	Dioden Array Detector
DC	Dünnschichtchromatographie
EtOH	Ethanol
EW	Einwaage
F	Fraktion
Flav	Flavonoid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IO	Isoorientin
IV	Isovitexin
K7O	Kämpferol-7-O-neohesperosid
KF	Korrekturfaktor
KG	Kieselgel
LM	Lösungsmittel
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
p.a.	pro analysi
PE	Petrolether
PEG 400	Polyethylenglycol 400
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
Rf	retention factor
Rt	retention time = Retentionszeit
S.	Seite
SF	Sammelfraktion
SL	Stammlösung
Std	Standard
US	Ultraschall

Inhaltsverzeichnis:

1 ABSTRACT.....	1
2 EINLEITUNG und AUFGABENSTELLUNG.....	2
2.1 <i>Passiflora incarnata</i> L. – Botanik, Chemie und Wirkungen.....	2
2.1.1 Botanische Merkmale:	2
2.1.2 Inhaltsstoffe:	2
2.1.3 Verwendung von <i>P. incarnata</i> :	3
2.1.4 Arbeiten von Dhawan et al.:.....	3
2.2 Aufgabenstellung:.....	5
3 MATERIAL UND METHODEN	6
3.1 Trockenextrakte:	6
3.2 Lösungsmittel und Vergleichssubstanzen:	6
3.3 Accelerated Solvent Extraction:	6
3.4 Dünnschichtchromatographie:.....	8
3.5 Hochleistungsflüssigchromatographie:	9
3.6 Säulenchromatographie:	11
4 ERGEBNISSE und DISKUSSION	12
4.1 Vorversuche Fraktionierung:.....	12
4.1.1 Extraktion mittels Ultraschall:.....	12
4.1.2 Extraktion mittels ASE:	14
4.1.3 DC-Vergleich der Extraktionsmethoden:	14
4.2 Aufarbeitung der Extrakte:	18
4.3 HPLC- Analytik:.....	20
4.3.1 Methodenentwicklung:	20
4.3.2 HPLC-Vergleich verschiedenen Extraktchargen:.....	24

4.4	Charakterisierung der Hauptkomponenten der Extrakte:.....	27
4.4.1	Flavonoide der ButOH-Fraktion und des Restextraktes:.....	27
4.4.2	Apolare Komponenten der ButOH-, PE- bzw. CHCl ₃ -Fraktion:.....	36
4.4.2.1	Apolare Anteil der ButOH-Fraktion:.....	36
4.4.2.2	PE-Fraktion:	39
4.4.2.3	Chloroformfraktion:.....	42
4.5	Versuch der Isolierung von Substanz X:.....	44
4.5.1	Anreicherung von Benzoflavon X:.....	48
4.5.2	Aufarbeitung mit Säulenchromatographie:	49
4.5.2.1	SC 1 - Aufarbeitung der Petrolfraktion:.....	49
4.5.2.2	SC 2 – Aufarbeitung von SF 1:	51
4.5.2.3	SC 3 - Aufarbeitung von F6 (aus SC 2).....	55
4.5.2.4	SC 4 – Aufarbeitung von SF 2:	56
4.6	NMR-Strukturaufklärung von MHPSF6 (=Phytolisomer):.....	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	62
7	TABELLENVERZEICHNIS.....	64
8	LITERATURVERZEICHNIS	65
	CURRICULUM VITAE	67
	ANHANG.....	68

1 ABSTRACT

Passionsblumenkraut wird in der Phytotherapie als Sedativum und Anxiolytikum angewandt. Viele pharmakologische Arbeiten mit kontroversen Angaben hinsichtlich des wirksamen Prinzips wurden bislang publiziert. Eine indische Arbeitsgruppe um Dhawan hat aus *P. incarnata* ein trisubstituiertes Benzoflavon isoliert, welches an Mäusen signifikante anxiolytische Wirkung zeigte und Entzugserscheinungen z.B. bei Morphinabhängigkeit minderte.

Ziel dieser Arbeit war die Fraktionierung des Extraktes KY 705 P aus Passionsblumenkraut nach der Methode von Dhawan, die Charakterisierung der Fraktionen mittels HPLC und die Isolierung des BZF. Mittels HPLC-DAD konnte das BZF nicht detektiert werden. Aus einer mit ASE gewonnenen PE-Fraktion konnten mittels Säulenchromatographie unter UV_{366nm} fluoreszierende Komponenten isoliert werden, deren R_f-Werte den von Dhawan beschriebenen entsprachen. Eine Komponente wurde mittels NMR als Phytol isomer identifiziert. BZF-ähnliche Substanzen wurden nur in minimalen Spuren gefunden, sodass NMR-Messungen nicht möglich waren. "BZF" kommt damit nicht als Wirkstoff des Extraktes KY 705 P in Frage.

In phytotherapy, passionflower herb has a long tradition in sedative and anxiolytic treatment, although the therapeutic principle has not been identified. An Indian group published the bioactivity-guided isolation of a tri-substituted benzoflavone (BZF) moiety from *P. incarnata* in 2001; due to consideration of a patent the structure was not given. BZF showed anxiolytic effects in mice and was considered as the active principle of passionflower herb. The objective of this thesis was to fractionate extract KY 705 P from Passionflower herb, to characterise the obtained fractions by HPLC-DAD, to isolate the BZF and finally to identify its chemical structure using NMR spectroscopy. On TLC plates spots showing blue fluorescence at similar R_f-values as published were detected. Those substances were isolated from the petroleum ether fraction using column chromatography. An isomer of the terpene alcohol phytol was identified using NMR-spectroscopy. A BZF-like substance was only isolated in trace amounts. Obviously BZF is not the active principle in passionflower extract KY 705 P.

2 EINLEITUNG und AUFGABENSTELLUNG

2.1 *Passiflora incarnata* L. – Botanik, Chemie und Wirkungen

2.1.1 Botanische Merkmale:

Abbildung 1: *P. incarnata* [1]



Mazepflanze - *Passiflora incarnata*

Die Stammpflanze *P. incarnata* L. (Passifloraceae) ist ein kletternder Strauch, die mehrere Meter Höhe erreichen kann und am amerikanischen Kontinent heimisch ist. Die Pflanze wird in tropischen und subtropischen Gegenden kultiviert [2].

Die behaarten Blätter sind wechselständig, fein gezähnt, in drei spitz zulaufende Lappen geteilt und grün bis grünlich braun gefärbt. Aus den Blattachsen entspringen sehr feine, glatte Ranken, welche am Ende spiralig eingerollt sind. Die radiären

Blüten weisen 3 kleine Tragblätter und eine Korolle aus weiß-länglichen Kronblättern sowie mehreren Reihen fadenförmiger Anhängsel auf [3].

2.1.2 Inhaltsstoffe:

Die Droge enthält als Hauptinhaltsstoffe bis zu 2,5% Flavonoide. Laut Ph. Eur. wird ein Mindestgehalt von 1,5% Flavonoide, berechnet als Vitexin gefordert. Bei diesen Flavonoiden handelt es sich überwiegend um C-Glykosylflavone der Aglyka Apigenin und Luteolin. Zu den Hauptkomponenten (vgl. Abbildung 2, S. 3) zählen Isovitexin, Vitexin, Schaftosid, Isoschaftosid, Isovitexin-2''-Glucosid, Vicenin sowie Orientin, Isoorientin und Isoorientin-2''-Glucosid [2].

Alkaloide vom Harmantyp sind nur in Spuren enthalten [4]. Weitere Inhaltsstoffe sind neben geringen Mengen ätherischen Öls (Limonen, α -Pinen u. a. Terpene), minimale Mengen des cyanogenen Glykosids Gynocardin und des γ -Benzopyrons Maltol sowie freie Aminosäuren, Glykoproteine, Saccharose, Fructose, Glucose, Raffinose und andere Zucker sowie Polysaccharide [5].

Abbildung 2: Strukturen der Flavonoide in *P. incarnata* (modifiziert nach [6])

	Flavonoid	R1	R2	R3	
	Apigenin	H	H	H	
	Vicenin-2	H	Glc	Glc	
	IV-2''-glucosid	H	Soph	H	
	Schaftosid	H	Glc	Ara	
	Isoschaftosid	H	Ara	Glc	
	Vitexin	H	H	Glc	
	Isovitexin	H	Glc	H	
	Luteolin	OH	H	H	
Glc	β-D-Glucopyranose	Orientin	OH	H	Glc
Ara	α-L-Arabinopyranose	Isorientin	OH	Glc	H
Soph	Sophorose	IO-2''-glucosid	OH	Soph	H

2.1.3 Verwendung von *P. incarnata*:

In ihren Ursprungsländern wird die Droge traditionell als Sedativum und als Spasmolytikum verwendet.

In Europa hat *Passiflorae Herba* einen festen Platz in der Phytotherapie bei der Behandlung von nervösen Zuständen, Schlafstörungen als auch Angstzuständen. Die Droge wird zumeist in Kombination mit Baldrian und Hopfen angewandt. Bisher waren die Versuche zur Identifizierung einer für die Wirkung verantwortlichen Einzelsubstanz nicht erfolgreich [2,6].

2.1.4 Arbeiten von Dhawan et al.:

2001 publizierte eine indische Arbeitsgruppe die bioaktivitätsgeleitete Isolierung von 332mg einer Substanz mit Benzoflavonstruktur (BZF) aus einer methanolischen Fraktion aus den oberirdischen Anteilen von *P. incarnata* (250g Droge) [7].

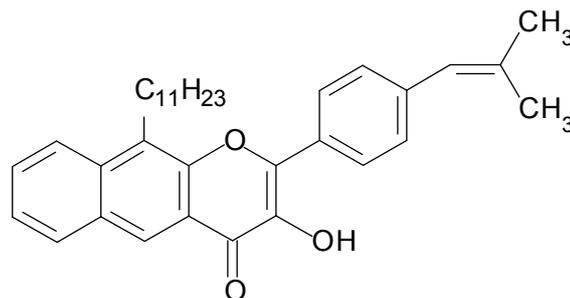
Dhawan charakterisierte die Fraktion, aus der BZF isoliert worden war, mittels DC durch zwei unter UV_{366nm} fluoreszierende Banden bei R_f-Werten von 0,65 (blau) bzw. 0,69 (türkis) unter Verwendung von KG–Fertigplatten als stationäre bzw. Petrolether-Toluol-Ethylacetat-Aceton (13+4+2+1 Teile) als mobile Phase. Neben BZF enthielt diese Fraktion Sitosterol; andere aus der Literatur in *P. incarnata* bekannte Inhaltsstoffe (zB. Flavonoide, Harmanalkaloide) wurden mittels DC ausgeschlossen [7].

Da BZF im Tierversuch signifikante anxiolytische Wirkung an Mäusen zeigte, wurde es von den Autoren für die anxiolytische Wirkung von *P. incarnata* verantwortlich gemacht. Unter Verweis auf patentrechtliche Gründe war eine Struktur (siehe Abbildung 3) publiziert worden, wobei aus der Arbeit nicht klar hervorging, ob es sich um die vollständige Formel handelte [5].

In weiteren Studien an Nagetieren (Mäuse und Ratten) untersuchten Dhawan et. al. Effekte des BZFs hinsichtlich des Potentials, Entzugserscheinungen bei der Entwöhnung von Suchtmitteln wie Morphin, Nicotin, $\Delta 9$ -THC, EtOH oder Benzodiazepinen zu verringern. Das BZF linderte in allen Fällen signifikant die Entzugserscheinungen bzw. verlangsamte teilweise die Entwicklung von Abhängigkeit und Toleranz [8-13].

Auffallend war, dass die Angaben zur Isolierung des BZF in allen diesen Arbeiten mit der Erstisolierung (332 mg BZF aus 250 g Droge) völlig ident waren bzw. auf diese verwiesen wurde [7]. Allerdings wären die für die Tierversuche erforderlichen Mengen an BZF in mindestens drei Arbeiten erheblich über der beschriebenen Menge gelegen [8, 12, 13].

Abbildung 3: Grundkörper des Benzoflavons [5]



2.2 Aufgabenstellung:

Im Rahmen der Diplomarbeit sollte ein kommerzielles Passiflora-Trockenextrakt (KY 705 P, Fa. Finzelberg), dessen anxiolytische Wirkung im Tierversuch [14] an Mäusen belegt werden konnte, nach der Methode von Dhawan [7] fraktioniert werden.

Die erhaltenen Fraktionen sollten mittels chromatographischer Techniken (DC, HPLC-DAD) analysiert, charakteristische Inhaltsstoffe identifiziert und soweit wie möglich quantifiziert werden. Anschließend sollten diese Fraktionen für in-vivo-Versuche an Mäusen (Prof. Butterweck, University of Gainesville, USA) eingesetzt werden.

Da seit der letzten Publikation der indischen Arbeitsgruppe zu *P. incarnata* im Jahr 2004 [5] kein nationales oder internationales Patent eingereicht worden war, sollte versucht werden, BZF zu isolieren und dessen Struktur mit Methoden der NMR-Spektroskopie zu bestätigen.

Die Substanz sollte sowohl für die Ausarbeitung eines entsprechenden Analysenverfahrens zur Quantifizierung in der Droge bzw. in Phytopharmaka, als auch für weitere in-vivo- Untersuchungen zur Verfügung stehen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Trockenextrakte:

Es standen 3 Chargen eines 50% ethanologischen Extraktes aus *Passiflorae Herba* Ph. Eur. zur Verfügung:

Extr. Passiflorae E Herb. Spir. Sicc. (KY 705 P) Sonderqualität Fa. Merck (Fa. Finzelberg, Deutschland) der Chargen 07000163, 08000538 bzw. 08017533. Das Extrakt war mit 30% technischen Hilfsstoffen (27% Maltodextrin Ph. Eur. und 3% hochdisperses Siliciumdioxid Ph. Eur.) versetzt [15].

3.2 Lösungsmittel und Vergleichssubstanzen:

Alle Lösungsmittel bzw. Chemikalien wiesen p.a. Qualität auf. Für die HPLC wurden Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet.

Die Referenzsubstanzen Kämpferol-7-O-neohesperosid (Lot: 07010204), Isoorientin (= Homoorientin, Lot: 04061708) bzw. Isovitexin (Lot: 02021907) stammten von der Fa. Genay (Frankreich).

β -Sitosterol (Lot: 99F0351) stammte von der Fa. SIGMA (Deutschland), Stigmasterin aus Beständen des Departments für Pharmakognosie.

3.3 Accelerated Solvent Extraction:

Die ASE wurde zur Fraktionierung des Extraktes KY 705 P verwendet.

Gerät:

ASE 200 Fa. Dionex (Österreich) mit ASE 200 Solvent Controller.

Für die Extraktion standen Edelstahlzellen mit 22ml und 33ml Füllvolumen zur Verfügung. Die Extrakte wurden in Glasvials mit 60ml Fassungsvermögen aufgefangen.

Extraktionsbedingungen:

Die Zahl der **Cycles** gibt an, wie oft die Extraktion einer Probe mit Anteil an neuem LM durchgeführt wurde. **Flush** gibt an, wie viele Prozent des Füllvolumens zwischen zwei Extraktionszyklen durch frisches LM ersetzt wurden.

Purge bezeichnet die Zeitspanne, wie lange die Extraktionszelle mit Stickstoff gespült wurde. Dabei wurden LM-Reste entfernt bzw. das Füllgut getrocknet.

ASE-Methode FRAKTIONIERUNG 1:

Diese Parameter wurden für die Herstellung der Extrakte nach [7] verwendet. Jede Zelle wurde bei dieser Methode je 5x mit n-Butanol, Petrolether und CHCl_3 extrahiert.

Zellenvolumen: 22ml;

Vorheizzeit: 0min *Purge:* 60sec

Aufheizzeit: 5min *Cycles:* 1

Extraktionszeit: 2min *Druck:* 150psi N_2

Flush: 10% *Temperatur:* 40°C

Lösungsmittel: ButOH, PE, CHCl_3 in dieser Reihenfolge

ASE-Methode FRAKTIONIERUNG 2:

Zur Herstellung der PE-Fraktion im Rahmen der Isolierung von Substanz X dienten folgenden Bedingungen, unter welchen jede Zelle 1x behandelt wurde.

Zellenvolumen: 33ml

Vorheizzeit: 0min *Purge:* 90sec

Aufheizzeit: 5min *Cycles:* 3

Extraktionszeit: 4min *Druck:* 150psi N_2

Flush: 70% *Temperatur:* 40°C

Lösungsmittel: PE

3.4 Dünnschichtchromatographie:

Sprühreagentien für die DC:

Anisaldehyd-Reagens [16]

Bestandteile: 0,5ml Anisaldehyd, 85ml MeOH, 10ml CH₃COOH_{conc} und 5ml H₂SO_{4 conc}.

Naturstoff-Reagens-A:

1% methanolische Lsg. von Diphenylboryloxyethylamin.

PEG-400-Reagens:

5% ethanolische Lösung von PEG 400.

DC-Bedingungen:

DC-System 1 [7]:

Im DC-System 1 wurden apolare Substanzgemische analysiert.

Stationäre Phase: Kieselgel 60 Fluoreszenzindikator_{254nm}
Fertigfolien Fa. Merck 20x20cm

Mobile Phase: PE-Toluol-Ethylacetat-Aceton (13+4+2+1)
Entwicklung unter Kammersättigung;

Detektion: UV_{366nm}, Besprühen mit Anisaldehyd-Reagens (ASR)

DC-System 2 [16]:

Im DC-System 2 wurden Flavonoide analysiert.

Stationäre Phase: Kieselgel 60 Fluoreszenzindikator_{254nm}
Fertigfolien Fa. Merck 20x20cm

Mobile Phase: Ethylacetat-HCOOH_{conc}-CH₃COOH_{conc}-H₂O
(100+11+11+26)
Entwicklung unter Kammersättigung.

Detektion: UV_{366nm} vor bzw. nach dem Besprühen mit Naturstoff-PEG
400-Reagens

3.5 Hochleistungsflüssigchromatographie:

HPLC-System:

Nachfolgendes Mehrkomponentensystem der Fa. Shimadzu (Österreich) wurde für sämtliche HPLC-Untersuchungen verwendet.

Autosampler: SIL-20AC HT

Degasser: DGU-20A5

Pumpe: LC-20AD

Säulenofen: CTO-20AC

Detektor: Diodenarray Detektor (SPD-M20A DAD)

Interface: CBM-20A

Eluenten:

Eluent A: H₂O mit HCOOH_{conc} auf pH 3 eingestellt (ca. 0,23ml/L)

Eluent B: MeCN mit HCOOH_{conc} (ca. 0,23ml/L)

HPLC-Bedingungen 1:

Für die Analyse der PE- und CHCl₃-Fraktion dienten folgende Parameter:

Stationäre Phase: Agilent Hypersil BDS C-18 Säule, 5µm,
4,0x250mm

<i>Gradient:</i>	Zeit	% Eluent B
	0	15
	25	50
	60	100

Flussrate: 1,0ml/min

Ofentemperatur: 30°C

Injektionsvolumen: 10µL (1,5mg Fraktion/ml)

Purge: 5 Minuten mit 100% Eluent B

Equilibrierungszeit: 5 Minuten

HPLC-Bedingungen 2:

Der apolare Anteil der n-Butanolfraktion wurde wie folgt analysiert:

<i>Stationäre Phase:</i>	Agilent Hypersil BDS C-18 Säule, 5µm 4,0x250mm						
<i>Gradient:</i>	<table><thead><tr><th>Zeit</th><th>% Eluent B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>30</td></tr><tr><td>35</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Zeit	% Eluent B	0	30	35	100
Zeit	% Eluent B						
0	30						
35	100						
<i>Flussrate:</i>	1,0ml/min						
<i>Ofentemperatur:</i>	30°C						
<i>Injektionsvolumen:</i>	10µL (1,5mg Fraktion/ml)						
<i>Purge:</i>	5 Minuten mit 100% Eluent B						
<i>Equilibrierungszeit:</i>	5 Minuten						

HPLC-Bedingungen 3:

Die Analyse des polaren Teils der n-Butanol-Fraktion bzw. des Restextraktes erfolgte unter diesen Bedingungen [3].

<i>Stationäre Phase:</i>	Lichrospher® 100 RP 18e Säule, 5µm, 250 x 4mm, Fa. Merck (Deutschland)								
<i>Gradient:</i>	<table><thead><tr><th>Zeit</th><th>% Eluent B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>15</td></tr><tr><td>20</td><td>25,5</td></tr><tr><td>21</td><td>95</td></tr></tbody></table>	Zeit	% Eluent B	0	15	20	25,5	21	95
Zeit	% Eluent B								
0	15								
20	25,5								
21	95								
<i>Flussrate:</i>	1,2ml/min								
<i>Ofentemperatur:</i>	30°C								
<i>Injektionsvolumen:</i>	10µL (4mg Restextrakt/ml) 10µL (6mg Butanolfraktion/ml)								
<i>Purge:</i>	5 Minuten mit 95% Eluent B								
<i>Equilibrierungszeit:</i>	5 Minuten								
<i>Referenzsubstanz:</i>	Kämpferol-7-O-neohesperosid, Fa. Genay (Frankreich)								

3.6 Säulenchromatographie:

Die Säulenchromatographie wurde für die Isolierung von Substanz X aus der Petrolfraktion nach ASE-Fraktionierung 2 verwendet.

SC 1:

Auftragevolumen: 1,20g PE-Fraktion (ASE-Fraktionierung 2)

Stationäre Phase: Sephadex[®] LH 20-100

Füllhöhe: ca. 30cm

Säulendurchmesser: 1,5cm

Mobile Phase: Ethylacetat

Fraktionsgröße: ca. 3ml/30 Minuten

SC 2:

Auftragevolumen: 190mg SF1 (von SC 1) auf 380mg KG 60

Stationäre Phase: KG 60; Fa. Merck (Deutschland)

Füllhöhe: ca. 60cm

Säulendurchmesser: 1,0cm

Mobile Phase: PE-Ethylacetat-Aceton (13+2+1)

Fraktionsgröße: ca. 3ml/30 Minuten

SC 3:

Auftragevolumen: 51mg F6 (von SC 2) auf 100mg KG 60

Stationäre Phase: KG 60; Fa. Merck (Deutschland)

Füllhöhe: 60cm

Säulendurchmesser: 1cm

Mobile Phase: PE-Toluol (13+4)

Fraktionsgröße: ca. 1ml/30 Minuten

SC 4:

Auftragevolumen: 130mg SF2 (von SC 1) auf 260mg KG 60

Stationäre Phase: KG 60; Fa. Merck (Deutschland)

Füllhöhe: ca. 60cm

Säulendurchmesser: 1,0cm

Mobile Phase: PE-Ethylacetat-Aceton (13+2+1)

Fraktionsgröße: ca. 3,5ml/15 Minuten

4 ERGEBNISSE und DISKUSSION

4.1 Vorversuche Fraktionierung:

Zunächst sollten mit der Ultraschallextraktion und der ASE zwei Methoden zur Fraktionierung des Passifloraextraktes KY 705 P verglichen werden.

Da mehrere Chargen dieses Extraktes zur Verfügung standen, wurde zudem überprüft, ob qualitative Unterschiede zwischen den Chargen bestanden.

Daher wurden mehrere Vorversuche mit kleinen Extraktmengen durchgeführt, um eine geeignete Methode für die spätere Aufarbeitung im größeren Maßstab zu ermitteln. Parallel wurde ein Chargenvergleich durchgeführt.

4.1.1 Extraktion mittels Ultraschall:

In einem Vorversuch wurden je 5g der Chargen 07000163 und 08000538 fünfmal mit je 2,5ml Lösungsmittel in der beschriebenen Reihenfolge [7] mit n-Butanol, PE und CHCl_3 am Ultraschallbad extrahiert, zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Auf diese Weise wurden Fraktionen hergestellt und unter vermindertem Druck bei 40°C zur Trockene eingedampft.

Der verbliebene Rückstand des Extraktes wurde als "Restextrakt" bezeichnet.

Tabelle 1: Ausbeuten des Vorversuches aus 5g Extrakt

Fraktion	Ch. 07000163	Ch. 08000538
Butanol	104mg	60mg
PE	27mg	12mg
CHCl_3	56mg	102mg

Der große Unterschied bei den Ausbeuten der CHCl_3 -Fraktionen war dadurch erklärbar, dass es trotz Zentrifugation zu einer unvollständigen Abtrennung des unlöslichen Rückstandes bei Charge 08000538 gekommen war. Weitere Aufschlüsse sollte die DC-Untersuchung bringen. Die Untersuchungslösungen wurden bandenförmig auf DC-Folien aufgetragen und in den DC Systemen 1 und 2 (vgl. S. 8) entwickelt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bzw. mittels Sprühreagentien.

Abbildung 4: DC-Untersuchung der Fraktionen des Vorversuches

Probenlösungen: 15µL (10mg Fraktion/ml, 100mg KY 705 P/ml in MeOH)

DC-System 1 (vgl. S. 8)

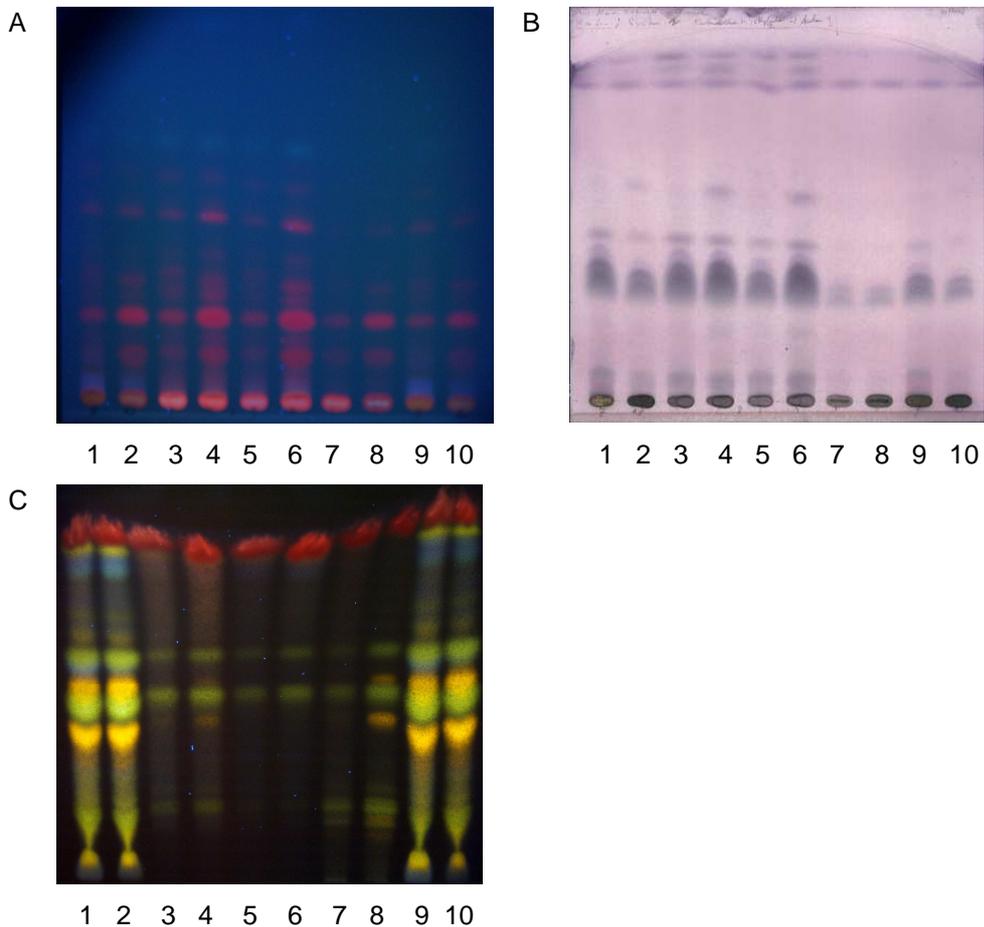
A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Nach Behandlung mit ASR, Detektion bei Tageslicht

DC-System 2 (vgl. S. 8)

C) Nach Behandlung mit Nat-A/ PEG 400, Detektion unter UV_{366nm}

1	KY 705 P (07000163)	6	PE-Fraktion (08000538)
2	KY 705 P (08000538)	7	CHCl ₃ -Fraktion (07000163)
3	Butanolfraktion (07000163)	8	CHCl ₃ -Fraktion (08000538)
4	Butanolfraktion (08000538)	9	Restextrakt (07000163)
5	PE-Fraktion (07000163)	10	Restextrakt (08000538)



Durch den Fingerprintvergleich konnte gezeigt werden, dass keine qualitativen Unterschiede zwischen den beiden Chargen bestanden.

4.1.2 Extraktion mittels ASE:

Alternativ zur Extraktion mittels Ultraschall wurde mit der ASE gearbeitet. Analog zu 4.1.1 wurden je 5g Trockenextrakt aufgearbeitet. Die ASE benötigte methodisch bedingt mehr LM. Es wurde die Methode FRAKTIONIERUNG 1 (vgl. S. 6 ff) verwendet. Beim Vorversuch wurde einmal mit ca. 10ml LM extrahiert. Die Fraktionen wurden unter vermindertem Druck bei 40°C zur Trockene eingedampft.

Tabelle 2: Ausbeuten des ASE- Vorversuches aus 5g Extrakt

Fraktion	Ch. 07000163	Ch. 08000538
Butanol	87mg	41mg
PE	7mg	4mg
CHCl ₃	4mg	4mg

4.1.3 DC-Vergleich der Extraktionsmethoden:

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Extraktionsmethoden zu Unterschieden in der Zusammensetzung der Fraktionen führten, erfolgte erneut ein Fingerprintvergleich mittels DC.

Abbildung 5: Qualitativer DC- Vergleich der Fraktionen nach US- und ASE-Extraktion

Probenlösungen: 15µL (10mg/ml)

DC-System 1 (vgl. S. 8)

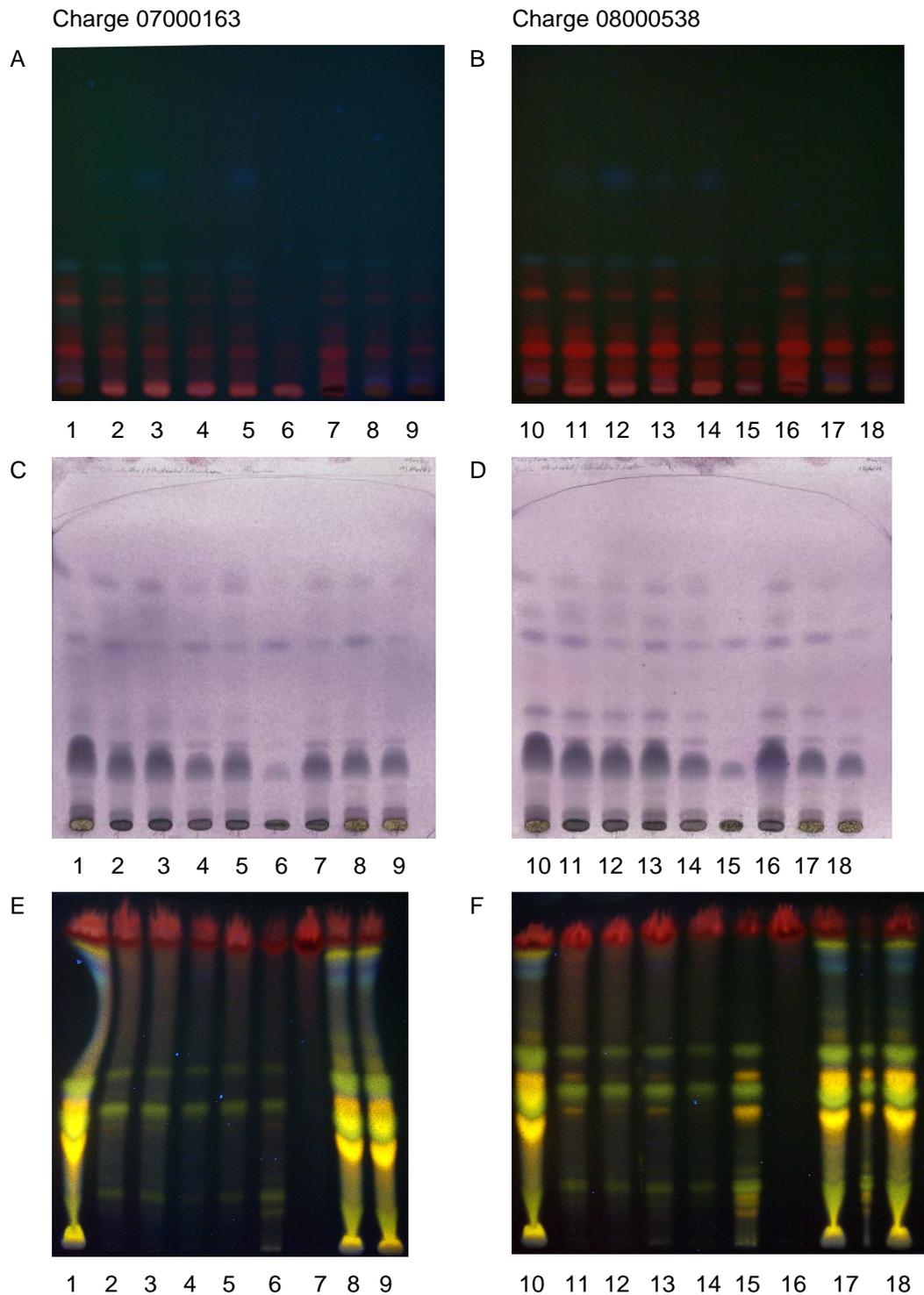
A), B) Detektion unter UV_{366nm}

C), D) Nach Behandlung mit ASR, Detektion bei Tageslicht

DC-System 2 (vgl. S. 8)

E), F) nach Behandlung mit Nat-A/ PEG 400, Detektion unter UV_{366nm}

1	KY 705 P Ch. 07000163	10	KY 705 P Ch. 08000538
2	Butanolfraktion	11	Butanolfraktion
3	Butanolfraktion ASE	12	Butanolfraktion ASE
4	PE-Fraktion	13	PE-Fraktion
5	PE-Fraktion ASE	14	PE-Fraktion ASE
6	CHCl ₃ -Fraktion	15	CHCl ₃ -Fraktion
7	CHCl ₃ -Fraktion ASE	16	CHCl ₃ -Fraktion ASE
8	Restextrakt	17	Restextrakt
9	Restextrakt ASE	18	Restextrakt ASE



Das Fehlen aller Flavonoidzonen in den CHCl_3 -Fraktionen (vgl. Abbildung 5 E, F, S. 14) aus der ASE auf den Bahnen 7 und 16 bestätigte, dass der große Unterschied in den Ausbeuten der CHCl_3 -Fraktion v. a. bei Charge 08000163 auf der schlechten Abtrennung der im LM unlöslichen Partikel beruhte.

Dass es sich dabei nicht um konzentrationsabhängige Effekte handelte, konnte in DC-System 1 (vgl. Abbildung 5; C und D; S. 14ff) gezeigt werden: die mit der ASE gewonnenen CHCl_3 -Fraktionen (Bahn 7 bzw. 16) wiesen intensivere Banden auf als jene, die mittels Ultraschall (Bahn 6 und 15) extrahiert worden waren.

Nach Entwicklung im DC-System 1 (vgl. S. 8) zeigten die DCs (vgl. Abbildung 5; C und D; S. 14) unter $\text{UV}_{366\text{nm}}$ im oberen Drittel (R_f ca. 0,67) blau fluoreszierende Zonen. Relativ gut waren diese bei den durch ASE gewonnenen Butanol- (Bahn 3 und 12) und PE-Fraktionen (Bahn 5 und 14) sichtbar. Diese Zonen deuteten auf das Vorhandensein einer BZF-artigen Komponente hin [7].

Da die ASE aufgrund der präziseren Auftrennung der Extrakte bessere Ergebnisse lieferte als die Extraktion mittels Ultraschall und mit der ASE ein deutlicher Zeitgewinn erzielt worden war, sollte versucht werden, die Ausbeuten der ASE-Extraktion zu verbessern.

Die Ultraschallextraktion war im Unterschied zur ASE für jedes LM fünfmal wiederholt worden. Daher wurde mit Charge 07000163 ein weiterer Vorversuch mittels ASE mit fünfmaligem Zusatz von neuem LM und Gleichgewichtseinstellung durchgeführt, um eine erschöpfende Extraktion zu erreichen. Die Ausbeute des Vorversuchs wurde in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Vergleich der Ausbeuten der Vorversuche

	Ultraschall 5x	ASE 1x	ASE 5x
Butanol	104mg	87mg	116mg
PE	27mg	7mg	9mg
CHCl_3	56mg	4mg	8mg

Durch die fünfmalige Extraktion konnten, wie in Tabelle 3 dargestellt, die Ausbeuten der ASE-Extraktion gesteigert werden. Aufgrund der stark abnehmenden Färbung der Fraktionen 4 und 5 konnte von einer nahezu erschöpfenden Extraktion ausgegangen werden.

Die Ausbeuten für die PE- und CHCl_3 -Fraktion lagen deutlich unter der Ultraschallextraktion, aber die ASE-Extrakte enthielten erheblich weniger polare Komponenten, da keine unlöslichen Extraktpartikel im PE- und CHCl_3 -Extrakt enthalten waren (vgl. Abbildung 5, E und F, S. 14ff).

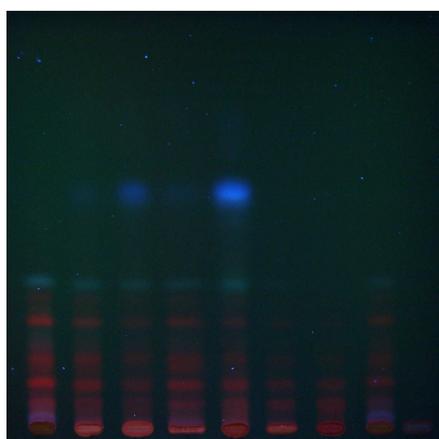
Weiters zeigte sich auf der DC (vgl. Abbildung 6) in der PE-Fraktion eine intensiv blau bzw. in der Butanolfraktion eine etwas schwächer fluoreszierende Bande bei einem Rf von 0,6, die auf das von Dhawan beschriebene Benzoflavon (Rf-Werte 0,65 bzw. 0,69) hindeuteten [7].

Dabei waren bei gleichen Konzentrationen der Probenlösungen die blau fluoreszierenden Banden (vgl. Abbildung 6) in der PE- Fraktion (Bahnen 4 und 5) bzw. Butanolfraktion (Bahnen 2 und 3) bei mit der ASE gewonnenen Extrakten deutlich intensiver als bei den daneben aufgetragenen, mittels Ultraschall hergestellten Extrakten.

Abbildung 6: DC-Vergleich fünfmalige Extraktion mit ASE bzw. Ultraschall

Probenlösung: 15 μL (10mg/ml) in MeOH

DC-System 1 (vgl. S. 8), Detektion unter $\text{UV}_{366\text{nm}}$



- 1 KY 705 P Ch. 07000163
- 2 Butanolfraktion US
- 3 Butanolfraktion ASE
- 4 PE-Fraktion US
- 5 PE-Fraktion ASE
- 6 CHCl_3 -Fraktion US
- 7 CHCl_3 -Fraktion ASE
- 8 Restextrakt US
- 9 Restextrakt ASE

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Die erschöpfende Extraktion mittels ASE ließ sich im Vergleich der Restextrakte auf den Bahnen 8 und 9 belegen. Bahn 8 enthielt mehrere unter $\text{UV}_{366\text{nm}}$ sichtbare Banden, während Bahn 9 keine derartigen Banden mehr aufwies. Weitere Vorteile der ASE lagen in der großen Zeitersparnis bzw. in der Stabilität und Automatisierbarkeit der Methode gegenüber der manuellen Ultraschallextraktion.

Daher wurde entschieden, die Fraktionierung einer größeren Extraktmenge mit der ASE durchzuführen.

4.2 Aufarbeitung der Extrakte:

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche wurden die Extrakte KY 705 P (72g von Ch. 07000163, 95g von Ch. 08000538 bzw. 50g von Ch. 08017533) mittels ASE bei den Bedingungen FRAKTIONIERUNG 1 (vgl. S. 6ff) unter fünfmaligem Zusatz von neuem LM aufgearbeitet.

Für die geplanten Tierversuche waren mindestens 180mg Extrakt jeder Fraktion erforderlich.

Von jeder Charge wurden 2g Extrakt als Rückhaltemuster aufbewahrt.

Da sowohl die DC- als auch die HPLC-Analysen (vgl. Kap. 4.3.2, S. 24) der Fraktionen aus Ch. 07000163, Ch. 08000538 bzw. Ch. 08017533, die mit dem gleichen LM hergestellt worden waren, qualitative Übereinstimmung zeigten, konnten diese vereinigt werden.

Abbildung 7: DC der Fraktionen für die Tierversuche

Probenlösungen: 30µL (5mg/ml in MeOH)

DC-System 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Nach ASR-Behandlung; Detektion bei Tageslicht

DC-System 2 (vgl. S. 8)

C) Detektion unter UV_{366nm}

D) Nach Naturstoff-A/ PEG 400 Behandlung; Detektion unter UV_{366nm}

Bahn:	Fraktion
1	KY 705 P (08000538)
2	Butanolfraktion
3	PE-Fraktion
4	Chloroformfraktion
5	Restextrakt (08000538)

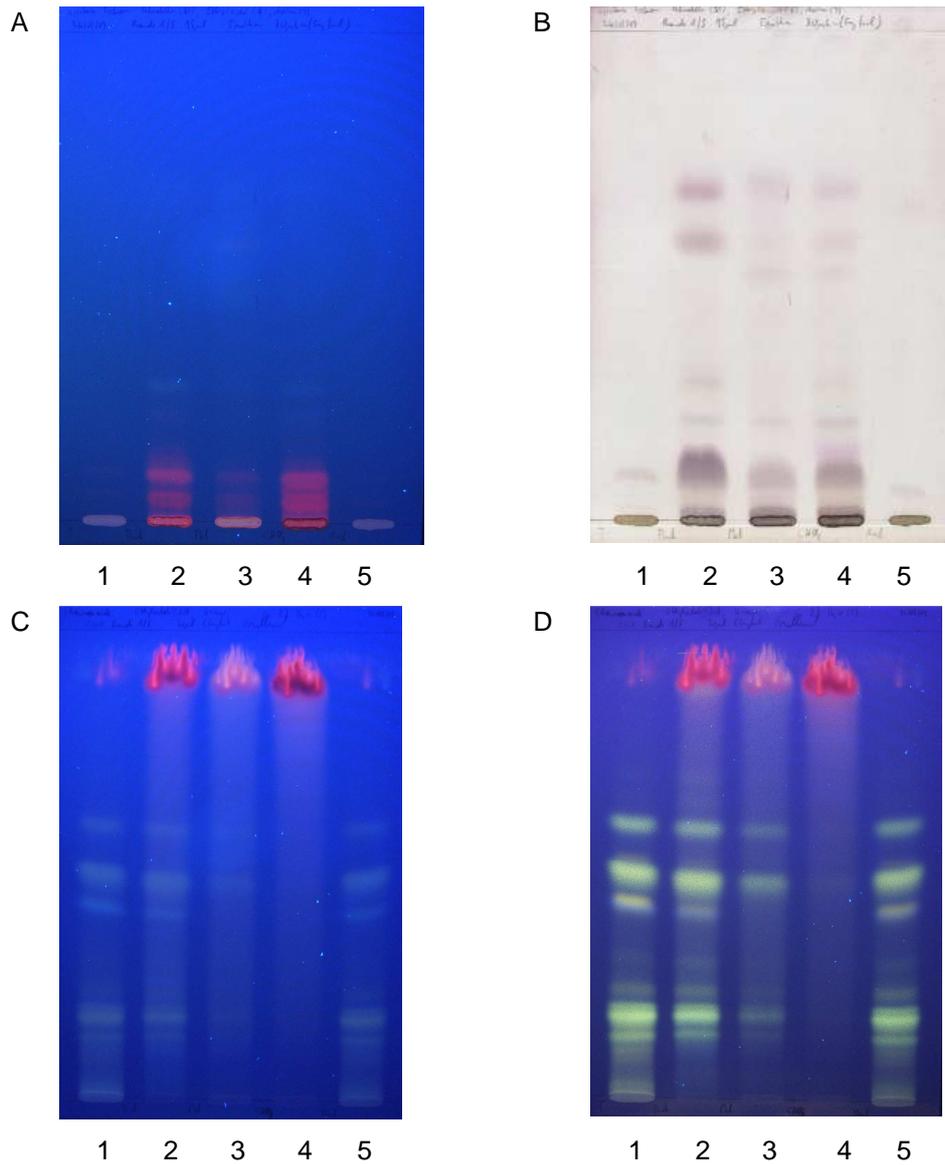


Tabelle 4: Ausbeuten der Extrakte für die Tierversuche in mg

Fraktion	Ch. 07000163	Ch. 08000538	Ch.08017533	GESAMT
Butanol	1658,8	663,0	730,0	3051,8
PE	98,5	76,9	22,1	197,5
CHCl ₃	75,6	91,6	36,8	204,0
Restextrakt	68760,0	93880,0	49101,0	211741,0

4.3 HPLC- Analytik:

Um die Fraktionen möglichst gut zu charakterisieren, sollten Analysen mittels HPLC-DAD durchgeführt werden. Dazu wurden geeignete Methoden entwickelt.

4.3.1 Methodenentwicklung:

Zunächst galt es, Aufschlüsse über die Zusammensetzung der Fraktionen zu sammeln. Dazu wurden auf einer Agilent Hypersil BDS C-18 Säule mit Wasser und MeCN als mobile Phase (HPLC-System vgl. 3.5, S. 9) Testläufe unter Gradientenelution (1%MeCN/min ausgehend von 0% MeCN) bei einer Flussrate von 1,0ml/min durchgeführt. Die Laufzeit betrug 100 Minuten. Die Konzentration der verwendeten Untersuchungslösungen lag bei 1,5mg/ml und es wurden jeweils 10µL analysiert.

Zudem wurden die Eluenten mit $\text{HCOOH}_{\text{conc}}$ auf pH3 eingestellt, da der Zusatz von Säure die Peakform verbesserte. Da über die Inhaltsstoffe keine Informationen vorlagen, wurden die DAD-Spektren bei 254nm analysiert. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden die HPLC-Bedingungen 1 (vgl. S. 9) entwickelt und die Fraktionen analysiert.

Abbildung 8: HPLC-Trennung der PE-Fraktion

HPLC-Bedingungen 1 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm

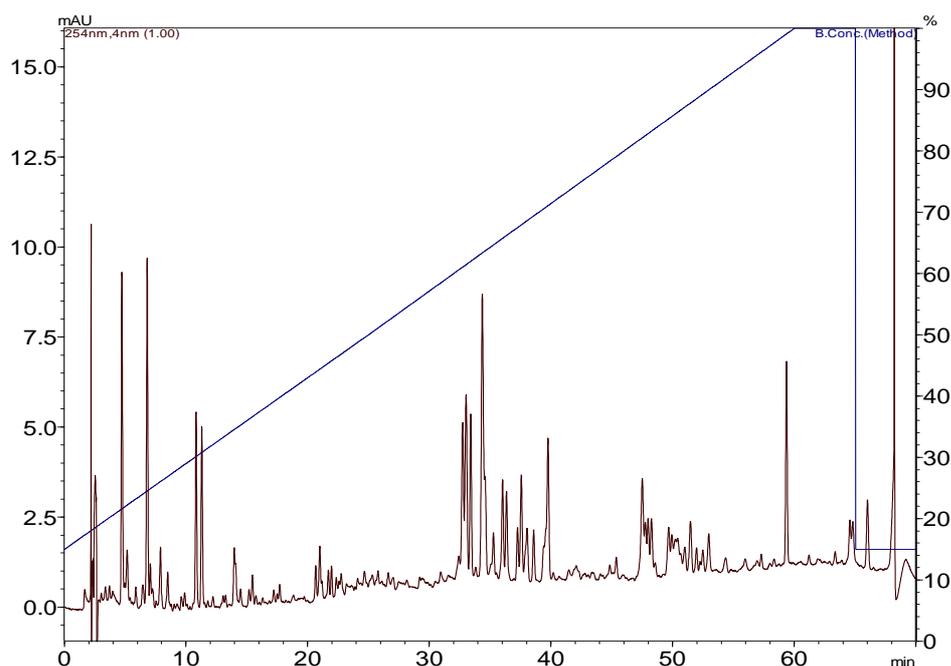
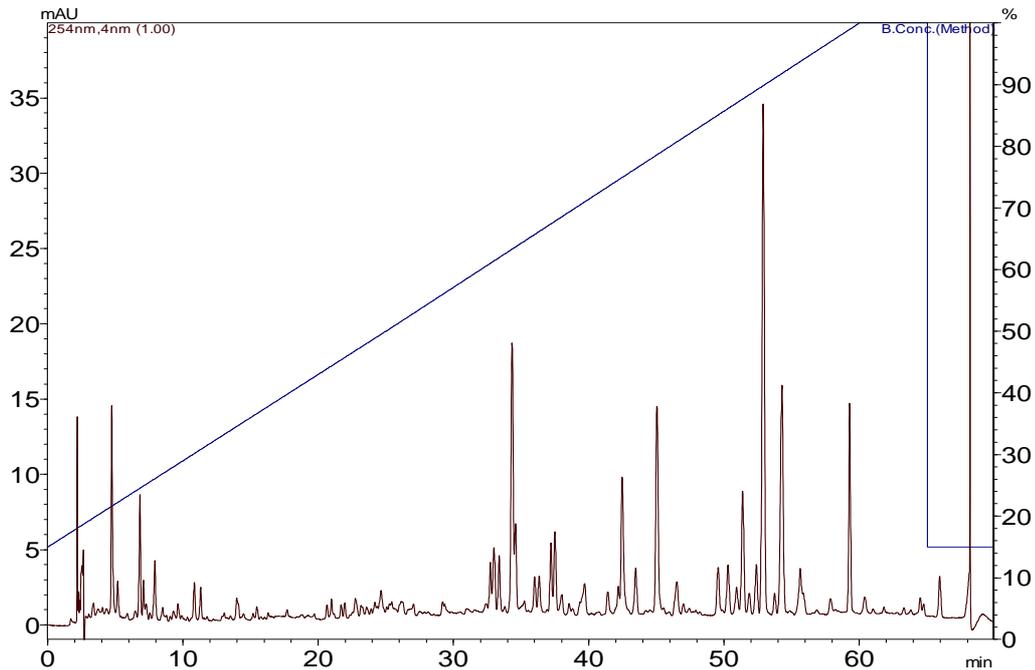


Abbildung 9: HPLC-Trennung der Chloroformfraktion

HPLC-Bedingungen 1 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm



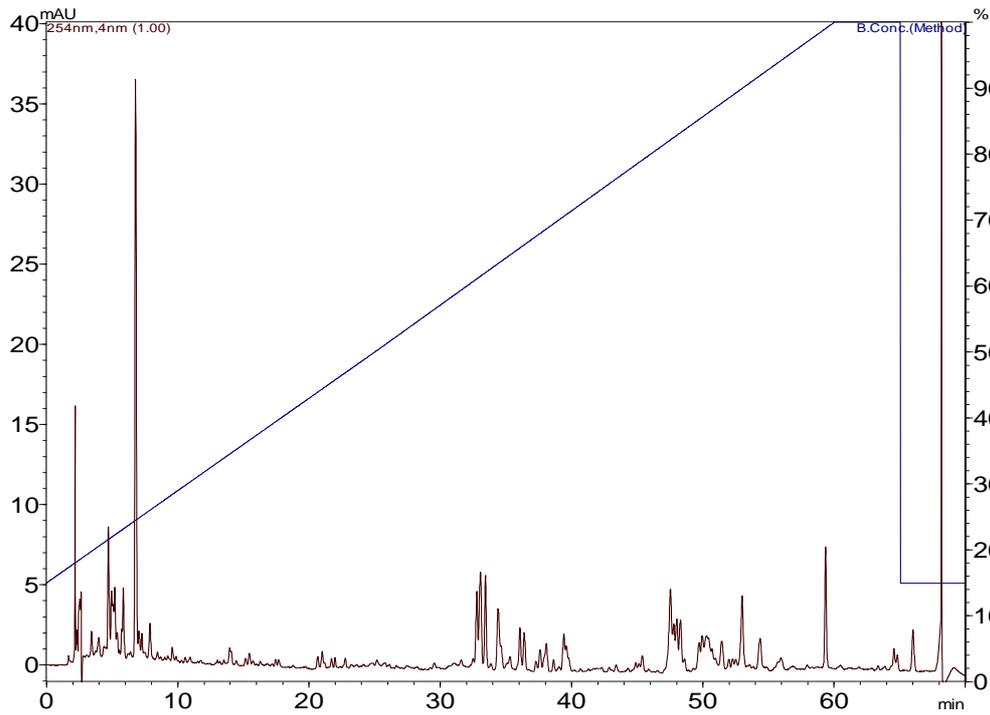
Für die PE- und Chloroformfraktion konnte mit dieser Methode eine zufriedenstellende Trennung erzielt werden.

Die Butanolfraction konnte mit der Methode HPLC-Bedingungen 1 nicht ausreichend getrennt werden. Wie im nachfolgenden Chromatogramm (Abbildung 10, S. 22) dargestellt, wies diese Fraktion höhere Anteile an polaren Inhaltsstoffen auf, die innerhalb von ca. 10 Minuten relativ schlecht getrennt eluierten. Apolare Komponenten eluierten nach ca. 30 Minuten.

Da die Trennung aller Komponenten der ButOH-Fraktion in einem Chromatogramm die Analysenzeit stark verlängert hätte, wurde entschieden, zwei getrennte Methoden zu erarbeiten.

Abbildung 10: HPLC-Trennung der ButOH-Fraktion

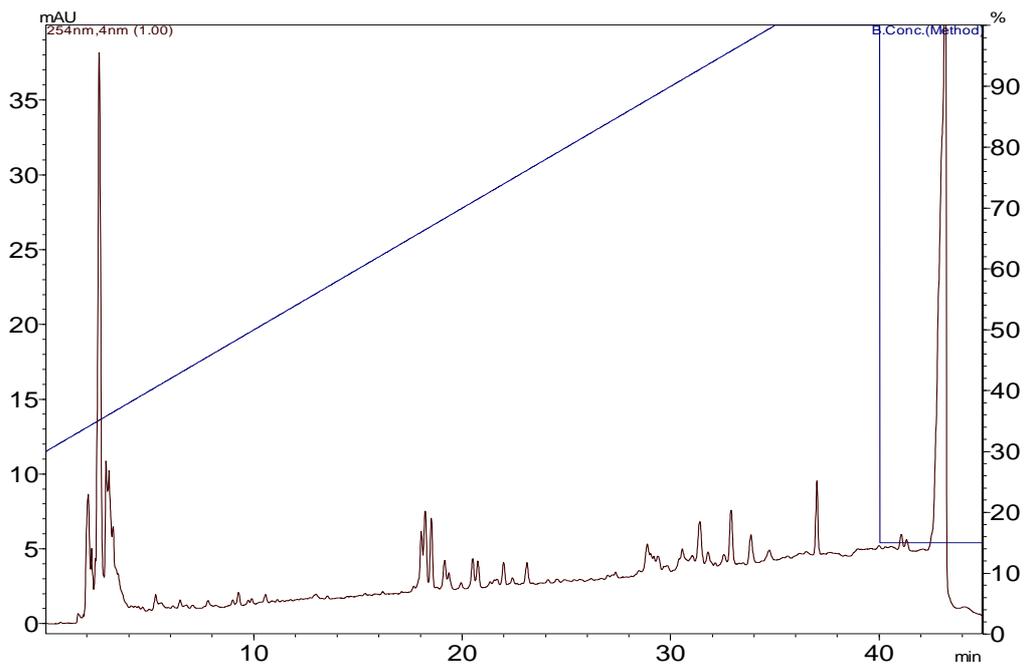
HPLC-Bedingungen 1 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm



Die apolaren Substanzen konnten mit der Methode HPLC-Bedingungen 2 aufgetrennt werden (vgl. Abbildung 11).

Abbildung 11: HPLC-Trennung der apolaren Substanzen der ButOH-Fraktion

HPLC-Bedingungen 2 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm

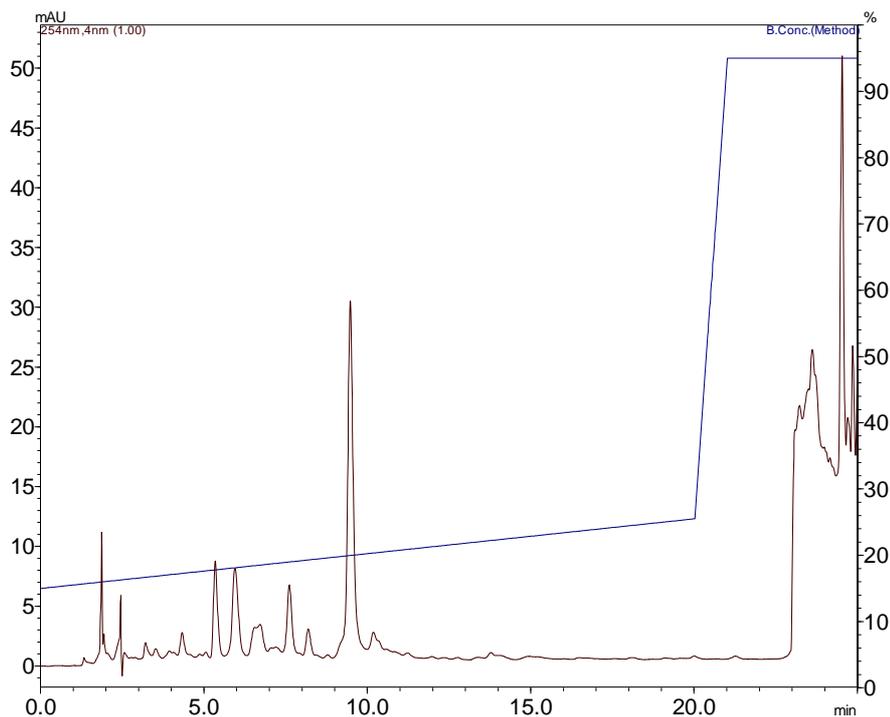


Die Ausarbeitung einer Methode zur Trennung der polaren Komponenten der ButOH-Fraktion mit Retentionszeiten unter 10 Minuten gestaltete sich schwieriger. Zahlreiche Versuche der Gradientenelution führten zu keinem zufrieden stellenden Ergebnis.

Aufgrund von UV-Spektren der Hauptkomponenten mit Hinweisen auf das Vorliegen von Apigenin- und Luteolinderivaten bzw. der DC-Ergebnisse erfolgte die Trennung dieser Komponenten in einem Flavonoidsystem (HPLC-Bedingungen 3, vgl. S. 9).

Durch den Austausch der stationären Phase von einer Hypersil- zu einer Lichrospher-Säule konnte die Auftrennung weiter verbessert werden.

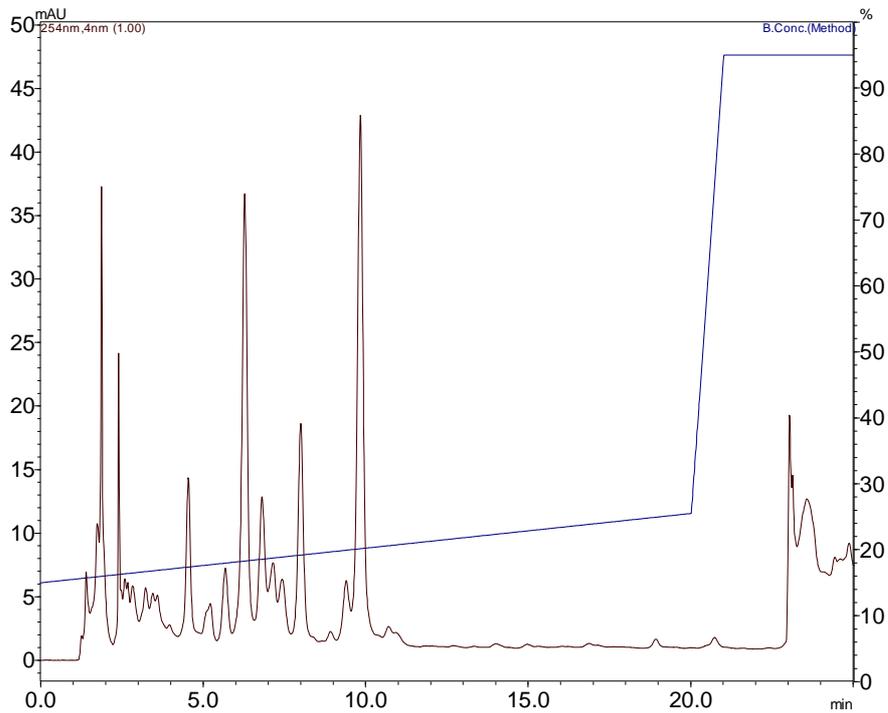
Abbildung 12: HPLC-Trennung der polaren Komponenten der ButOH- Fraktion
HPLC-Bedingungen 3 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm



Der Restextrakt wurde ebenfalls mittels HPLC-Bedingungen 3 getrennt.

Abbildung 13: HPLC-Trennung des Restextrakts

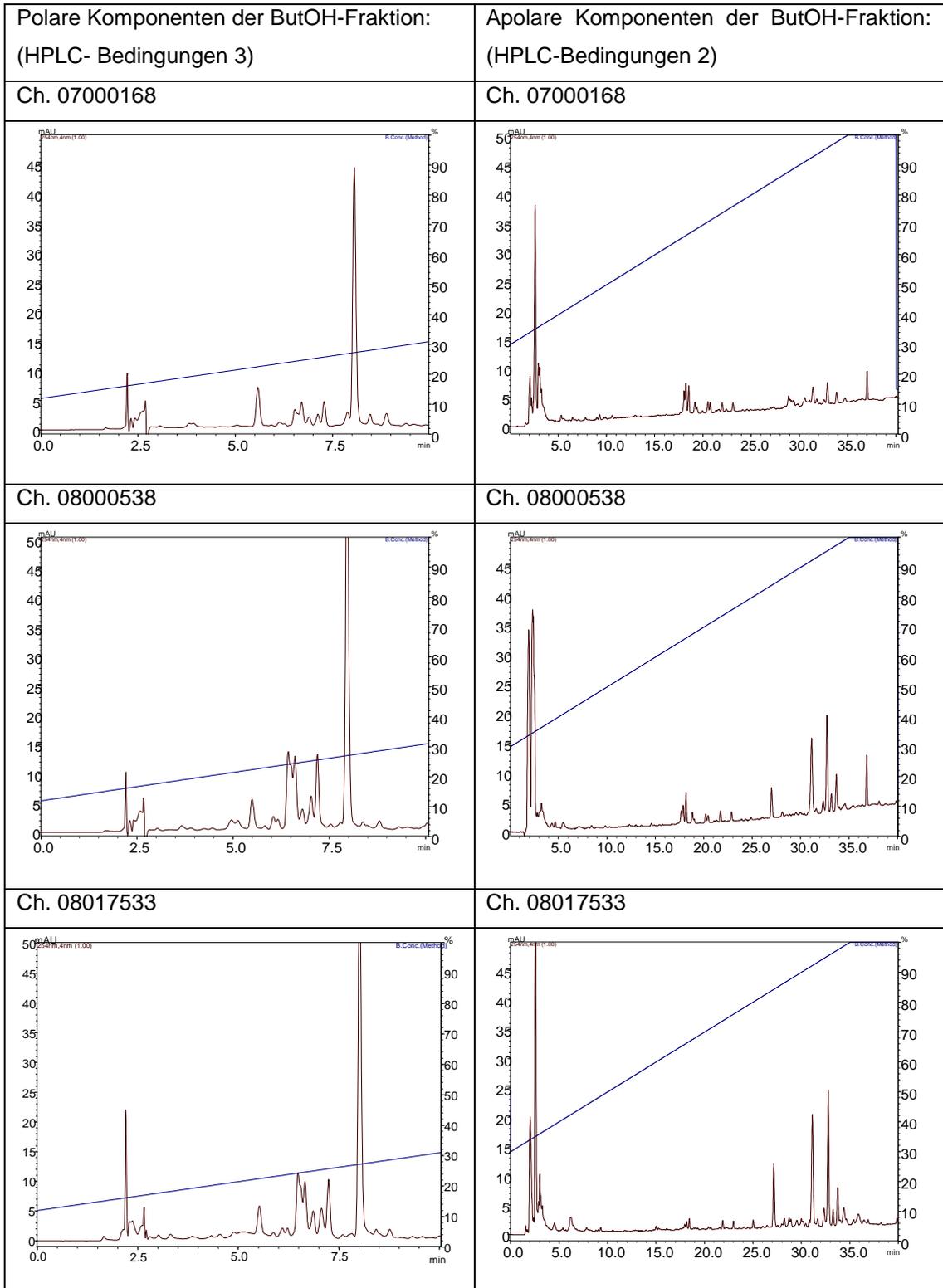
HPLC-Bedingungen 3 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm

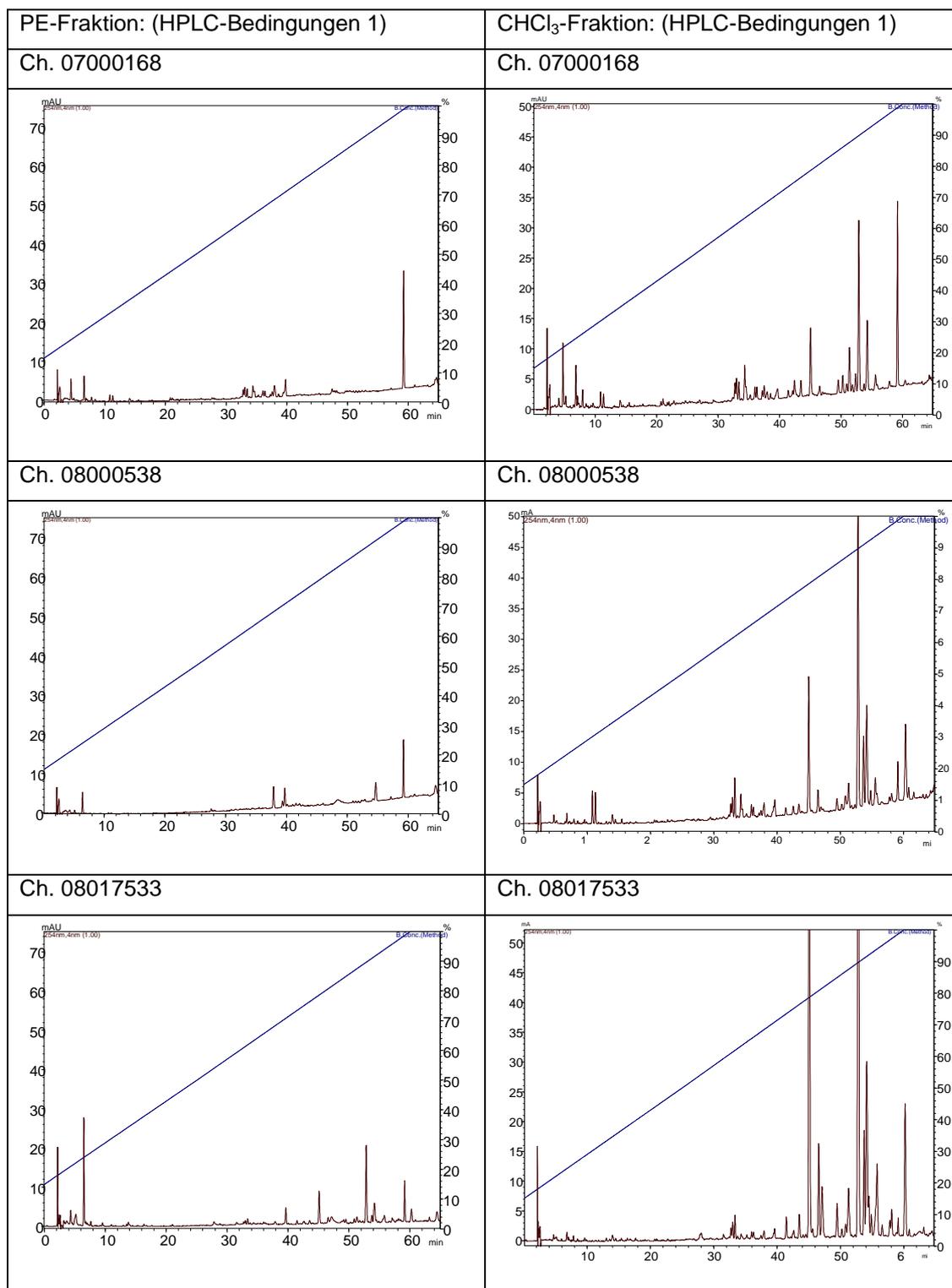


4.3.2 HPLC-Vergleich verschiedenen Extraktchargen:

Nachdem die DC-Charakterisierung der Chargen 07000168 und 08000538 des Passifloratrockenextraktes KY 705 P qualitativ gute Übereinstimmung gezeigt hatte, wurden die daraus hergestellten Fraktionen auch mittels HPLC auf ihre Zusammensetzung überprüft.

Abbildung 14: HPLC-Untersuchung auf Chargenkonformität





Die qualitative Übereinstimmung der Fraktionen, die mit dem gleichen LM hergestellt worden waren, konnte durch die HPLC-Untersuchung bestätigt werden. Daher erfolgte die Vereinigung für die weiteren Experimente.

4.4 Charakterisierung der Hauptkomponenten der Extrakte:

4.4.1 Flavonoide der ButOH-Fraktion und des Restextraktes:

Nachdem sowohl in der ButOH-Fraktion als auch im Restextrakt Flavonoide mittels DC nachgewiesen worden waren, erfolgte die Identifizierung mittels RP-HPLC [17]. Die Detektion erfolgte bei 340nm, die Identifizierung anhand der Elutionsfolge, des UV-Spektrums und durch Vergleich mit authentischen Flavonoiden.

Abbildung 15: HPLC-Trennung des Restextraktes

HPLC-Bedingungen 3 (vgl. S. 9); Detektion bei 340nm

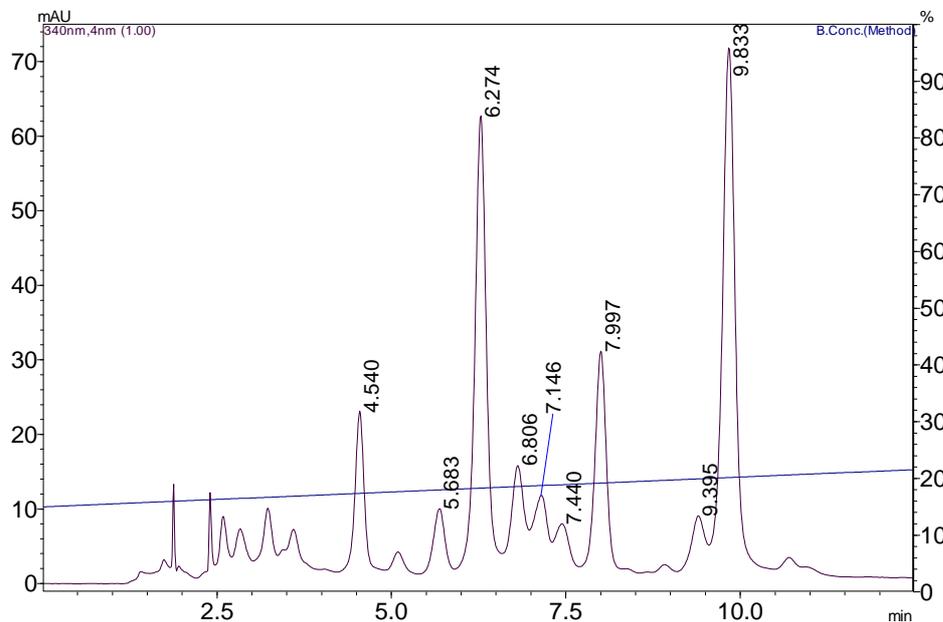
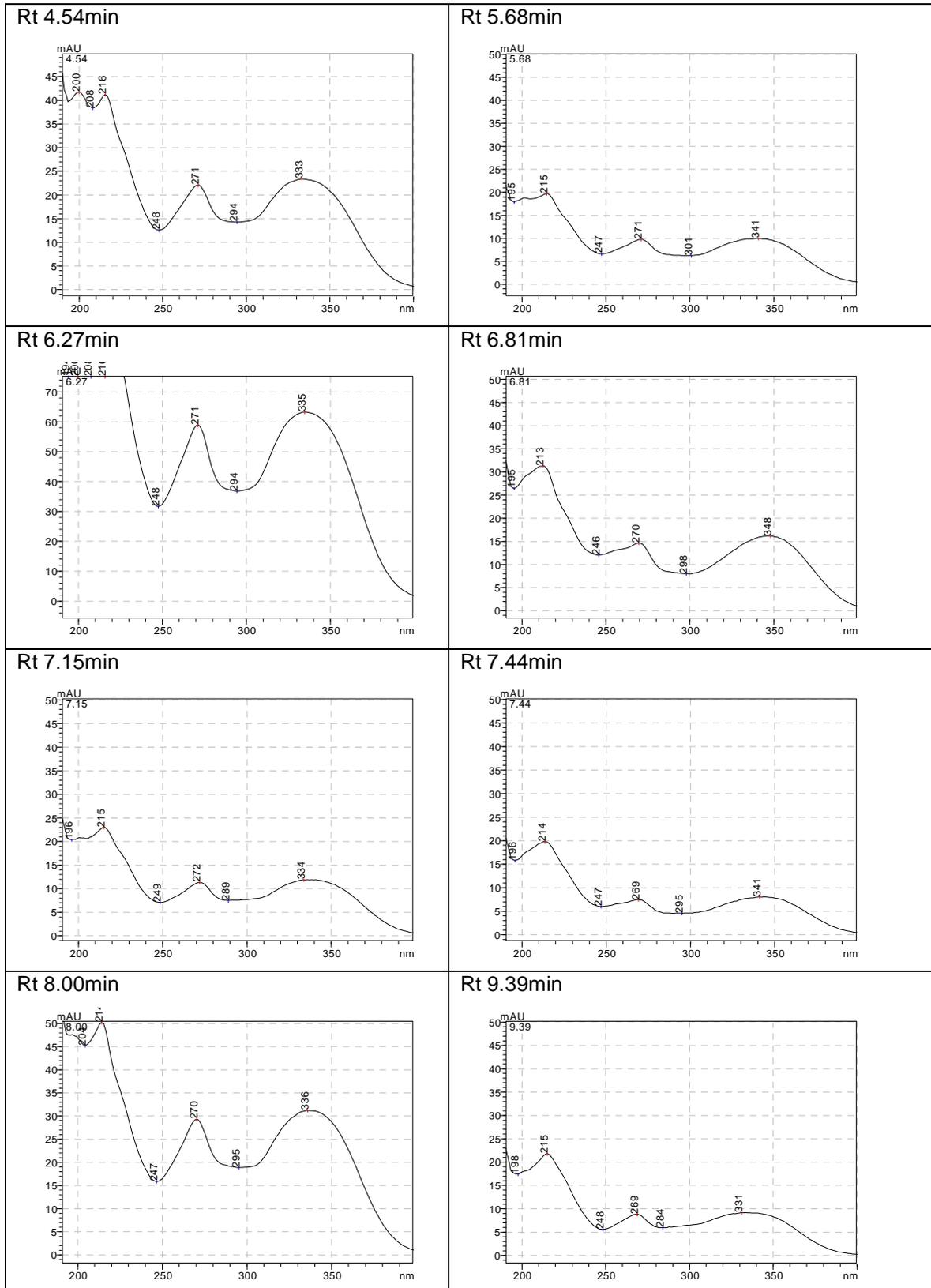
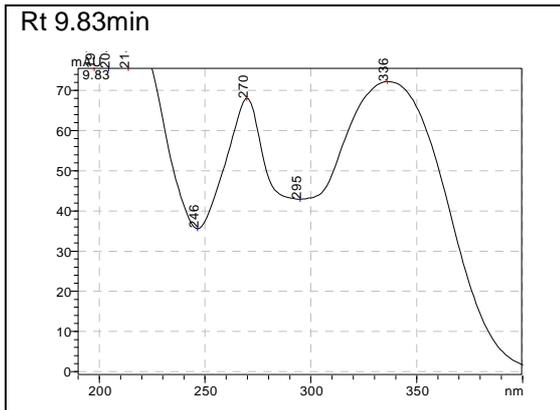


Tabelle 5: Retentionszeiten der Flavonoide des Restextraktes (zu Abbildung 15)

Rt	Zugeordnetes Flavonoid	Rt	Zugeordnetes Flavonoid
4.54	Vicenin	7.44	Luteolinglycosyl
5.68	Isorientin-2''-glucosid	8.00	Isovitexin-2''-glucosid
6.27	Schaftosid/ Isoschaftosid	9.40	Vitexin
6.81	Isorientin	9.83	Isovitexin
7.15	Apigeninglycosyl		

Abbildung 16: UV-Spektren der Flavonoide des Restextraktes (zu Abbildung 15, S. 27)





Zur Identifizierung der Flavonoide im polaren Anteil der ButOH-Fraktion wurde analog bei 340nm detektiert. Basierend auf der Peakabfolge des Restextraktes und der DAD-Spektren wurden die Flavonoidkomponenten zugeordnet.

Abbildung 17: HPLC-Trennung der Flavonoide der ButOH-Fraktion
HPLC-Bedingungen 3 (vgl. S. 9); Detektion bei 340nm

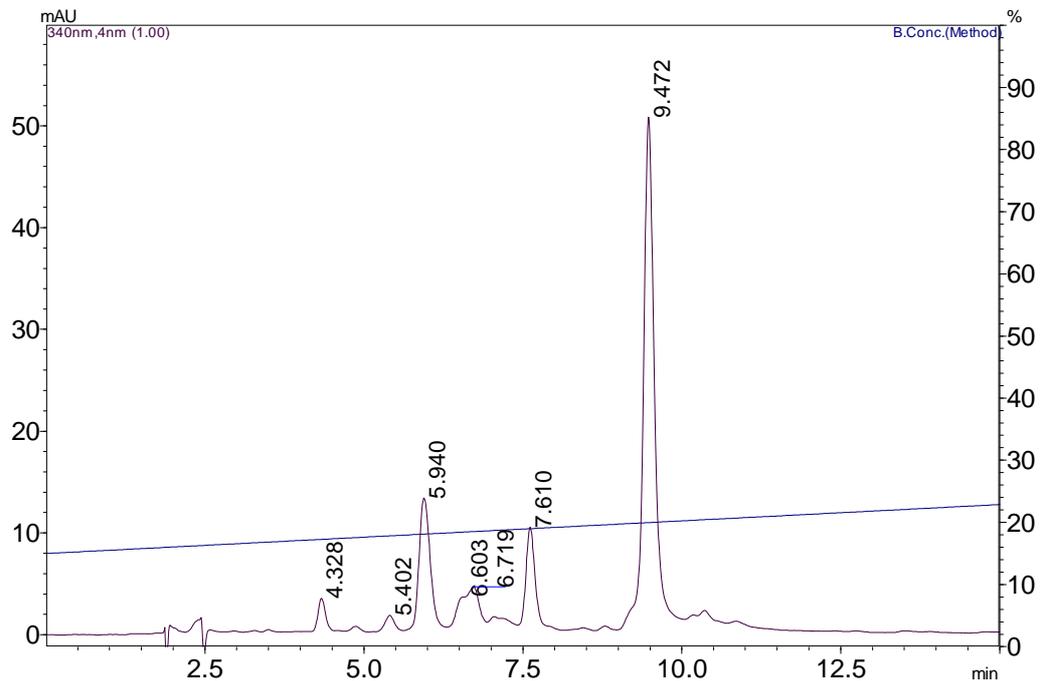


Tabelle 6: Retentionszeiten der Flav. der ButOH-Fraktion (zu Abbildung 17, S. 29)

Rt	Zugeordnetes Flavonoid	Rt	Zugeordnetes Flavonoid
4.33	Vicenin	6.72	Orientin
5.40	Isoorientin-2''-glucosid	7.61	Isovitexin-2''-glucosid
5.94	Schaftosid/ Isoschaftosid	9.47	Isovitexin
6.53	Isoorientin		

Nach weitgehend erfolgter Identifizierung der Flavonoide im Restextrakt und der ButOH-Fraktion erfolgte die Quantifizierung dieser Substanzen mittels HPLC. Hierzu musste das HPLC-System unter Verwendung von Reinsubstanzen geeicht werden [18].

Es wurde mit Isovitexin und Isoorientin je ein Apigenin- bzw. Luteolinderivat zur Eichung verwendet, sodass Korrekturfaktoren für die weiteren Flavonoidkomponenten mit dem jeweiligen Genin berechnet werden konnten. Kämpferol-7-O-neohesperosid wurde als interne Standardsubstanz verwendet.

Es wurden methanolische Stammlösungen (SL) der Referenzsubstanzen in einer Konzentration von jeweils 0,30mg/ml hergestellt. Daraus wurden 3 Eichlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Isoorientin (IO) und Isovitexin (IV) bereitet. Von der SL von Kämpferol-7-O-neohesperosid (K7O) wurden jeweils 200µl zugesetzt. (siehe Tabelle 7).

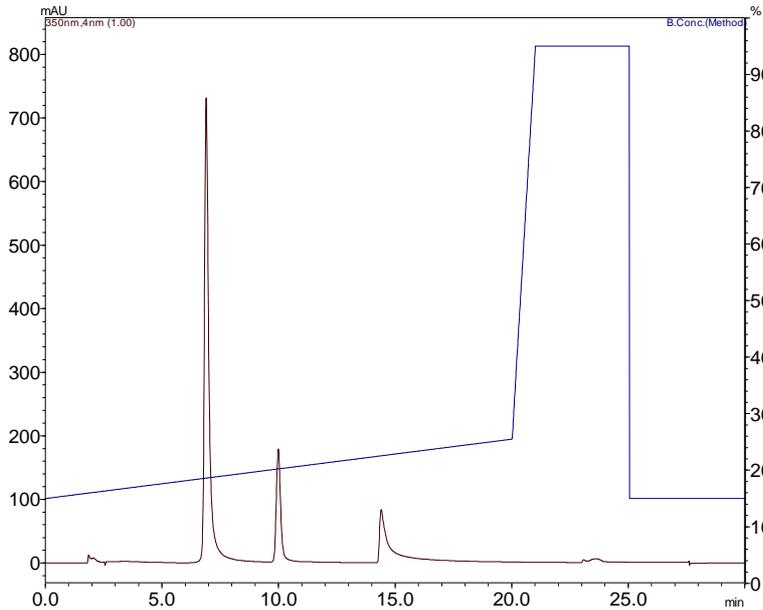
Tabelle 7: Zusammensetzung der Eichlösungen

Lösung	SL: IO	SL: IV	SL: K7O	Gesamt
1	100µL	300µL	200µL	600µL
2	200µL	200µL	200µL	600µL
3	300µL	100µL	200µL	600µL

20µL jeder Eichlösung wurden in Doppelbestimmungen analysiert. Die Detektionswellenlänge wurde unter Berücksichtigung der Absorptionsmaxima von Apigeninderivaten bei 335nm, von Luteolinderivaten bei 348nm und Kämpferolderivaten bei 365nm auf 350nm festgelegt.

Abbildung 18: HPLC von Eichlösung 1

HPLC-Bedingungen 3 (vgl. S. 9); Detektion bei 350nm



Die Berechnung der Korrekturfaktoren erfolgte nach nachstehender Formel:

$$KF = \frac{EW_{(Flav)} \times A_{(Std)}}{EW_{(Std)} \times A_{(Flav)}}$$

KF	Korrekturfaktor
$EW_{(Flav)}$	Aliquotierte Einwaage Flavonoid in mg
$EW_{(Std)}$	Aliquotierte Einwaage Standard in mg
$A_{(Flav)}$	Peakfläche Flavonoid
$A_{(Std)}$	Peakfläche Standard

Tabelle 8: Korrekturfaktor für Isoorientin

Eichlösung:	1	2	3
Einwaage in mg	0,09	0,06	0,03
KF Bestimmung 1	0,3644	0,3955	0,3786
KF Bestimmung 2	0,3799	0,3879	0,3753
Arithmetisches Mittel:	0,3803		
Standardabweichung:	0,0108		
Variationskoeffizient:	2,84%		

Tabelle 9: Korrekturfaktor für Isovitexin

Eichlösung:	1	2	3
Einwaage in mg	0,03	0,06	0,09
KF Bestimmung 1	0,4509	0,4630	0,4343
KF Bestimmung 2	0,4691	0,4509	0,4341
Arithmetisches Mittel	0,4509		
Standardabweichung	0,0144		
Variationskoeffizient	3,20%		

Anhand der errechneten Korrekturfaktoren wurde je eine Eichgerade erstellt. Beide Eichgeraden verliefen annähernd durch den Nullpunkt und das Bestimmtheitsmaß R^2 zeigte einen linearen Zusammenhang an.

Abbildung 19: Eichgerade für Isoorientin

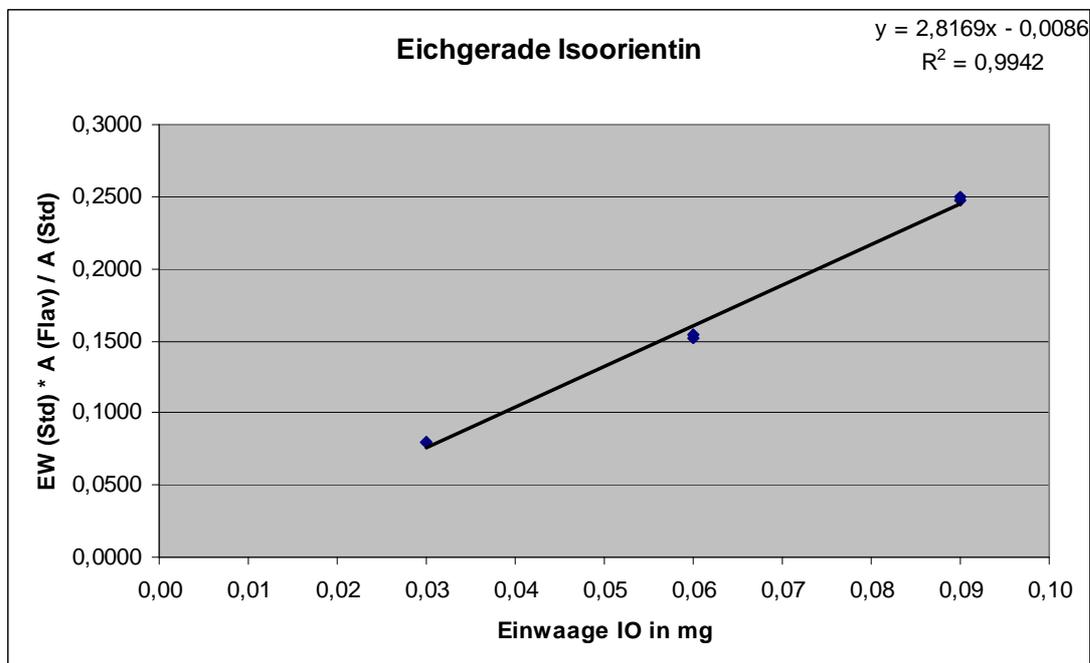
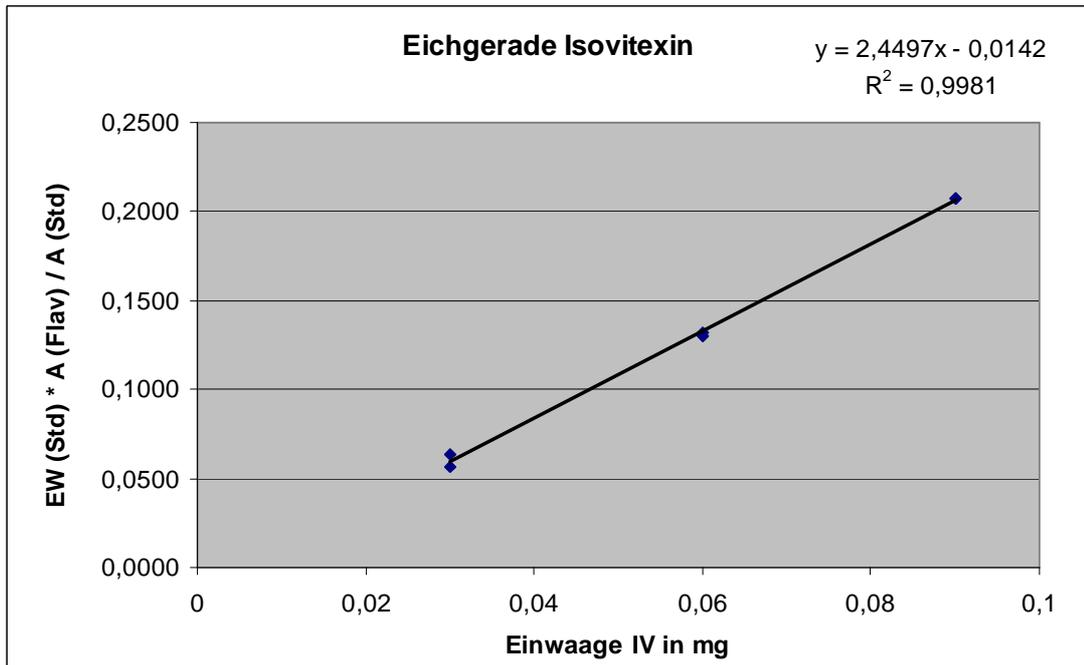


Abbildung 20: Eichgerade für Isovitexin



Für die übrigen Flavonoide wurden die Korrekturfaktoren anhand jener für Isoorientin und Isovitexin ermittelt. Dies war möglich, weil ausschließlich Apigenin- und Luteolinderivate zu quantifizieren waren. Für die Apigeninglykoside wurde der KF von Isovitexin der Berechnung zugrunde gelegt, für die Luteolinglykoside jener des Isoorientins.

Die Berechnung der KFs der einzelnen Flavonoide erfolgte nach nachstehender Formel.

$$KF = \frac{MG_{(Flav)} \times KF_{(Std)}}{MG_{(Std)}}$$

KF	Korrekturfaktor
$MG_{(Flav)}$	Molekulargewicht des Flavonoids in g
$MG_{(Std)}$	Molekulargewicht des Flavonoidstandards in g
$KF_{(Std)}$	Korrekturfaktor des Flavonoidstandards

Tabelle 10: Berechnete Korrekturfaktoren für die einzelnen Flavonoide

Flavonoid	Genin	MG	Basis von	KF
Vicenin	Apigenin	594	IV	0,6199
IV-2''-Glucosid	Apigenin	594	IV	0,6199
Schaftosid/Isoschaftosid	Apigenin	564	IV	0,5886
Isorientin	Luteolin	448	IO	0,3803
Orientin	Luteolin	448	IO	0,3803
IO-2''-Glucosid	Luteolin	610	IO	0,5178
Vitexin	Apigenin	432	IV	0,4509
Isovitexin	Apigenin	432	IV	0,4509

Mit diesen Korrekturfaktoren wurden die Flavonoide im ButOH- bzw. Restextrakt mittels Doppelbestimmungen quantifiziert. Es wurden jeweils 10µL Messlösung analysiert.

Bereitung der Messlösung:

100µL Stammlösung von Kämpferol-7-O-neohesperosid (0,60mg/ml in MeOH) wurden mit 100µL Probenlösung (8mg/ml in 50% EtOH) gemischt, 5 Minuten zentrifugiert (13.000rpm) und anschließend analysiert.

Abbildung 21: HPLC der Flavonoide im Restextrakt (Ch. 08000538)

HPLC-Bedingungen 3 (vgl. S. 9); Detektion bei 350nm

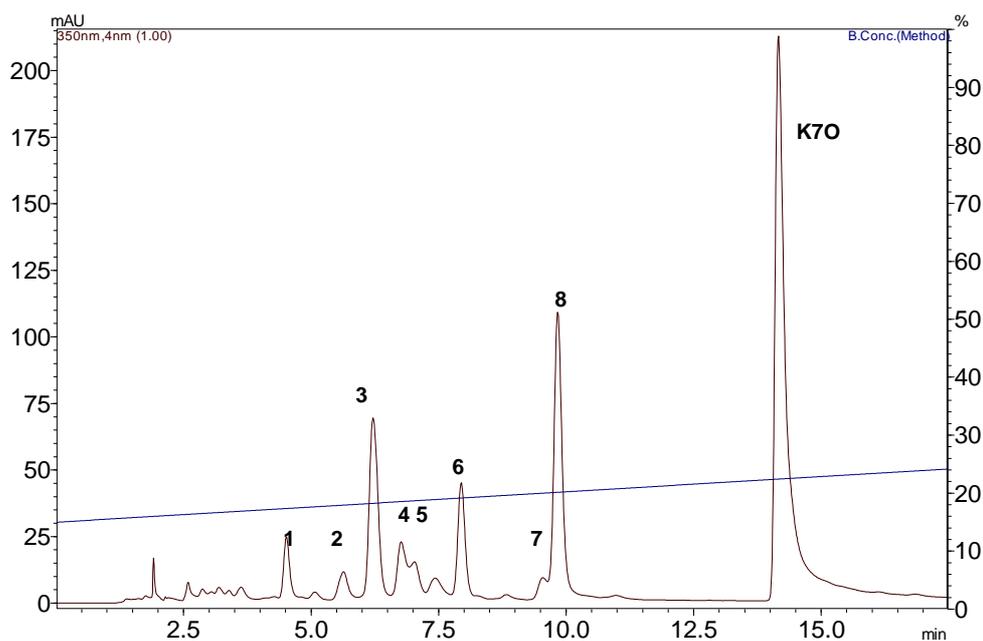


Tabelle 11: Ergebnisse der Flavonoidquantifizierung

		Restextrakt	Restextrakt	ButOH-Fraktion
Nr.	Flavonoid	Ch. 07000163	Ch. 08000538	
1	Vicenin	0,25%	0,25%	0,04%
2	IV-2''-Glucosid	0,16%	0,18%	0,03%
3	Schaftosid/Isoschaftosid	0,91%	1,03%	0,24%
4	Isoorientin	0,16%	0,22%	0,06%
5	Orientin	0,16%	0,14%	0,04%
6	IO-2''-Glucosid	0,42%	0,51%	0,13%
7	Vitexin	0,06%	0,08%	0,05%
8	Isovitexin	0,94%	1,19%	0,62%
	Gesamtflavonoidgehalt	3,05%	3,60%	1,21%

Da im Analysenzertifikat [15] für die Ch. 08000538 des Extraktes KY 705 P ein Gesamtflavonoidgehalt von 5,28% und für Isovitexin ein Gehalt von 1,50% angegeben worden war, wurde für das Extrakt bzw. für das Restextrakt dieser Charge eine analoge Gehaltsbestimmung nach Ph. Eur. durchgeführt:

Die photometrische Bestimmung lieferte für den nativen Extrakt einen Gesamtflavonoidgehalt von 4,84%, berechnet als Isovitexin. Die Wiederfindung betrug ca. 10 Monate nach dem Testdatum 92% des im Analysenzertifikat angeführten Wertes.

Der Flavonoidgehalt des Restextraktes betrug 4,77%, berechnet als Isovitexin.

Die HPLC-Methode der Fa. Finzelberg war für einen direkten Vergleich nicht verfügbar. Die Abweichung des Isovitexingehaltes von ca. 20% von der Angabe im Analysenzertifikat könnte eventuell methodisch bedingt gewesen sein.

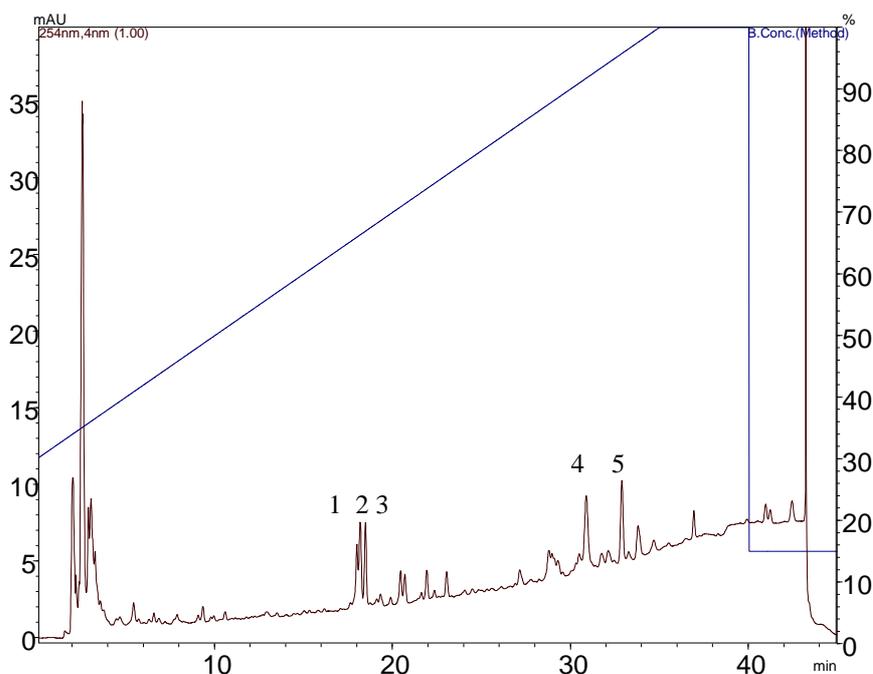
4.4.2 Apolare Komponenten der ButOH-, PE- bzw. CHCl₃-Fraktion:

4.4.2.1 Apolare Anteil der ButOH-Fraktion:

Anders als bei den polaren Fraktionen konnten in den DC-Analysen keine charakteristischen Inhaltsstoffe identifiziert werden. Daher wurde bei 254nm detektiert, um die enthaltenen Komponenten so weit wie möglich zu erfassen.

Anhand der DAD-Spektren und charakteristischer Maxima der Hauptkomponenten sollten die Inhaltsstoffe identifiziert werden.

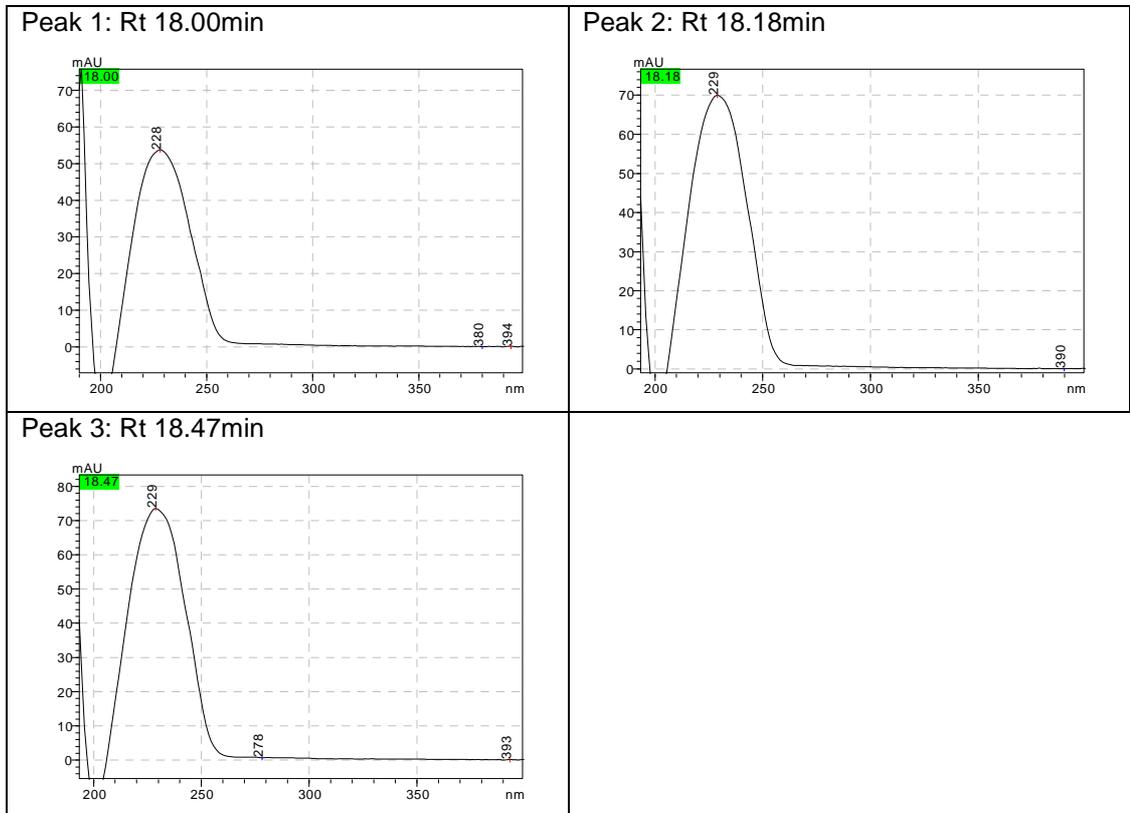
Abbildung 22: HPLC-Trennung der apolaren Komponenten der ButOH-Fraktion
HPLC-Bedingungen 2 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm



Bei den Peaks, die innerhalb der ersten 10 Minuten eluierten, handelte es sich um Flavonoide (vgl. 4.4.1, S. 27f).

Bei Retentionszeiten von 16 bis 20 Minuten eluierten Komponenten mit Absorptionsmaxima bei ca. 228nm. Ein Maximum bei 228nm ließ auf das Vorliegen eines chromophoren Systems mit einer konjugierten Doppelbindung schließen bzw. wies auf aliphatische Kohlenwasserstoffe wie Fette, Fettsäuren oder Wachse (vgl. Abbildung 23, S. 37) hin.

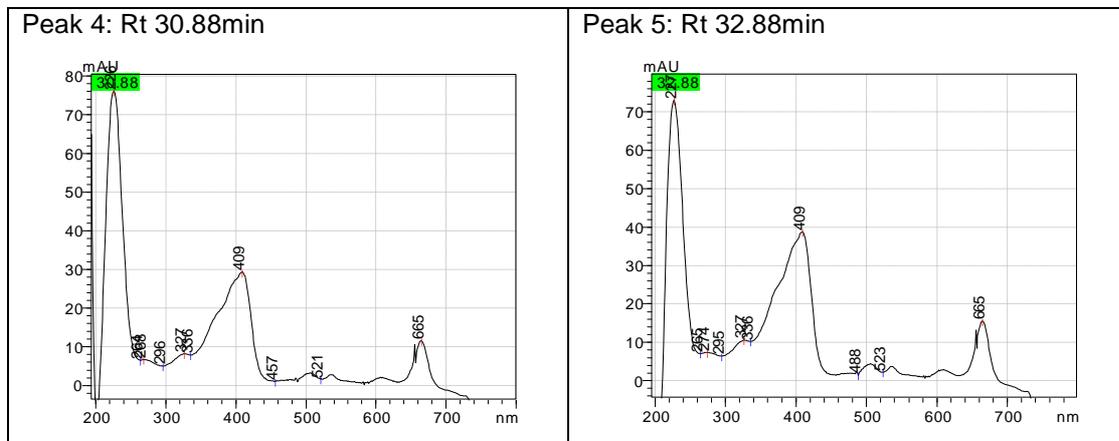
Abbildung 23: Ausgewählte UV-Spektren apolarer Komponenten der ButOH-Fraktion mit Rt < 20min



Bei Retentionszeiten von 30 bis 38min wurden zwei Hauptkomponenten mit Absorptionsmaxima bei 409nm bzw. 665nm detektiert, welche sich im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums befanden. Unter Berücksichtigung der dunkelgrünen Eigenfarbe der Butanolfraktion lag nahe, dass es sich um Chlorophylle handeln könnte. Allerdings sind in der Literatur für Chlorophyll in MeOH charakteristische Maxima bei 430 bzw. 662nm für Chlorophyll a und 454 bzw. 643nm für Chlorophyll b angegeben [19].

Das Maximum bei 409nm ließ den Schluss zu, dass es sich bei den bei Rt 30,9 und 32,9min eluierten Substanzen um Isomere von Pheophytin a [20] handeln könnte.

Abbildung 24: Ausgewählte UV-Spektren apolarer Komponenten der ButOH-Fraktion mit Rt > 30min



Um eine semiquantitative Aussage über den Anteil an chlorophyllartigen Komponenten treffen zu können, wurde eine Abtrennung durchgeführt und die "Chlorophyllfraktion" gravimetrisch bestimmt:

50mg Butanolfraktion wurden in 7,5ml CH_2Cl_2 (0,15ml/mg Extrakt) gelöst und mit 7,5ml einer Mischung aus MeOH und H_2O (1:1 V/V) versetzt. Das halogenierte LM wurde bei 40°C unter vermindertem Druck (etwa 600-800mbar) abgedampft, wobei die unlöslichen chlorophyllartigen Komponenten in der polaren H_2O -MeOH-Phase ausfielen und abfiltriert werden konnten. Die wässrige Phase wurde zur Trockene gebracht und gewogen.

Die semiquantitative Abtrennung lieferte 17,4mg aufgereinigte ButOH-Fraktion, bzw. einen relativen Anteil von 34,8%. Somit enthielt der Extrakt einen Anteil von ca. 65,2% chlorophyllartige Komponenten.

Die erhaltenen Subfraktionen wurden mittels DC (vgl. Abbildung 25, S. 39) untersucht.

Abbildung 25: DC-Untersuchung der Fraktionen nach der "Chlorophyllabtrennung"
Probenlösung 10 μ L (10mg Fraktion /ml)
DC-System 1 (vgl. S. 8); Detektion: UV_{366nm}



Bahn	Subfraktion
1	Butanolfraktion
2	Filtrat (=MeOH-H ₂ O-lösliche Komponenten)
3	Filterrückstand (=chlorophyllartige Komponenten)

Anhand der rotfluoreszierenden Banden (Bahn 1 und 3) wurde gezeigt, dass diese Komponenten aus der ButOH-Fraktion abgetrennt werden konnten.

Auf Bahn 2 konnten ausschließlich die polaren Substanzen der Butanolfraktion detektiert werden.

1 2 3

4.4.2.2 PE-Fraktion:

Zur Charakterisierung der Komponenten wurde die Fraktion mittels HPLC unter den Bedingungen 1 (vgl. S. 9) analysiert. Im Gegensatz zur intensiv grün gefärbten Butanolfraktion war die PE-Fraktion nur schwach hellgrün und wies eine wachsige Konsistenz auf.

Wie in Abbildung 26 (vgl. S. 40) dargestellt, eluierten die polaren Hauptkomponenten mit Retentionszeiten kleiner 10 Minuten und die apolaren Komponenten bei Retentionszeiten von 32 bis 40 Minuten.

Abbildung 26: HPLC-Trennung der PE-Fraktion
HPLC-Bedingungen 1 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm

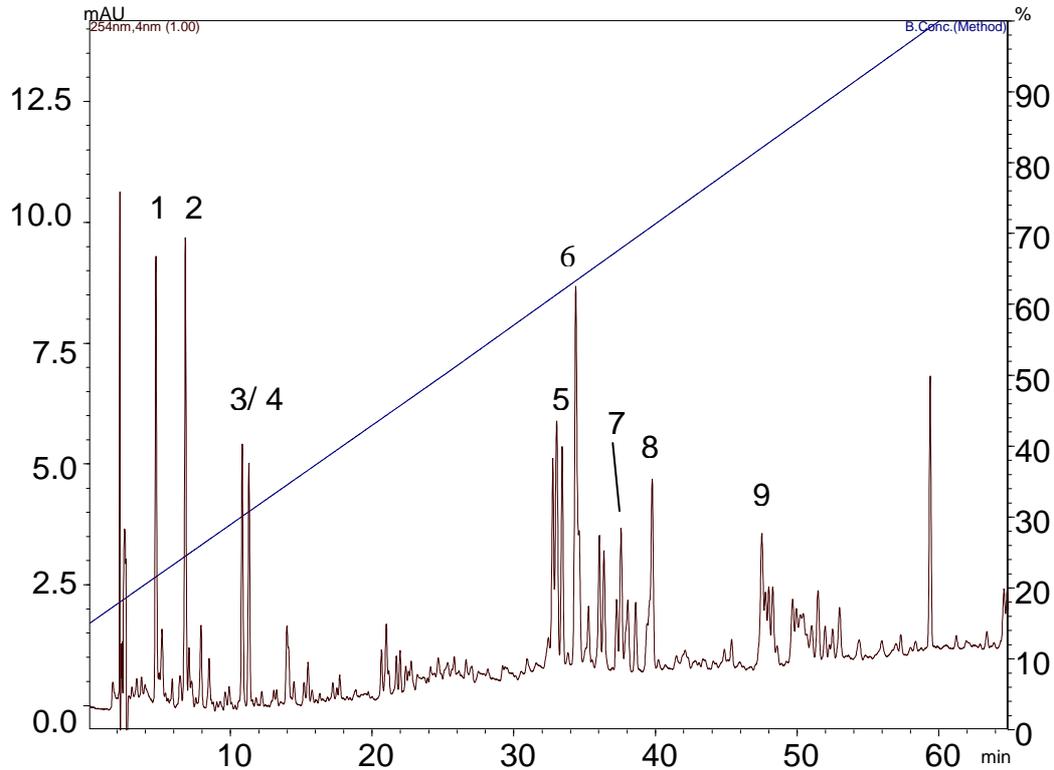
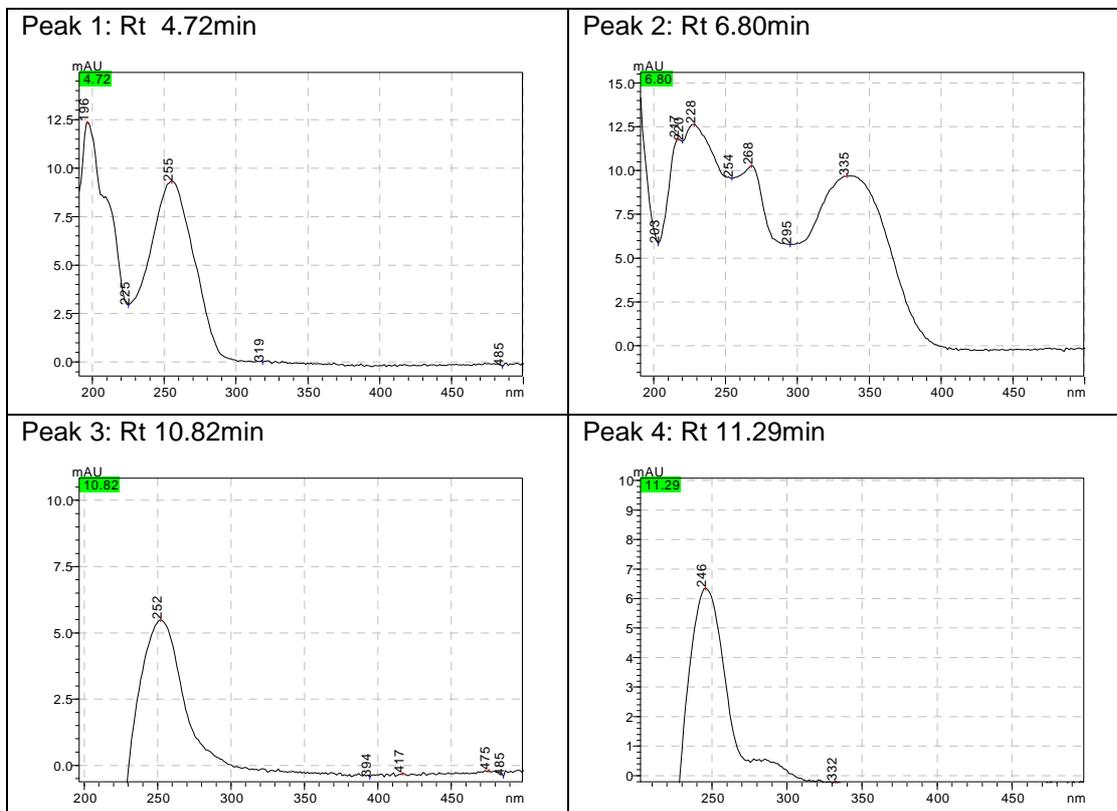
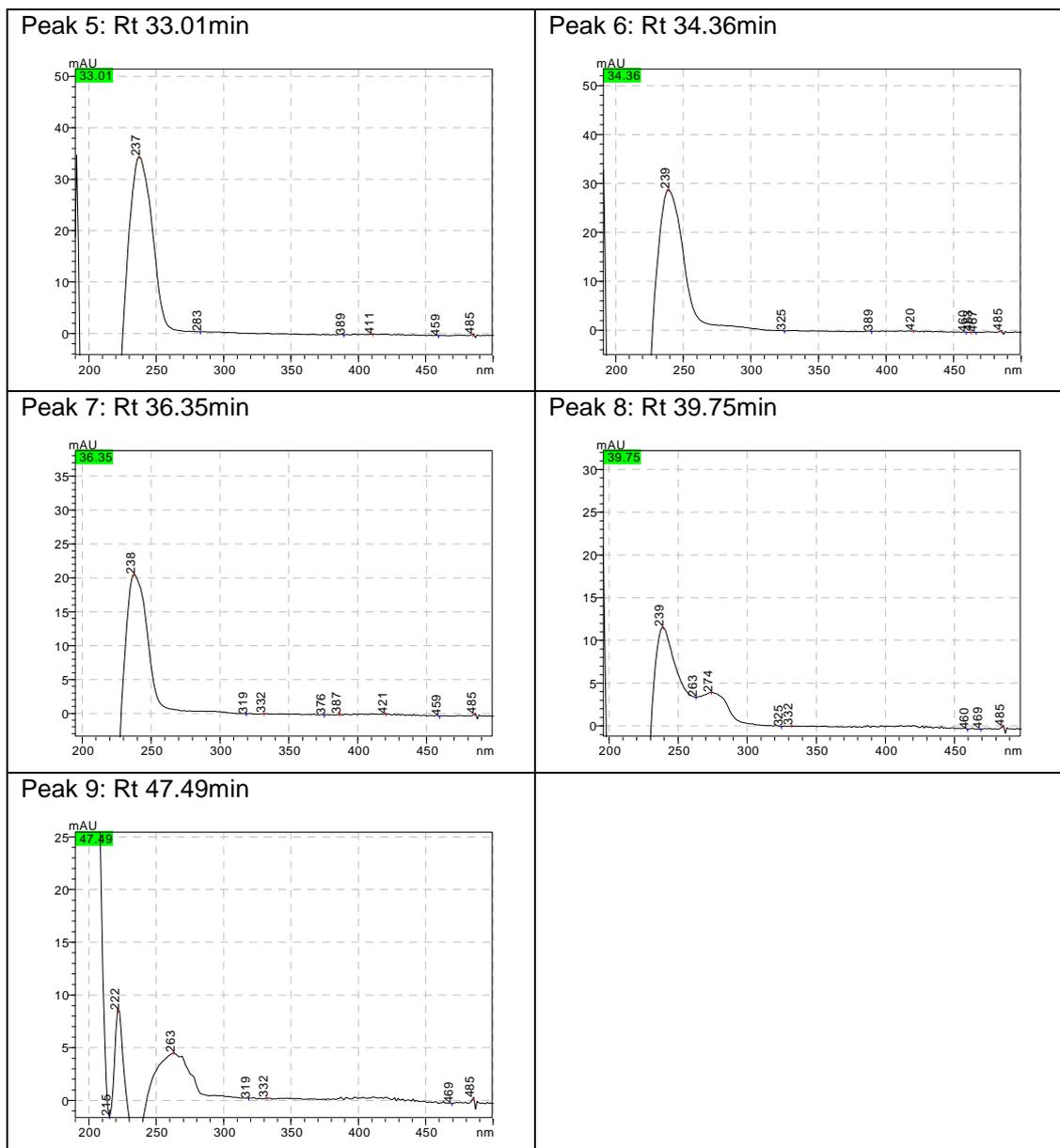


Abbildung 27: UV-Spektren der polaren Komponenten mit Rt < 10min



Die Peaks 1, 3 und 4 zeigten Absorptionsmaxima um 250nm und wiesen auf das Vorliegen eines chromophoren Systems mit zwei konjugierten Doppelbindungen hin. Bei Peak 2 handelte es sich aufgrund der charakteristischen Maxima bei 268nm bzw. 335nm um eine Flavonoidkomponente vom Apigenintyp. Die Retentionszeit und die relative Intensität des Peaks deuteten auf Isovitexin hin.

Abbildung 28: ausgewählte UV-Spektren der apolaren Komponenten mit Rt > 32 Minuten



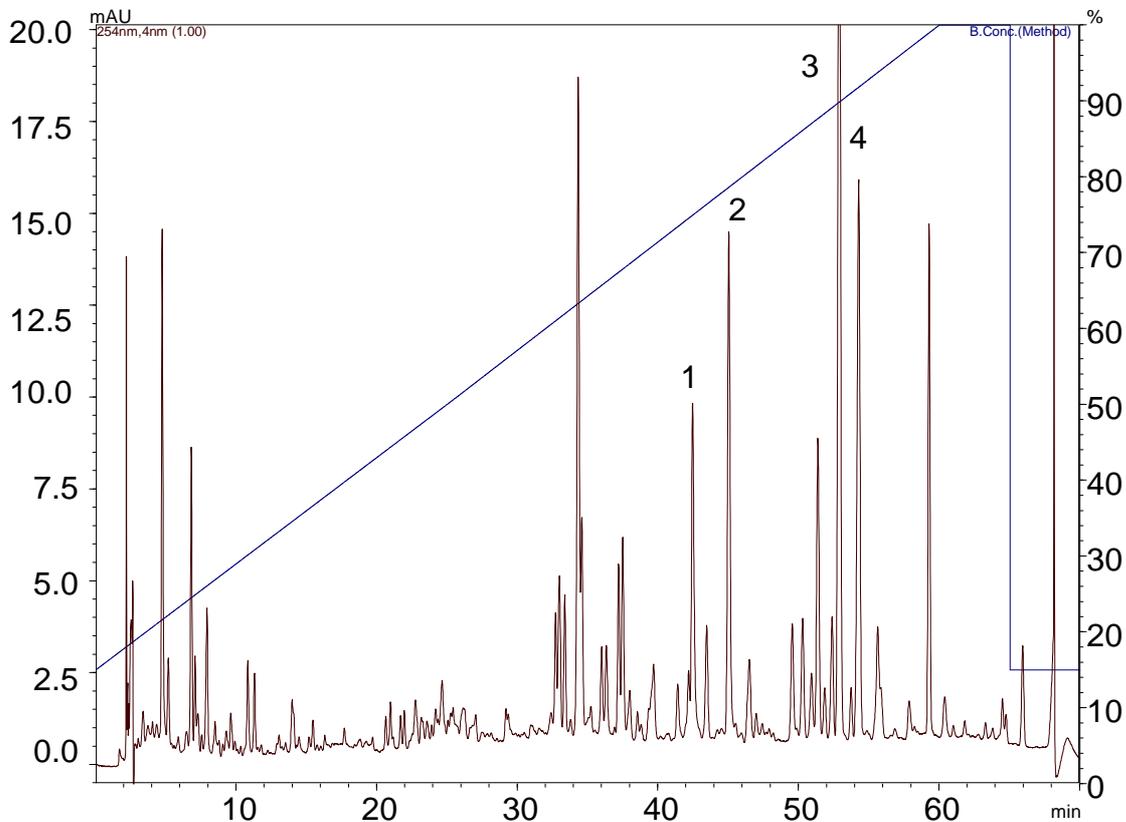
Die Peaks im Bereich von Rt. 32 bis 40min zeigten relativ einheitliche DAD-Spektren mit einem charakteristischen Maximum bei ca. 240nm und einer relativen Intensität von 25 – 40mAU. Die Profile der DAD-Spektren waren jenen der polaren Komponenten der ButOH-Fraktion (vgl. Abbildung 23 S. 37) ähnlich, das Absorptionsmaximum war allerdings bathochrom um ca. 10nm verschoben. Es lag nahe, dass es sich bei diesen Substanzen um Fette und Wachse handelte, was durch die Konsistenz der PE-Fraktion untermauert wurde.

4.4.2.3 Chloroformfraktion:

Die intensiv grün gefärbte und klebrige Chloroformfraktion wurde mittels HPLC unter den Bedingungen 1 (vgl. S. 9) aufgetrennt und die eluierten Komponenten bei 254nm detektiert.

Abbildung 29: HPLC-Trennung der Chloroformfraktion

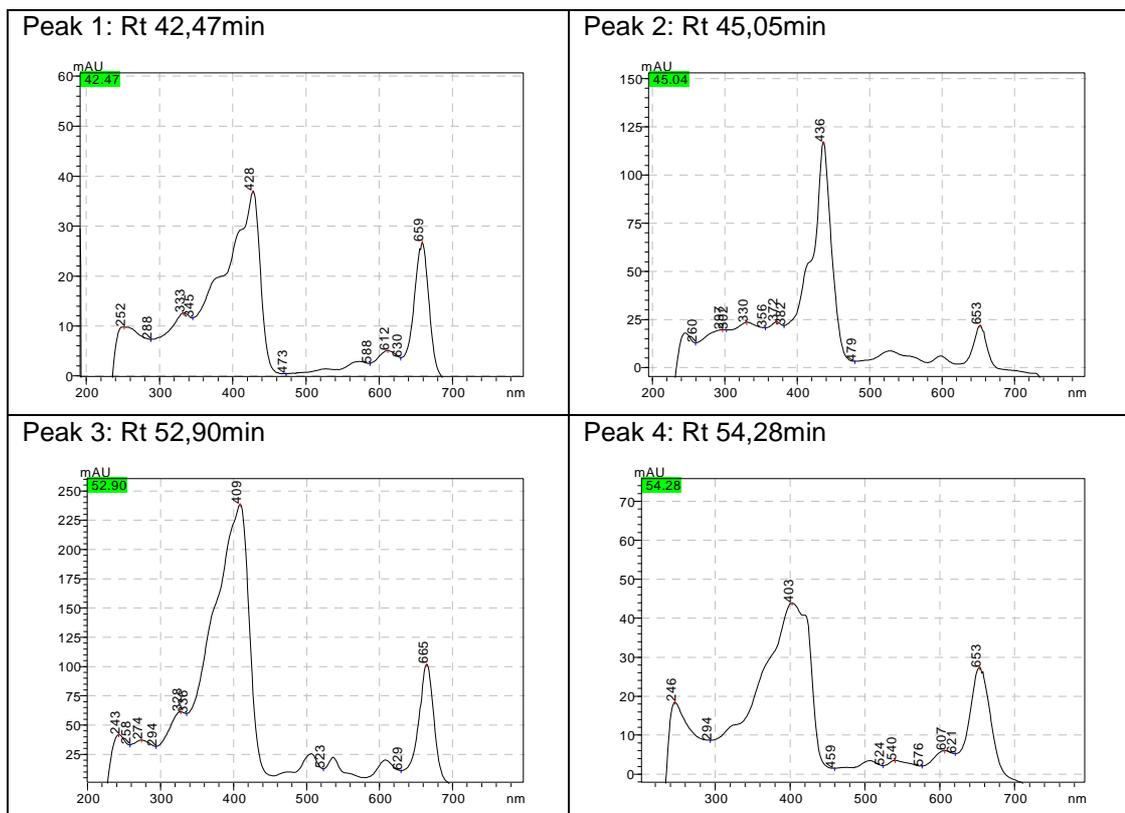
HPLC-Bedingungen 1 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm



Das Muster der unter 10 Minuten und zwischen 30 und 40 Minuten eluierten Substanzen stimmte weitgehend mit jenem der PE-Fraktion (vgl. Abbildung 26, S. 40, bzw. Abbildung 28, S. 41) überein. Das Absorptionsmaximum lag bei λ 240nm und ließ wiederum auf Fette und Wachse schließen.

Im Unterschied zur PE-Fraktion konnten weitere Hauptkomponenten mit Retentionszeiten zwischen 40 und 60 Minuten detektiert werden.

Abbildung 30: ausgewählte UV-Spektren der Komponenten mit Rt von 40 bis 60min



Die Spektren der Peaks (vgl. Abbildung 30) zeigten mehrere Maxima im sichtbaren Bereich:

Peak 1 bei 428nm bzw. 659nm, Peak 2 bei 436nm und 653nm. Peak 1 konnte als Chlorophyll a identifiziert werden, dessen charakteristische Absorptionsmaxima bei λ 430nm und 662nm in methanolischer Lösung liegen [19]. Peak 2 dürfte strukturell sehr ähnlich sein.

Bei den Peaks 3 und 4 mit Retentionszeiten über 50 Minuten war ein hypsochromer Shift des ersten Absorptionsmaximums zu 409nm zu beobachten.

Die Spektren stimmten qualitativ weitgehend mit den apolaren Komponenten der ButOH-Fraktion überein (vgl. Abbildung 24, S. 38), die den Pheophytinen zugeordnet worden waren [20].

Auf eine semiquantitative Chlorophyllabtrennung für die Chloroformfraktion wurde aufgrund der geringen Menge an Extrakt verzichtet. Die HPLC-Analysen bzw. die intensivgrüne Färbung ließen auf einen relativ hohen Anteil an Chlorophyll bzw. verwandten Komponenten schließen.

Im Rahmen der HPLC-Analytik konnten keine Substanzen mit charakteristischen Absorptionsmaxima ([4], [21]) von Harman-Alkaloiden detektiert werden.

4.5 Versuch der Isolierung von Substanz X:

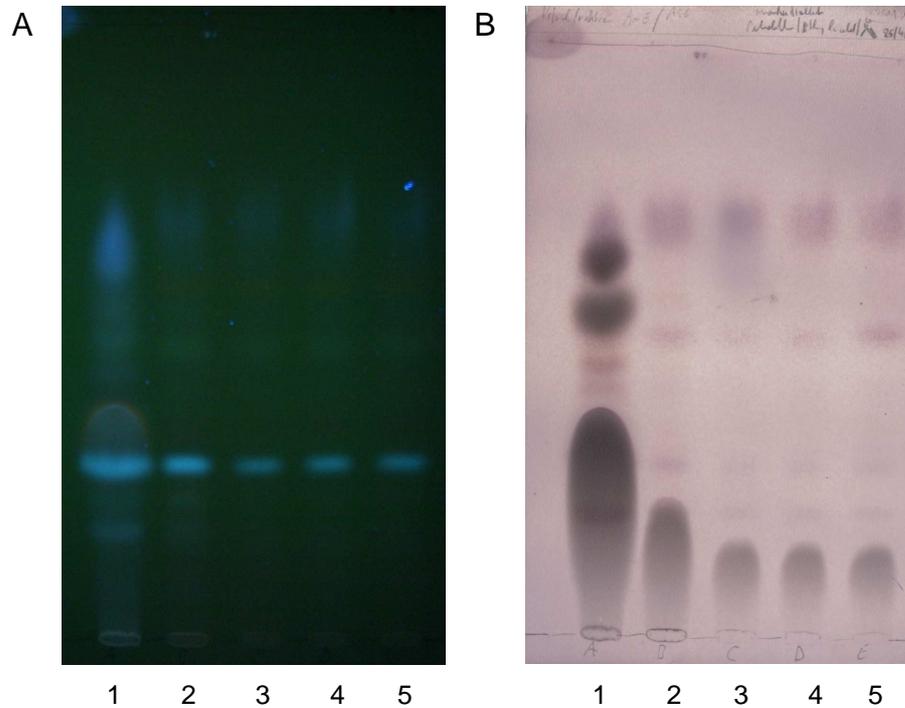
Nachdem in vorangegangenen Arbeiten [22] blaufluoreszierende Komponenten mit Rf-Werten des Benzoflavons X aus dem Passiflora-Trockenextrakt KY 705 P mit PE angereichert werden konnten, erfolgte ein von [7] abweichender Vorversuch zur Isolierung mittels ASE.

5g des Extraktes KY 705 P der Ch. 08017533 wurden mittels ASE unter den Bedingungen FRAKTIONIERUNG 1 (vgl. S. 6) mit PE aufgearbeitet und die Auszüge mittels DC bzw. HPLC-DAD analysiert.

Für die DC wurden die ASE-Fractionen 1-5 (vgl. gleichlautende Bahnen in Abbildung 31, vgl. S. 45) schonend zur Trockene eingedampft. Die Extrakte waren von wachsiger Konsistenz und gelblich-weiß gefärbt.

Im Vorversuch konnten 12mg PE-Fraktion hergestellt werden, wobei der Hauptteil aus den Fractionen 1 bis 3 erhalten wurde.

Abbildung 31: DC der PE-Extrakte des Vorversuchs zur Isolierung von Benzoflavin X
Probenlösung: 15µL (10mg Fraktion/ml in CHCl₃)
DC-System 1 (vgl. S.; 8)
A) Unbehandelte Folie, Detektion bei UV_{366nm}
B) Nach ASR-Behandlung Detektion bei Tageslicht



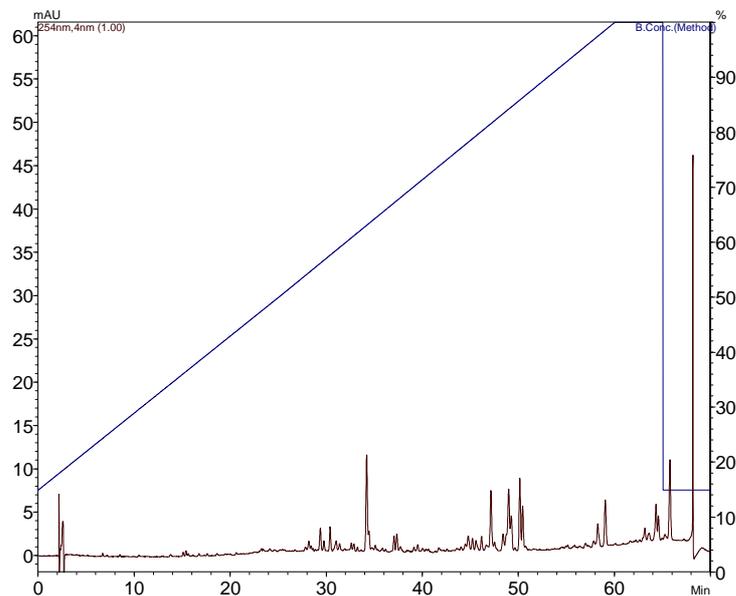
Auf der DC waren unter UV_{366nm} zwei blafluoreszierende Banden mit R_f-Werten von 0,30 bzw. 0,65 detektierbar. Verglichen mit der mittels ASE nach [7] gewonnenen PE-Fraktion (vgl. Bahn 5 (DC-System 1) in Abbildung 5, S. 14) zeigte sich, dass ohne vorherige ButOH-Extraktion unterhalb der blau fluoreszierenden Bande bei R_f ca. 0,30 in Abbildung 31 keine rot fluoreszierenden Begleitstoffe mehr enthalten waren.

Diese Beobachtung konnte mittels HPLC-DAD bestätigt werden. Im Chromatogramm von ASE-Fraktion 1 dieses Vorversuchs wurden keine polaren Komponenten mit Retentionszeiten unter 10 Minuten detektiert.

Abbildung 32: HPLC-Trennung von Fraktion 1 des ASE-Vorversuches

Probenlösung: 10 μ L (5mg Fraktion/ml)

HPLC-Bedingungen 1 (vgl. S. 9); Detektion bei 254nm

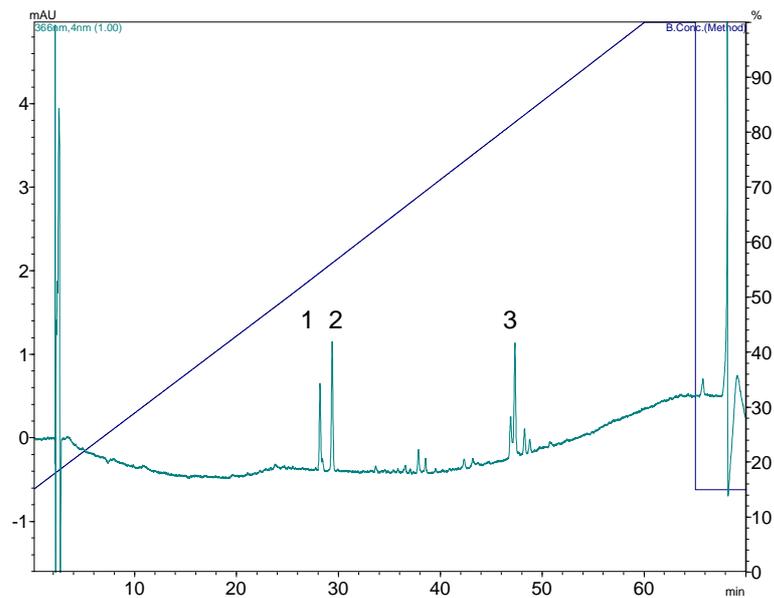


Da in der DC unter UV_{366nm} (vgl. Abbildung 31, S. 45) blau fluoreszierende Banden mit einem Rf-Wert von 0,30 detektiert worden waren, wurde das HPLC-Chromatogramm aus Abbildung 32 auch bei dieser Wellenlänge analysiert.

Abbildung 33: HPLC-Trennung von Fraktion 1 des ASE-Vorversuches

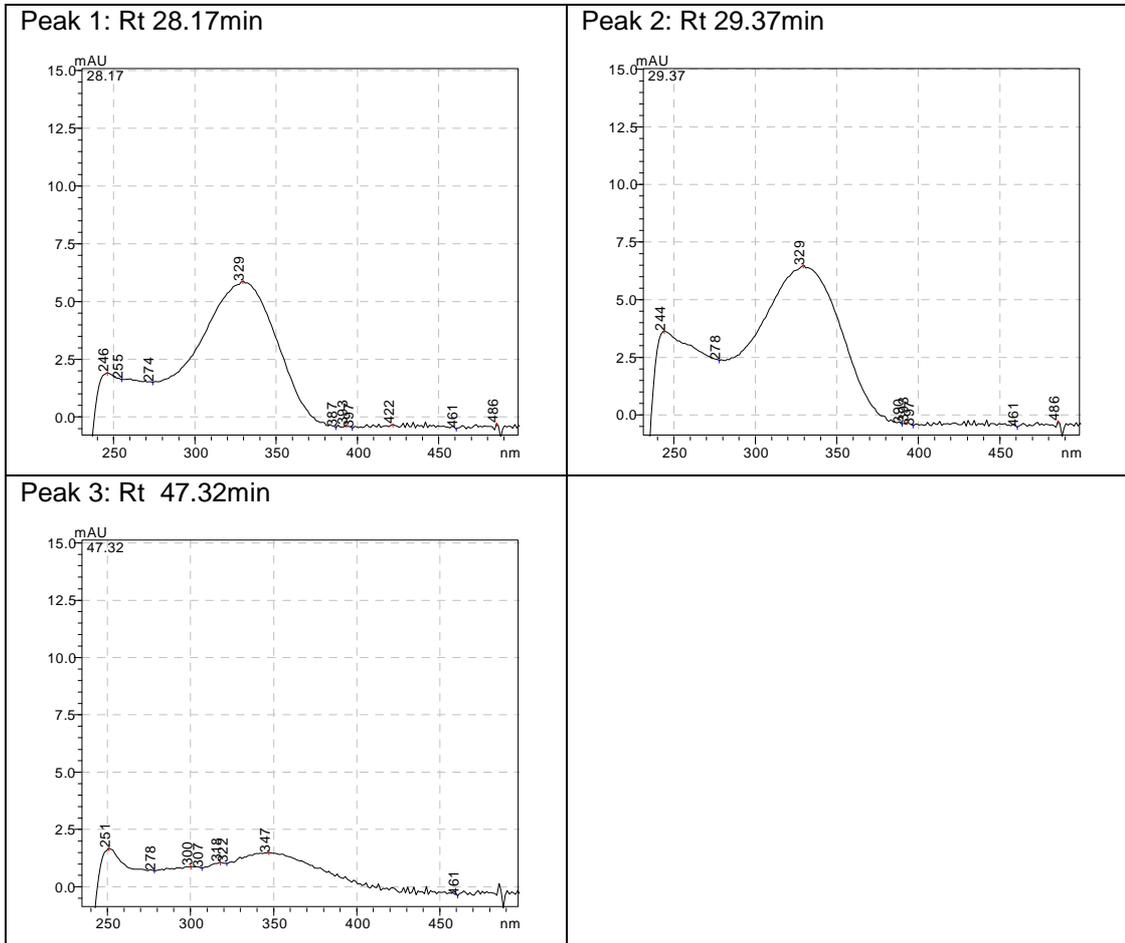
Probenlösung: 10 μ L (5mg Fraktion/ml)

HPLC-Bedingungen 1 (vgl. S. 9); Detektion bei 366nm



Es waren zwei Komponenten mit Rt um 28 Minuten detektierbar, deren DAD-Spektren weitgehend übereinstimmten. Peak 3 zeigte ein Maximum bei 347nm.

Abbildung 34: ausgewählte UV-Spektren von Fraktion 1 des ASE-Vorversuches



Im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass die blau fluoreszierenden Banden mit der ASE unter den Bedingungen FRAKTIONIERUNG 1 (vgl. S. 6) mit PE ohne vorherige ButOH-Extraktion angereichert wurden, ohne dass störende polare Substanzen mit Rt. unter 10 Minuten mitextrahiert worden waren.

Daher wurde entschieden, den Extrakt KY 705 P der Ch. 08017533 mittels ASE unter Verwendung von PE weiter aufzuarbeiten. Um die Extraktionszeit, den Extraktumsatz bzw. die Ausbeuten zu optimieren, sollte eine neue Fraktionierungsmethode unter Verwendung von 33ml ASE-Extraktionszellen entwickelt werden.

4.5.1 Anreicherung von Benzoflavon X:

Unter den Bedingungen FRAKTIONIERUNG 2 (vgl. S. 6) konnten pro Aufarbeitung ca. 12,5g von KY 705 P mit PE eluiert werden. Die Ausbeuten wurden durch eine Erhöhung der Extraktionszeit bzw. des Spülvolumens (Flush) gesteigert. Es wurde in 3 Zyklen extrahiert, da im Vorversuch (vgl. Abbildung 31, S. 45) mit den Fraktionen 1 bis 3 die Hauptmenge an Extrakt erhalten worden war.

Insgesamt wurden 610g Extrakt KY 705 P der Ch. 08017533 (entsprechend ca. 2500g Droge) aufgearbeitet. Die erhaltenen Lösungen wurden bei 40°C unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft und vereinigt.

Auf diese Weise konnten 1,22g PE-Fraktion hergestellt werden.

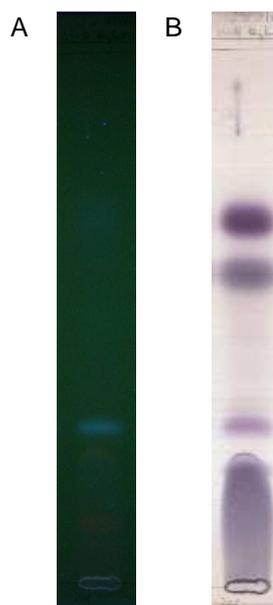
Abbildung 35: DC der PE-Fraktion

Probenlösung: 30µL (10mg Fraktion/ml in MeOH)

DC Bedingungen 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) nach ASR-Behandlung im sichtbaren Bereich



Unter UV_{366nm} konnte im unteren Drittel der DC bei Rf. ca. 0,29 eine türkisblau fluoreszierende Zone detektiert werden.

Unterhalb dieser beschriebenen Bande zeigte sich bei Rf 0,29 nach Detektion mit ASR eine violett gefärbte Bande mit starkem Tailing, die auf Wachse schließen ließ.

Mittels ASR konnten weiters eine grauviolette Bande im Bereich von Rf 0,57 bzw. eine dunkelviolettfärbte Zone bei Rf 0,67 detektiert werden.

4.5.2 Aufarbeitung mit Säulenchromatographie:

Wie in Abbildung 35 dargestellt, handelte es sich bei der durch ASE-Extraktion isolierten PE-Fraktion um ein Gemisch mehrerer apolarer Substanzen. Daher sollte versucht werden, dieses Extrakt mithilfe der Säulenchromatographie weiter zu fraktionieren. Ziel war es, die blau fluoreszierenden Komponenten rein darzustellen und die Strukturen mittels NMR aufzuklären.

4.5.2.1 SC 1 - Aufarbeitung der Petrolfraktion:

Als stationäre Phase wurde Sephadex[®]-LH-20 gewählt, weil es sich gut eignet, phenolische Komponenten anzureichern. Als mobile Phase wurde Ethylacetat verwendet [22].

1,20g Petrolfraktion wurden im Fließmittel gelöst und unter den Bedingungen SC 1 (vgl. S. 11) aufgearbeitet. Es wurden 120 Fraktionen zu je ca. 3 ml gesammelt. Die Fraktionen 10 – 24 waren intensiv grüngelb gefärbt. Die Farbtintensität ließ nach, ab Fraktion 33 waren die Eluate farblos. Für die DC-Untersuchung wurden die Fraktionen eingengt und im DC-System 1 (vgl. S. 8) analysiert.

Die Einzelfraktionen wurden entsprechend ihrer Zusammensetzung zu drei Sammelfraktionen vereinigt.

Tabelle 12: Sammelfractionen aus SC 1

Fraktion	Fusioniert aus	Ausbeute	Konsistenz
SF 1	F10 – F13	190,1mg	ölig
SF 2	F14 – F18	130,0mg	ölig
SF 3	F19 – F35	705,2mg	wachsartig
	Gesamtmenge	1026,3mg	

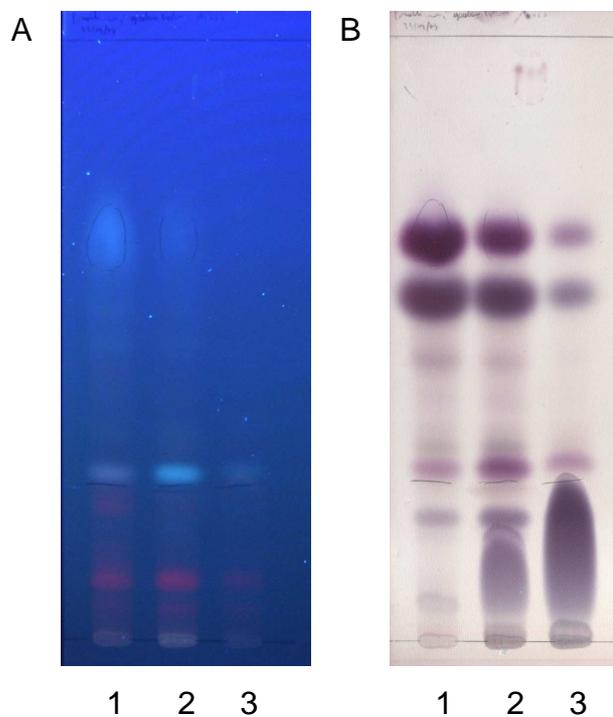
Abbildung 36: DC der Sammelfractionen von SC 1

Probenlösung: 25 μ L (10mg Fraktion/ml in Ethylacetat)

DC-System 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Nach ASR-Behandlung; Detektion bei Tageslicht



Auf der DC (Abbildung 36, Folie A) konnte die Trennung der zwei fluoreszierenden Komponenten gezeigt werden:

SF 1 zeigte unter UV_{366nm} einen blau fluoreszierenden Fleck bei Rf 0,68. Als Hauptkomponente in SF 2 war unter UV_{366nm} die fluoreszierende Bande bei Rf 0,28 detektierbar.

Nach ASR-Behandlung waren in allen drei Sammelfractionen die violett gefärbten Banden mit Rf 0,58 bzw. 0.66 sichtbar.

Die wachsartigen Substanzen konnten zu einem hohen Anteil in SF 3 abgetrennt werden, wie die Bande mit starkem Tailing auf Bahn 3 zeigte.

Daher wurde entschieden, SF 1 und SF 2 weiter aufzuarbeiten.

4.5.2.2 SC 2 – Aufarbeitung von SF 1:

Es sollte versucht werden, die unter UV_{366nm} blau fluoreszierende Substanz bei Rf 0,68 (vgl. Abbildung 36, S. 50) zu isolieren.

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 gewählt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus PE-Ethylacetat-Aceton (13+2+1) verwendet [22]. SF 1 wurde auf KG 60 aufgezogen und unter den Bedingungen SC 2 (vgl. S. 11) fraktioniert.

Es wurden 70 Fraktionen mit je ca. 3ml gesammelt und mittels DC (Abbildung 37) analysiert. Als Referenzsubstanzen wurden die Phytosterole Stigmasterol und β -Sitosterol, welches auch in der von Dhawan isolierten Fraktion enthalten [7] war, verwendet.

Abbildung 37: DC der Fraktionen von SC 2

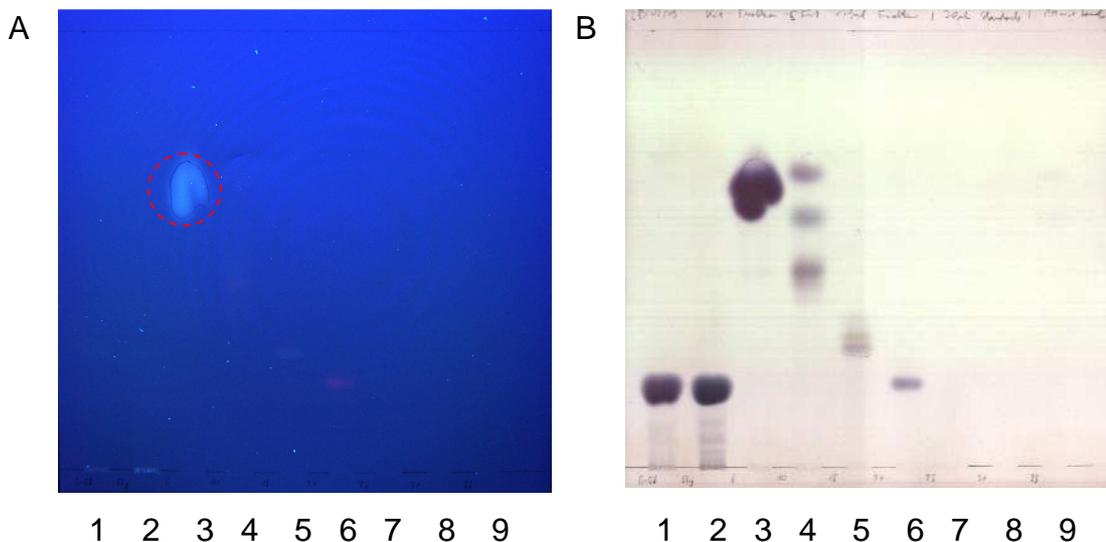
Probenlösungen: je 10 μ L Fraktion aus SC 2

Referenzen: 30 μ L (10mg /ml in CHCl₃)

DC-System 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Nach ASR-Behandlung; Detektion bei Tageslicht



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	β -Sitosterol	4	Fraktion 10	7	Fraktion 25
2	Stigmasterol	5	Fraktion 15	8	Fraktion 30
3	Fraktion 6	6	Fraktion 20	9	Fraktion 35

Auf Bahn 3 (F6) zeigte sich unter UV_{366nm} die blau fluoreszierende Substanz bei R_f ca. 0,65. Nach Behandlung mit ASR war an dieser Stelle ein intensiv violett gefärbter Fleck zu erkennen, der größer als der fluoreszierende Substanzfleck war. Dies deutete auf das Vorliegen eines Substanzgemisches hin.

Die Vergleichssubstanzen wurden mittels ASR bei einem R_f -Wert von 0,18 detektiert. Nachdem die unbekannte Substanz deutlich apolarer als die aufgetragenen Sterole war, wurden strukturelle Ähnlichkeiten mit Sterolen ausgeschlossen.

Fraktion 10 enthielt keine unter UV_{366nm} fluoreszierenden Komponenten. Mit ASR konnten drei Banden mit R_f -Werten von 0,44, 0,56 bzw. 0,67 detektiert werden. Die Fraktionen 15 und 20 enthielten Komponenten, die sich chromatographisch ähnlich zu den Referenzsubstanzen verhielten.

Die Fraktionen wurden schonend zur Trockene eingedampft und das Gewicht bestimmt.

Tabelle 13: Ausbeuten der Einzelfraktionen von SC 2

Fraktion	Ausbeute
F1- F5	1,9mg
F6	54,8mg
F7	24,0mg
F8	22,6mg
F9	7,0mg
F10- F25	15,0mg
Gesamtmenge	125,4mg

Die Fraktionen 6 – 11 stellten quantitativ die Hauptfraktionen dar und wurden mittels DC analysiert.

Abbildung 38: DC der Fraktionen 6 – 11 von SC2

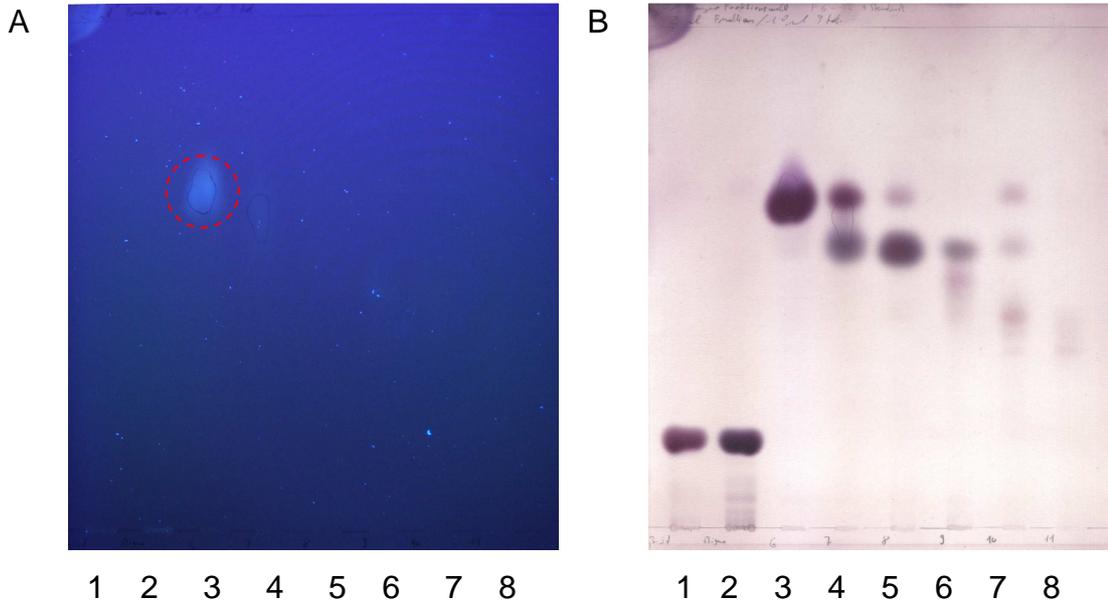
Probenlösung: je 2µL Fraktion aus SC 2

Referenzen: 10µL (10mg /ml in CHCl₃)

DC System 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Nach ASR-Behandlung; Detektion bei Tageslicht



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	β-Sitosterol	4	Fraktion 7	7	Fraktion 10
2	Stigmasterin	5	Fraktion 8	8	Fraktion 11
3	Fraktion 6	6	Fraktion 9		

Fraktion F6 zeigte unter UV_{366nm} eine blau fluoreszierende Bande mit einem Rf-Wert von 0,67, Fraktion F7 eine schwach fluoreszierende Komponente mit Rf 0,62 (vgl. Abbildung 38). Die Rf-Werte deuteten auf die von Dhawan beschriebenen Substanzen [7] (0,65 bzw. 0,69) hin.

Mit ASR wurde in Fraktion 6 ein intensiver violetter Fleck genau auf Höhe der fluoreszierenden Zone detektiert. In Fraktion 7 waren nach ASR-Behandlung zwei Banden detektierbar (Rf-Werte 0,56 bzw. 0,66).

Die Intensität der Zonen wies auf das Vorliegen eines Substanzgemisches in Fraktion 6 hin.

Um konzentrationsabhängige Effekte auszuschließen, wurde ein Aliquot von F6 im DC-System 1 entwickelt und zur besseren Beurteilung wie in Abbildung 39 dargestellt, nur zur Hälfte mit ASR besprüht und erneut unter UV_{366nm} analysiert.

Abbildung 39: DC-Untersuchung von F6 von SC 2

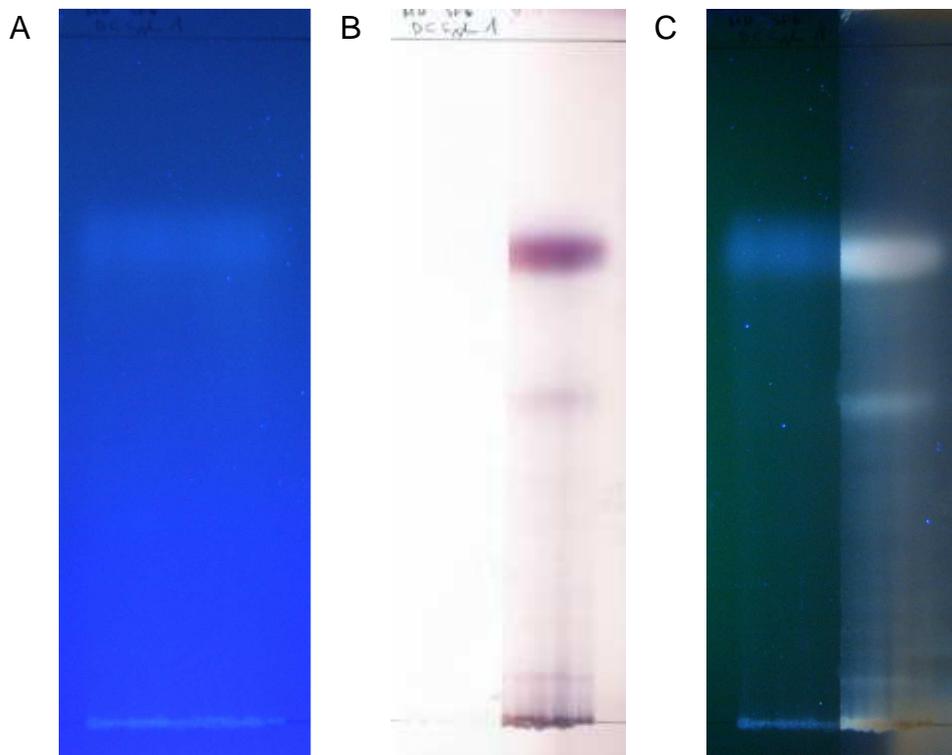
Probenlösung: 120 μ L (5mg F6/ml in $CHCl_3$)

DC-System 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Behandlung mit ASR, Detektion bei Tageslicht

C) ASR-behandelte Platte unter UV_{366nm}



Wie in Abbildung 39 (B und C) erkennbar, handelte es sich bei F6 um ein Mehrkomponentengemisch.

Unter UV_{366nm} war eine fluoreszierende Bande mit R_f ca. 0,70 detektierbar. Nach Behandlung mit ASR waren drei Banden bei R_f 0,06, bei R_f 0,47 bzw. 0,68 zu erkennen. Der fluoreszierende Fleck im oberen Drittel jedoch erschien chromatographisch einheitlich. Aufgrund der Ausbeute von 54,8mg wurde entschieden, F6 weiter zu fraktionieren.

4.5.2.3 SC 3 - Aufarbeitung von F6 (aus SC 2)

Als stationäre Phase wurde KG 60 gewählt. Als mobile Phase wurde ein PE-Toluol-Gemisch (13+4) gewählt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden entsprechende Sammelfractionen gebildet.

Abbildung 40: DC der Sammelfractionen von SC 3

Probenlösung: 5µL (10mg SF/ml)

DC-System 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Nach ASR-Behandlung; Detektion bei Tageslicht

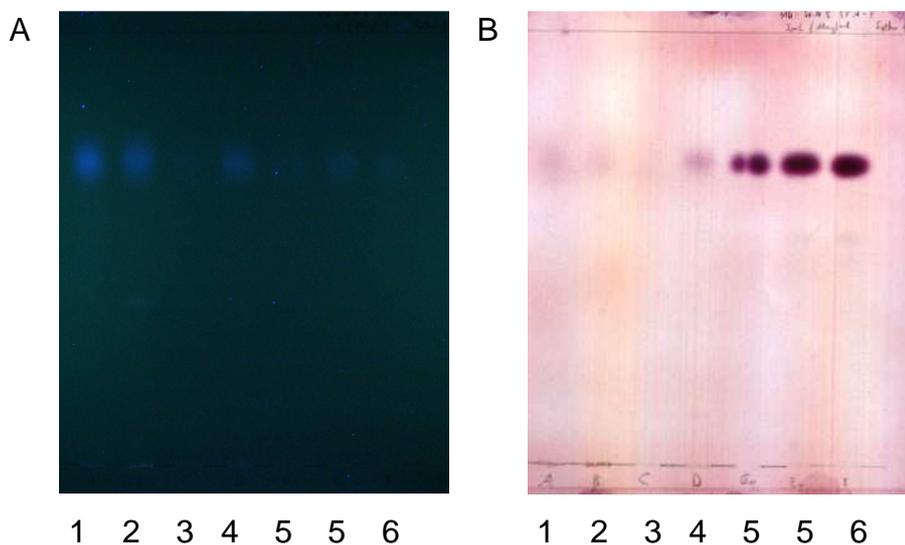


Tabelle 14: Sammelfractionen von SC 3

Bahn	SF	Fraktionen	Ausbeute
1	A	10 - 17	1,35mg
2	B	18 - 28	1,39mg
3	C	29 - 30	0,62mg
4	D	31 - 37	1,03mg
5	E	38 - 43	1,98mg
6	F	44 - 53	3,50mg
		Nachlauf	29,83mg

In den Sammelfractionen SF A und SF B konnte die blaufluoreszierende Substanz mit einem R_f-Wert wie das Benzoflavon X angereichert werden.

In allen weiteren Fraktionen war diese Bande durch eine Komponente, die nach Detektion mit ASR rotviolett gefärbt war, überlagert.

Allerdings war es nicht gelungen, die Substanz in chromatographisch einheitlicher Form aus SF 1 (vgl. S. 49) zu isolieren. Die Sammelfraktionen aus SC 3 lieferten minimale Ausbeuten und stellten Substanzgemische dar, da in der DC auf der Startzone noch deutliche Anteile von Begleitsubstanzen sichtbar waren. Wegen der geringen Mengen war eine weitere Aufreinigung für eine NMR-Strukturaufklärung nicht möglich.

4.5.2.4 SC 4 – Aufarbeitung von SF 2:

Zielsetzung war die Isolierung und Strukturaufklärung der blau fluoreszierenden Substanz mit Rf 0,29 in SF 2 von SC 1. Die Fraktion wurde auf KG 60 aufgezogen und mittels SC 4 aufgetrennt. Es wurden 90 Fraktionen à ca. 3,5ml gesammelt und mittels DC (Abbildung 41) analysiert.

Abbildung 41: DC der Fraktionen von SC 4

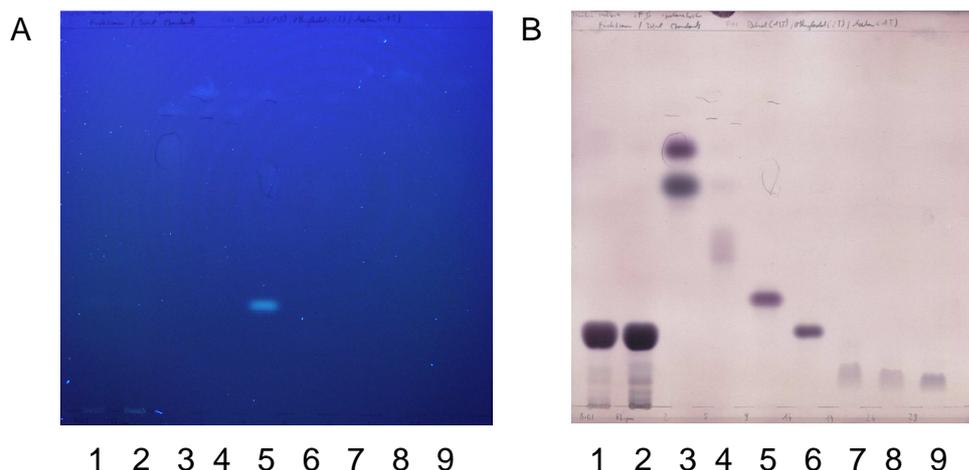
Probenlösung: 15µL Fraktion aus SC 4

Referenzen: 10µL (10mg /ml in CHCl₃)

DC System 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Nach ASR-Behandlung; Detektion bei Tageslicht



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	β-Sitosterol	4	Fraktion 5	7	Fraktion 18
2	Stigmasterin	5	Fraktion 9 (10µL)	8	Fraktion 23
3	Fraktion 2 (10µL)	6	Fraktion 13	9	Fraktion 28

Unter UV_{366nm} war in Fraktion 9 bei R_f 0,29 eine intensiv fluoreszierende Zone detektierbar. Da nur diese Bande mit ASR violett angefärbt wurde, deutete dies auf das Vorliegen einer chromatographisch einheitlichen Substanz hin.

Fraktion 2 enthielt eine unter UV_{366nm} schwach fluoreszierende Zone. Mit ASR waren zwei Zonen detektierbar, die sich chromatographisch (R_f -Werte 0,59 bzw. 0,69) ähnlich wie die Komponenten in F7 von SC 2 (vgl. S. 53) verhielten.

In Fraktion 13 eluierte eine Komponente, die im R_f - Wert und der Färbung nach der Detektion den Referenzsubstanzen ähnelte.

Mittels DC sollte analysiert werden, ob die oben beschriebene Substanz noch in anderen Fraktionen enthalten war.

Abbildung 42: DC der Fraktionen F6 – F12 von SC 4

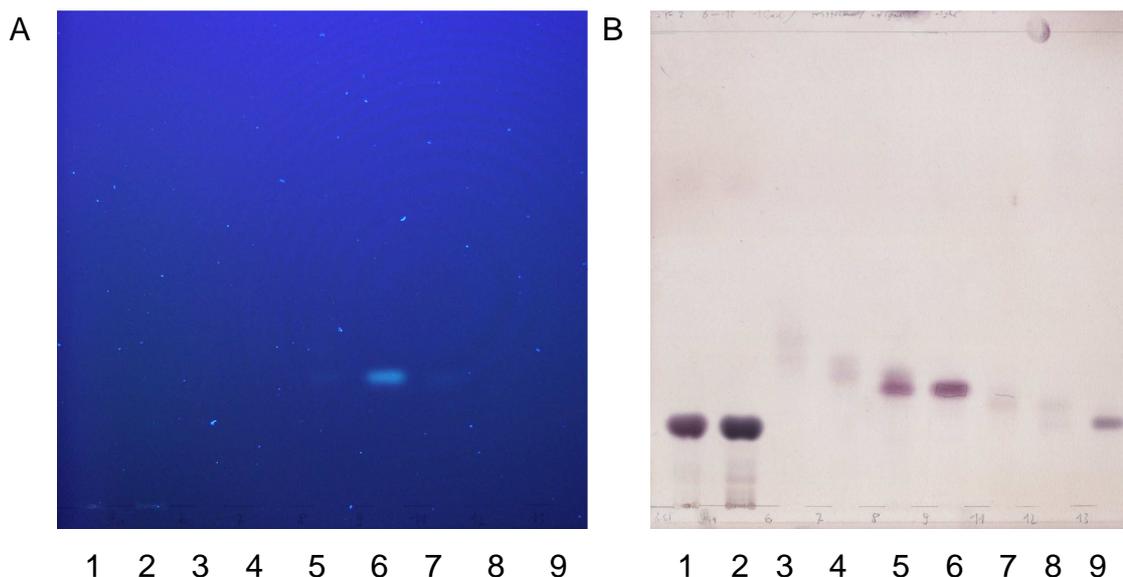
Probenlösung: je 10 μ L Fraktion aus SC 4

Referenzen: 10 μ L (10mg/ml in $CHCl_3$)

DC System 1 (vgl. S. 8)

A) Detektion unter UV_{366nm}

B) Nach ASR-Behandlung; Detektion bei Tageslicht



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	β -Sitosterol	4	Fraktion 7	7	Fraktion 10
2	Stigmasterin	5	Fraktion 8	8	Fraktion 11
3	Fraktion 6	6	Fraktion 9	9	Fraktion 12

Unter UV_{366nm} konnten in den Fraktionen F8 und F10 schwach fluoreszierende Zonen mit identen R_f -Werten (R_f 0,28) wie F9 detektiert werden. Mit ASR konnten Unterschiede aufgezeigt werden: Bei Fraktion F8 wurde eine weitere violett gefärbte Zone oberhalb der gesuchten Bande detektiert. Fraktion F10 zeigte nur eine ganz schwache Färbung, etwas unterhalb der für Bande (R_f 0,28) in F9.

Daher wurde entschieden, nur die chromatographisch einheitlich erscheinende Fraktion F9 (5,12mg) mittels NMR zu analysieren. Die anderen Fraktionen wurden zu Sammelfraktionen vereinigt.

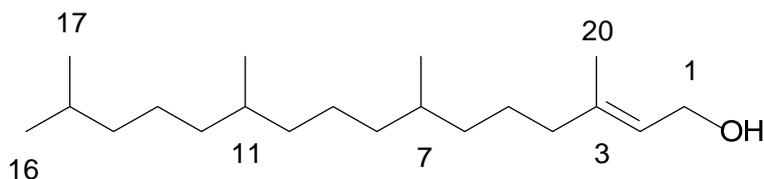
Tabelle 15: Ausbeuten der Fraktionen von SF2

Fraktion	Ausbeute
F 1-5	66,55mg
F 6-8	6,41mg
F9	5,12mg
F10 -25	11,29mg
Summe	89,37mg

4.6 NMR-Strukturaufklärung von MHPSF6 (=Phytol):

Fraktion F9 (=MHPSF6) wurde mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Obwohl die Fraktion chromatographisch einheitlich erschienen war, handelte es sich um ein Substanzgemisch, wobei ein Isomer des Diterpenalkohols Phytol als Hauptkomponente identifiziert werden konnte.

Abbildung 43: Strukturformel von Phytol



Die Verschiebung der Signale (vgl. Tabelle 16, S. 59 bzw. Anhang) im ^{13}C -NMR stimmte sehr gut mit publizierten Daten [23], [24] überein.

Phytol war von [25] als Komponente des ätherischen Öls von *P. incarnata* beschrieben worden.

Tabelle 16: ^{13}C - NMR- Messdaten für Phytol

C-Atom	$\delta^\circ\text{C}$	[23]	[24]	C-Atom	$\delta^\circ\text{C}$	[23]	[24]
C_1	59.43	59.0	59,44	C_{11}	32.78	32.7	32,80
C_2	123.03	123.3	123,06	C_{12}	37.34	37.2	37,36
C_3	140.35	139.4	140,36	C_{13}	24.78	24.7	24,80
C_4	39.86	39.8	39,88	C_{14}	39.35	39.3	39,37
C_5	25.12	25.1	25,15	C_{15}	27.97	27.9	27,98
C_6	36.64	36.6	36,66	C_{16}	22.71	22.6	22,72
C_7	32.68	32.6	32,69	C_{17}	22.62	16.0	22,63
C_8	37.27	37.3	37,29	C_{18}	19.74	19.6	19,75
C_9	24.46	24.4	24,48	C_{19}	19.71	19.6	19,71
C_{10}	37.41	37.3	37,43	C_{20}	16.17	22.6	16,18

5 ZUSAMMENFASSUNG

Passionsblumenkraut wird in der Phytotherapie als Sedativum und Anxiolytikum angewandt. Viele pharmakologische Arbeiten mit kontroversen Angaben hinsichtlich des wirksamen Prinzips wurden bislang publiziert.

Eine indische Arbeitsgruppe veröffentlichte die aktivitätsgeleitete Isolierung eines trisubstituierten Benzoflavons als Wirkkomponente für *P. incarnata*, das an Mäusen signifikante anxiolytischen Wirkungen gezeigt hatte [7].

Ziel dieser Arbeit war die Fraktionierung eines kommerziellen Trockenextraktes *Passiflorae Hb.* (KY 705 P), das im Tierversuch ebenfalls anxiolytische Aktivität gezeigt hatte, nach der publizierten Methode [7].

Mittels ASE wurde das Extrakt in vier unterschiedlich polare Fraktionen (Petrolether, Chloroform, Butanol, "Restextrakt") aufgetrennt. Mittels DC und HPLC-DAD konnten in der Butanolfraktion und dem "Restextrakt" Flavonoide nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Butanolfraktion enthielt außerdem ca. 65% Chlorophyll. In der Chloroformfraktion waren ebenfalls Chlorophylle detektierbar, die Petroletherfraktion enthielt offensichtlich überwiegend wachsartige Komponenten.

Bei den Versuchen zur Isolierung des BZF konnten Komponenten angereichert werden, die sich in der DC ähnlich der gesuchten Substanz verhielten.

Eine mittels ASE gewonnene und durch Säulenchromatographie weiter aufgereinigte Petroletherfraktion führte zur Isolierung einer unter UV_{366nm} blau fluoreszierenden Substanz mit einem geringeren R_f-Wert als BZF. Diese Komponente wurde mittels NMR-Spektroskopie als Phytolisomer identifiziert.

Eine weitere Fraktion enthielt eine intensiv blau fluoreszierende Substanz mit einem Rf-Wert, der der Literaturangabe entsprach. Aufgrund der minimalen Ausbeuten von 1,35mg einer chromatographisch nicht völlig einheitlichen Substanz war eine Strukturklärung nicht möglich.

Da für die Isolierung dieser Menge 600g Trockenextrakt (entsprechend ca. 2500g Droge) fraktioniert worden waren und auch in anderen Arbeiten Versuche, die Substanz aus Drogenmaterial verschiedenen Ursprungs zu isolieren, erfolglos geblieben waren, bestätigten diese Untersuchungen, dass BZF offensichtlich nicht für die Wirkung von *Passiflorae Hb.* und daraus hergestellten Zubereitungen verantwortlich gemacht werden kann.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: <i>P. incarnata</i> [1]	2
Abbildung 2: Strukturen der Flavonoide in <i>P. incarnata</i> (modifiziert nach [6])	3
Abbildung 3: Grundkörper des Benzoflavons [5].....	4
Abbildung 4: DC-Untersuchung der Fraktionen des Vorversuches	13
Abbildung 5: Qualitativer DC- Vergleich der Fraktionen nach US- und ASE-Extraktion.....	14
Abbildung 6: DC-Vergleich fünfmalige Extraktion mit ASE bzw. Ultraschall.....	17
Abbildung 7: DC der Fraktionen für die Tierversuche	18
Abbildung 8: HPLC-Trennung der PE-Fraktion	20
Abbildung 9: HPLC-Trennung der Chloroformfraktion	21
Abbildung 10: HPLC-Trennung der ButOH-Fraktion.....	22
Abbildung 11: HPLC-Trennung der apolaren Substanzen der ButOH-Fraktion	22
Abbildung 12: HPLC-Trennung der polaren Komponenten der ButOH- Fraktion.....	23
Abbildung 13: HPLC-Trennung des Restextrakts	24
Abbildung 14: HPLC-Untersuchung auf Chargenkonformität	25
Abbildung 15: HPLC-Trennung des Restextraktes	27
Abbildung 16: UV-Spektren der Flavonoide des Restextraktes (zu Abbildung 15, S. 27)	28
Abbildung 17: HPLC-Trennung der Flavonoide der ButOH-Fraktion.....	29
Abbildung 18: HPLC von Eichlösung 1	31
Abbildung 19: Eichgerade für Isoorientin	32
Abbildung 20: Eichgerade für Isovitexin	33
Abbildung 21: HPLC der Flavonoide im Restextrakt (Ch. 08000538).....	34
Abbildung 22: HPLC-Trennung der apolaren Komponenten der ButOH-Fraktion.....	36
Abbildung 23: Ausgewählte UV-Spektren apolarer Komponenten der ButOH-Fraktion mit $R_t < 20\text{min}$	37
Abbildung 24: Ausgewählte UV-Spektren apolarer Komponenten der ButOH-Fraktion mit $R_t > 30\text{min}$	38
Abbildung 25: DC-Untersuchung der Fraktionen nach der "Chlorophyllabtrennung"	39
Abbildung 26: HPLC-Trennung der PE-Fraktion	40
Abbildung 27: UV-Spektren der polaren Komponenten mit $R_t < 10\text{min}$	40
Abbildung 28: ausgewählte UV-Spektren der apolaren Komponenten mit $R_t > 32\text{ Minuten}$..	41
Abbildung 29: HPLC-Trennung der Chloroformfraktion	42
Abbildung 30: ausgewählte UV-Spektren der Komponenten mit R_t von 40 bis 60min.....	43
Abbildung 31: DC der PE-Extrakte des Vorversuchs zur Isolierung von Benzoflavon X.....	45
Abbildung 32: HPLC-Trennung von Fraktion 1 des ASE-Vorversuches.....	46
Abbildung 33: HPLC-Trennung von Fraktion 1 des ASE-Vorversuches.....	46
Abbildung 34: ausgewählte UV-Spektren von Fraktion 1 des ASE-Vorversuches	47

Abbildung 35: DC der PE-Fraktion.....	48
Abbildung 36: DC der Sammelfractionen von SC 1.....	50
Abbildung 37: DC der Fraktionen von SC 2.....	51
Abbildung 38: DC der Fraktionen 6 – 11 von SC2.....	53
Abbildung 39: DC-Untersuchung von F6 von SC 2.....	54
Abbildung 40: DC der Sammelfractionen von SC 3.....	55
Abbildung 41: DC der Fraktionen von SC 4.....	56
Abbildung 42: DC der Fraktionen F6 – F12 von SC 4.....	57
Abbildung 43: Strukturformel von Phytol.....	59

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ausbeuten des Vorversuches aus 5g Extrakt.....	12
Tabelle 2: Ausbeuten des ASE- Vorversuches aus 5g Extrakt.....	14
Tabelle 3: Vergleich der Ausbeuten der Vorversuche.....	16
Tabelle 4: Ausbeuten der Extrakte für die Tierversuche in mg.....	19
Tabelle 5: Retentionszeiten der Flavonoide des Restextraktes (zu Abbildung 15)...	27
Tabelle 6: Retentionszeiten der Flav. der ButOH-Fraktion (zu Abbildung 17, S. 29)	30
Tabelle 7: Zusammensetzung der Eichlösungen	30
Tabelle 8: Korrekturfaktor für Isoorientin.....	31
Tabelle 9: Korrekturfaktor für Isovitexin	32
Tabelle 10: Berechnete Korrekturfaktoren für die einzelnen Flavonoide	34
Tabelle 11: Ergebnisse der Flavonoidquantifizierung	35
Tabelle 12: Sammelfractionen aus SC 1	50
Tabelle 13: Ausbeuten der Einzelfractionen von SC 2.....	52
Tabelle 14: Sammelfractionen von SC 3	55
Tabelle 15: Ausbeuten der Fractionen von SF2.....	58
Tabelle 16: 13C- NMR- Messdaten für Phytol	59

8 LITERATURVERZEICHNIS

[1]	www.swsbm.com/images/Walcott/Passiflora_incarnata-2.jpg ; besucht am 17.10.2009.
[2]	<i>Krenn L</i> : Die Passionsblume (<i>Passiflora incarnata</i> L.) – ein bewährtes pflanzliches Sedativum. <i>WMW</i> 2002; 152: 404-406
[3]	<i>Pharmacopoea Europaea</i> , 6. Auflage, Grundwerk 2008.
[4]	<i>Rehwald A, Meier B, Sticher O</i> : Harmanalkaloide in <i>Passiflorae herba</i> . <i>Z Phytoth</i> 1995; 16 (2): 4– 5.
[5]	<i>Dhawan K, Dhawan, S, Sharma, A</i> : <i>Passiflora</i> : a review update. <i>J Ethnopharmacol</i> 2004; 94: 1– 23.
[6]	<i>Hänzel R, Sticher O</i> : <i>Pharmakognosie Phytopharmazie</i> . Springer Verlag, Heidelberg, 2007.
[7]	<i>Dhawan K, Kumar S, Sharma A</i> : Anti-anxiety studies on extracts of <i>Passiflora incarnata</i> Linneaus. <i>J Ethnopharmacol</i> 2001; 78: 165– 170.
[8]	<i>Dhawan K, Dhawan S, Chhabra S</i> . Attenuation of benzodiazepine dependence in mice by a trisubstituted benzoflavone moiety of <i>Passiflora incarnata</i> Linneaus: A non-habit forming anxiolytic. <i>J Pharm Pharmceut Sci</i> 2003; 6: 215-222.
[9]	<i>Dhawan K, Kumar S, Sharma A</i> . Nicotine reversal effects of the benzoflavone moiety from <i>Passiflora incarnata</i> L. in mice. <i>Addiction Biology</i> 2002; 7: 435- 441.
[10]	<i>Dhawan K, Kumar S, Sharma A</i> . Reversal of cannabinoids (Δ^9 -THC) by the benzoflavone moiety from methanol extract of <i>Passiflora incarnata</i> L. in mice: a possible therapy for cannabinoid addiction. <i>J Pharm Pharmacol</i> 2002; 54: 875-881.
[11]	<i>Dhawan K, Kumar S, Sharma A</i> . Suppression of alcohol-cessation-oriented hyperanxiety by the benzoflavone moiety from <i>Passiflora incarnata</i> L. in mice. <i>J Ethnopharmacol</i> 2002; 81: 239-244.
[12]	<i>Dhawan K, Kumar S, Sharma A</i> . Restoration of chronic Δ^9 -THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from <i>Passiflora incarnata</i> L. <i>Brit J Pharmacol</i> 2002; 138: 117-120.
[13]	<i>Dhawan K, Sharma A</i> . Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreased libido, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from <i>Passiflora incarnata</i> L. in healthy male rats. <i>Life Sciences</i> 2002; 71: 3059-3069.
[14]	<i>Grundmann O, Wähling C, Staiger C, Butterweck V</i> . Anxiolytic effects of a passionflower (<i>Passiflora incarnata</i> L.) extract in the elevated plus maze in mice. <i>Pharmazie</i> , 2009, 1; 63-64.
[15]	<i>Finzelberg</i> : Analysenzertifikat Extr. <i>Passiflorae E Herb.</i> (KY 705 P), Charge 08000538; 2008.
[16]	<i>Wagner H, Bladt S</i> : <i>Plant Drug Analysis</i> . Springer- Verlag; Heidelberg 1996.

[17]	<i>Amberger W</i> : Chemische Untersuchung von <i>Passiflora incarnata</i> hinsichtlich Inhaltsstoffen mit Benzoflavonstruktur. Diplomarbeit Universität Wien 2008.
[18]	<i>Rahman K</i> : Characterisation and quantification of flavonoids in <i>Herba Passiflorae</i> . Dissertation Universität Wien 1997.
[19]	<i>Hoff A, Amesz J</i> . in Scheer H (Hrsg.): Chlorophylls, CRC Press 1991
[20]	<i>Tenerio MD</i> : Changes in carotenoids and chlorophylls in fresh green asparagus (<i>Asparagus officinalis</i> L) stored under modified atmosphere packaging, <i>J Sci Food Agric</i> 2004; 84: 357– 365.
[21]	<i>Abourashed E, Vanderplank J, Khan I</i> : High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants – II. Application to Harman Alkaloids of Genus <i>Passiflora</i> . <i>Pharma Biol</i> 2003: Vol. 41 (2): 100- 106.
[22]	<i>Mayer N</i> : Chemische Untersuchungen eines Passionsblumenkrautextraktes. Diplomarbeit Universität Wien 2009.
[23]	<i>Chang YC, Chang FR, Khalil AT, Hsieh PW, Wu YA</i> : Cytotoxic Benzophenanthridine and Benzylisoquinoline Alkaloids from <i>Argemone mexicana</i> . <i>Z Naturforsch</i> 2003; 58c: 521– 526.
[24]	<i>Nabeta K, Kawae T, Kikuchi T, Saitoh T, Okuyama H</i> . Biosynthesis of chlorophyll a from ¹³ C-labelled mevalonates and glycine in liverwort. Nonequivalent labelling of phytol side chain. <i>J Chem Soc Chem Commun</i> , 1995, 2529-2530.
[25]	<i>Buchbauer G, Jirovetz L</i> : Volatile constituents of the essential oil of <i>P. incarnate</i> L. <i>J Essent Oil Res</i> 1992; 4: 329– 334.

CURRICULUM VITAE

Name Martin HOLBIK
Geburtsdatum 12/04/1985
Geburtsort Wien
Eltern Mag. Elisabeth Holbik (geb. Röder)
Mag. Dr. Herbert Holbik

Ausbildung

1991 – 1995 Volksschule, 4720 Neumarkt/H
1995 – 2003 Gymnasium Dachsberg, 4731 Prambachkirchen
Juni 2003 Matura mit Auszeichnung
2004 Präsenzdienst; 1130 Wien
Oktober 2004 – lfd. Pharmaziestudium an der Universität Wien
WS 2008 – lfd. Tutoriumsauftrag am Department für Pharmakognosie Wien

Praktika

2003 – lfd. Marienapotheke Neumarkt, 4720 Neumarkt
2006 – 2008 Fa. Herba Chemosan Apotheker AG, 1110 Wien (je 1 Monat)
Juli 2008 Mag. pharm. R. Kottas-Heldenberg & Sohn Drogenhandel Ges.m.b.H.
Juli 2009 Anstaltsapotheke Klinikum Wels-Grieskirchen, 4600 Wels
Juni 2007 – lfd. Tätigkeit als Studienvertreter der StV Pharmazie Wien

Publikationen:

[1] *Holbik M, Krasteva S, Mayer N, Kählig H, Krenn L.*

Apparently No Sedative Benzoflavone Moiety in *Passiflorae Herba*.
Planta Med. 2010 Mar 18. [Epub ahead of print]

ANHANG

Abbildung 1: ¹H-NMR von MHPSF6 (Phytolisomer)

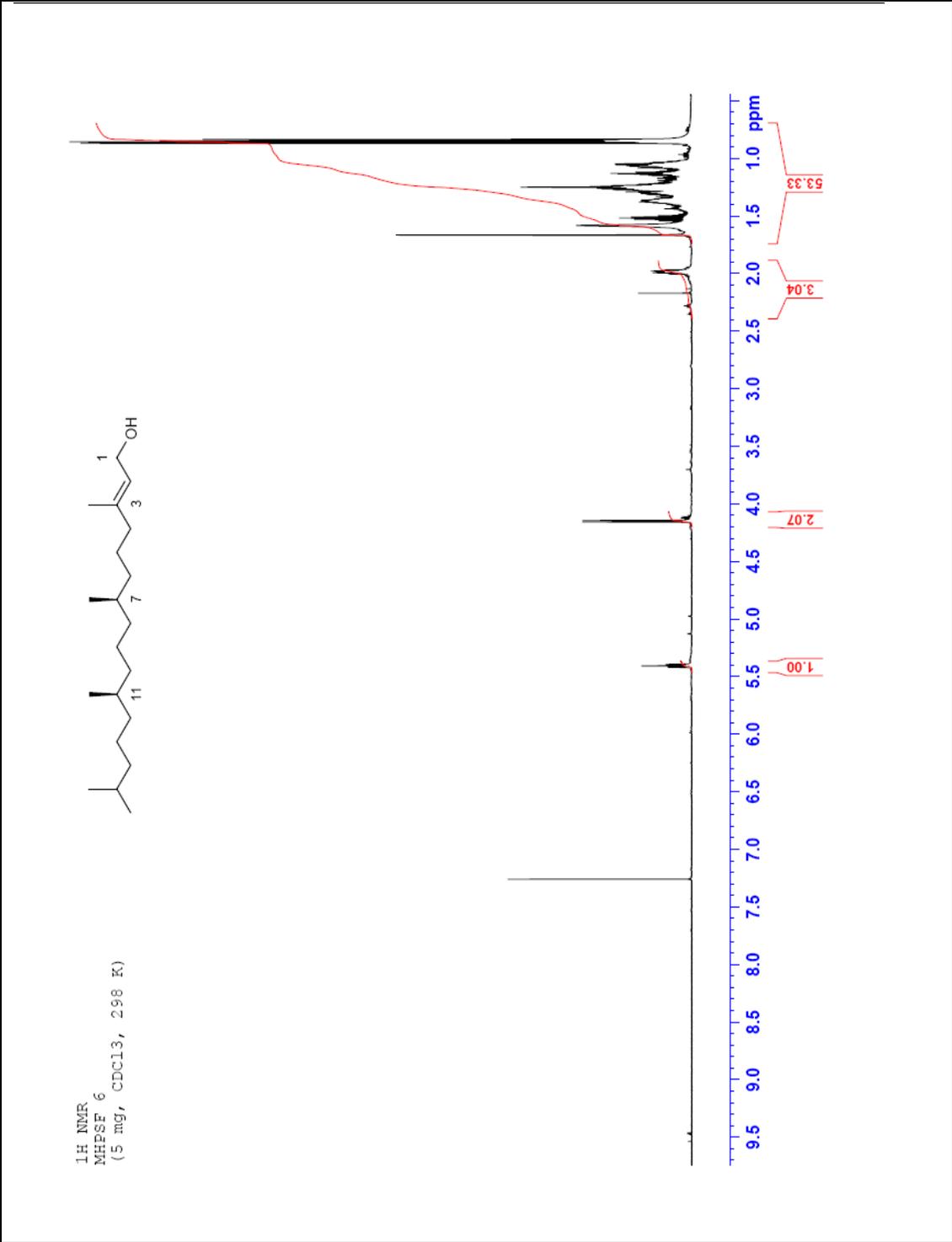


Abbildung 2: J-moduliertes ¹³C-NMR von MHPSF6 (Phytolisomer)

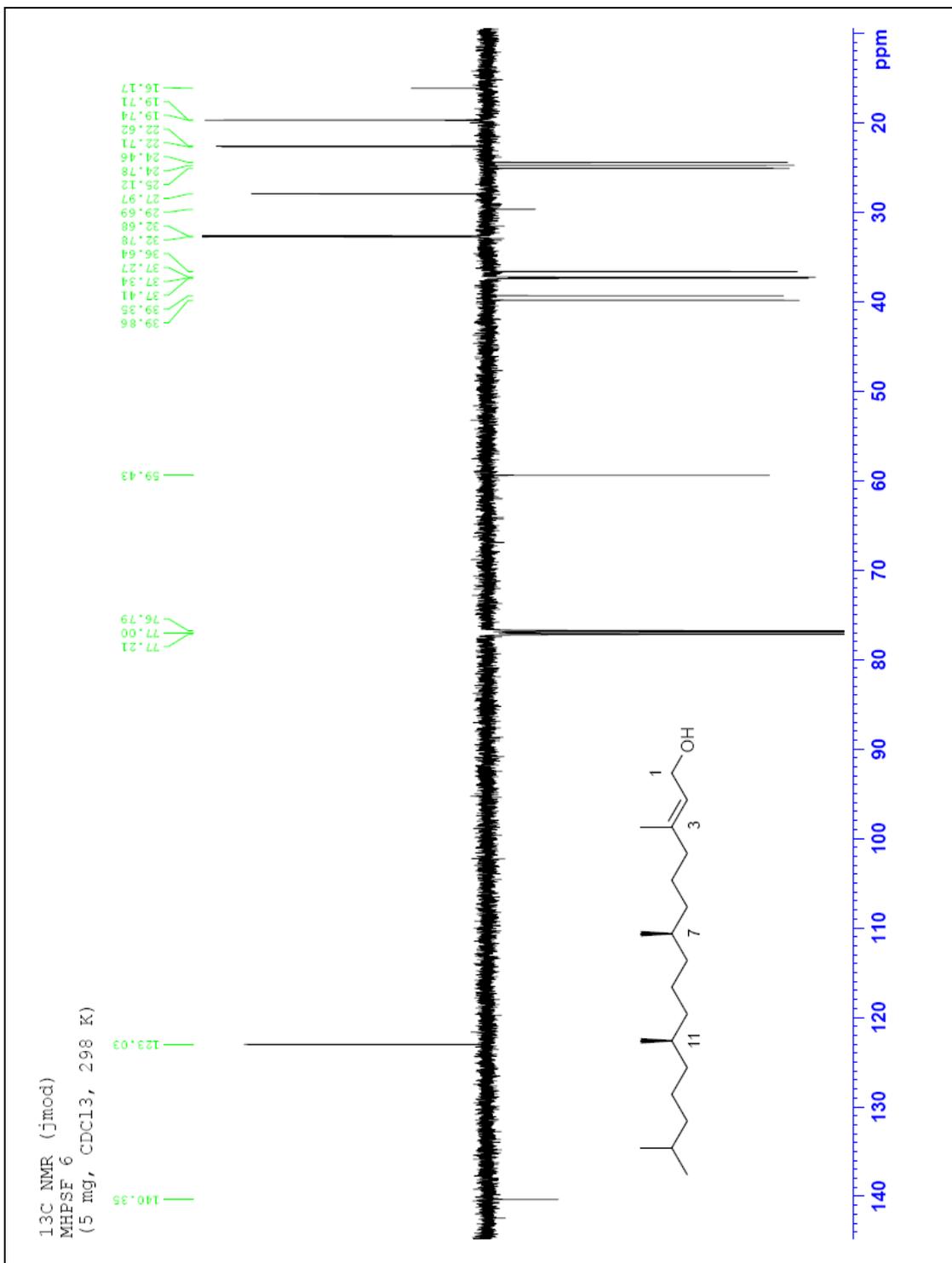


Abbildung 3: Ausschnitt aus Abbildung 2 im Bereich 16 - 40ppm

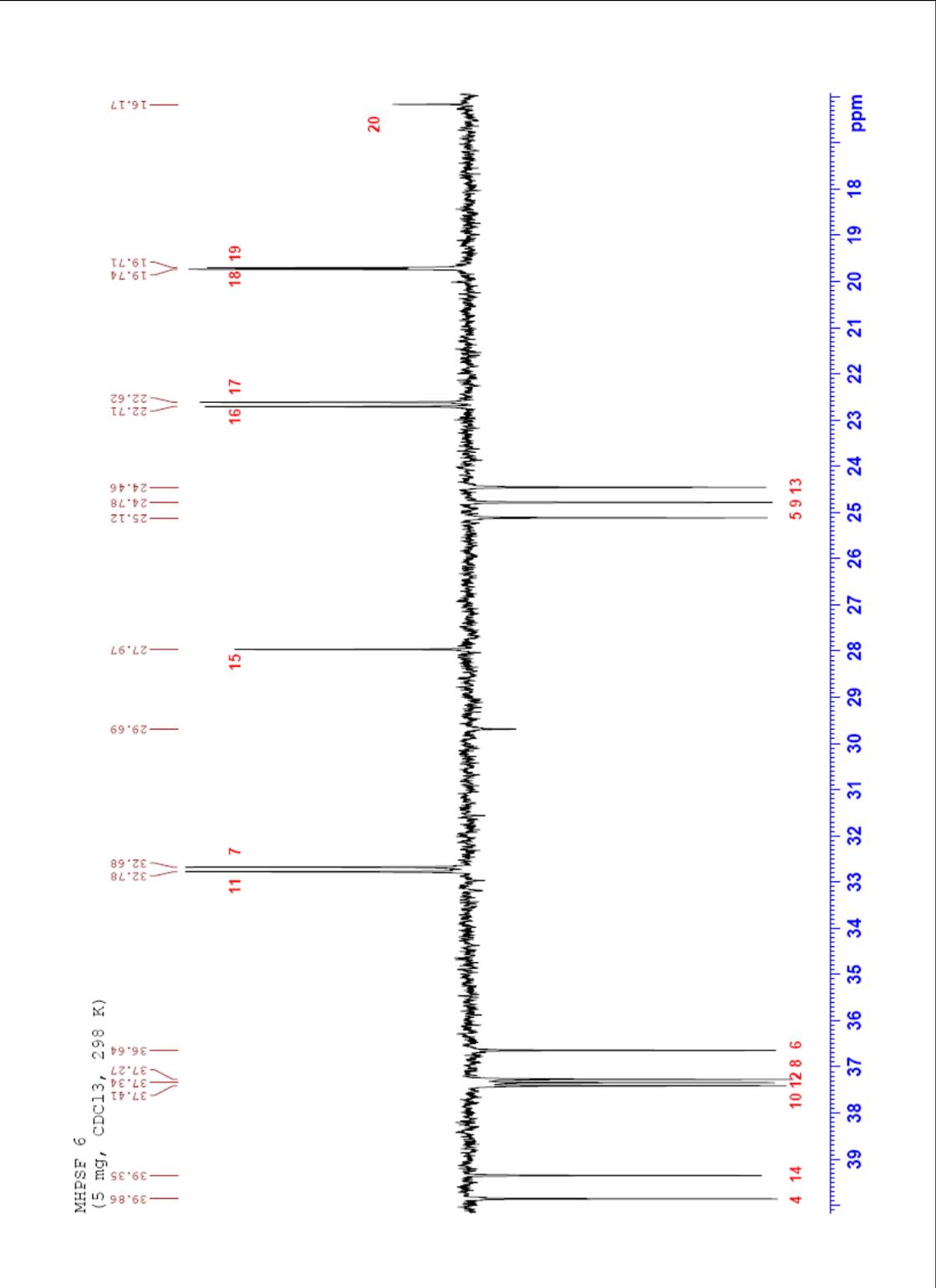


Abbildung 4: HMBC- Spektrum von MHPSF6 (Phytolisomer)

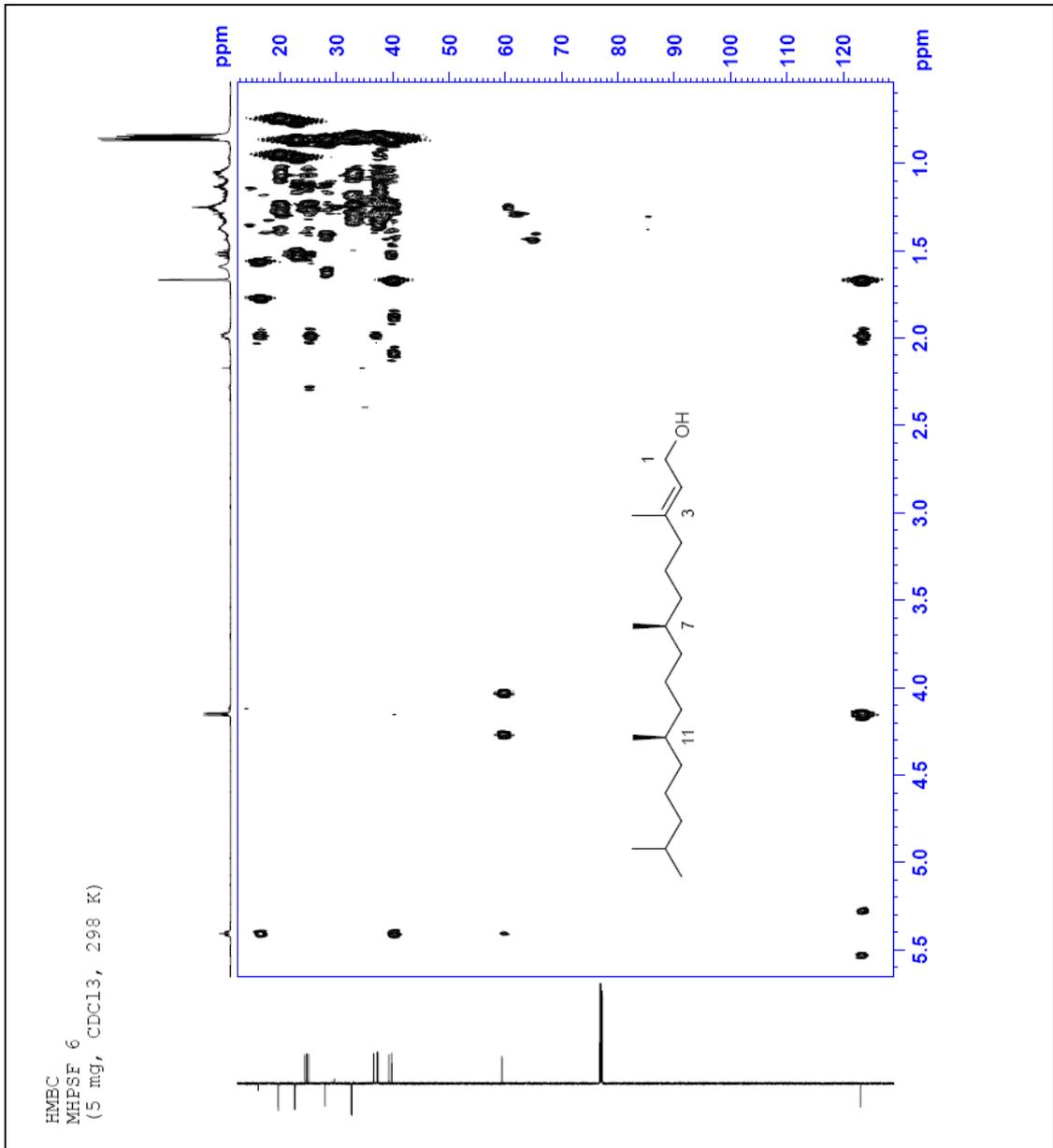


Abbildung 5: HSQC- Spektrum von MHPSF6 (Phytolisomer)

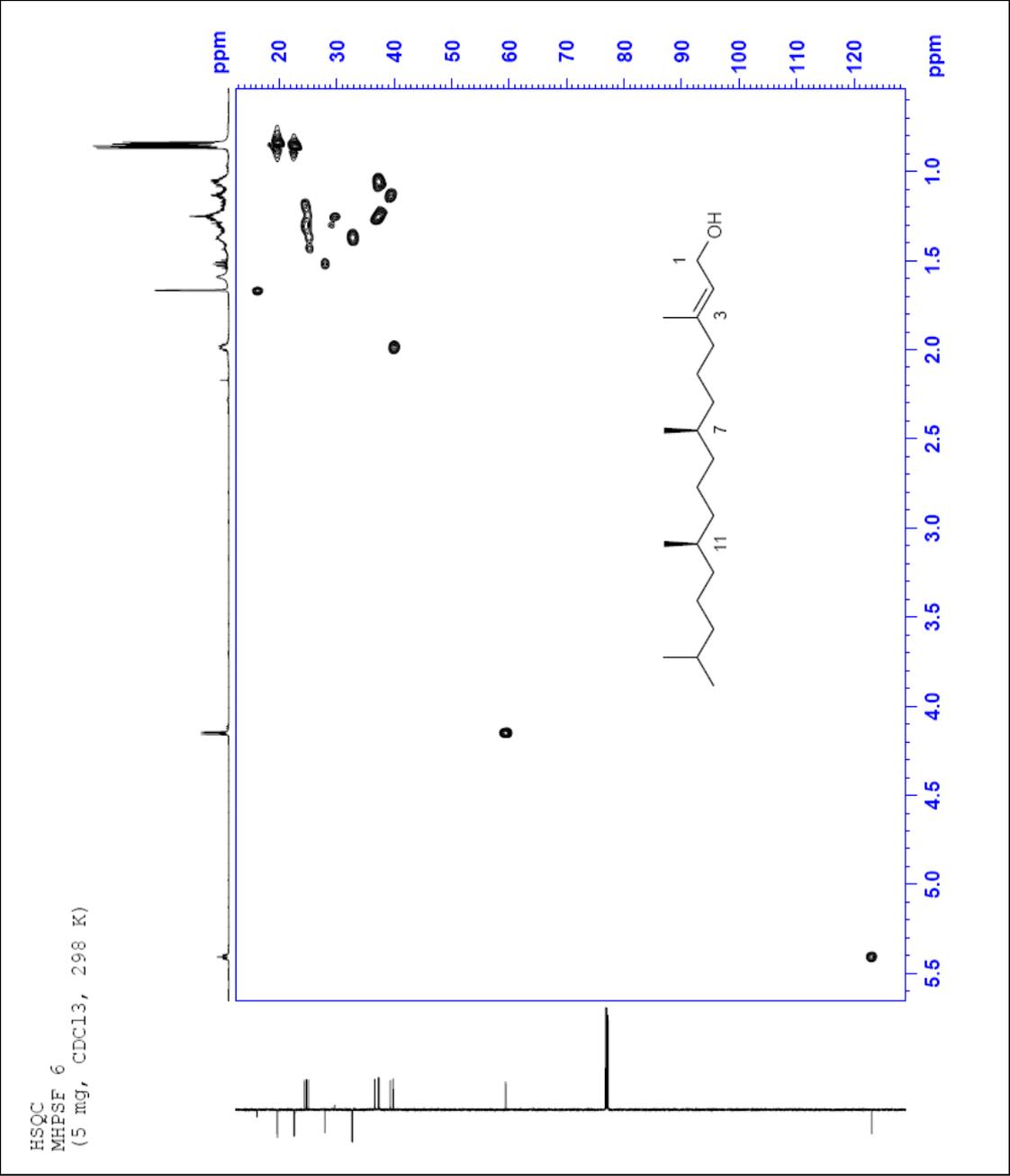


Abbildung 6: NOESY- Spektrum von MHPSF6 (Phytolisomer)

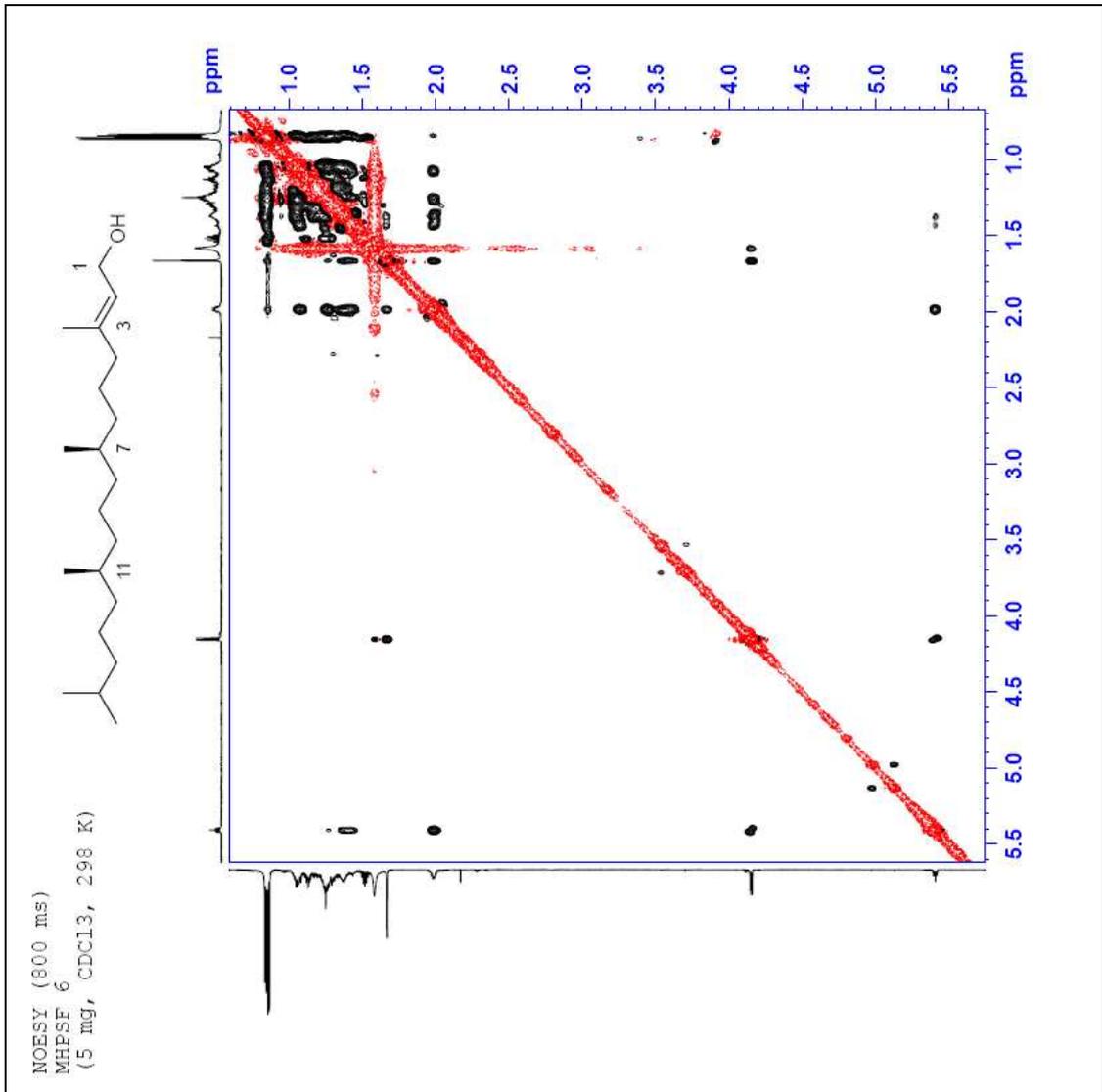


Abbildung 7: TOCSY- Spektrum von MHPSF6 (Phytolisomer)

