universität wien

DIPLOMARBEIT

Bioassay-geleitete Fraktionierung von *Dryopteris filix-mas*
zur Auffindung potentiell antiphlogistisch wirksamer Inhaltsstoffe

Verfasserin

Christina Bruckner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, im Mai 2010

Studienkennzahl (lt. Studienblatt):	A 449
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Frau Univ. Prof. V. Dirsch für den bereitgestellten Arbeitsplatz am Department für Pharmakognosie der Universität Wien bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek. Mit seiner fachlichen Kompetenz und seinen einzigartigen Vorschlägen zur Problembehebung hat er alle Sorgen vertrieben.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. J. Jurenitsch und Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Sabine Glasl für ihre Anregungen. Durch ihre Bemühungen, mir neue Perspektiven zu erläutern, und die netten Anekdoten aus vergangenen Tagen haben sie unsere Besprechungen immer aufgelockert.

Für ein wunderbares Arbeitsklima und die guten und hilfreichen Ratschläge möchte ich mich beim gesamten Team bedanken. Frau Mag. Astrid Obmann hat mir im Besonderen bei der einen oder anderen Schwierigkeit in Sachen HPLC weitergeholfen, Herr Dr. Martin Zehl hat mich mit der Thematik der LC-MS bekannt gemacht, Herr Mag. Oliver Donath und Herr Mag. Paolo Picker haben mir die verschiedensten Verfahren nähergebracht.
Ihnen allen ein liebes Dankeschön für die schöne Zeit!

Weiters gäbe es keine pharmakologischen Ergebnisse ohne die Arbeitsgruppe von Dr. Atanas Atanasov. Danke!

Mein größter Dank gebührt allerdings meinen Eltern Emilie Bruckner und Leopold Bruckner, die mir mentale und finanzielle Unterstützung zukommen ließen, meiner Schwester Karina Bruckner, die immer hinter mir steht, und Johannes Hauer, der mich in allem, was ich tue, bestärkt.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	7
1.1. Einleitung	7
1.2. Problemstellung	9
2. Material und Methoden	12
2.1. Material	12
2.2. Methoden	12
2.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	13
2.2.2. Festphasenextraktion (SPE)	14
2.2.3. Gaschromatographie (GC)	15
2.2.4. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	15
2.2.5. Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS)	16
2.2.6. NFκB-Test	19
2.2.7. PPAR-Tests	21
3. Experimenteller Teil	23
3.1. Probenvorbereitung	23
3.2. Herstellung des Dichlormethanextraktes	23
3.3. Abtrennung des Chlorophylls	24
3.4. DC-Überprüfung des gereinigten Extraktes	24
3.5. Festphasenextraktion	25
3.6. Gaschromatographie	26
3.7. Hochleistungsflüssigchromatographie	28
3.8. Semipräparative HPLC	29
3.9. LC-MS zur Analyse der SPE-70%-MeOH-Fraktion	44
3.10. DC zur Auffindung der Stoffgruppe	59
3.11. NFκB-Test und PPAR-Tests als pharmakologische Untersuchungen	60
4. Zusammenfassung und Diskussion	64
5. Literaturverzeichnis	65
6. Lebenslauf	66

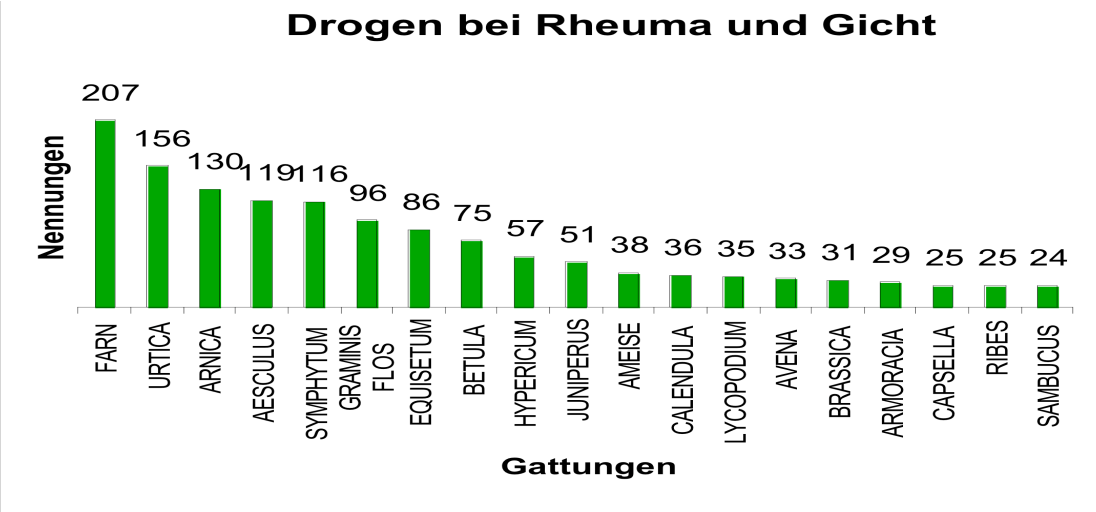
1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Einleitung

Der volksmedizinische Erfahrungsschatz der älteren, ländlichen Bevölkerung in Österreich wurde in den letzten Jahren zu einer umfangreichen Datenbank (VOLKSMED-Datenbank) zusammengetragen [20].
Diese Datenbank beinhaltet Heilpflanzen und deren Zubereitungen, die bei den verschiedensten Indikationen in der ländlichen Bevölkerung Verwendung finden. Dabei besteht die Möglichkeit, diese Datenbank entweder nach einer Pflanze oder bestimmten Indikationen zu befragen.
Bei Entzündungen, wie Rheuma, Gicht oder Gelenksentzündungen ergibt die Suche eine große Anzahl von Pflanzen mit antiphlogistischer Wirkung.

Farne werden hier an erster Stelle genannt, wobei über die antiphlogistischen Inhaltsstoffe kaum etwas in der Literatur zu finden ist.

Abb. 1. Reihung der Pflanzen der VOLKSMED-Datenbank mit entzündungshemmender Wirkung



Deswegen wollte man sich am Department für Pharmakognosie mit den Farnen näher auseinandersetzen und die entzündungshemmenden Stoffe ausfindig machen.
Da in Österreich mehrere Farnarten beheimatet sind, wurde der Wurmfarn oder auch Gemeine, Echte, Wald- oder Männerfarn ausgewählt. *Dryopteris filix-mas* L., die lateinische Bezeichnung dieser Art, gehört der Familie der *Dryopteridaceae*, der Unterfamilie *Dryopteridoideae* und Gattung *Dryopteris* L., an und ist im Vergleich zu vielen anderen Farnen relativ einfach zu bestimmen, womit eindeutig identifiziertes Pflanzenmaterial zur Bearbeitung verwendet werden konnte.

Zu finden ist diese Pflanze in der gemäßigten Zone Europas, aber auch im nördlichen Asien, Nord- und Südamerika. Der Wurmfarn bevorzugt schattige Wälder, in denen er eine Höhe von 30 bis 140cm erreicht. Er ist eine ausdauernde Pflanze, die eine lange Geschichte hat [11].

Abb. 2. *Dryopteris filix-mas* [18]

Gemeinsam mit Schachtelhalm- und Bärlappgewächsen bildeten die Urfarne im Paläozoikum, vor rund 400 Millionen Jahren, riesige Wälder, welche die Grundlage der heutigen Steinkohlevorkommen bilden [4].
Aufgrund des Alters und der ständigen Präsenz des Farns findet er bereits seit der Antike Anwendung als Antihelmintikum oder Abortivum. Von innerlichen Anwendungen ist allerdings strengstens abzuraten, weil der toxische Bereich durch seine geringe therapeutische Breite schnell erreicht ist. Dieser macht sich bemerkbar durch Kopfschmerzen, Sehstörungen bis hin zur Erblindung, und kann sogar zum Atemstillstand führen [9].
Davon abgesehen, soll der Wurmfarn eine gute Wirkung bei Entzündungsmechanismen wie Rheumatismus, Hexenschuss und Ischias zeigen, indem man Farnwedel in ein Kissen einarbeitet und dieses auflegt [11, 20].

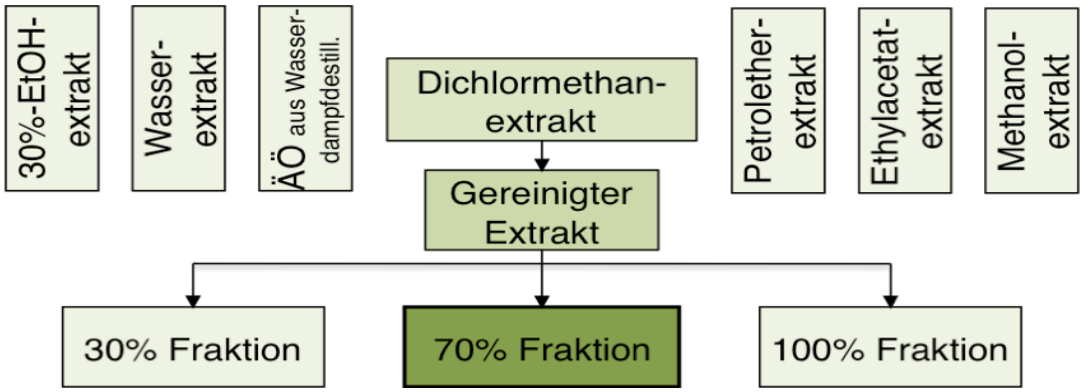
Folgende Inhaltsstoffe sind laut Literatur bereits bekannt:

- Acylphloroglucinole, wie etwa die Flavaspidsäure, ein Dimer, oder die Filixsäure, die ein Trimer ist, welche sich vermehrt im Rhizom des Wurmfarn befinden und für die antihelmintische Wirkung hauptverantwortlich sind,
- Polyensäuren, beispielsweise Hexadecatrien-, Octadecatrien-, Eicosatriensäuren,
- Terpenoide,
- Flavonoide, zu denen das Kämpferol-3-O-glucosid, das Quercetin-3-O-glucosid oder das Dryopterin zählen,
- Ätherisches Öl mit den Bestandteilen Nerolidol und Phytol [11].

1.2. Problemstellung

Um die möglichen entzündungshemmenden Wirkstoffe rasch und zielgerichtet isolieren zu können, wurde in vorangegangenen Diplomarbeiten die sogenannte „Bioassay-guided Fraktionierung“ angewendet. Dabei handelt es sich um eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung von Pflanzenextrakten, bei der die verschiedenen Schritte, wie die Aufarbeitung, Fraktionierung usw., fortlaufend auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Folgende Grafik veranschaulicht die verschiedenen Fraktionierungs-Schritte im Bezug auf die Daten der pharmakologischen Erhebungen.

Abb. 3. Darstellung der Extrakte und Fraktionierungen von *Dryopteris filix-mas*

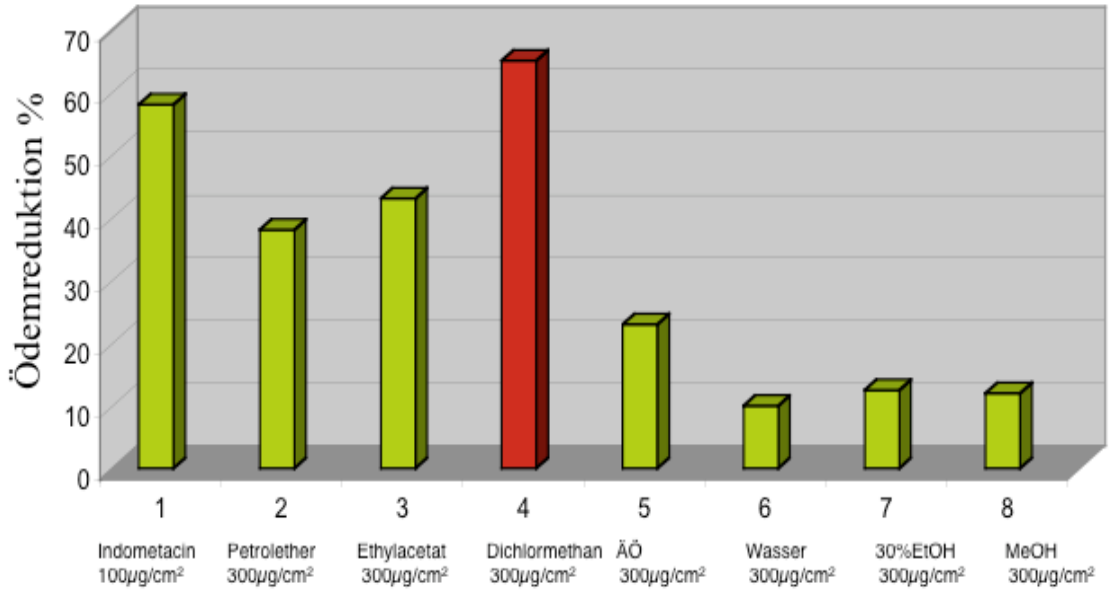


Martina Tremesberger bearbeitete in ihrer Diplomarbeit die verschiedenen Extrakte (EtOH-, Wasser-, Petrolether-, Ethylacetat-, Methanolextrakt, Ätherisches Öl aus Wasserdampfdestillation), wobei das Dichlormethanextrakt im sogenannten Crotonöl-Mäuseohrödem-Test die beste Wirkung zeigte (siehe Abb. 4). Dieser pharmakologische Test, ein in-vivo-Test, wurde an der Universitá degli Studi di Trieste am Dipartimento del Materiali e delle Risorse Naturali durchgeführt und für die aktivitätsgeleitete Fraktionierung in den darauf folgenden Diplomarbeiten verwendet [9].

Marlies Sommergruber hat den Dichlormethanextrakt mittels Festphasenextraktion (30%-, 70%-, 100%-MeOH-Extrakt) weiter aufgetrennt, wobei die 30% Fraktion keine Wirkung, die 70% bzw. 100% Fraktion etwa gleich starke Aktivität zeigten [10].

Nicole Ritter hat in ihrer Diplomarbeit versucht, die 70%-MeOH-Fraktion zu charakterisieren und Sarah Ismail hat sich 2009 mit der 100%-MeOH-Fraktion auseinandergesetzt [1, 2].

Abb. 4. Ergebnis des Crotonöl-Mäuseohrödem-Tests an verschiedenen Extrakten von *Dryopteris filix-mas* [2]



Da dieser in-vivo-Test allerdings sehr teuer ist und ethische Fragen aufwirft, sollten für weitere pharmakologischen Überprüfungen einfache, schnelle und günstige in-vitro-Zelltests etabliert werden. Die einfachen Tests auf Inhibierung NFκB bzw. Erhöhung

der PPARα und PPARγ sollten mit den Ergebnissen des in-vivo Crotonöl-Mäuseohrödem-Tests verglichen werden.

Dementsprechend war es die Aufgabe dieser Diplomarbeit, die 70%-MeOH-Fraktion in größerer Menge und weitere Subfraktionen herzustellen und deren Aktivitäten mit den in-vitro-assays zu prüfen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Als Grundlage für die phytochemischen Untersuchungen wurde die Charge gewählt, die im Oktober 2006 auf der Ebenwaldhöhe in Niederösterreich gesammelt wurde. Nach eingehenden anatomischen und morphologischen Untersuchungen wurde sie als *Dryopteris filix-mas* L. identifiziert. Im Department für Pharmakognosie der Universität Wien liegen entsprechende Herbarbelege auf.

2.2. Methoden

Es wurden folgende chromatographische, spektroskopische und pharmakologische Verfahren angewendet:

- Dünnschichtchromatographie (DC)
- Festphasenextraktion (SPE)
- Gaschromatographie (GC)
- Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)
- Semipräparative Hochleistungsflüssigchromatographie
- Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS)
- NFκB-Test
- PPARα-Test
- PPARγ-Test

2.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Mittels DC konnten wir die einzelnen Fraktionen und Extrakte überprüfen und an Hand der Rf-Werte und ihrer Färbung charakterisieren.
Es wurden Kieselgel-Fertigplatten als stationäre Phase verwendet, und als mobile Phase hat sich schon in vorhergehenden Arbeiten eine bestimmte Mischung von Toluol, Ethylformiat und konzentrierter Ameisensäure bewährt. Das Detektionsmittel war „Naturstoffreagens A“, welches für phenolische Verbindungen und Flavonoide besonders geeignet ist. Für die Detektion wählten wir UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366nm.

Parameter für die Dünnschichtchromatographie:

Stationäre Phase:	KG 60 F_{254}, Fertigplatten Merck®, Schichtdicke: 0,25mm
Mobile Phase:	Toluol-Ethylformiat-konz. Ameisensäure (5+4+1)
Trennstrecke :	8cm
Sprühreagenz:	Naturstoffreagens A [2]: 1%ige alkoholische Lösung von Diphenylboroxyethylamin mit PEG 400 nachbesprüht

Mit einer weiteren DC sollte die Zusammensetzung der Phloroglucinole geprüft werden.
Als stationäre Phase verwendeten wir wiederum eine Kieselgel-Fertigplatte, als mobile Phase diente ein Gemisch von Chloroform mit Methanol. Für die Detektion versuchten wir zum einen „Echtblausalz B“ und zum anderen „Echtrotsalz B“; beides lieferte im sichtbaren Licht unterschiedlich gefärbte Banden [5].

Parameter für die Dünnschichtchromatographie:

Stationäre Phase:	KG 60 F_{254}, Fertigplatten Merck®, Schichtdicke: 0,25mm
Mobile Phase:	Chloroform-Methanol (85:15)
Trennstrecke :	8cm
Sprühreagenzien:	„Echtblausalz B"-Lösung: 0,2g/40ml H_2O,
	„Echtrotsalz B"-Lösung: 0,2g/40ml H_2O [6]

2.2.2. Festphasenextraktion (SPE)

Verwendung fand diese Form der Extraktion, welche Solid Phase Extraktion (SPE) oder auch Sorbensextraktion genannt wird, bei der Fraktionierung des Rohextraktes. Es ist eine Sonderform der Säulenchromatographie, und somit handelt es sich dabei um einen physikalischen Extraktionsprozess; dabei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen einer flüssigen und einer festen Phase (Sorbens) [12].
Weiters kann die SPE auch zur Abtrennung störender Begleitstoffe (beispielsweise Chlorophyll), zur Anreicherung, Aufkonzentrierung oder Isolierung von Analyten verwendet werden [3].

Parameter für die SPE:

Stationäre Phase:	Varian Mega Bond Elut C18, 5000mg, 20ml
Mobile Phase:	30%, 70%, 100% Methanol
Auftragemenge:	200mg des gereinigten Extraktes in 2ml Dichlormethan gelöst
Elutionsmenge:	je 5 Reservoirvolumina (á 20ml)

2.2.3. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Gaschromatographie bietet sich zur Untersuchung auf das Vorhandensein von flüchtigen Stoffen an, wobei die getrennten Substanzen mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Parameter für die GC:

Gerät:	Shimadzu GC-MS-QP 2010
Säule:	Phenomenex ZB-5/ 60m x 0,25mm Innendurchmesser
Trägergas:	Helium 5.0
Ionenquelle:	Ei, 70eV, 250°C
Temperatur:	50-270°C/ 3°C pro Minute
Injektor:	270°C
Scan:	m/z 40-m/z 500
Bibliotheken:	Wiley, NIST, SZTERP

2.2.4. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC ist ein chromatographisches Trennverfahren, welches die zu untersuchende Substanz gemeinsam mit der mobilen Phase durch eine Trennsäule, gefüllt mit der stationären Phase, pumpt.
Geeignet ist die HPLC, wenn es sich um schwerflüchtige, nicht-flüchtige und thermolabile Substanzen handelt.
Wir versuchten damit, einen Überblick über die Inhaltsstoffe des Extraktes und der einzelnen Fraktionen zu erhalten und eine Grundlage für die semipräparative HPLC zu schaffen.
Die entsprechenden UV-Spektren zu den Peaks konnten durch Verwendung eines Diode Array Detektors (DAD) erzielt werden [3].

Parameter für die HPLC:

Stationäre Phase:	Lichrospher® 100 RP-18; 4x250mm, Korngröße 5μm
Mobile Phase:	Methanol/Wasser (pH 2,8), angesäuert mit Ameisensäure
Pumpe:	Shimadzu LC-20 AD
Autosampler:	Shimadzu SIL-10 AD
Detektion:	DAD, Shimadzu SPD-M20A
Software:	Shimadzu LC-Solution Version 1.21 SP1
Flussrate:	1ml/min
Einspritzvolumen:	10μl, Lösung von 1mg/ml in 50% MeOH
Gradient:	Methanol/Wasser, von 50% Methanol in 50min auf 100% Methanol

Dieses System wurde auch für semipräparative Zwecke verwendet; dabei wurde die Beladung der Säule durch konzentrierte Lösungen und einer erhöhten Auftragsmenge vergrößert.

2.2.5. Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS)

Das zu Grunde liegende Prinzip der Massenspektrometrie besteht darin, Substanzen in geeigneter Form zu ionisieren, wodurch sich Fragmente bilden, die nach ihrem Verhältis Masse/Ladung getrennt werden können. Dabei erhält man ein Massenspektrum, das die Größe von Fragmenten und ihre relative Intensität anzeigt.
Verwendung findet die MS in der analytischen Chemie bei der Aufklärung von Strukturen und der Zusammensetzung von Verbindungen und Gemischen.
Bei der LC-MS können stärker polare Substanzen mit Hilfe der ESI (Electrospray-Ionisation) nach der Auftrennung mittels HPLC untersucht werden [3].

Parameter für die LC-MS:

Gerät:	Dionex Ultimate 3000 RS; HPLC-System mit Pumpe, Autosampler, Säulenofen, DAD
Column Oven Temperature:	25°C
%A. Equate:	H_2O auf pH 2,86 mit Ameisensäure
%B. Equate:	Methanol
3DField.MinWavelength:	190,0nm
3Dfield.MaxWavelength:	800,0nm
Flow:	1,000ml/min
MS-Gerät:	Bruker HCT Ionenfallenmassenspektrometer

Tabelle mit den Daten der MS-Methoden:

	MS-1	MS-2: -DDA	MS-2: +DDA
Mode:			
Mass Range Mode:	Std/Enhanced	Std/Enhanced	Std/Enhanced
(Alternation) Ion Polarity:	On	Negative	Positive
Tune Source:			
Dry Temp (Set):	340°C	340°C	340°C
Nebulizer (Set):	30,00 psi	30,00 psi	30,00 psi
Dry Gas (Set):	7,00l/min	7,00l/min	7,00l/min
HV Capillary:	-4000V	4000V	-4000V
Tune SPS:			
Target Mass:	500m/z	400m/z	400m/z
Trap:			
Scan Begin:	100m/z	130m/z	100m/z
Scan End:	2000m/z	500m/z	800m/z
Averages:	5 Spectra	5 Spectra	5 Spectra
MS/MS Automatic:			
MS(n) Averages:		5 Spectra	3 Spectra

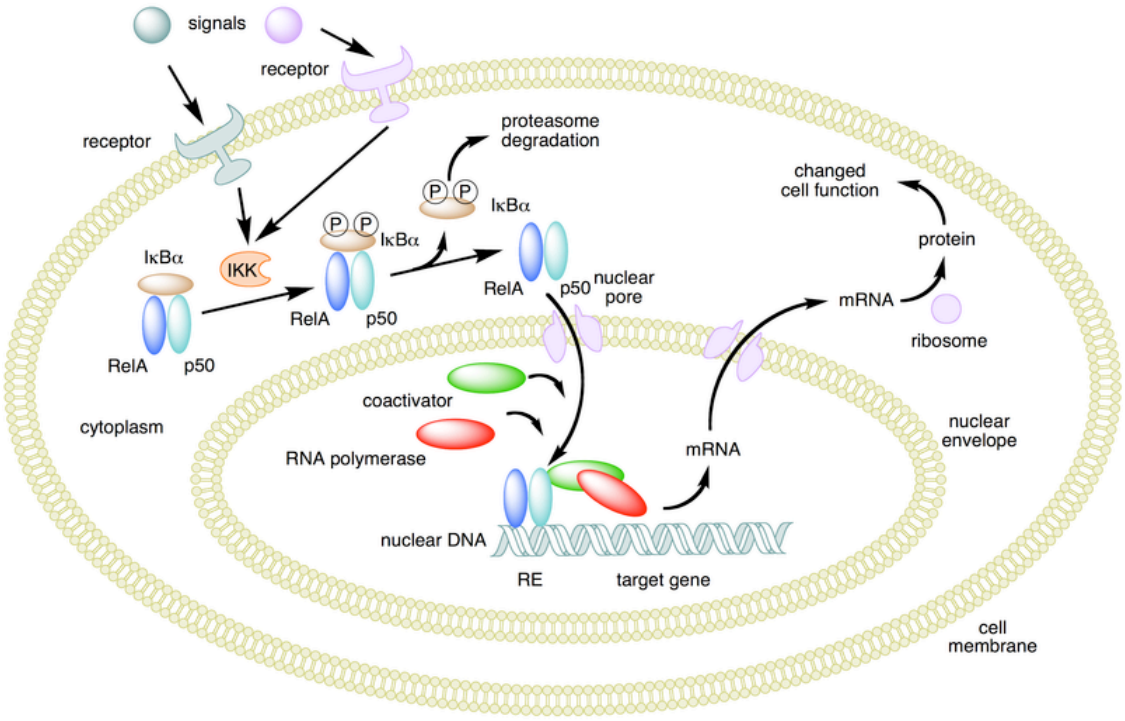
Abs. Threshold Auto MS(2):		1000.000	3000.000
Rel. Threshold Auto MS (2):		10,0%	10,0%
Abs. Threshold Auto MS (3):		30.000	50.000
Rel. Threshold Auto MS (3):		10,0%	10,0%
Active Exclusion:		On	On
Active Exclude After:		2 Spectra	2 Spectra
Active Include After:		0,50min	0.50min
Precursor Ions AutoMS (2):		1	2
Precursor Ions AutoMS (3):		2	2
Ablauf:			
Bei min:	1: %B = 50,0%	1: %B = 50,0%	1: %B = 50,0%
Bei min:	50: %B = 100,0%	35: %B = 85,0%	35: %B = 85,0%
Bei min:	51: %B = 50,0%	46: %B = 100,0%	46: %B = 100,0%
Bei min:	65: %B = 50,0%	47: %B = 50,0%	47: %B = 50,0%
Bei min:		61: %B = 50,0%	61: %B = 50,0%

2.2.6. NFκB-Test

NFκB, nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells, ist ein spezifischer Transskriptionsfaktor. Er ist in allen Zelltypen und Geweben zu finden und übernimmt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes. Außerdem ist seine Aktivierung ausschlaggebend für die Entstehung von Entzündungen.
Strukturell gesehen handelt es sich bei NFκB um mehrere Proteine (p50, RelA...), wobei immer Dimere gebildet werden.
Grundsätzlich kann NFκB in den Zellen im Zellkern konstitutiv aktiv, also ohne Anwesenheit eines äußeren Reizes, vorhanden sein (z.B. B-Lymphozyten oder dentritische Zellen) oder in den meisten anderen Zelltypen im Zytoplasma im inaktiven Zustand vorkommen. Letzteres ist auf das inhibitorische κB-Protein, kurz IκBα, zurückzuführen, das an NFκB gebunden ist, und es so in seinem deaktivierten Zustand behält.

Durch Stimuli, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Antigene oder Zytokine (TNF-α, Il-1β...) wird ein IκBα-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert, der die IκBα-Proteine phosphoryliert und damit seinen Abbau einleitet. Dadurch wird NFκB frei und kann nun in den Zellkern gelangen, wo es an eine bestimmte DNA-Sequenz bindet und zum Beispiel eine verstärkte Genexpression einleitet [16].
Zum Verständnis des Vorganges soll folgende Abbildung verhelfen.

Abb. 5. Wirkung des NFκB auf zellulärer Ebene [19]

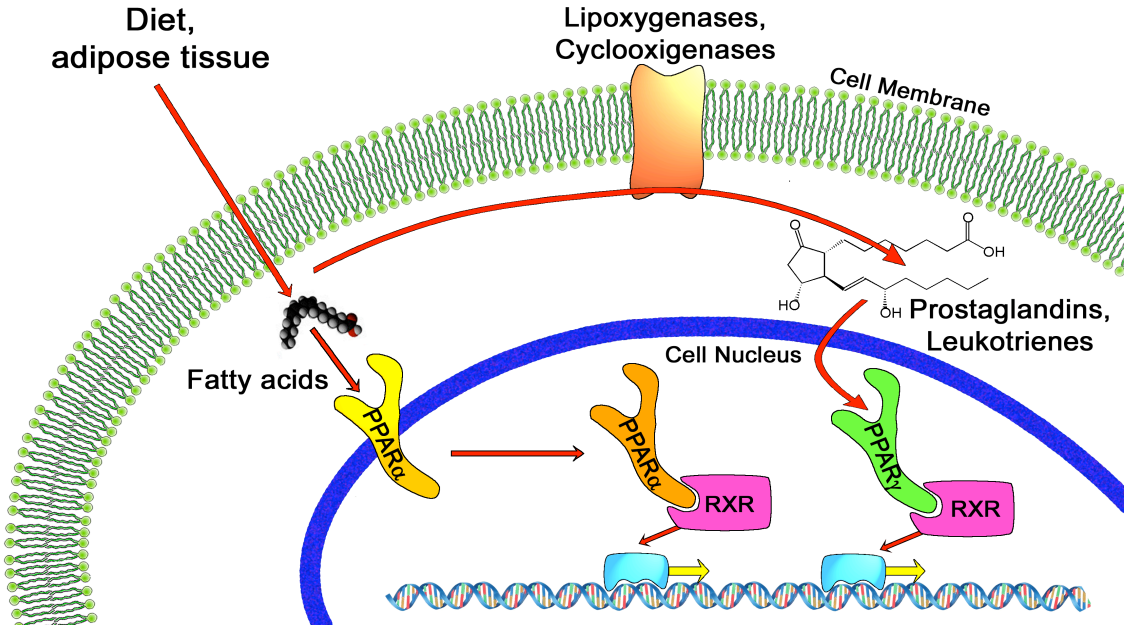


Der NFκB-Test ist ein Zelltest, der als Grundlage eine Rezeptoraktivierung mit einer darauf folgenden Rezeptorinhibierung hat. Dabei findet eine Transfektion statt; eine Methode zur Einschleusung von Fremd-DNA, in diesem Fall von pNFκB-Luc in Human embryonic kidney Zellen (HEK). Das pNFκB-Luc ist ein in DNA inkludiertes NFκB-Luciferase-Reporter-Konstrukt. Dabei ist zu beachten, dass die Luciferase ein Enzym ist, das Einfluss auf eine Reaktion von Luciferin mit Sauerstoff zu einem energiereicheren, aber instabilen Produkt hat. Beim Zerfall kommt es zur Biolumineszenz, Licht, das mittels Luminometer detektiert werden kann. Als interner Standard wird ein grün fluoreszierendes Markergen, das pEGFP-C1 verwendet [15].

2.2.7. PPAR-Tests

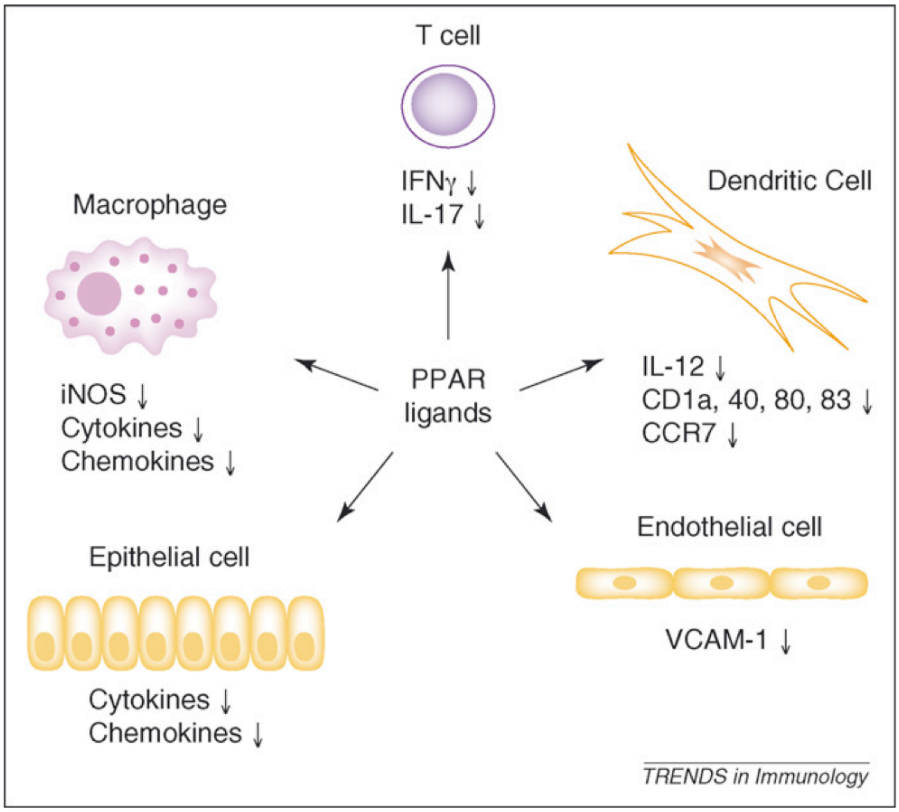
Die PPAR, Peroxisom Proliferator Aktivierte Rezeptoren, sind Nuklear-Rezeptoren, die eine entzündungshemmende Aktivität in Bezug auf akute, aber auch chronische Entzündungen, aufweisen. Genauer gesagt, bilden sie mit dem Retinoid-X-Rezeptor, kurz RXR, Heterodimere und aktivieren so die Transkription durch eine Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz, das PPAR-Response-Element (PPRE).

Abb. 6. Wirkung der PPARs auf zellulärer Ebene [17]



Durch ihre Aktivierung mittels spezifischer Liganden, wie Fettsäuren, einige Eicosanoide und therapeutisch eingesetzte Fibrate bei PPARα oder oxidierte Fettsäuren, Prostaglandinderivate und Typ-2-Diabetes-mellitus-Therapeutika wie Thiazolidindione bei PPARγ, hemmen sie diverse Komponenten der inflammatorischen Antwort wie die zytokine und chemokine Sekretion [14, 15]. Weitere Beispiele für die Wirkung von PPARs sind in der folgenden Abbildung zu sehen.

Abb. 7. Wirkungen von PPAR-Liganden [14]



Die PPAR-Testsysteme werden auf dieselbe Weise durchgeführt wie der NFκB-Test. In diesem Fall wird die Transfektion mittels eines der DNA inkludierten PPAR-Luciferase-Reporter-Konstruktes, dem PPRE-tk3x-Luc, durchgeführt (jeweils für PPARα bzw. PPARγ).

3. Experimenteller Teil

3.1. Probenvorbereitung

Die Drogenpflanze wurde von uns geschnitten und danach mit der Drogenmühle auf Siebgröße 0,75mm zerkleinert.
Da in früheren Diplomarbeiten bereits an Hand des Crotonöl-Mäuseohrödem-Tests bewiesen wurde, dass das Dichlormethan-Extrakt die stärkste antiphlogistische Wirksamkeit zeigt, extrahierten wir ausschließlich mit Dichlormethan.

3.2. Herstellung des Dichlormethanextraktes

Es wurden jeweils 100g der pulverisierten Droge mit 1000ml Dichlormethan (CH_2Cl_2) für 30min bei Raumtemperatur am Ultraschallbad extrahiert. Mittels Abnutschens konnten wir die groben Bestandteile entfernen und durch Filtrieren erhielten wir ein dunkelgrünes Filtrat, das wir am Rotationsverdampfer bei ca. 45°C zur Trockene brachten.
Danach wurden die gleichen 100g der Droge noch zweimal auf dieselbe Weise extrahiert, um zu einer erschöpfenden Extraktion zu gelangen.
Wir verarbeiteten so 1200g und erhielten 36,38g Rohextrakt.

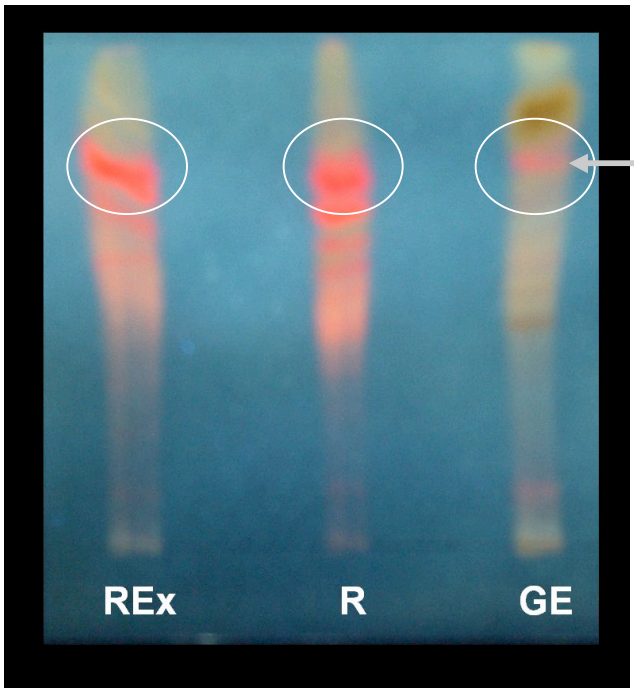
3.3. Abtrennung des Chlorophylls

Den Hauptanteil des Rohextraktes stellte das Chlorophyll dar. Da dieses weitere phytochemische und pharmakologische Untersuchungen erschwert hätte, musste versucht werden, es weitgehend zu entfernen.
Wiederum stützten wir uns auf Erfahrungen vorhergehender Diplomarbeiten und nutzten die Flüssig-Flüssig-Verteilung mittels CH_2Cl_2 und einem Methanol-Wasser-Gemisch.
Dabei wurde 1g Rohextrakt mit 150ml CH_2Cl_2 und weiteren 150ml Methanol-Wasser-Gemisch, im Verhältnis 1:1, am Rotavapor bei 45° eingeengt, bis das CH_2Cl_2 entfernt war. Die Methanol-Wasser-Phase enthielt mehrere Kügelchen, die aus unlöslichen Begleit- und Ballaststoffen (vor allem Chlorophyll) bestanden. Mittels 2-facher Filtration entstand ein gelbes Filtrat, das zur Trockene gebracht wurde [2].
Mit diesem Verfahren gelang es uns, insgesamt 4,76g gereinigtes Extrakt herzustellen.

3.4. DC-Überprüfung des gereinigten Extraktes

Wie schon in Punkt 2.2.1 beschrieben, brachten wir auf eine DC-Platte jeweils eine Dichlormethan-Lösung des Rohextraktes, des Filterrückstandes und des gereinigten Extraktes auf, um zu prüfen, ob das Chlorophyll weitgehend entfernt werden konnte. Als mobile Phase verwendeten wir Toluol-Ethylformiat-konz. Ameisensäure (5+4+1).
Das Ergebnis wird auf folgender Abbildung veranschaulicht.

Abb. 8. DC zur Untersuchung der Abtrennung des Chlorophylls



Chlorophyll-Zone

REx... Rohextrakt

R... Rückstand des gereinigten Extraktes

GE... gereinigtes Extrakt

Aus dieser DC ist ersichtlich, dass uns die Abtrennung des Chlorophylls für den weiteren Verlauf gut gelungen ist, weil die roten Banden (in Abb. 8 eingekreist) im gereinigten Extrakt nahezu verschwunden sind.

3.5. Festphasenextraktion

Um die 30%-, 70%-, und 100%-Methanol-Fraktionen zu erhalten, mussten wir vorerst die SPE-Kartuschen konditionieren.

Dazu verwendeten wir 60ml MeOH (das entspricht 3 Reservoirvolumina) und ein Reservoirvolumen dest. H_2O bei einem Druck von 5mmHg.

Als nächstes wurde ein Reservoirvolumen 30%-iger MeOH bei 5mmHg durch die Kartuschen eluiert. Nun war eine Trocknungszeit von mindestens 30min erforderlich; dabei wurde Luft mit einem Unterdruck von 15mmHg durch die Kartuschen gesaugt.

Für den Extraktionsvorgang lösten wir ca. 200mg gereinigtes Extrakt in 1,5-2ml CH_2Cl_2 und trugen die Lösung vorsichtig bei 5mmHg auf die Kartusche auf. Wiederum mussten die Kartuschen mindestens 30min bei obigen Bedingungen getrocknet werden, damit das CH_2Cl_2 entfernt wurde. Anschließend konnten wir jeweils mit 5 Reservoirvolumina mit 30%-igen, 70%-igen und 100%-igen Methanol bei 5mmHg eluieren. Die einzelnen Extrakte wurden gesammelt und am Rotavapor zur Trockene gebracht. Zum Nachwaschen und Reinigen der Kartuschen verwendeten wir ein Gemisch aus Isopropanol und MeOH im Verhältnis 1:1.
Nach 2 Durchgängen wechselten wir die Kartuschen und begannen mit neuen Kartuschen wieder mit der Konditionierung.

Auf diese Weise erhielten wir aus 4,5g gereinigtem Extrakt folgende Mengen der einzelnen Fraktionen:

30% MeOH-Fraktion:	0,81g
70% MeOH-Fraktion:	1,75g
100% MeOH-Fraktion:	1,66g

In weiterer Folge konzentrierten wir uns auf die Fraktionierung der 70%-MeOH-Fraktion, weil diese in den vorangegangenen Arbeiten gute Ergebnisse bezüglich der Aktivität lieferte.

3.6. Gaschromatographie

Um einen Überblick über das Vorhandensein von flüchtigen Stoffen zu erhalten, wählten wir die Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie.
Dazu wurde eine Lösung von 1,1mg 70%-MeOH-Fraktion in 1ml CH_2Cl_2 hergestellt, wobei die Löslichkeit des Extraktes leider nicht vollständig war. Zum Vergleich wurde auch das gereinigte Extrakt in Lösung gebracht.
Wie an den folgenden Abbildungen erkennbar ist, konnten in der 70%-MeOH-Fraktion nur sehr kleine Peaks detektiert werden, was durch die polaren, nicht flüchtigen

Komponenten erklärbar ist. Dies wird später noch in den Kapiteln 3.7. HPLC und 3.9. LC-MS genauer erläutert.

Abb. 9. Tic des gereinigten Extraktes

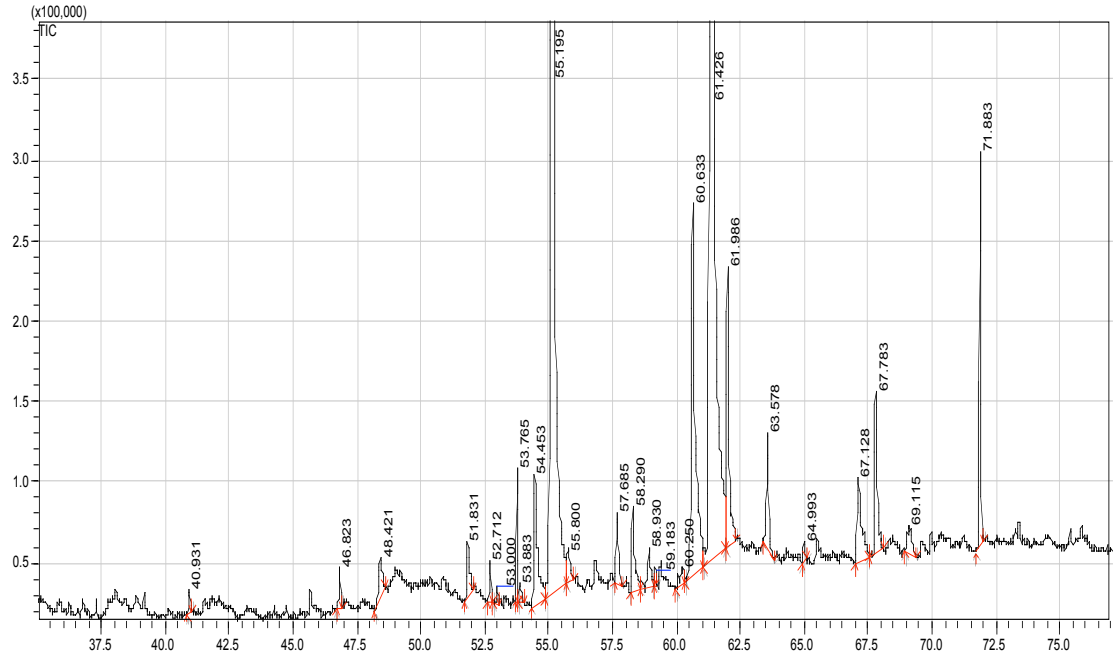
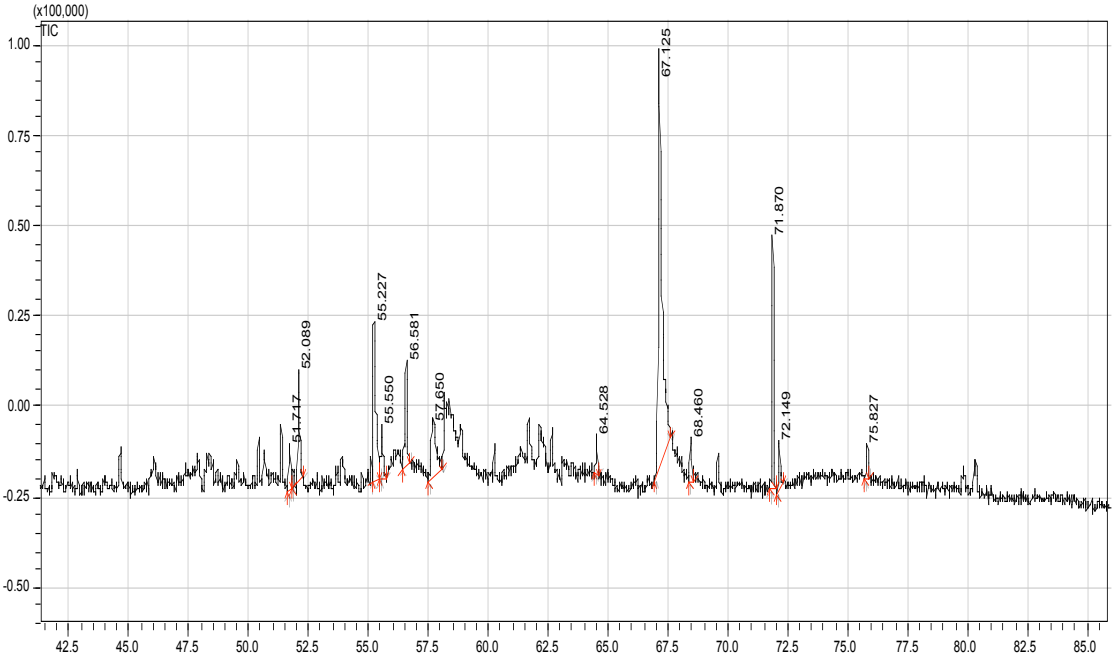


Abb. 10. Tic der 70%-MeOH-Fraktion



3.7. Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die HPLC-Analyse lösten wir 1mg 70%-MeOH-Extrakt in 0,5ml 100% MeOH. Als mobile Phase verwendeten wir destilliertes Wasser, das mit Ameisensäure (HPLC-Qualität) auf einen pH-Wert von 2,8 angesäuert wurde, und Methanol (HPLC-Qualität). Als Gradient nahmen wir 0% - 100% MeOH in 100min.

Da diese Analyse allerdings keine ausreichende Trennung ergab, starteten wir einen weiteren Versuch. Dabei wurde eine Lösung von 1mg in 1ml 50%-igem MeOH injiziert, und ein Gradient von 50% MeOH auf 100% MeOH in 50min verwendet.

Abb. 11. HPLC-Analyse der 70%-MeOH-SPE-Fraktion bei 254nm

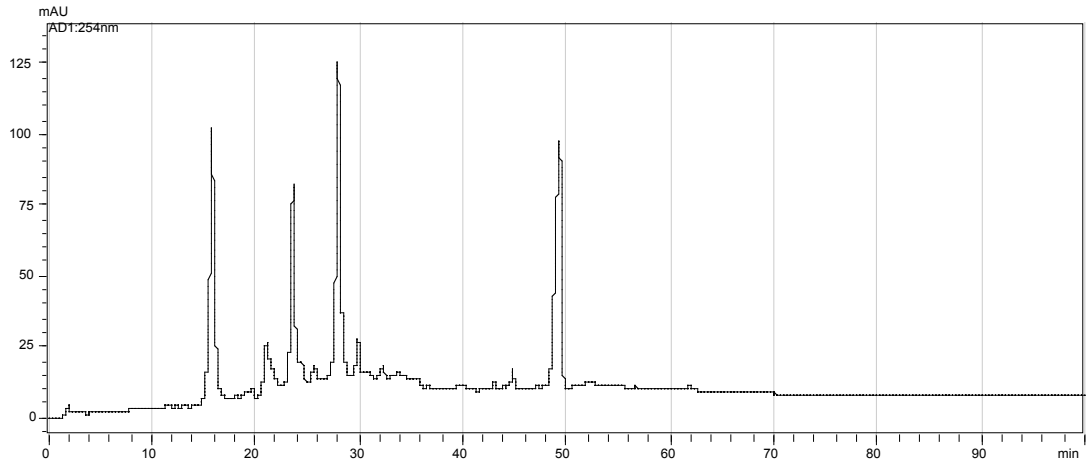


Abb. 12. HPLC-Analyse der 70%-MeOH-SPE-Fraktion bei 285nm

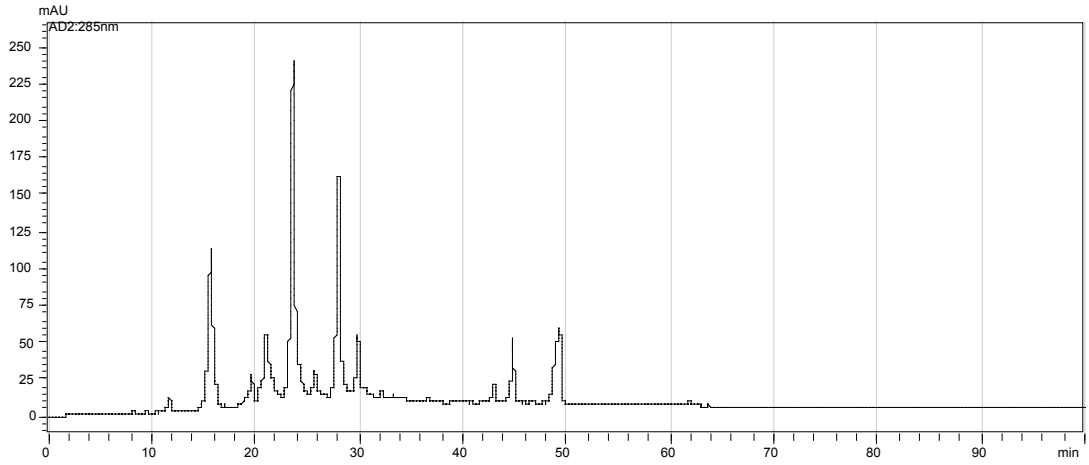
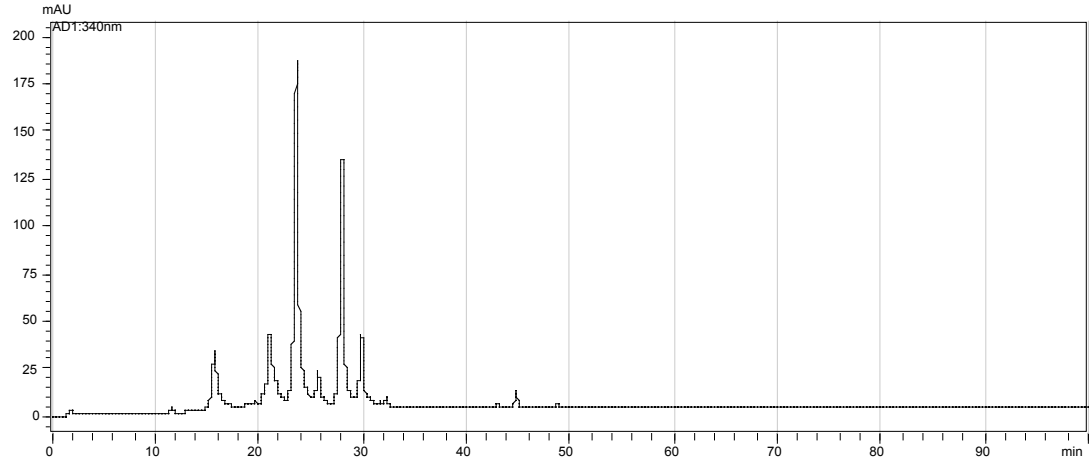


Abb. 13. HPLC-Analyse der 70%-MeOH-SPE-Fraktion bei 340nm

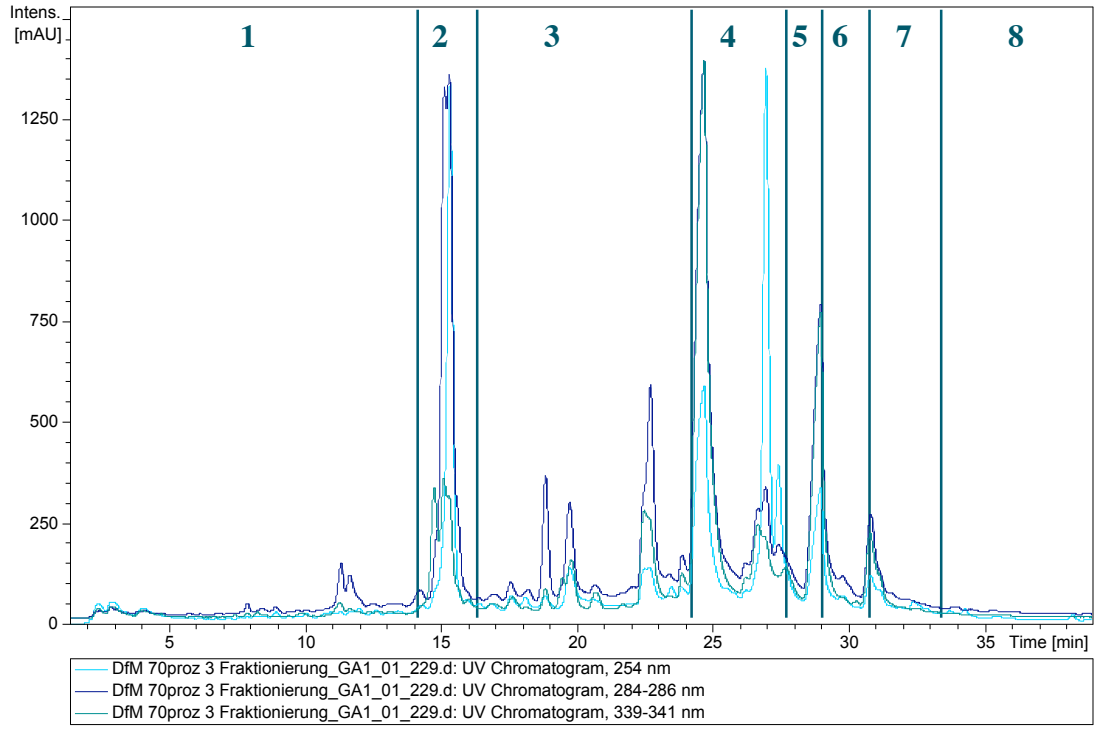


Die Wellenlängen wurden in Anlehnung an vorangegangene Diplomarbeiten gewählt, weil dabei die aussagekräftigsten Chromatogramme erhalten wurden.
Die Abb. 11-13 weisen wenige aber gut getrennte Peaks auf, welche dann mittels semipräparativen HPLC weiter fraktioniert werden sollten.

3.8. Semipräparative HPLC

Das Chromatogramm der analytischen HPLC diente als Vorlage für die semipräparative HPLC, allerdings verkürzten wir nochmals die Laufzeit von 50min auf 35min, um in kürzerer Zeit mehrere Trennungen durchführen zu können. Dazu verwendeten wir analytische Säulen, die wir bis zur Grenze der Kapazität beluden und nicht präparative Säulen, die zwar eine größere Beladbarkeit aufweisen, aber dafür eine geringere Trennleistung zeigen.
Wir stellten eine gesättigte Lösung (8mg/ml MeOH) her, wovon wir pro Durchgang 40μl injizierten.
Das Eluat wurde der Abb. 14 entsprechend fraktioniert.

Abb. 14. Auftrennung der Subfraktionen mittels semipräparativer HPLC



Die einzelnen Subfraktionen wurden danach am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und mittels HPLC analysiert, was in den folgenden Abbildungen gezeigt werden soll. Die Detektion erfolgte nicht nur bei verschiedenen UV-Wellenlängen, sondern auch mit einem ELSD-Detektor (Evaporative Light Scattering Detector, Lichtstreudetektor). Dieser Detektor erkennt alle nicht flüchtigen Substanzen ohne Berücksichtigung des chromophoren Systems, das heißt, es werden auch Substanzen detektierbar, die mit UV-Detektoren nicht sichtbar sind, weil keine Doppelbindungen vorhanden sind.

Darüber hinaus kann man im ELSD die mengenmäßige Zusammensetzung eines Substanzgemisches abschätzen.

Weiters schalteten wir einen DAD (Diode Array Detector) zu, welcher auch die UV-Spektren der Hauptpeaks aufzeichnete, was in den dementsprechenden Abbildungen veranschaulicht ist und somit auch einen Hinweis auf die Strukturen erlaubt.

Abb. 15. ELSD-Signal der Subfraktion 1

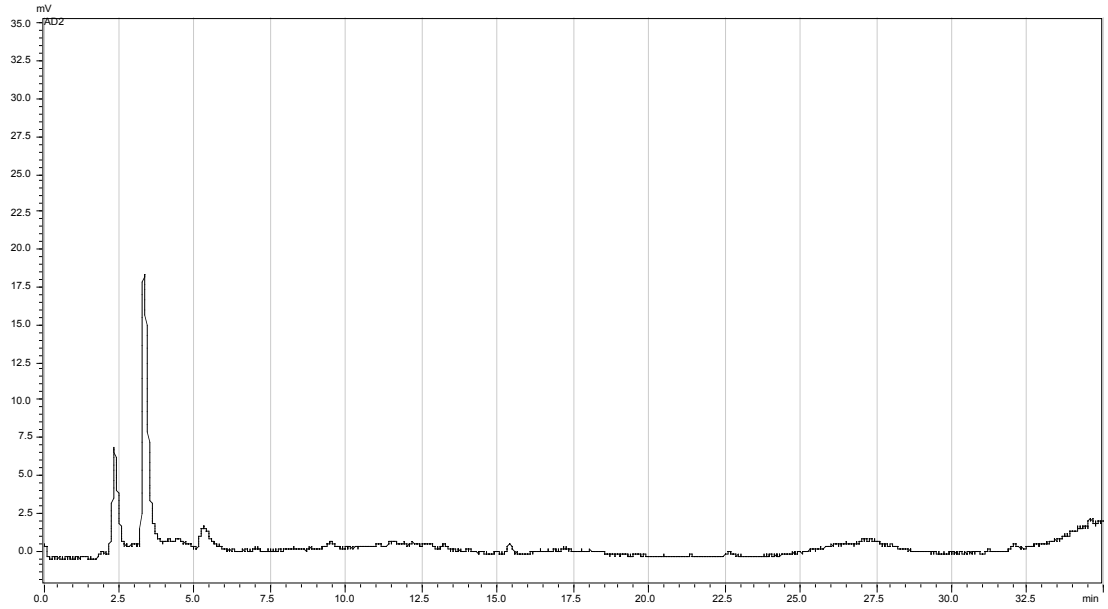


Abb. 16. UV-Signal der Subfraktion 1 bei 254nm

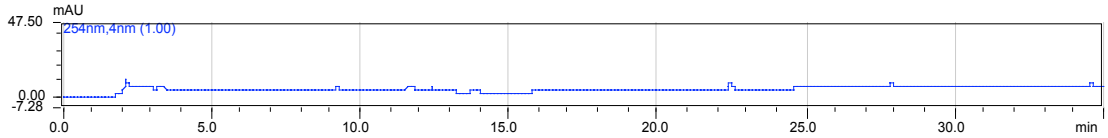


Abb. 17. UV-Signal der Subfraktion 1 bei 285nm

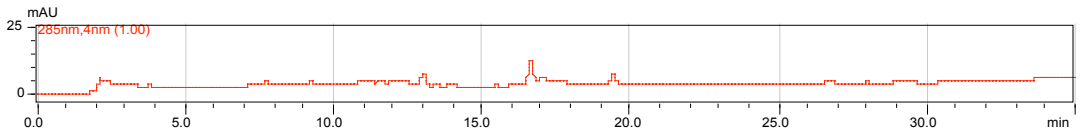


Abb. 18. UV-Signal der Subfraktion 1 bei 340nm

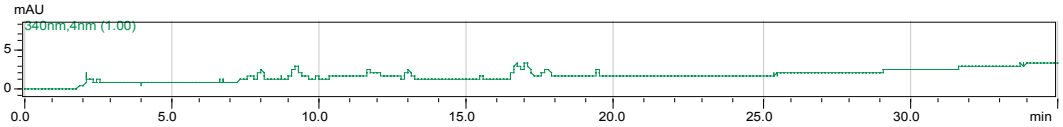


Abb. 19. ELSD-Signal der Subfraktion 2

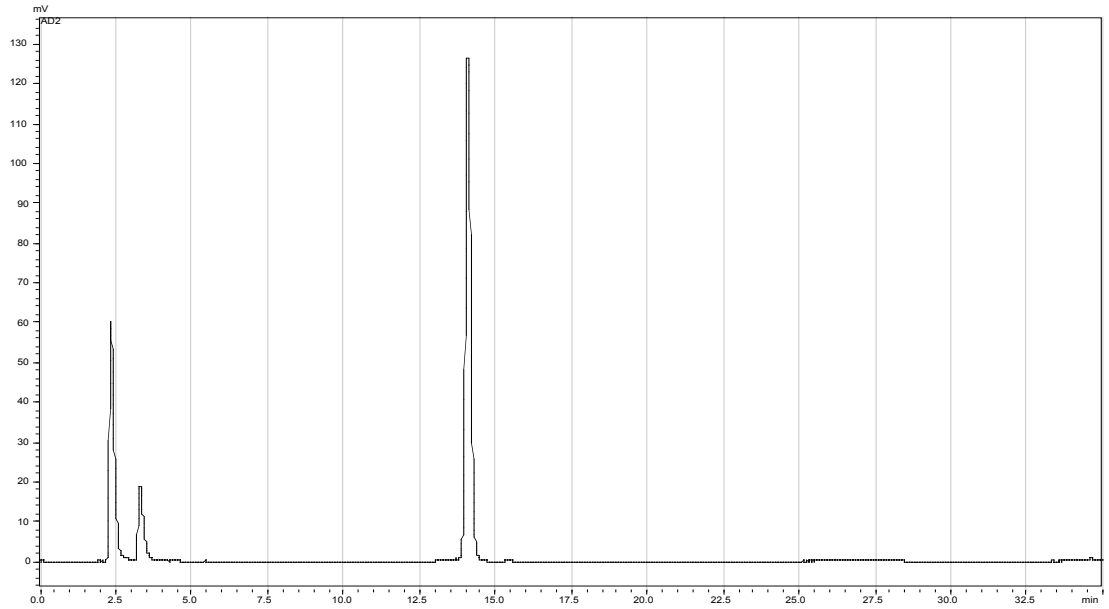


Abb. 20. UV-Signal der Subfraktion 2 bei 254nm

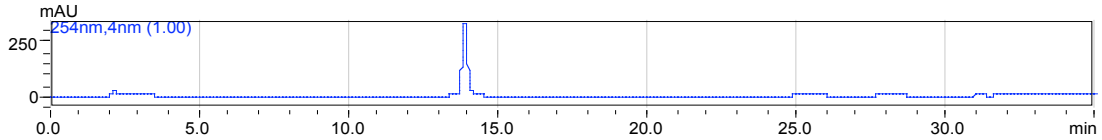


Abb. 21. UV-Signal der Subfraktion 2 bei 285nm

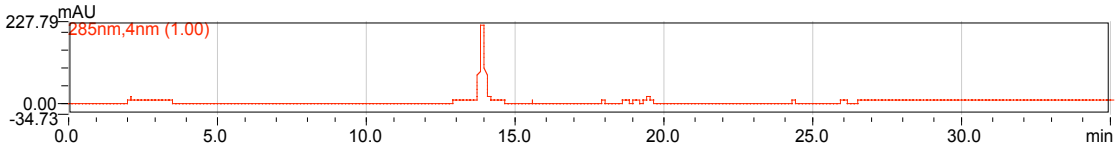


Abb. 22. UV-Signal der Subfraktion 2 bei 340nm

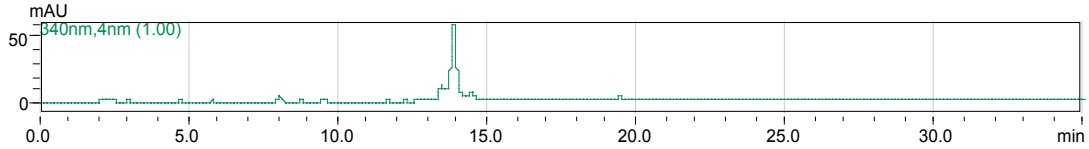


Abb. 23. UV-Spektrum des Peaks bei Retentionszeit=13.91min aus Subfraktion 2

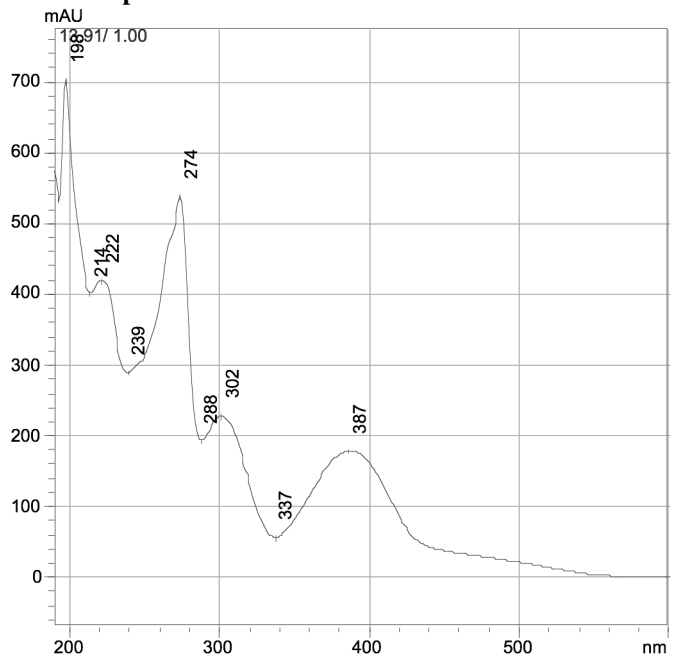


Abb. 24. ELSD-Signal der Subfraktion 3

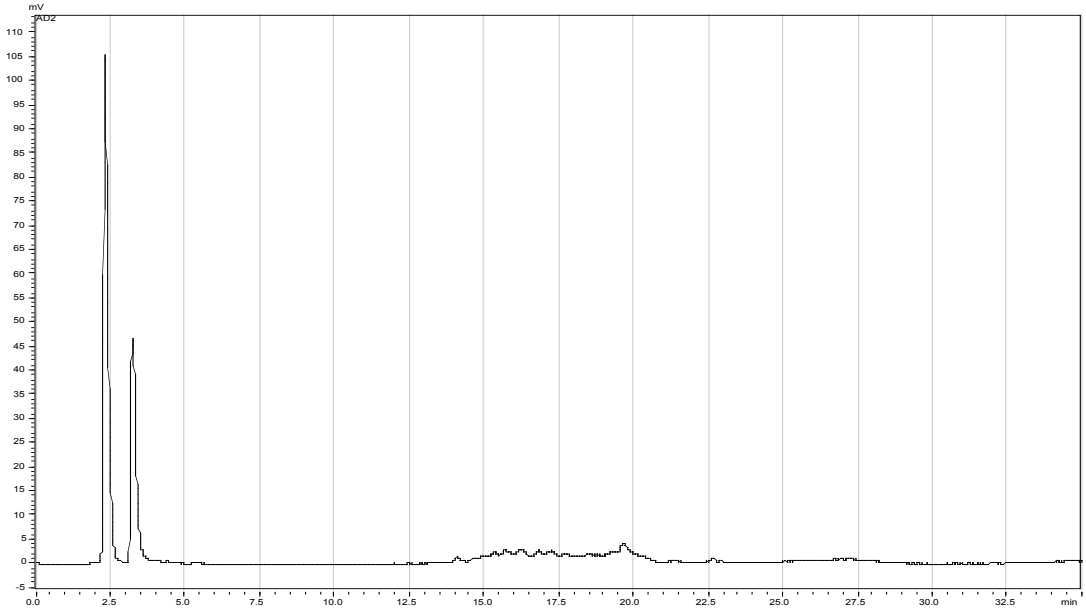


Abb. 25. UV-Signal der Subfraktion 3 bei 254nm

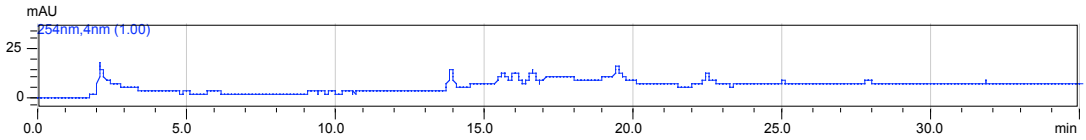


Abb. 26. UV-Signal der Subfraktion 3 bei 285nm

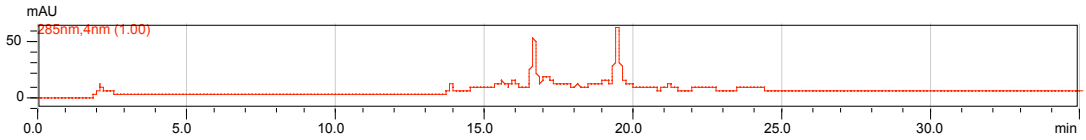


Abb. 27. UV-Signal der Subfraktion 3 bei 340nm

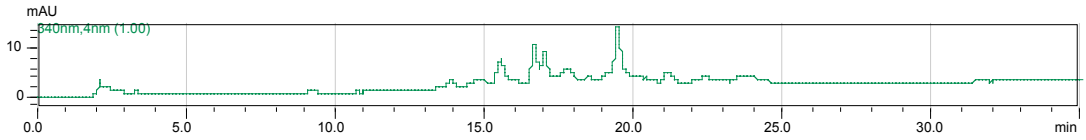


Abb. 28. UV-Spektrum des Peaks bei RT=16.67min aus Subfraktion 3

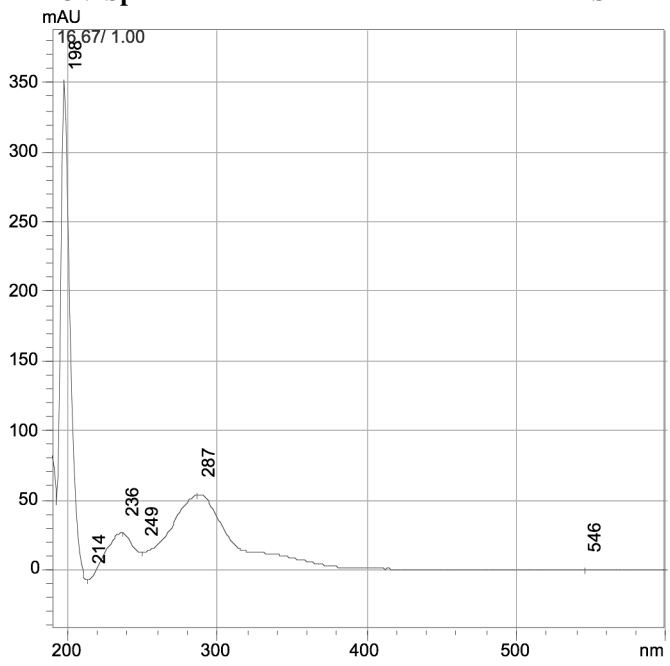


Abb. 29. UV-Spektrum des Peaks bei RT=19.47min aus Subfraktion 3

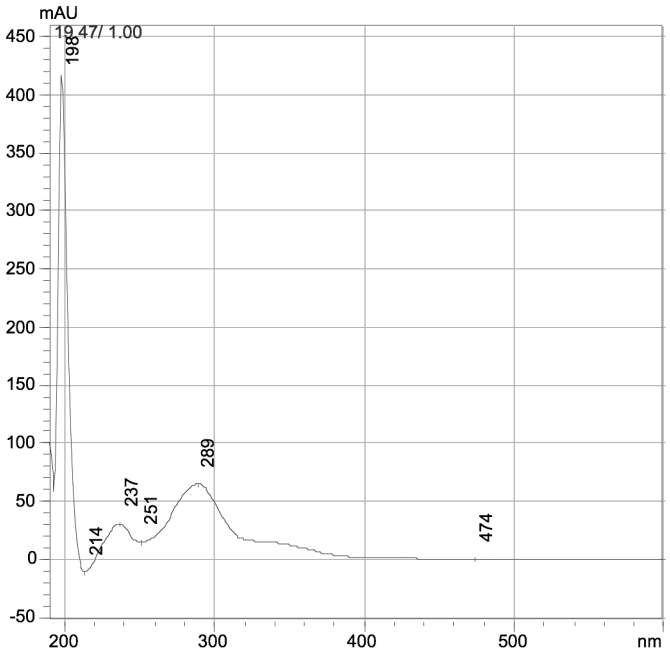


Abb. 30. ELSD-Signal der Subfraktion 4

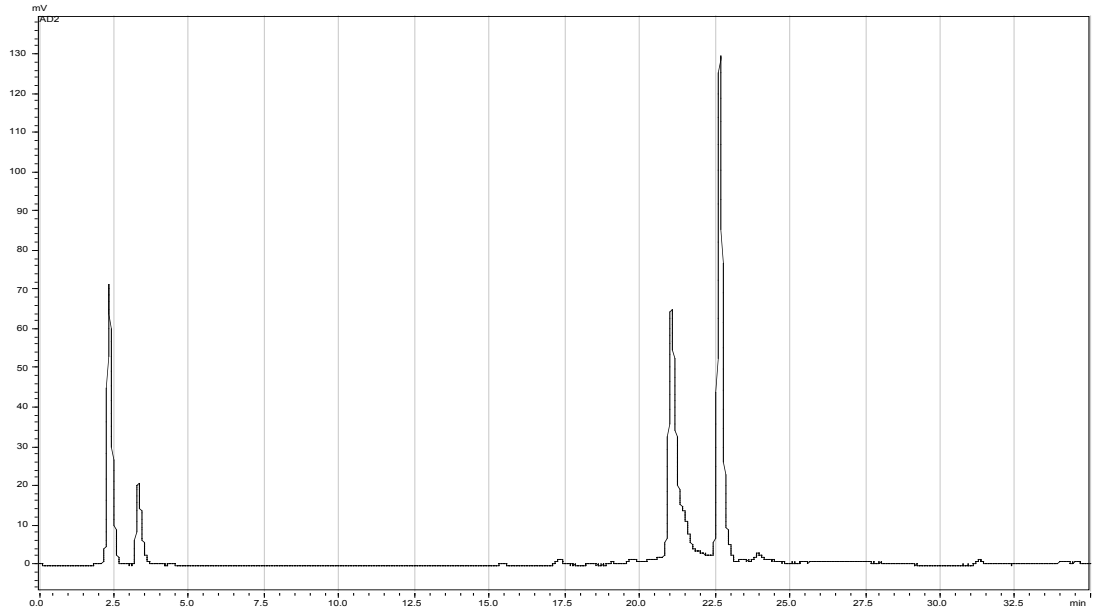


Abb. 31. UV-Signal der Subfraktion 4 bei 254nm

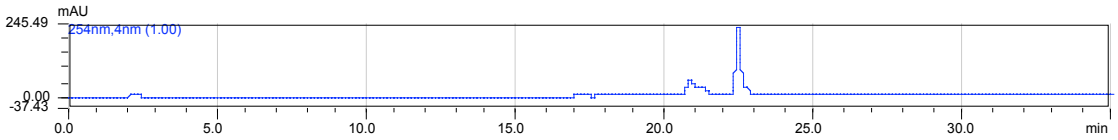


Abb. 32. UV-Signal der Subfraktion 4 bei 285nm

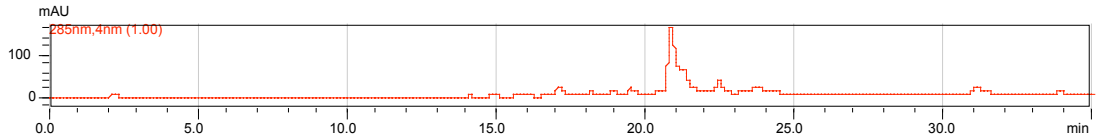


Abb. 33. UV-Signal der Subfraktion 4 bei 340nm

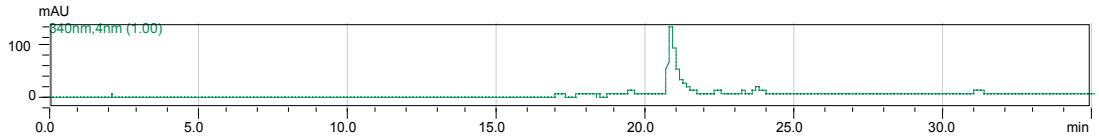


Abb. 34. UV-Spektrum des Peaks bei RT=20.85min aus Subfraktion 4

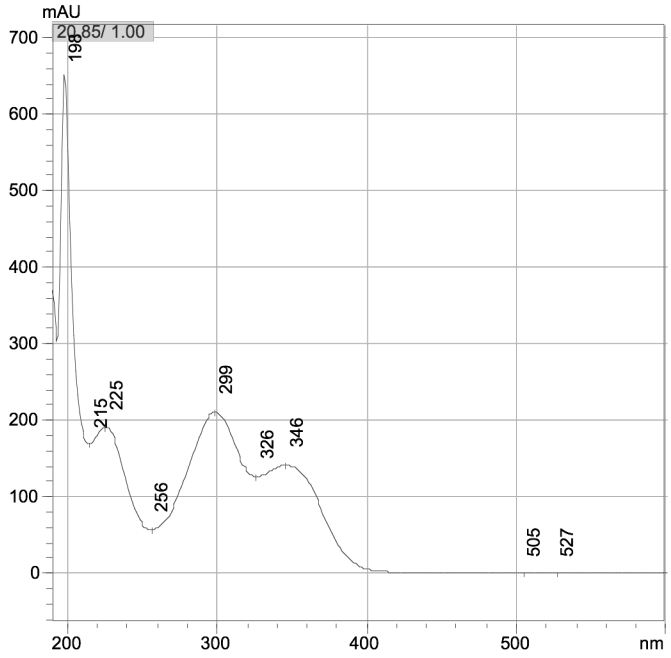


Abb. 35. UV-Spektrum des Peaks bei RT=22.46min aus Subfraktion 4

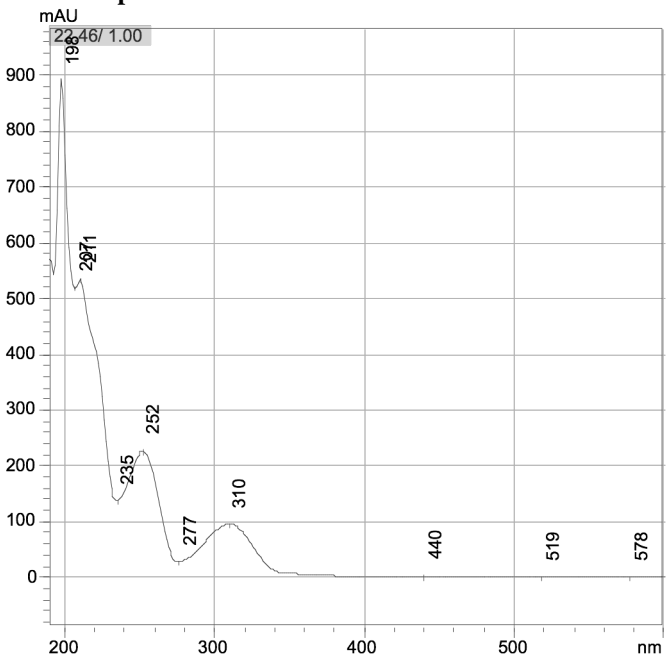


Abb. 36. ELSD-Signal der Subfraktion 5

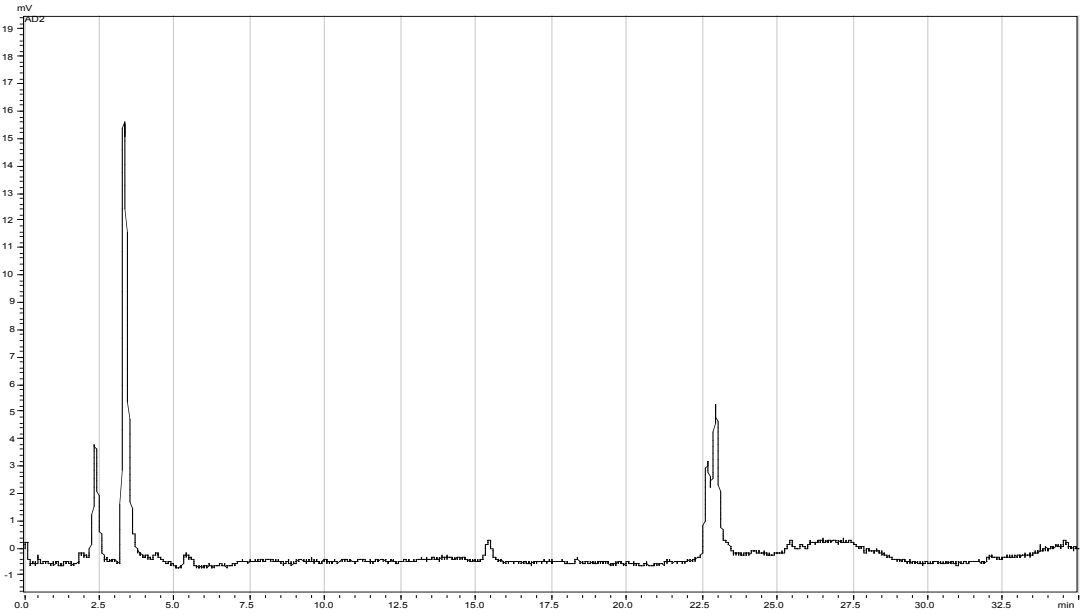


Abb. 37. UV-Signal der Subfraktion 5 bei 254nm

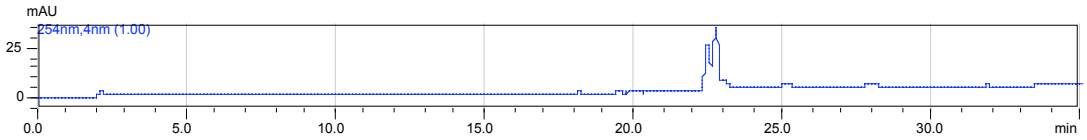


Abb. 38. UV-Signal der Subfraktion 5 bei 285nm

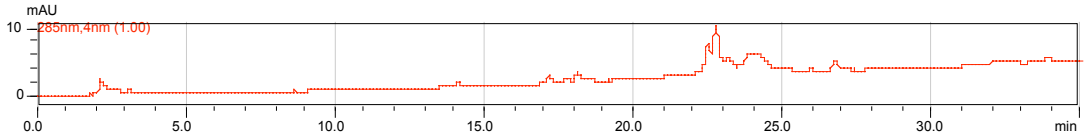


Abb. 39. UV-Signal der Subfraktion 5 bei 340nm

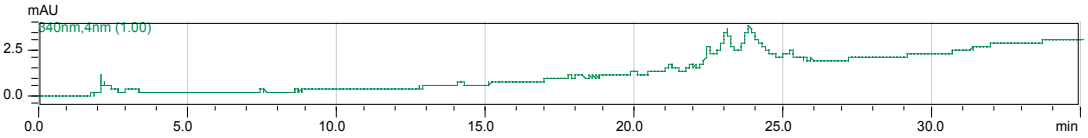


Abb. 40. UV-Spektrum des Peaks bei RT=22.79min aus Subfraktion 5

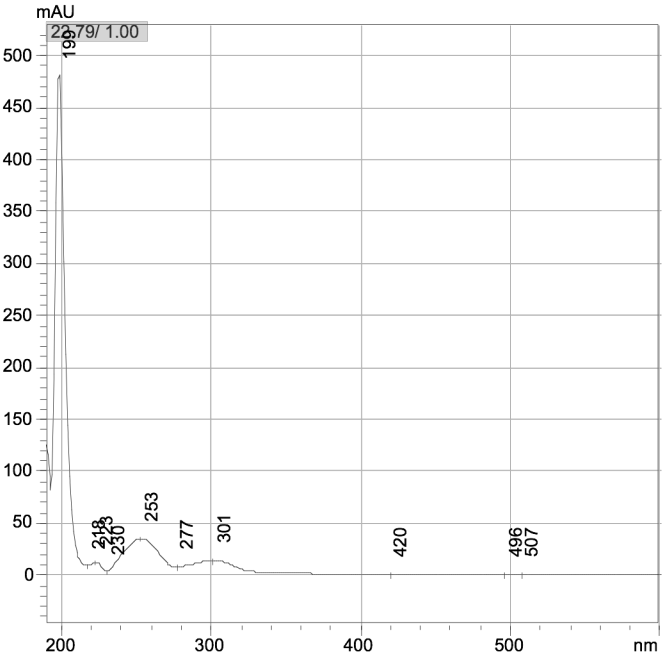


Abb. 41. ELSD-Signal der Subfraktion 6

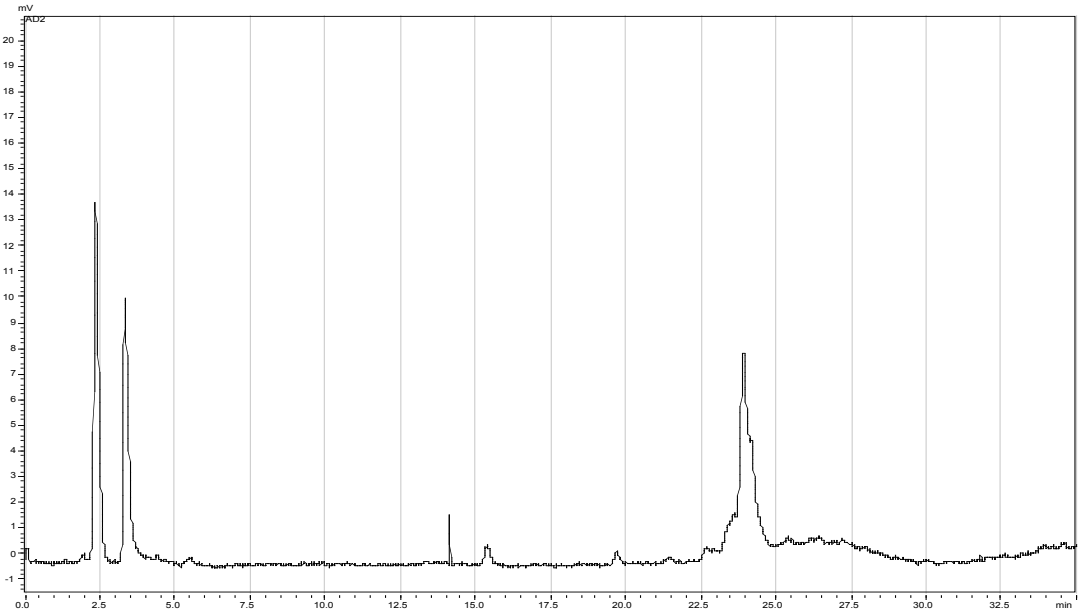


Abb. 42. UV-Signal der Subfraktion 6 bei 25nm

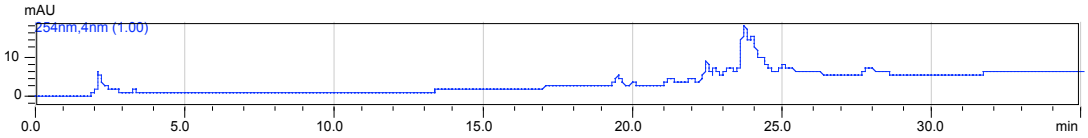


Abb. 43. UV-Signal der Subfraktion 6 bei 285nm

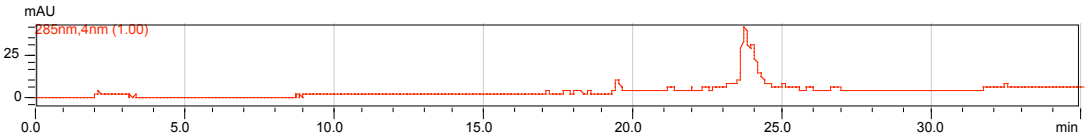


Abb. 44. UV-Signal der Subfraktion 6 bei 340nm

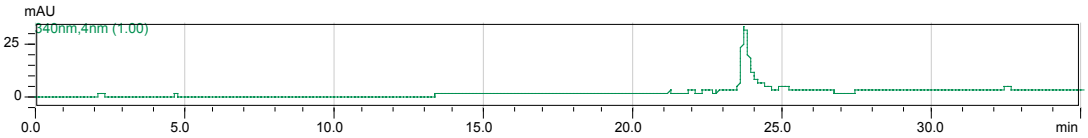


Abb. 45. UV-Spektrum des Peaks bei RT=23.73min aus Subfraktion 6

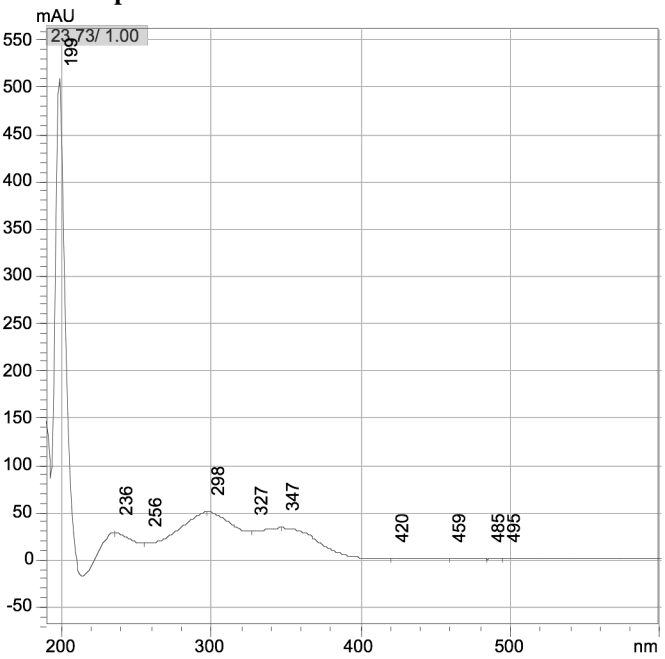


Abb. 46. ELSD-Signal der Subfraktion 7

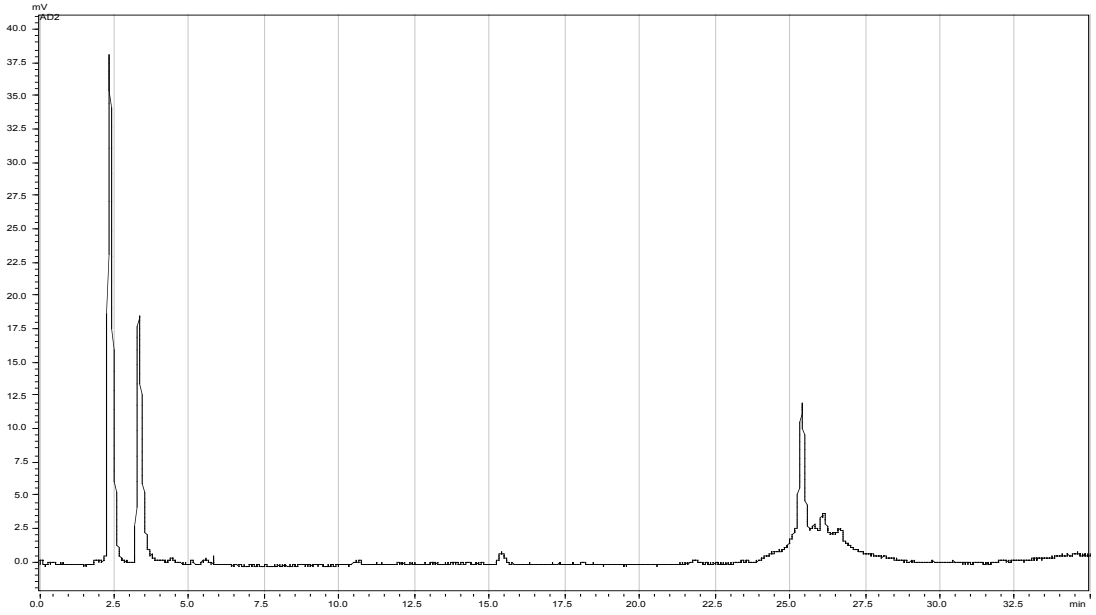


Abb. 47. UV-Signal der Subfraktion 7 bei 254nm

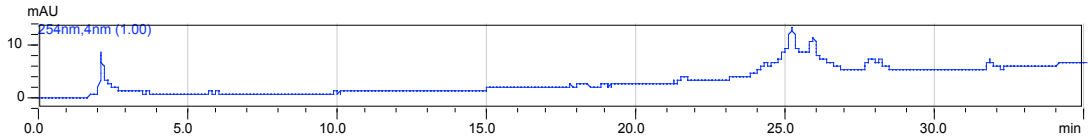


Abb. 48. UV-Signal der Subfraktion 7 bei 285nm

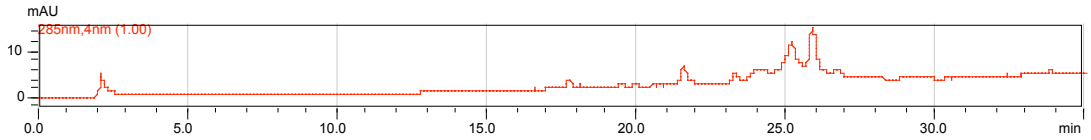


Abb. 49. UV-Signal der Subfraktion 7 bei 340nm

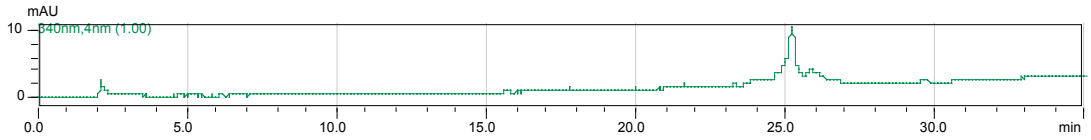


Abb. 50. UV-Spektrum des Peaks bei RT=25.23min aus Subfraktion 7

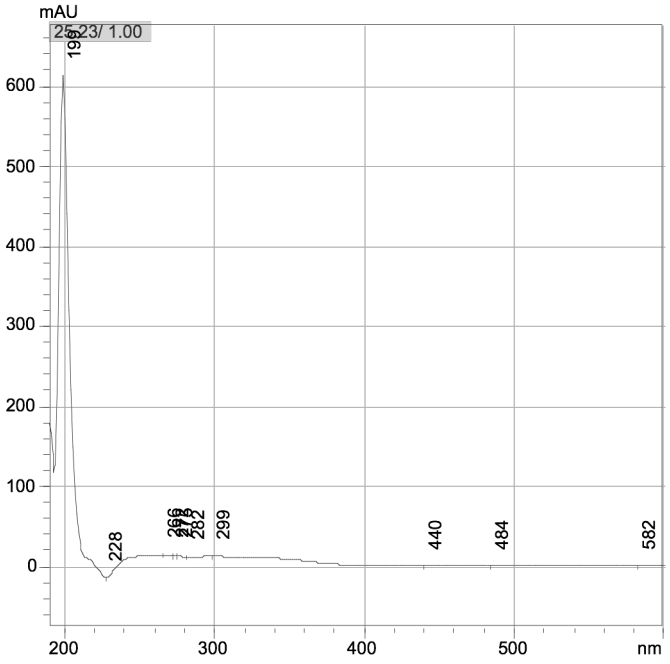


Abb. 51. UV-Spektrum des Peaks bei RT=25.92min aus Subfraktion 7

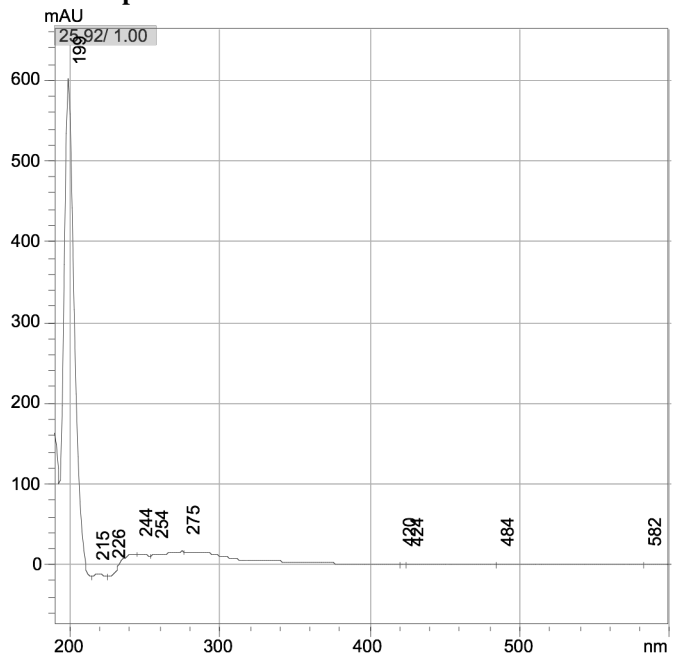


Abb. 52. ELSD-Signal der Subfraktion 8

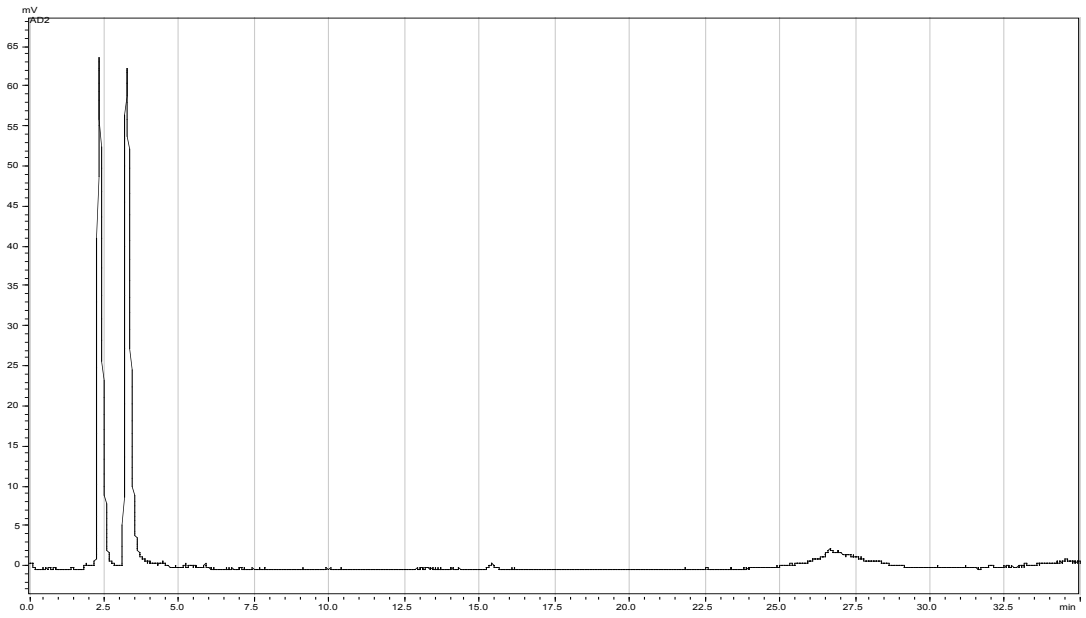


Abb. 53. UV-Signal der Subfraktion 8 bei 254nm

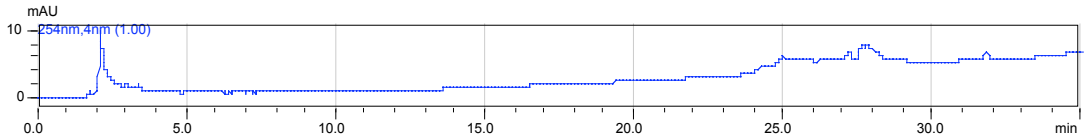


Abb. 54. UV-Signal der Subfraktion 8 bei 285nm

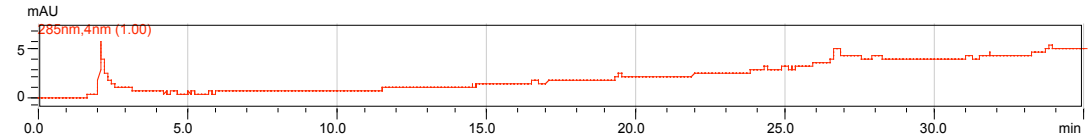
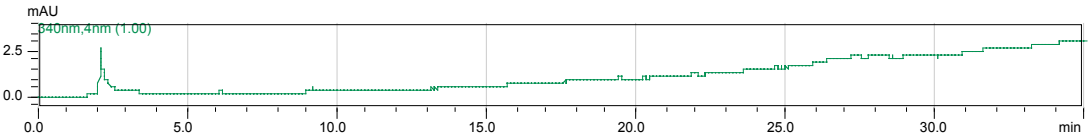


Abb. 55. UV-Signal der Subfraktion 8 bei 340nm



In allen Chromatogrammen sieht man zwischen 2,5min und 3,5min zwei Peaks, die offensichtlich nicht der semipräparativen Fraktionierung entstammen, sondern von Verunreinigungen bei der Aufarbeitung der Fraktionen.

Nach 15 Durchgängen wurden die jeweiligen Fraktionen vereinigt, zur Trockene gebracht und abgewogen. In der folgenden Auflistung sind die Auswaagen der Subfraktionen zusammengestellt:

Subfraktion 1: 0,00104g
Subfraktion 2: 0,00087g
Subfraktion 3: 0,00114g
Subfraktion 4: 0,00101g
Subfraktion 5: 0,00039g
Subfraktion 6: 0,00073g
Subfraktion 7: 0,00059g
Subfraktion 8: 0,00082g
Leerwert: 0,00015g

Diese Subfraktionen und der Leerwert (eingeengte mobile Phase, über 10min gesammelt, ohne Eluierung von Peaks) wurden gemeinsam mit der Ausgangsfraktion (0,00171g der 70%-MeOH-Fraktion) zur pharmakologischen Testung gebracht, und auf Aktivierung von PPARα und PPARγ, bzw. Inhibierung von NFκB untersucht.

3.9. LC-MS zur Analyse der SPE-70%-MeOH-Fraktion

Um erste Hinweise auf die Identität und Zusammensetzung der Substanzen in der SPE-70%-MeOH-Fraktion zu erhalten, wurde die Fraktion mittels LC-MS analysiert, zusätzlich wurde ein Diode-Array-Detektor verwendet, um neben den Massenspektren auch UV-Spektren der Hauptverbindungen zu erhalten. Die Ergebnisse wurden mit der Literaturrecherche verglichen, wo nach bereits bekannten Verbindungen in *Dryopteris filix-mas* gesucht wurde.

Bei der Aufnahme der Massenspektren wechselte das Massenspektrometer im MS-1-Modus zwischen positiver und negativer Spannung und zeichnete die entstandenen Molekülionen auf. Das MS-2, das die höchsten Peaks des MS-1 fragmentierte, führten wir im positiven und auch im negativen Modus getrennt voneinander durch. Ausgehend von den MS-2 Peaks, fragmentierten wir diese nochmals, um weitere Hinweise der Strukturen zu erhalten. Da das MS-3 aber keine wesentliche Aussagekraft hatte, stützten wir unsere Untersuchungen hauptsächlich auf MS-1 und MS-2.
Im folgenden sind die Abbildungen des UV-Chromatogrammes und des Basispeak-Chromatogramms im Vergleich abgebildet. Das Basispeak-Chromatogramm stellt einen Zusammenhang zwischen Basispeak-Intensität und Laufzeit her.

Abb. 56. HPLC-Analyse der 70%-MeOH-Fraktion mit DAD

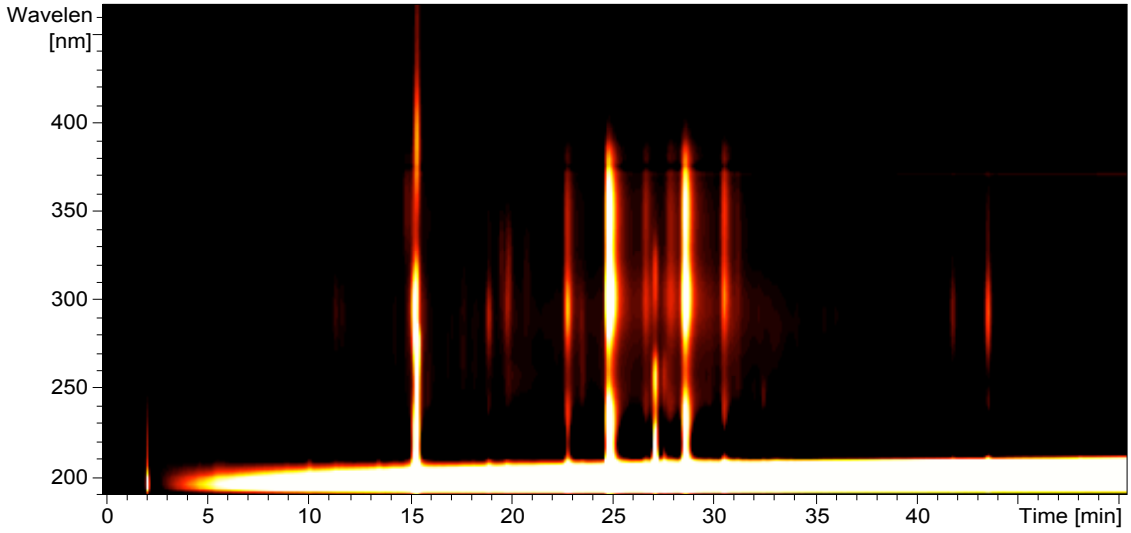
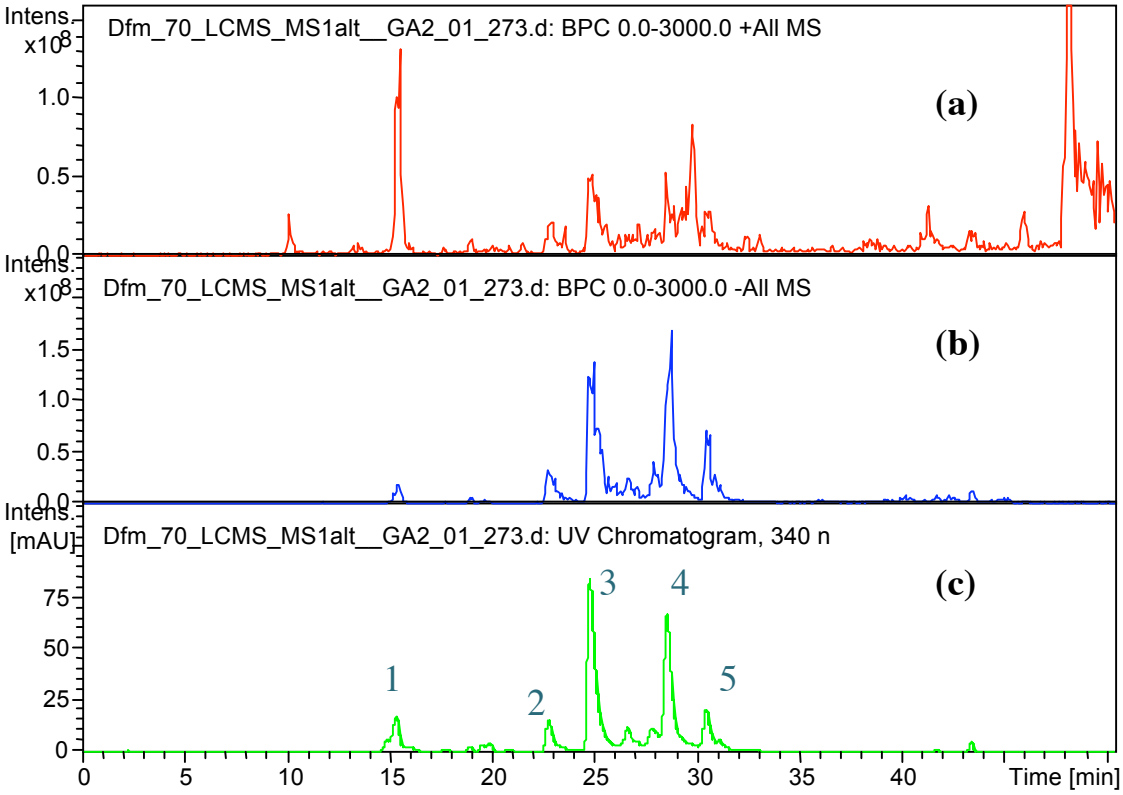


Abb. 57. Basispeak-Chromatogramm der 70%-MeOH-Fraktion (a) im positiv Modus, (b) im negativ Modus; (c) UV-Chromatogramm bei 340nm



Bei unseren Arbeiten zur Substanzanalytik waren uns die Beilstein Datenbank [13], die Publikation von Widén „Die Phloroglucide von *Dryopteris villarii* (Bell.) Woynar und anderer Farne der Gattung *Dryopteris* sowie die mögliche Abstammung von *D. filix-mas* (L.) Schott“ [7] und auch Widéns „Fast-Atom-Bombardment Mass Spectra of Phloroglucinols from Drypteris Ferns“ [8] äußerst hilfreich.
Im folgenden werden die Massenspektren der 5 größten Peaks im Chromatogramm bei 340nm diskutiert und mögliche Strukturvorschläge gemacht.

Peak 1 bei 15,1min zeigt im MS-1 im negativen Modus m/z 223 $[M\text{-}H]^-$ (Abb. 58) und im positiven Modus m/z 225 $[M+H]^+$ (Abb. 69). Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 224.

Abb. 58. MS-1 und MS-2 im neg. Modus, Peak 1 bei 15.1min

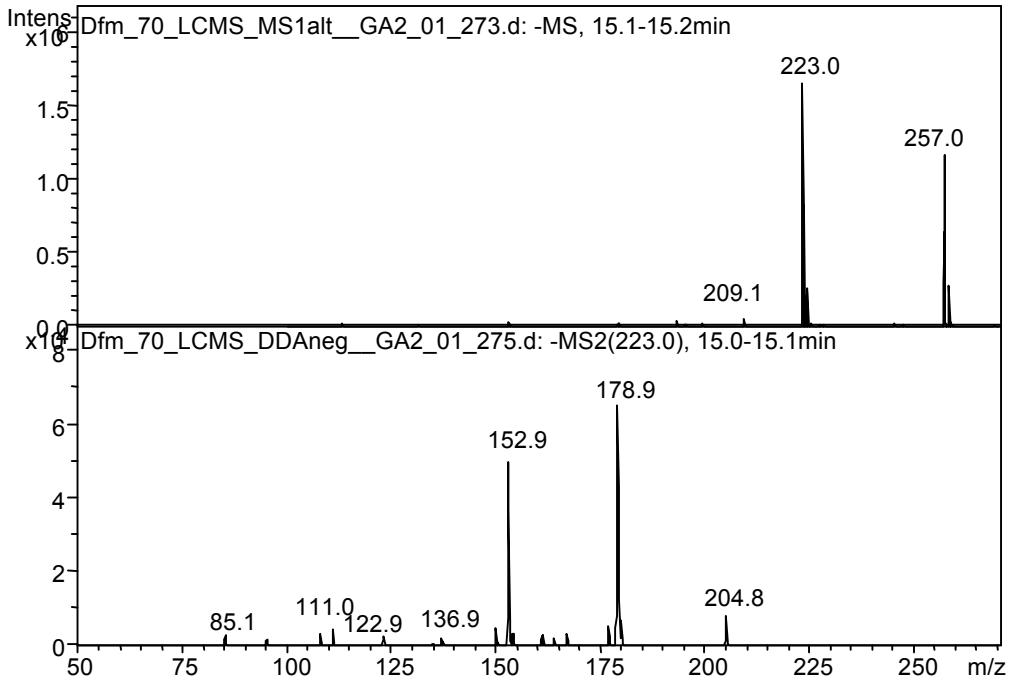
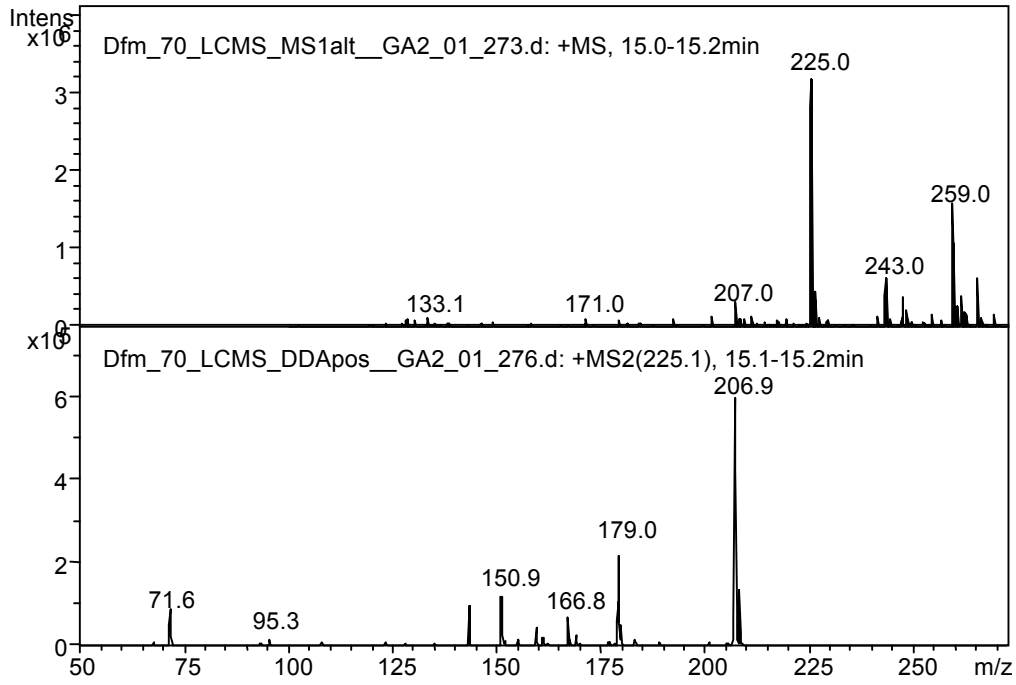


Abb. 59. MS-1 und MS-2 im pos. Modus, Peak 1 bei 15.1min



Mit diesem Molekulargewicht erhält man laut Literatur Aspidinol B und Butyrylfilicinsäure, welche in den nachstehenden 2 Abbildungen angeführt sind.

Abb. 60. Aspidinol B mit einem Molekulargewicht von 224.2

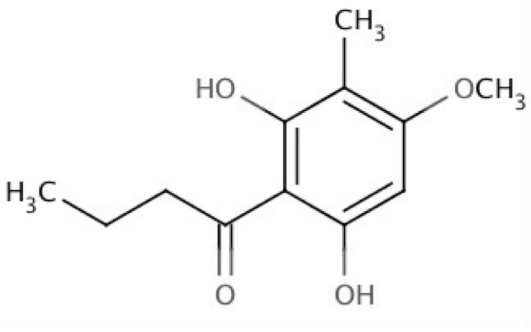
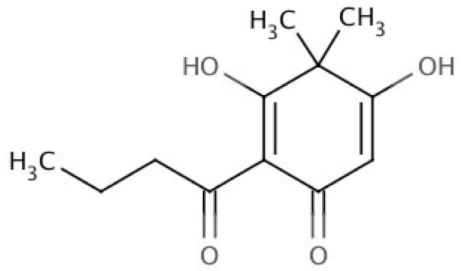


Abb. 61. Butyrylfilicinsäure mit einem Molekulargewicht von 224.2



Der Peak bei min 15,0-15,6 beschreibt einen Doppelpeak, bestehend aus zwei Substanzen, dessen Trennung offensichtlich nicht möglich war. Der erste Peak befindet sich bei 15,1min (siehe Abb. 58-59) und der zweite bei 15,3min. Der Vollständigkeit halber zeigen wir auch die Massenspektren des zweiten Peak, wenngleich wir für diesen keine Erklärung finden konnten.

Abb. 62. MS-1 und MS-2 im neg. Modus, Peak 1 bei 15.3min

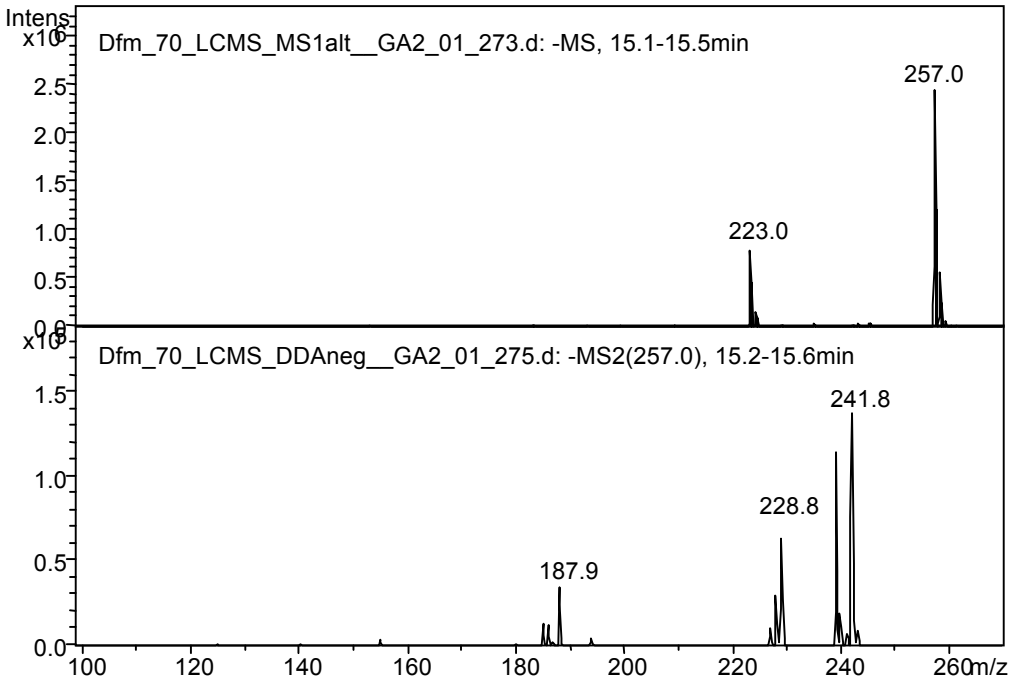
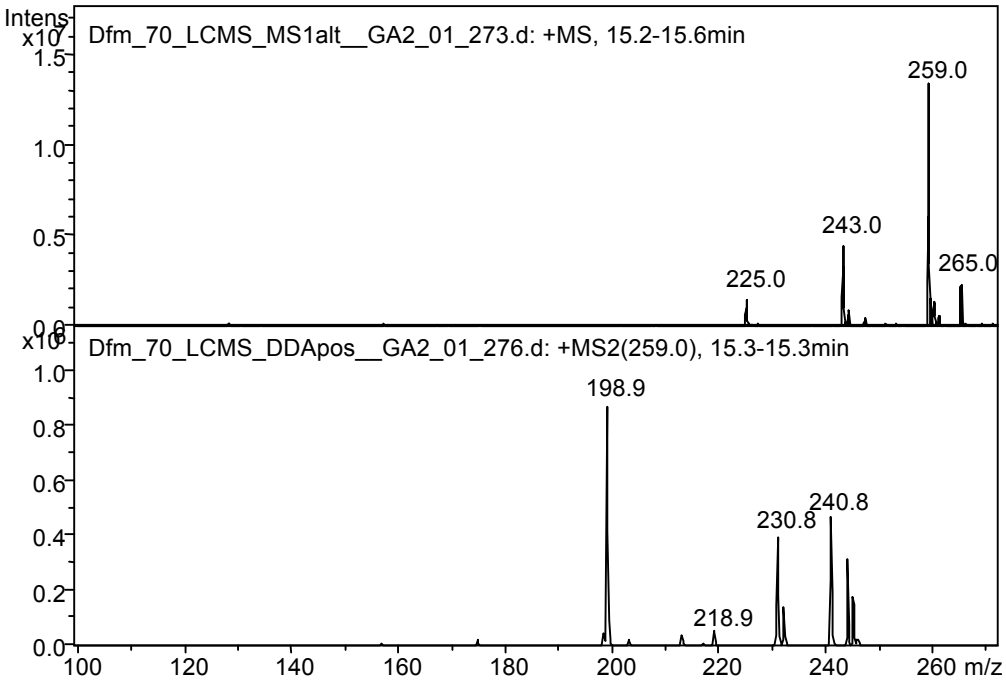


Abb. 63. MS-1 und MS-2 im pos. Modus, Peak 1 bei 15.3min



Peak 2 bei 22,6min zeigt im MS-1 im negativen Modus m/z 403 $[M\text{-}H]^-$ (Abb. 64) und im positiven Modus m/z 405 $[M+H]^+$ (Abb. 65). Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 404.

Abb. 64. MS-1 und MS-2 im neg. Modus, Peak 2 bei 22.6min

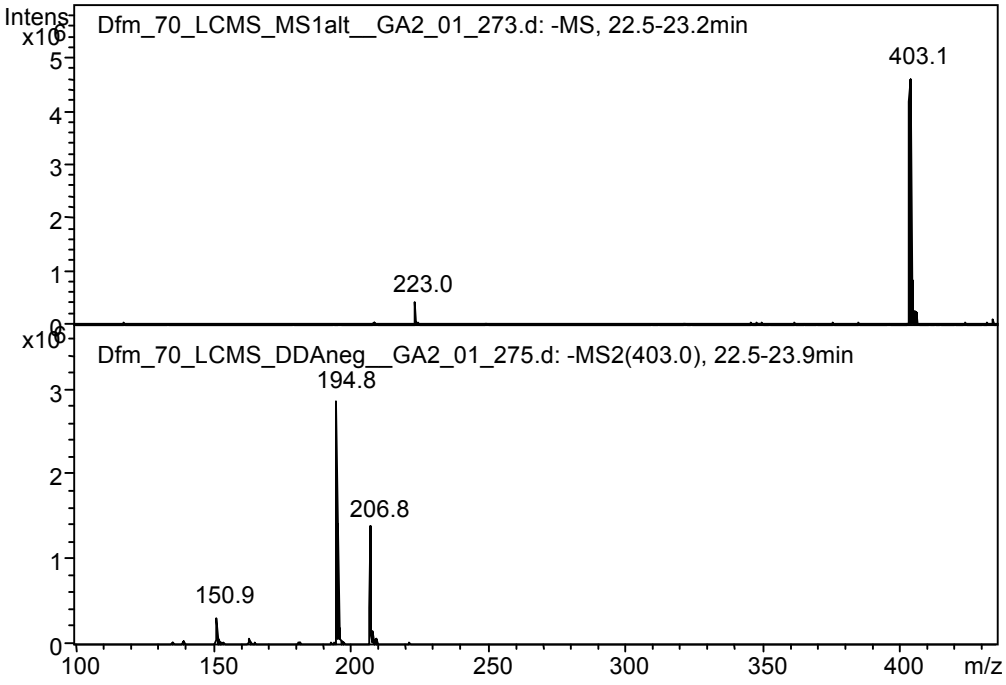
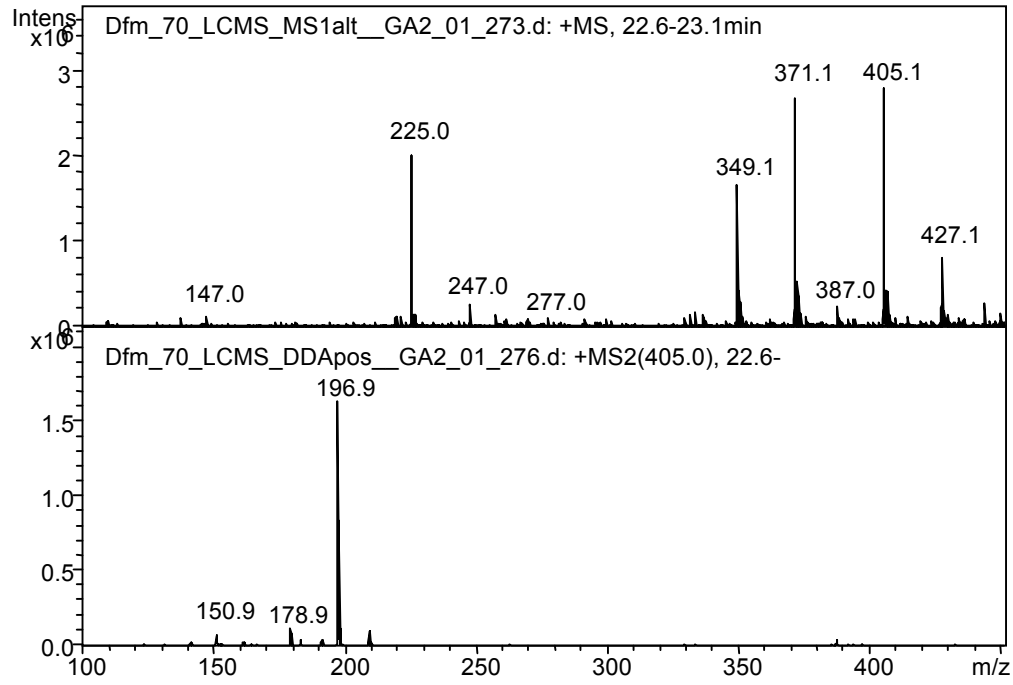


Abb. 65. MS-1 und MS-2 im pos. Modus, Peak 2 bei 22.6min



Die Abb. 66-68 zeigen die Substanz Methylen-bis-norflavaspidsäure BBBB, wobei Abb. 67 dem MS-1 und Abb. 70 dem MS-2 entspricht. Erklärbar wird der Zerfall der Substanz beispielsweise durch zeitbedingte Prozesse wie die Lagerung.

Abb. 66. Methylen-bis-norflavaspidsäure BBBB

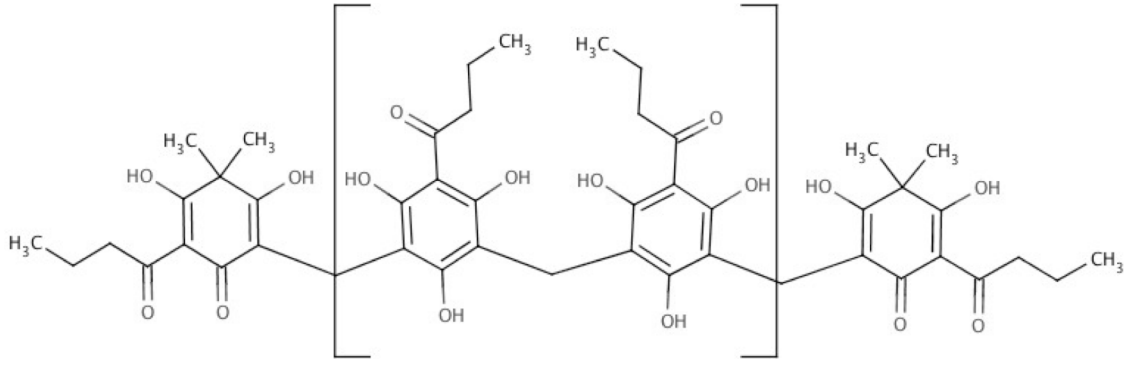


Abb. 67. Fragmentierungsmöglichkeiten von Methylen-bis-norflavaspidsäure BBBB mit einem Molekulargewicht von 404

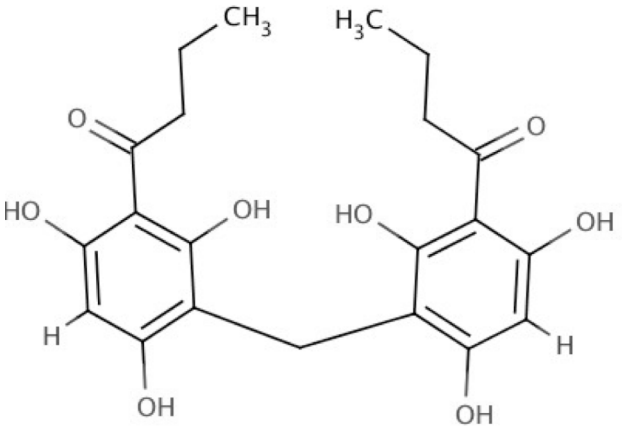
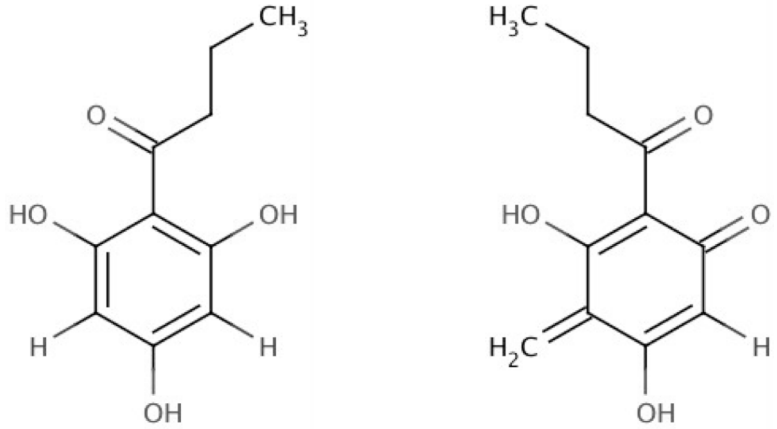


Abb. 68. Fragmentierungsmöglichkeiten des Fragments aus Abb. 67.



MG = 196 MG = 208

Peak 3 bei 24,8min zeigt im MS-1 im negativen Modus m/z 417 $[M\text{-}H]^-$ (Abb. 69) und im positiven Modus m/z 419 $[M+H]^+$ (Abb. 70). Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 418.

Abb. 69. MS-1 und MS-2 im neg. Modus, Peak 3 bei 24.8min

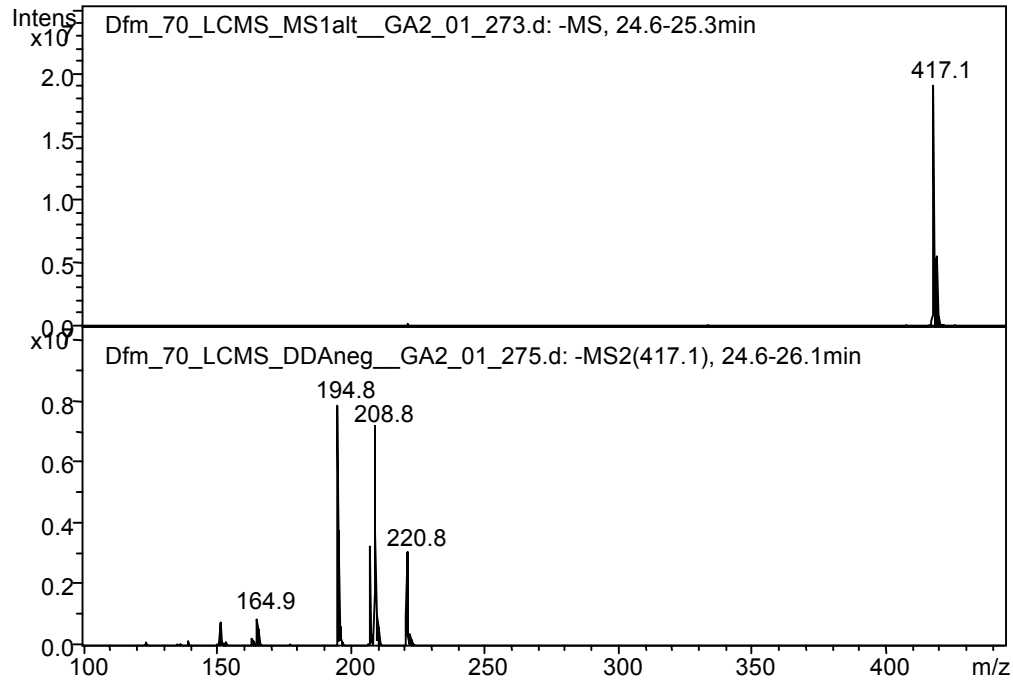


Abb. 70. MS-1 und MS2 im pos. Modus, Peak 3 bei 24.8min

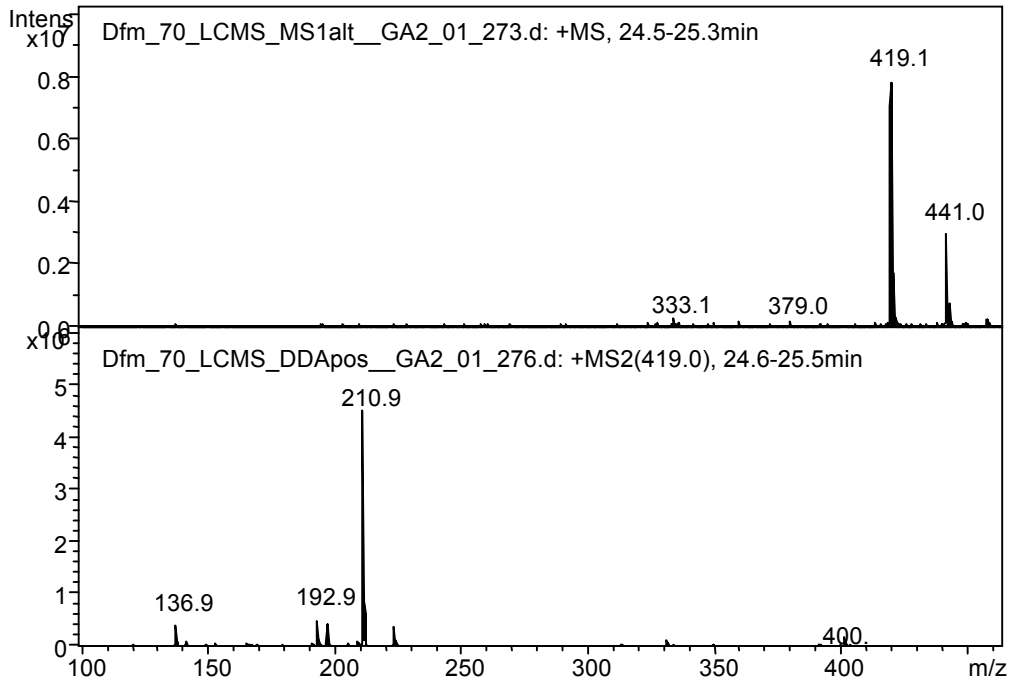


Abb. 71. Flavaspidsäure AB mit einem Molekulargewicht von 418.1

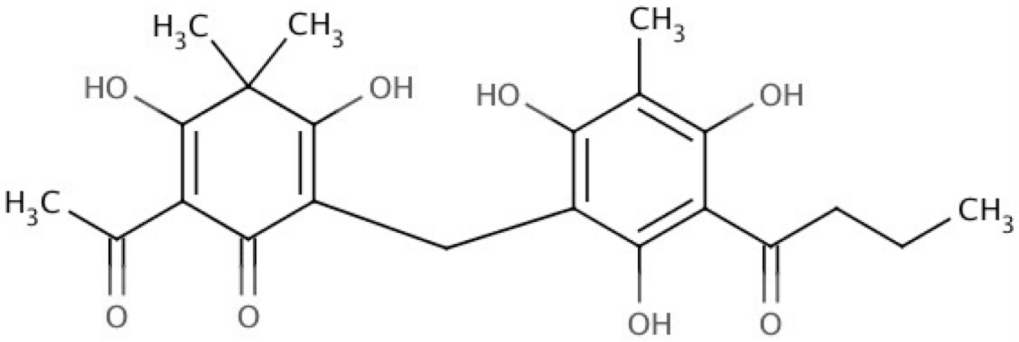
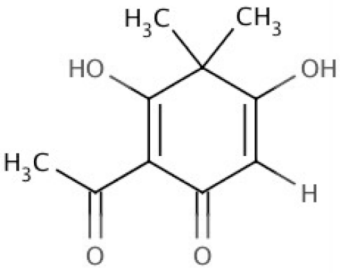
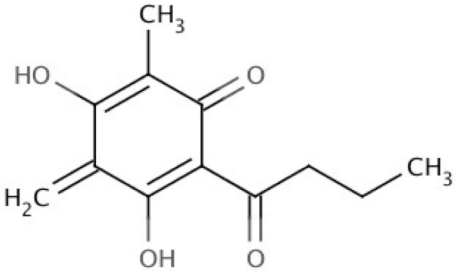


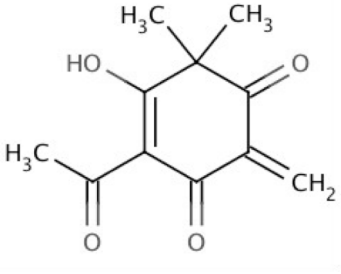
Abb. 72. Fragmentierungsmöglichkeiten der Flavaspidsäure AB



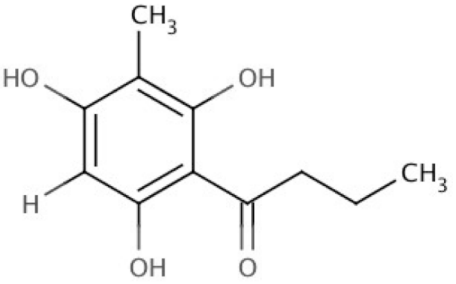
MG = 196



MG = 222



MG = 208



MG = 210

Peak 4 bei 28,4min zeigt im MS-1 im negativen Modus m/z 431 $[M\text{-}H]^-$ (Abb. 73) und im positiven Modus m/z 433 $[M+H]^+$ (Abb. 74). Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 432.

Abb. 73. MS-1 und MS-2 im neg. Modus, Peak 4 bei 28.4min

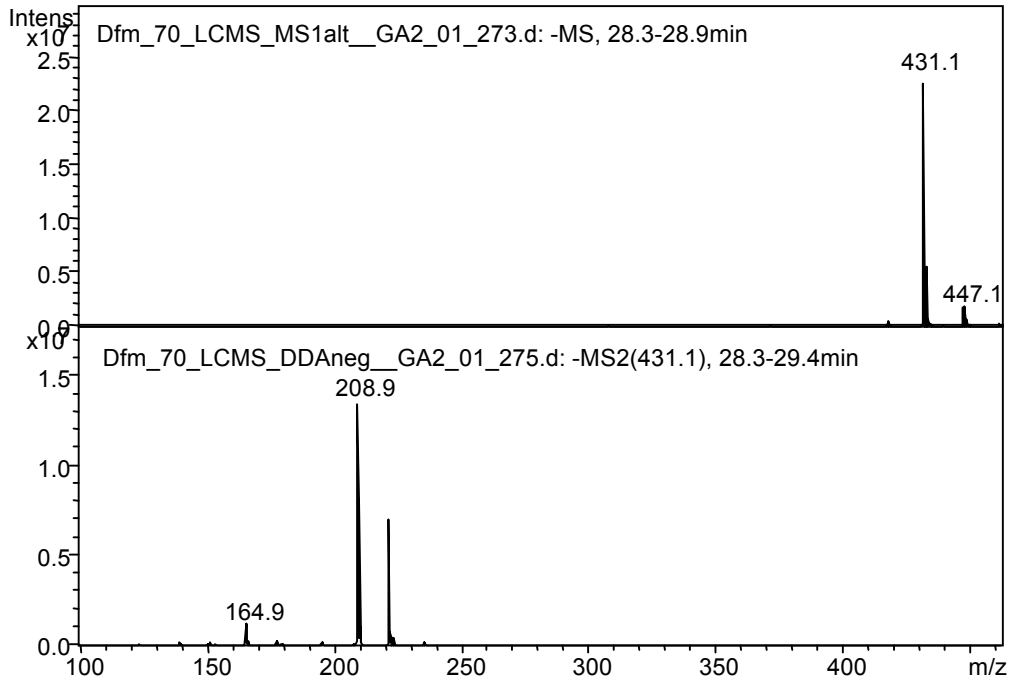


Abb. 74. MS-1 und MS-2 im pos. Modus, Peak 4 bei 28.4min

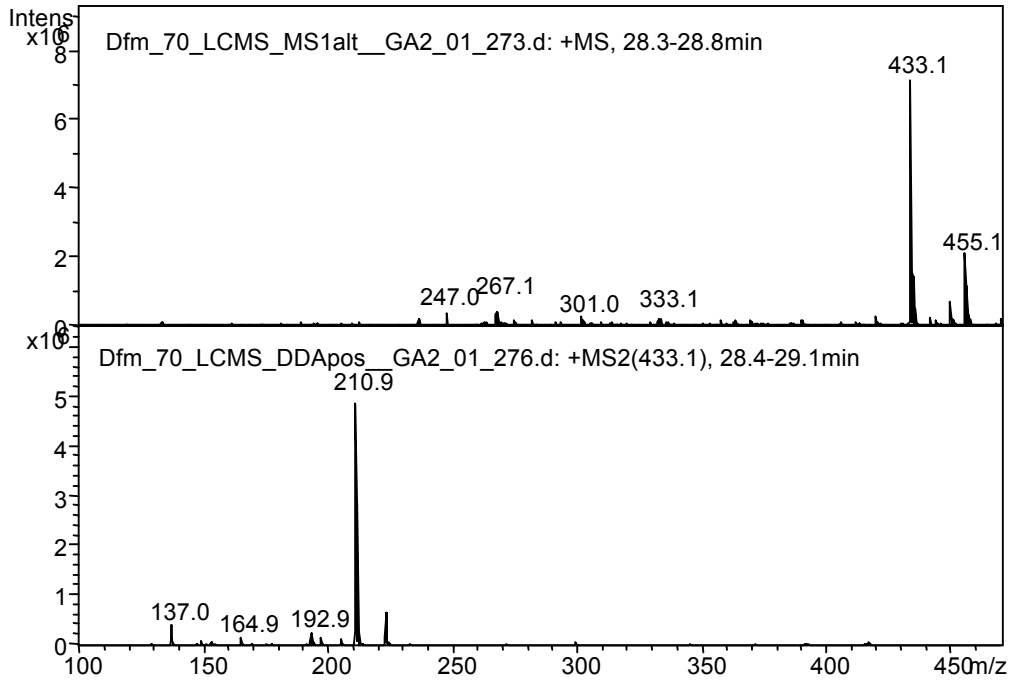
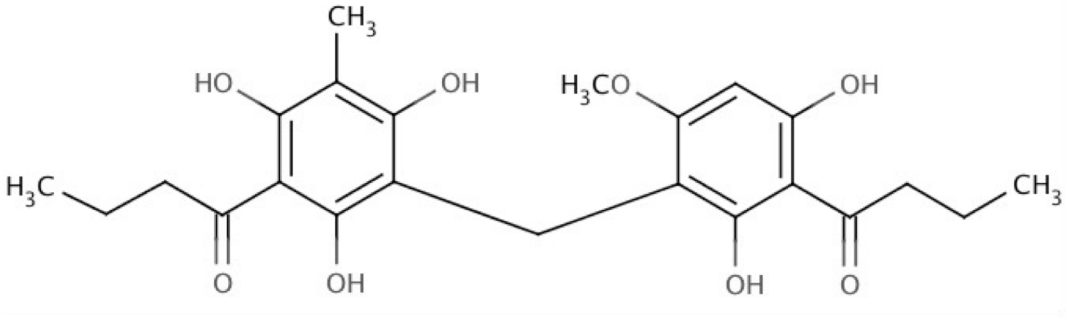
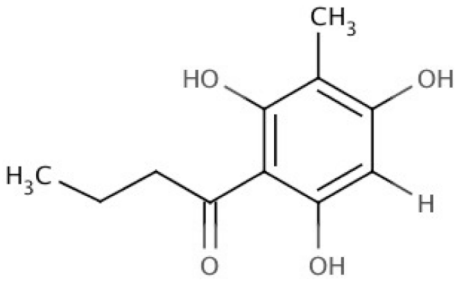


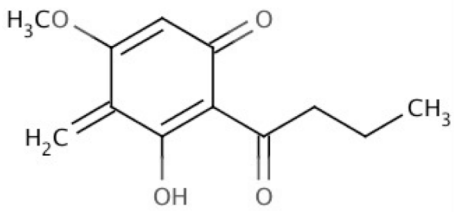
Abb. 75. Phloraspin BB mit einem Molekulargewicht von 432.5



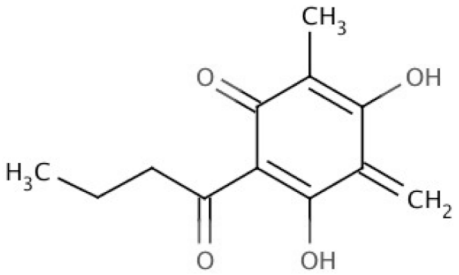
Ab. 76. Fragmentierungsmöglichkeiten von Phloraspin BB



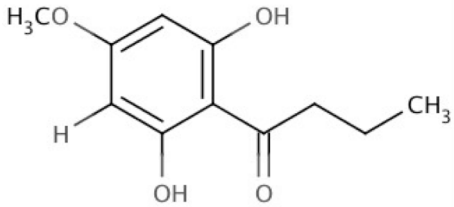
MG = 210



MG = 222



MG = 222



MG = 210

Peak 5 bei 30,4min zeigt im MS-1 im negativen Modus m/z 445 $[M-H]^-$ (Abb. 77) und im positiven Modus m/z 447 $[M+H]^+$ (Abb. 78). Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 446.

Abb. 77. MS-1 und MS-2 im neg. Modus, Peak bei min 30.4

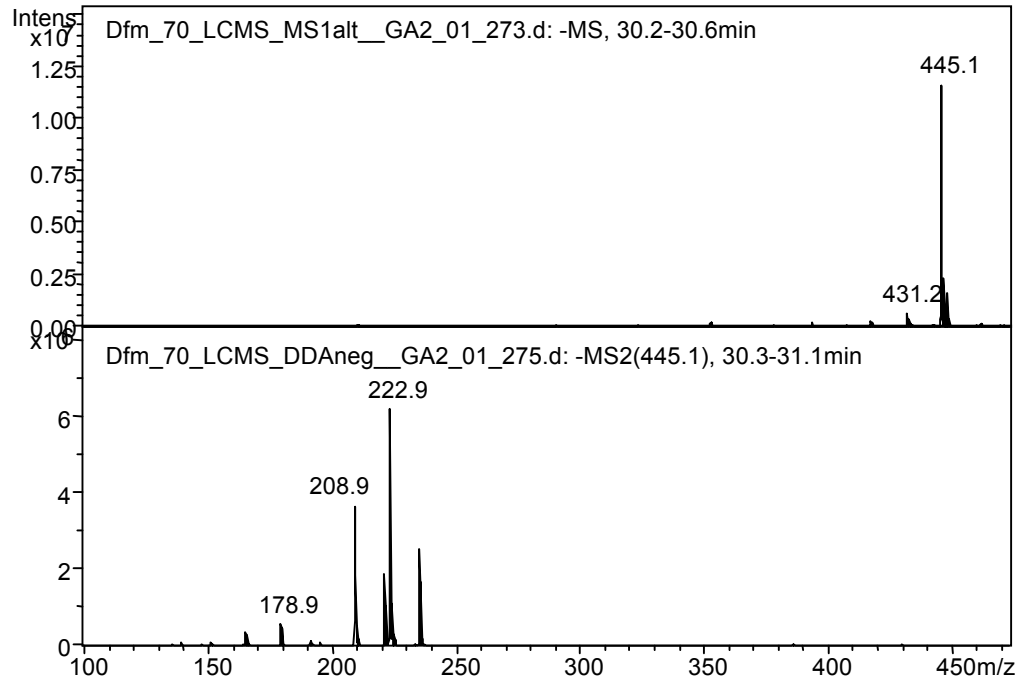


Abb. 78. MS-1 und MS-2 im pos. Modus, Peak bei min 30.4

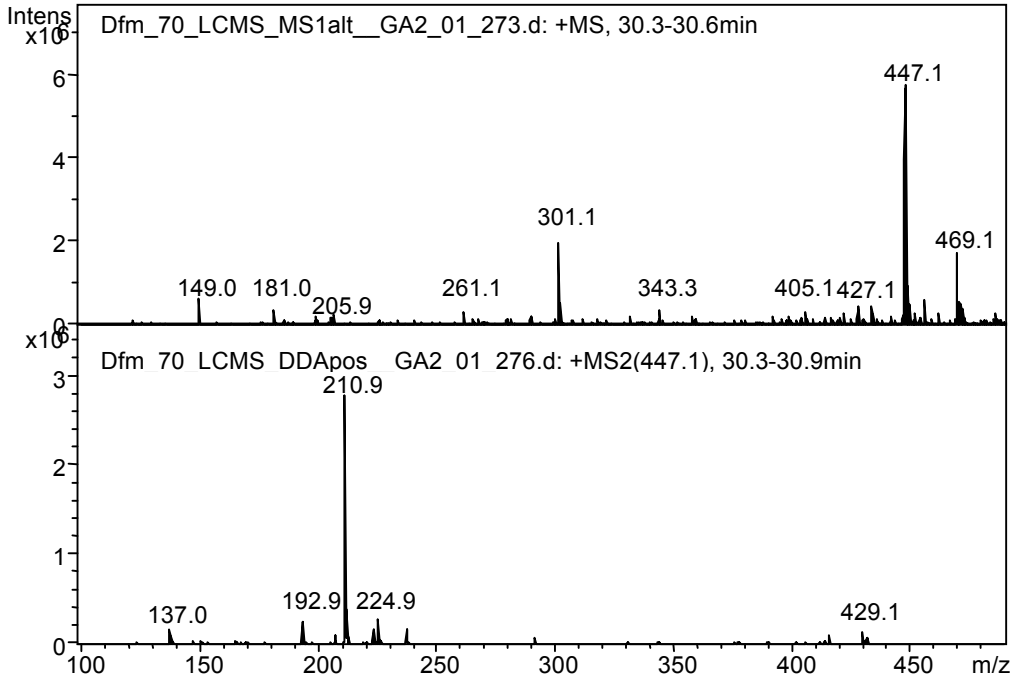


Abb. 79. Flavaspidsäure BB mit einem Molekulargewicht von 446.5

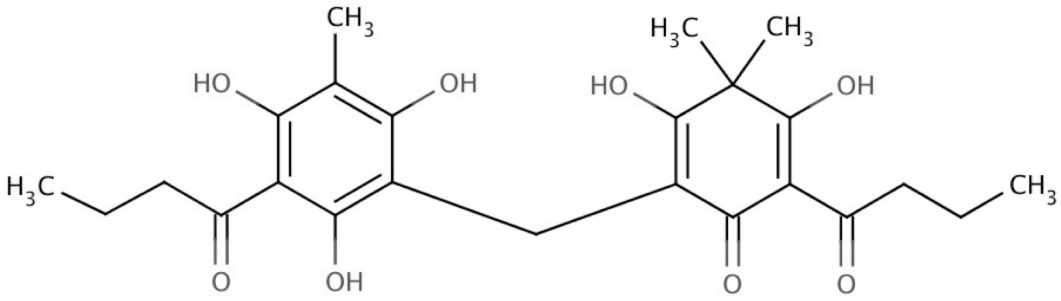
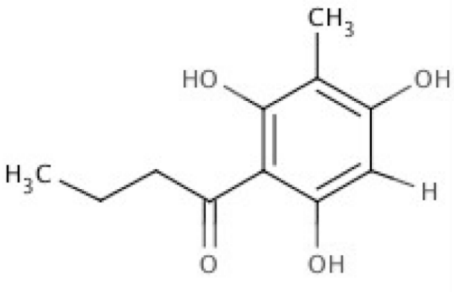
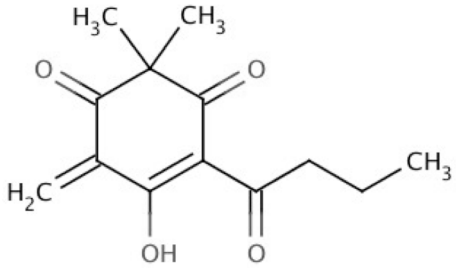


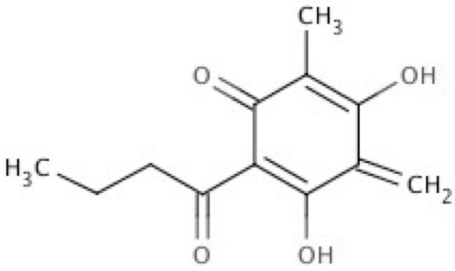
Abb. 80. Fragmentierungsmöglichkeiten der Flavaspidsäure BB



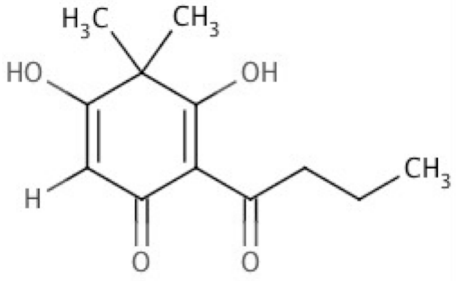
MG = 210



MG = 236



MG = 222



MG = 224

Abb. 81. Desaspidin mit einem Molekulargewicht von 446.5

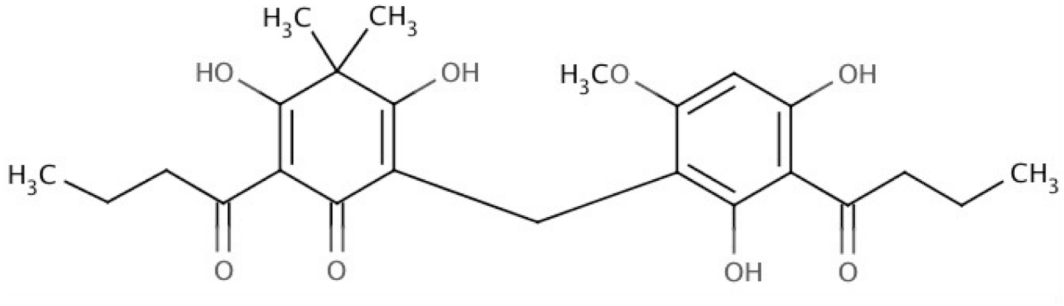
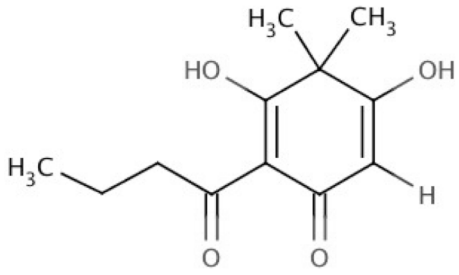
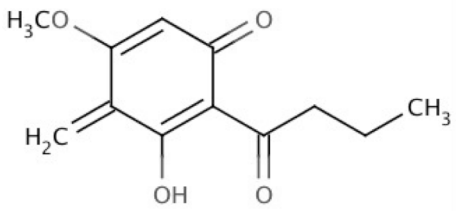


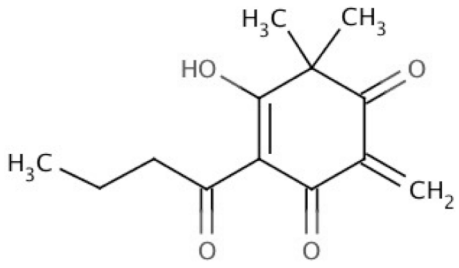
Abb. 82. Fragmentierungsmöglichkeiten des Desaspidin



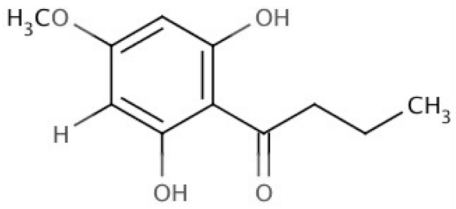
MG = 224



MG = 222



MG = 236



MG = 210

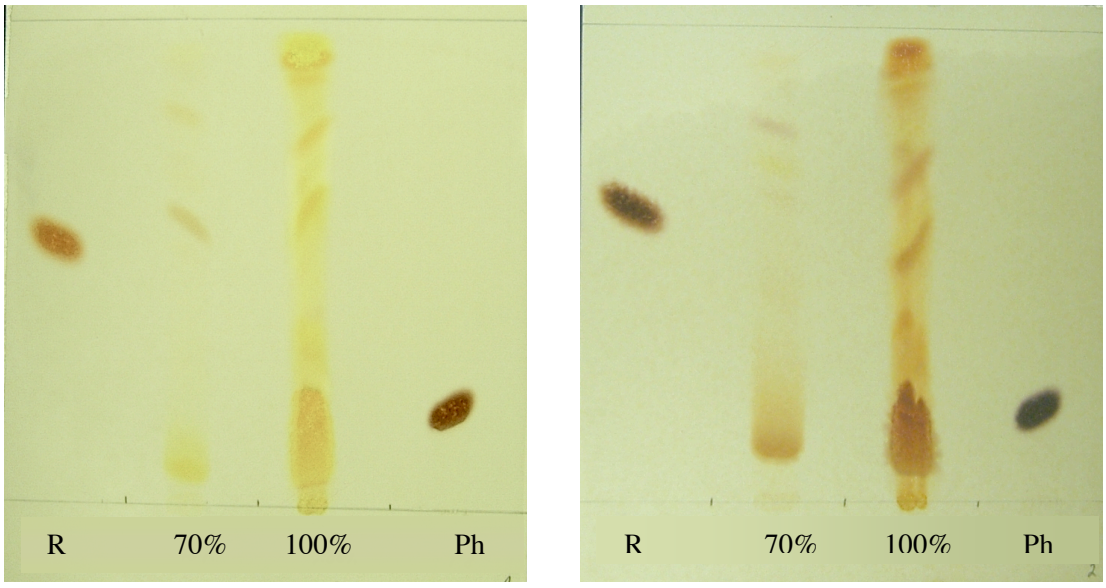
Somit konnten wir im LC-MS der 70%-MeOH-Fraktion nur Phloroglucinole entdecken, aber keine anderen Strukturen ausfindig machen. Hierbei handelt es sich allerdings nur um vorläufige Ergebnisse, und daher ist es unumgänglich, noch weitere Methoden zur Strukturaufklärung anzuwenden.

3.10. DC zur Auffindung der Stoffgruppe

Bei der LC-MS Analyse fanden wir Hinweise auf das Vorliegen verschiedener Phyloroglucinol-Derivate. Deshalb sollte versucht werden, ob das Vorkommen dieser Strukturen mittels DC bestätigt werden konnte.
Ausgehend von DC-Systemen aus der Literatur, entwickelten wir ein eigenes System, bei dem die mobile Phase aus einer 85:15-Mischung von Chloroform und Methanol bestand und die Trennstrecke 8cm nicht überschritt. Bei den 20cm-Platten verflüchtigte sich das Methanol aus der mobilen Phase, und die Trennung war nicht mehr erfolgreich.

Als Sprühreagenzien dienten „Echtblausalz B“ und „Echtrotsalz B“, welche besonders mit phenolischen Verbindungen reagieren. Als Referenzsubstanzen zogen wir Resorcin und Phloroglucin heran [5, 6].

Abb. 83. DC mit den Sprühreagenzien Echtrotsalz B (links) und Echtblausalz B (rechts) bei sichtbarem Licht



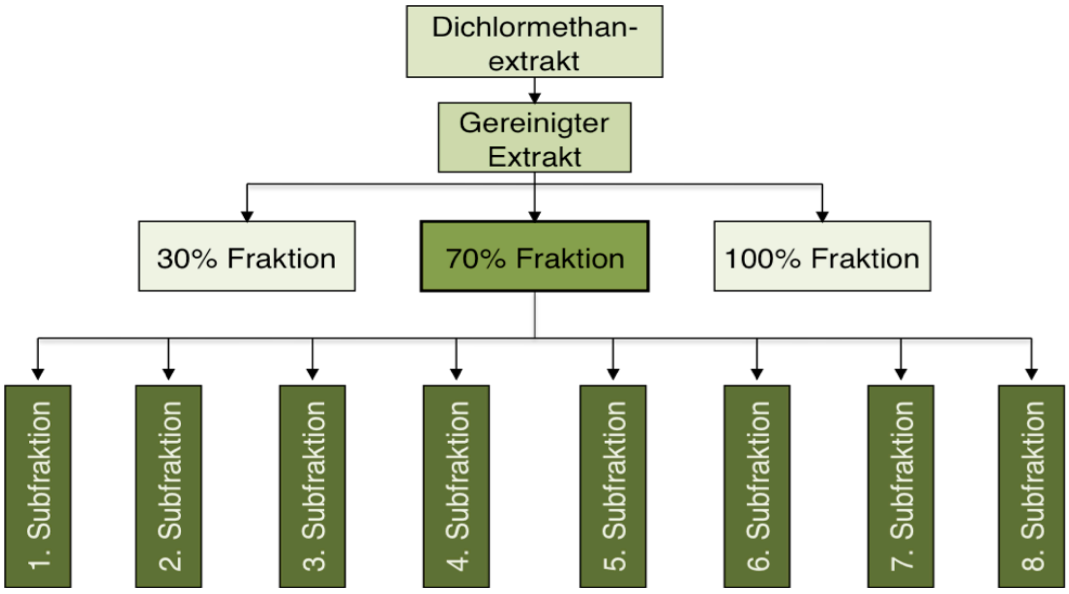
R	1mg Resorcin/ml MeOH	Auftragevolumen: 2μl
70%	2mg 70%-MeOH-Fraktion/ml MeOH	Auftragevolumen: 5μl
100%	2mg 100%-MeOH-Fraktion/ml MeOH	Auftragevolumen: 5μl
Ph	1mg Phloroglucin/ml MeOH	Auftragevolumen: 2μl

Auf der DC sind einzelne rotbraune Banden zu sehen, die - laut Literatur - die Phloroglucinole darstellen. Dabei ist erkennbar, dass in der 70%-MeOH-Fraktion andere Substanzen (bzw. weniger Phloroglucinole) vorhanden sind als in der 100%-MeOH-Fraktion [6].

3.11. NFκB-Test und PPAR-Tests als pharmakologische Untersuchungen

Zum besseren Verständnis soll nun eine kurze Zusammenfassung der bisherigen Arbeitsvorgänge gezeigt werden:
Nach der Herstellung eines Dichlormethanextraktes (36,38g Rohextrakt) aus dem pulverisierten Farnkraut und der Abtrennung des Chlorophylls (gereinigtes Extrakt: 4,76g) wurde mittels Festphasenextraktion (SPE) eine 30%-Methanol-Fraktion (0,81g), eine 70%-Methanol-Fraktion (1,75g) und eine 100%-Methanol-Fraktion (1,66g) erhalten.
Durch die semipräparative HPLC konnten aus der 70%-Methanol-Fraktion acht Subfraktionen (1-8) gewonnen werden. Als pharmakologische Untersuchungen wurden der NFκB-Test, der PPARα-Test und der PPARγ-Test gewählt, welche die entzündungshemmende Wirkung der einzelnen Subfraktionen in-vitro eruieren sollten.

Abb. 84. Darstellung des Frationierungsschemas



Beim NFκB-Test kann von einer guten Wirkung ab einer Inhibierung von 50% gegenüber der Kontrolle gesprochen werden. Der NFκB-Test wurde in drei unabhängigen Untersuchungen durchgeführt.

Bei diesem Zelltest kommt es durch eine Stimulierung mit TNFα zu einer Rezeptoraktivierung. Der gemessene Wert stellt die Kontrolle dar. Danach sollte die Rezeptorinhibierung erfolgen.

Als Positiv-Kontrolle dient Parthenolid, ein spezifischer NFκB-Hemmer in einer Dosierung von 5μM, welcher eine Reduktion auf 1-2% gegenüber der Kontrolle bewirkt. Als Leerwert diente der Rückstand der eingeengten mobilen Phase (aus der semipräparative Fraktionierung).

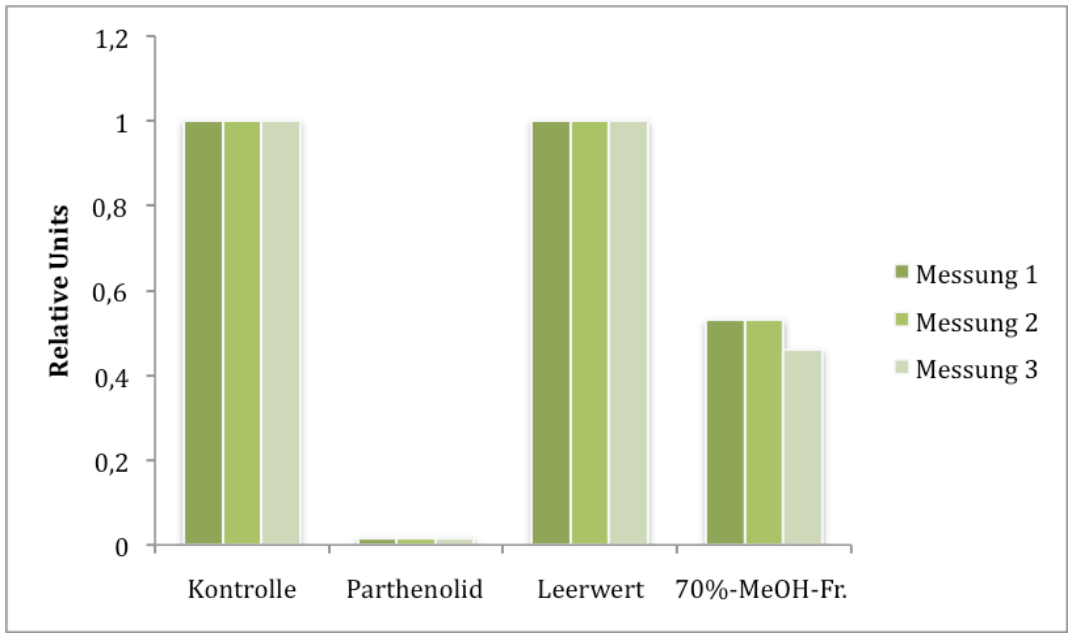
Alle Fraktionen wurden in einer Konzentraktion von 5μg/ml getestet.

Übersicht der pharmakologischen Ergebnisse:

Probe	Inhibierung von NFκB	Aktivierung von PPARα	Aktivierung von PPARγ
70%-MeOH-Fraktion	(1) 47% (2) 47% (3) 54%	nein	(1) 168% (2) 279%
Subfraktion 1	nein	nein	nein
Subfraktion 2	nein	nein	nein
Subfraktion 3	nein	nein	nein
Subfraktion 4	nein	nein	(1) 71% (2) 66%
Subfraktion 5	nein	nein	nein
Subfraktion 6	nein	nein	nein
Subfraktion 7	nein	nein	nein
Subfraktion 8	nein	nein	(1) 74% (2) 64%
Leerwert	nein	nein	nein

Folgende Grafiken sollen die Ergebnisse verdeutlichen.

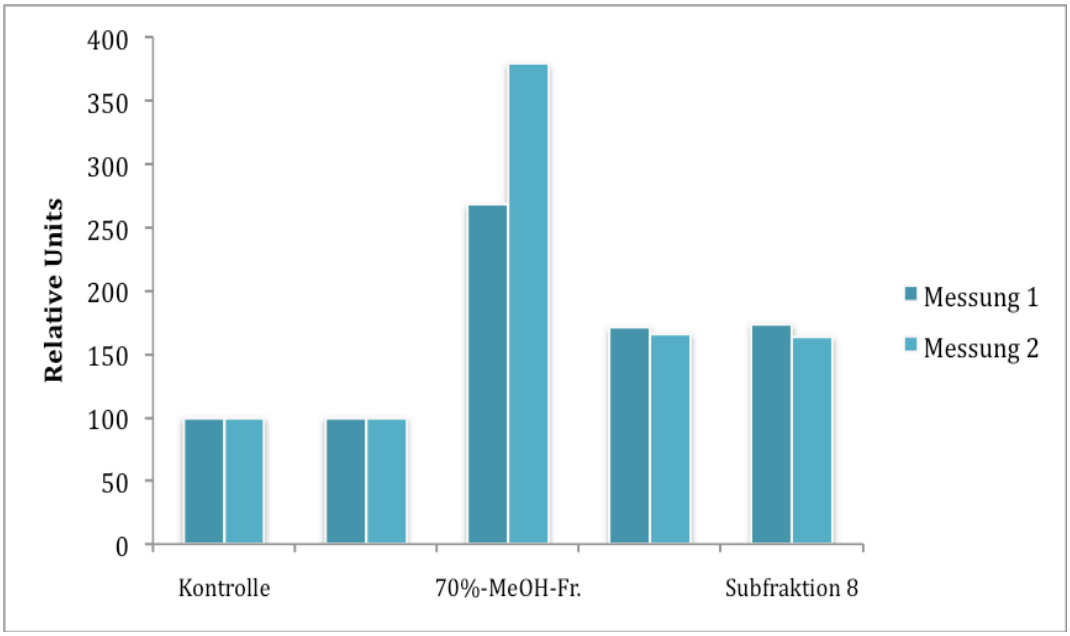
Abb. 85. Rezeptorinhibierung von NFκB



Die Subfraktionen zeigten keine Reduktion unter 50%, weshalb sie im Diagramm auch nicht aufscheinen.

Bei PPARα und PPARγ spricht man von einer guten Wirkung, wenn eine Aktivierung über 50% im Vergleich zur Kontrolle vorhanden ist. Hier wurden jeweils zwei Messwerte erhoben, wobei teilweise eine große Streuung der Werte zu beobachtet war.

Abb. 86. Rezeptoraktivierung von PPARγ



Zur Verdeutlichung wurden ausschließlich die signifikanten Ergebnisse in die Diagramme miteinbezogen.

Damit wird sichtbar, dass die gesamte 70%-MeOH-Fraktion eine gute Wirkung sowohl beim PPARγ- als auch beim NFκB-Test zeigte. Dasselbe Ergebnis brachte die 100%-MeOH-Fraktion.

Eine Aktivitätssteigerung von PPARα war nicht erkennbar, deshalb könnte es sich hierbei um eine selektive PPARγ-Aktivierung handeln.

Die Resultate der Subfraktionen sind eventuell auf die zu geringen Konzentrationen zurückzuführen, was durch eine Vereinigung der Subfraktionen mit neuerlichen pharmakologischen Untersuchungen beweisbar wäre.

Eine endgültige Erklärung zu den Untersuchungen muss einer nachfolgenden Diplomarbeit vorbehalten sein.

4. Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich in Fortsetzung vorangegangener Arbeiten mit der Bioassay-geleiteten Fraktionierung zur Auffindung potentiell antiphlogistischer Stoffe aus *Dryopteris filix-mas*.

Das Dichlormethanextrakt wurde vom Chlorophyll gereinigt und mittels SPE in drei Fraktionen aufgetrennt. Bei der 30%-MeOH-Fraktion wurde schon zuvor nur eine schwache Wirkung festgestellt.
Die 70%- und die 100%-MeOH-Fraktionen wiesen eine starke Ödemreduktion auf. Um die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe der 70%-MeOH-Fraktion analysieren zu können, wurden mittels sempräparativer HPLC acht Subfraktionen hergestellt und diese pharmakologisch mit in-vitro-Zellsystemen (PPARα-, PPARγ- und NFκB-Test) untersucht.

NFκB konnte nur beim 70%-MeOH-Extrakt inhibiert werden, was eventuell durch die niedrigere Konzentration der einzelnen Subfraktionen erklärbar ist.
Der PPARα-Test zeigte keine Aktivität.
Die 70%-MeOH-Fraktion, die 4. und die 8. Subfraktion steigerten beim PPARγ-Test die Aktivität.

Weiters wurde die 70%-MeOH-Fraktion mit Hilfe des LC-MS untersucht. Es konnten Strukturvorschläge zu den prominentesten Peaks erstellt werden. Dabei handelt es sich um verschiedene Acylphloroglucinol-Derivate, die in *Dryopteris filix-mas* bereits bekannt sind, aber nicht für die antiphlogistische Wirkung verantwortlich sind.

5. Literaturverzeichnis

[1] Ritter N., 2008, Diplomarbeit, Universität Wien

[2] Ismail S., 2009, Diplomarbeit, Universität Wien

[3] Rotter-le Beau T., 2008, Diplomarbeit, Universität Wien

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

[5] Die Quantitative Zusammensetzung der Filix-Phloroglucide von *Dryopteris filix mas* und *Dryopteris Austriaca ssp. Dilatata*; Von Schantz; Planta Medica 10 (1962)

[6] Drogenanalyse – Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen; Wagner, Bladt, Zgainski; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1983)

[7] Die Phloroglucide von *Dryopteris villarii* (Bell.) Woynar und anderer Farne der Gattung Dryopteris sowie die mögliche Abstammung von *D. filix-mas* (L.) Schott; Widén, Vida, Euw, Reichstein; Helvetica Chimica Acta – Vol. 54, Fasc. 8 (1971)

[8] Fast-Atom-Bombardment Mass Spectra of Phloroglucinols from Dryopteris Ferns; Widén, Pyysalo, Reichstein; Helvetica Chimica Acta – Vol. 77 (1994)

[9] Tremesberger M., 2007, Diplomarbeit, Universität Wien

[10] Sommergruber M., 2007, Diplomarbeit, Universität Wien

[11] Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis; Hänsel, Keller, Rimpler, Schneider; Springer-Verlag (1992)

[12] Analytik biogener Arzneistoffe, Band 4; Adam, Becker; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2000)

[13] MDL Cross Fire Commander, database: Beilstein (2009/02)

[14] Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms; Straus, Glass; Trends in Immunology – Volume 28, Issue 12 (2007)

[15] Huber K., 2009, Diplomarbeit, Universität Wien

[16] www.de.wikipedia.org (September 2009)

[17] www.wikipedia.com (August 2009)

[18] http://images.google.at/ (Juni 2009)

[19] http://patentdocs.typepad.com/ (September 2009)

[20] Gerlach S., 2007, Dissertation, Universität Wien

6. Lebenslauf

Christina Bruckner
Dörfl 2
A-3371 Neumarkt/Ybbs

Geboren:	06. 05. 1983, Scheibbs	
Eltern:	Bruckner Emilie, Arbeiterin und Nebenerwerbsbäuerin	
	Bruckner Leopold, Arbeiter und Nebenerwerbsbauer	
Nationalität:	Österreich	
Ausbildung:	10/2002 – dato	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
	09/1998 – 06/2002	Bundesoberstufenrealgymnasium Scheibbs
	09/1994 – 06/1998	Hauptschule Steinakirchen/Forst
	09/1990 – 06/1994	Volksschule Neumarkt/Ybbs
Berufliche Erfahrung:	10/2008 – 02/2010	Allerheiligenapotheke, Allerheiligenplatz 4, 1200 Wien
	03/2003 – 07/2003	Apotheke zum Weißen Hirschen, Westbahnstraße 19, 1070 Wien