



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Chemische Untersuchung von *Eriosema laurentii*

Verfasser

Gerald Pichler

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Ich möchte mich hiermit ganz herzlich bei Frau ao. Univ-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die Gelegenheit bedanken, meine Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe verfassen zu dürfen und für ihre umfangreiche und ausführliche Betreuung im Rahmen meiner Arbeit.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie, für die Ermöglichung der Durchführung meiner praktischen Arbeit durch Bereitstellung eines entsprechenden Arbeitsplatzes.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Sylvain Ateba, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und für seine Engelsgeduld.

Außerdem möchte ich mich noch bei Herrn Mag. Dr. Andreas Schinkovitz bedanken, der mir mit seiner Erfahrung und seinen Hinweisen oftmals weitergeholfen hat.

Ich bedanke mich auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Departments für Pharmakognosie, für ihre Unterstützung im Rahmen meiner Diplomarbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Material und Methoden.....	3
2.1	Material.....	3
2.2	Methoden.....	3
2.2.1	Extraktion.....	3
2.2.2	Säulenchromatographie.....	3
2.2.3	HPCCC.....	4
2.2.4	Dünnschichtchromatographie.....	4
2.2.4.1	Stationäre und mobile Phasen.....	5
2.2.4.2	Detektionsverfahren.....	5
2.2.5	HPLC.....	6
3	Ergebnisse.....	7
3.1	Flüssig-Flüssig-Verteilung.....	7
3.2	Dünnschichtchromatographische Vergleiche.....	8
3.2.1	DC – Vergleich von W-RUL und i-RUL mit Chlorogensäure und Flavonoiden.....	8
3.2.2	DC – Vergleich von W-RUL mit Zuckern.....	10
3.3	Aufarbeitung des unlöslichen Anteils i-RUL.....	11
3.3.1	HPLC - i-RUL.....	11
3.3.2	Dünnschichtchromatographischer Vergleich von i-RUL mit Genistin.....	13
3.4	Aufarbeitung der Chloroform/Isopropanol-Phase.....	14
3.4.1	Extraktion von Fraktion Ci-RUL mit Hexan.....	14
3.4.2	Extraktion von Fraktion R mit Methanol und Ethylacetat.....	16
3.4.3	Säulenchromatographie an Sephadex.....	20
3.4.4	High Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC).....	27
3.4.4.1	Auswahl des Fließmittelsystems.....	27
3.4.4.2	HPCCC 1.....	28
3.4.4.3	Optimierung des Fließmittelsystems.....	30
3.4.4.4	HPCCC 2.....	31
3.4.4.5	HPCCC 3.....	35
3.4.4.6	HPCCC 4.....	38
3.4.4.7	Zusammenfassung der HPCCC-Experimente.....	42

3.4.5	Dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgewählter Fraktionen mit Kaffeesäure.....	43
3.5	Aufarbeitung der Sammelfraktion 6 von HPCCC 4.....	44
4	Diskussion der Ergebnisse.....	46
5	Zusammenfassung.....	48
6	Summary.....	49
	Literaturverzeichnis.....	I
	Abbildungsverzeichnis.....	II
	Tabellenverzeichnis.....	III
	Curriculum Vitae.....	IV
	Anhang	

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Vertreter der Gattung *Eriosema*, die zur Familie der Schmetterlingsblütler (Fabaceae) gehört, sind vor allem in tropischen Regionen beheimatet, wobei man etwa 140 Species unterscheidet [1, 2].

Auch der im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchte Vertreter *Eriosema laurentii* DeWild. ist ein, vor allem in tropischen Gebieten verbreiteter Strauch. So stammt das Ausgangsmaterial für diese Arbeit, die unterirdischen Pflanzenteile von *Eriosema laurentii*, aus Kamerun (Zentralafrika).

Abbildung 1: *Eriosema laurentii* (Foto, Sylvain B. Ateba)



Etliche Vertreter der Gattung *Eriosema* (*E. kraussianum* Meisn., *E. englerianum* Harms, *E. rufum* G. Don.,...) sind in der traditionellen afrikanischen, chinesischen bzw. südamerikanischen Medizin in Gebrauch, wobei meist Dekokte der Wurzeln der entsprechenden Vertreter zum Einsatz kommen [1, 3, 4].

1. Einleitung und Zielsetzung

Ihr Anwendungsgebiet umfasst unter anderem Sterilität bei Frauen (*E. rufum*) [1] sowie Erektionsstörungen und Harnwegsbeschwerden bei Männern (*E. kraussianum*) [4, 5].

So wird auch *E. laurentii* in der traditionellen afrikanischen Medizin zur Fruchtbarkeitssteigerung bei Frauen und zur Förderung der Potenz bei Männern bzw. als „Aphrodisiakum“ eingesetzt.

In etlichen vorangegangenen Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen bestimmten Inhaltsstoffen der Wurzeln von *E. kraussianum* und ihren positiven Effekten bei erektiler Dysfunktion und Impotenz nachgewiesen werden [4 - 6].

Für diese Wirkung wurden vor allem Pyranosiflavonoide (Kraussianone) verantwortlich gemacht [2, 4 - 6].

Da es hinsichtlich der Inhaltsstoffe von *E. laurentii* noch keine näheren Untersuchungen gab und aufgrund ihres Einsatzes in der traditionellen afrikanischen Medizin, war es Zielsetzung dieser Arbeit, das Extrakt der unterirdischen Pflanzenteile von *E. laurentii* aufzutrennen und die für die Wirkung verantwortlichen Substanzen zu isolieren.

Abbildung 2: Details Herbarbeleg *E. laurentii*



2 Material und Methoden

2.1 Material

Ausgangsmaterial waren 43 g methanolisches Extrakt der gepulverten unterirdischen Pflanzenteile von *Eriosema laurentii*. Das Pflanzenmaterial stammte aus Kamerun (Zentralafrika), wo es bei Bazou gesammelt worden war.

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion

Das methanolische Extrakt (UEL) wurde mit Wasser extrahiert, um darin enthaltene Zucker zu entfernen (W-UL).

Der in Wasser unlösliche Rest (R-UL) wurde zwischen Chloroform/Isopropanol und Wasser verteilt:

24 g R-UL wurden in 20 ml Methanol im Ultraschallbad gelöst und im Scheidetrichter mit 1,5 l Chloroform/Isopropanol (3+2) und 1,5 l Wasser ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde bei 3500 U/min 20 min lang zentrifugiert.

Die organische Phase wurde am Rotovapor zur Trockene eingedampft, die wässrige Phase lyophilisiert. Daraus resultierten 17,3 g Chloroform/Isopropanol-Fraktion (Ci-RUL), 1,3 g unlöslicher Anteil (i-RUL) und 3,3 g Wasserfraktion (W-RUL).

2.2.2 Säulenchromatographie

Zur weiteren Auftrennung und Aufreinigung der jeweiligen Fraktionen wurde die Säulenchromatographie eingesetzt.

Als stationäre Phase wurde dabei Sephadex[®] LH 20 (Sigma) verwendet.

Als mobile Phase kamen verschiedene Mischungen von Methanol und Wasser zum Einsatz. Auf die jeweiligen Bedingungen wird in den entsprechenden Abschnitten genauer eingegangen.

2. Material und Methoden

Um die gewonnenen Fraktionen zu Sammelfraktionen zusammenfassen zu können, wurde jede fünfte bzw. jede zehnte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie untersucht und solche mit vergleichbarer Zusammensetzung vereinigt.

2.2.3 HPCCC

Zur weiterführenden Fraktionierung wurde auch die High Performance Countercurrent Chromatographie an einem Spectrum HPCCC-Gerät der Firma Dynamic Extractions, Plymouth, UK eingesetzt.

Säule: Dynamic Extractions Spectrum HPCCC - Semi-Preparative Säule
(Volumen: 170 ml)

Fließmittelsysteme: HPCCC 1: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser
(1 + 4 + 1 + 4)
HPCCC 2: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser
(2 + 3 + 2 + 3)
HPCCC 3: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser
(1 + 1 + 1 + 1)
HPCCC 4: Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser
(4 + 1 + 4 + 1)

Bei allen HPCCC-Trennungen wurde als mobile Phase die Oberphase und als stationäre Phase die Unterphase bei einer Flussrate von 6 ml/min und einer Drehzahl von 1620 rpm verwendet.

Es wurde jede fünfte bzw. jede zehnte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie untersucht und solche mit vergleichbarer Zusammensetzung vereinigt.

2.2.4 Dünnschichtchromatographie

Mittels DC wurde der Verlauf der durchgeführten Fraktionierungsschritte und Vergleiche der verschiedenen Extrakte mit Referenzsubstanzen durchgeführt.

2.2.4.1 Stationäre und mobile Phasen

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte Merck

- Mobile Phasen:
- (1) Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(60 + 32 + 12 + 8)
 - (2) Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)
 - (3) Ethylacetat + Ameisensäure conc. + Essigsäure conc.
+ Wasser (100 + 11 + 11 + 20)
 - (4) 2-Propanol + Aceton + Milchsäure conc.
(40 + 40 + 15)
 - (5) n-Butanol + Essigsäure conc. + Ether + Wasser
(9 + 6 + 3 + 1)
 - (6) Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(70 + 25 + 10 + 5)
 - (7) Ethylformiat + Toluol + Ameisensäure conc.
(50 + 50 + 15)
 - (8) Toluol + Ethylacetat
(93 + 7)

Konzentration der Auftragelösungen: Es wurden 0,1 mg der jeweiligen Substanz in 100 µl Methanol gelöst und 10 µl aufgetragen.

2.2.4.2 Detektionsverfahren

Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (NP/PEG)

Die entwickelte DC-Platte wird mit einer 1%igen Lösung von Naturstoffreagens A (Diphenylboryloxyethylamin) in Methanol und anschließend mit einer 5%igen Lösung von PEG 400 in Ethanol besprüht. Die Platte wird unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366nm ausgewertet [7].

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AAS)

0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml konzentrierter Essigsäure und 85 ml Methanol versetzt. Anschließend werden 5 ml konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt.

Die entwickelte DC-Platte wird mit dem Reagens besprüht und im Trockenschrank bei 100°C für 10 min erhitzt. Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht [7].

2. Material und Methoden

Naphthoresorcin-Butanol-Phosphorsäure-Reagens (NBP)

Die DC-Platte wird mit einer 0,2%igen Lösung von Naphthoresorcin in Butanol, das 10% Phosphorsäure enthält, besprüht.

Anschließend wird die DC-Platte im Trockenschrank bei 100°C für 10 min erhitzt.

Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht [8].

2.2.5 HPLC

<u>System:</u>	SHIMADZU
<u>Pumpe:</u>	LC-20AD
<u>Detektor:</u>	SPD M20A diode array detector,
<u>Column oven:</u>	CTO-20AC
<u>Auto injector:</u>	SIL-20AC HT
<u>Säule:</u>	Hypersil® BDS-C18, 5µm, 4.0 x 250mm (Fa. Agilent)
<u>Mobile Phase:</u>	A: 0,03M wässrige Essigsäure (pH 3) B: CH ₃ CN/0,03M wässrige Essigsäure (pH 3) (80+20)
<u>Gradient:</u>	5% B 5 min 5-20% B 10 min 20% B 25 min 20-26% B 20 min
<u>Purge:</u>	100% B 6 min
<u>Detektion:</u>	340 nm
<u>Flussrate:</u>	1,0 ml/min
<u>Injektionsvolumen:</u>	10 µl
<u>Druck:</u>	120 bar
<u>Temperatur:</u>	25 °C

3 Ergebnisse

Das methanolische Extrakt (UEL) wurde zur Auftrennung der enthaltenen Substanzen weiter fraktioniert. Dabei wurden verschiedene Methoden angewandt. Es wurde wie folgt vorgegangen.

3.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung

Um keine Inhaltsstoffe durch Adsorptionsprozesse zu verlieren, ist die Flüssig-Flüssig-Verteilung die optimale Möglichkeit, um im 1. Schritt zu fraktionieren.

Daher erfolgte die Verteilung von UEL zwischen Chloroform/Isopropanol und Wasser.

Aus der Flüssig-Flüssig-Verteilung des methanolischen Extraktes der unterirdischen Pflanzenteile von *Eriosema laurentii* gingen 3 Fraktionen hervor (siehe 2.2.1, Seite 3):

-) Wasserfraktion (W-RUL)
-) unlöslicher Anteil (i-RUL)
-) Chloroform/Isopropanol-Fraktion (Ci-RUL)

Die 3 Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch verglichen (siehe Abbildung 3, Seite 8)

Abbildung 3: DC - Vergleich von W-RUL, i-RUL und Ci-RUL

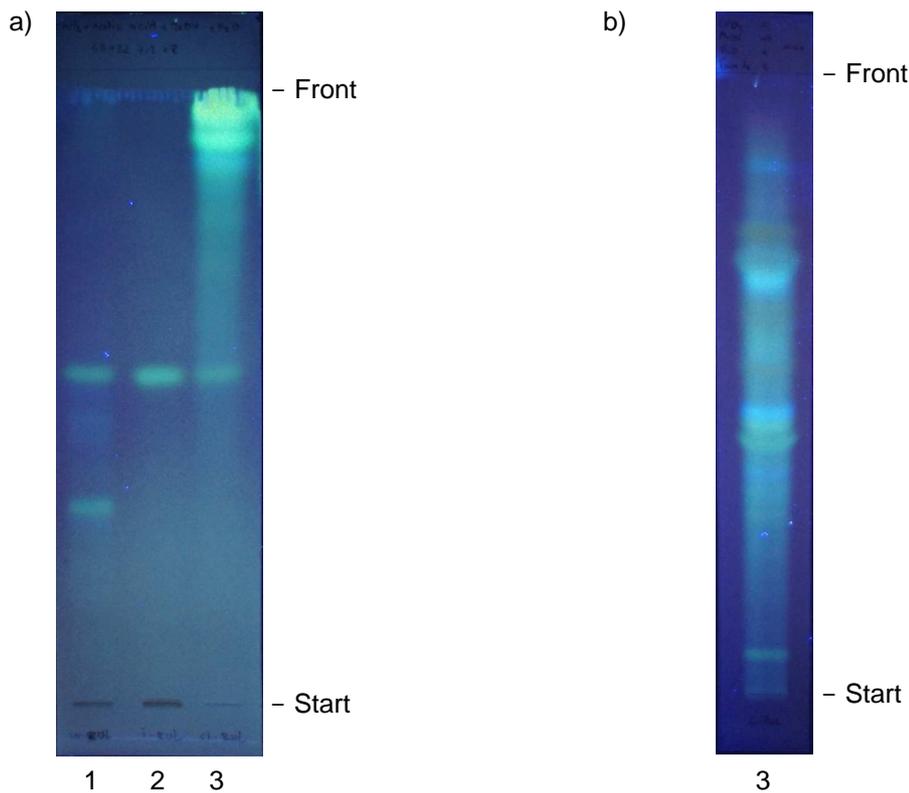
Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 7 x 20 cm und 3 x 20 cm

Mobile Phase: a) Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser
(60 + 32 + 12 + 8)

b) Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)

3. Ergebnisse



Bahn	Substanz
1	W-RUL
2	i-RUL
3	Ci-RUL

Die Dünnschichtchromatographie zeigte, dass in W-RUL 2 Komponenten angereichert werden konnten, eine bei R_f ca. 0,32 und eine weitere bei R_f ca. 0,53. In i-RUL lag 1 Komponente bei R_f ca. 0,53 fast rein vor. Bei Ci-RUL war der Hauptanteil der Komponenten an der Front eluiert worden, daher wurde eine weitere DC mit einem stärker polaren Laufmittel durchgeführt. Die resultierende DC zeigte eine bessere Auftrennung der Komponenten in Ci-RUL.

3.2 Dünnschichtchromatographische Vergleiche

3.2.1 DC – Vergleich von W-RUL und i-RUL mit Chlorogensäure und Flavonoiden

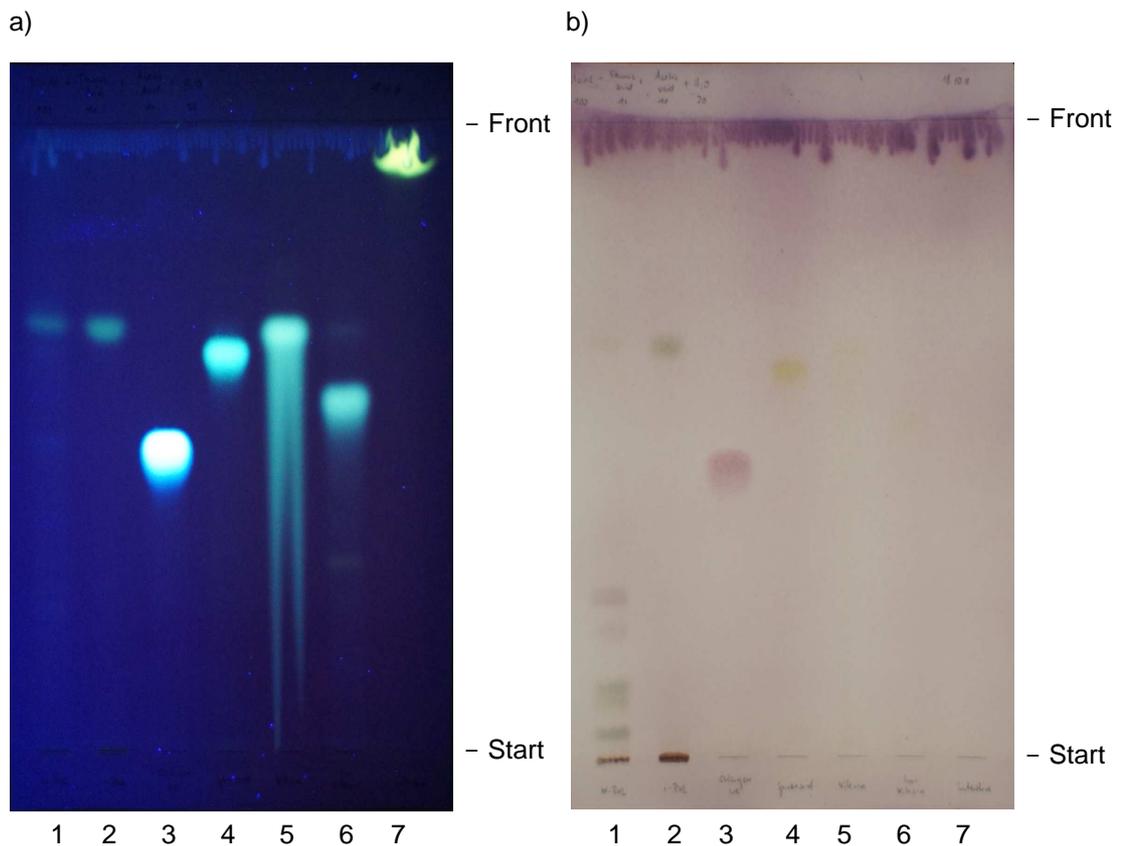
Aufgrund der bläulichen Fluoreszenz der Hauptkomponente in W-RUL und i-RUL wurden Flavonoide mit grünlichblauer – blauer Fluoreszenz [9] als Vergleiche herangezogen.

Abbildung 4: DC - Vergleich W-RUL und i-RUL mit Chlorogensäure und Flavonoiden

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 15 x 20 cm

Mobile Phase: Ethylacetat + Ameisensäure conc. + Essigsäure conc. + Wasser
(100 + 11 + 11 + 20)

Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)
b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)



Bahn	Substanz
1	W-RUL
2	i-RUL
3	Chlorogensäure
4	Spiraeosid

Bahn	Substanz
5	Vitexin
6	Isovitexin
7	Luteolin

Die DC zeigte keine Übereinstimmung zwischen Komponenten aus W-RUL und i-RUL mit den Referenzsubstanzen. Es waren deutliche Unterschiede in der Färbung und den Laufstrecken im Vergleich mit den Vergleichssubstanzen festzustellen. Es konnte daher ausgeschlossen werden, dass diese Substanzen in den beiden Fraktionen enthalten waren.

3. Ergebnisse

3.2.2 DC – Vergleich von W-RUL mit Zuckern

Da in Fraktion W-RUL aufgrund der Polarität der Komponenten das Vorliegen von Zuckern vermutet wurde, wurde ein dünnenschichtchromatographischer Vergleich mit Zuckern durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche mobile Phasen und Detektionsmethoden angewandt.

Abbildung 5: DC - Vergleich W-RUL mit Zuckern (AAS) (siehe Abbildung 5)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 13 x 20 cm
 Mobile Phase: 2-Propanol + Aceton + Milchsäure conc. (40 + 40 + 15)
 Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)

Abbildung 6: DC - Vergleich W-RUL mit Zuckern (NBP) (siehe Abbildung 6)

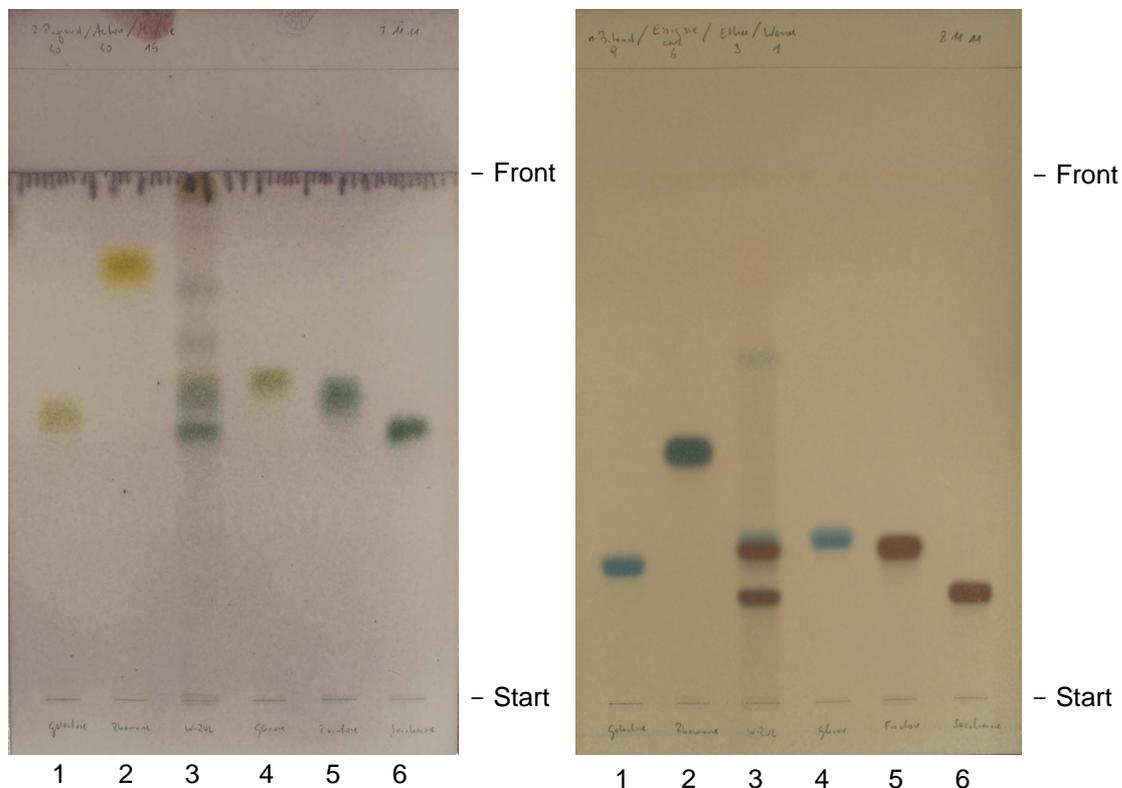
Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 13 x 20 cm
 Mobile Phase: n-Butanol + Essigsäure conc. + Ether + Wasser (9 + 6 + 3 + 1)
 Detektion: Naphthoresorcin-Butanol-Phosphorsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)

Abbildung 5:

Abbildung 6:

DC - Vergleich W-RUL mit Zuckern (AAS)

DC - Vergleich W-RUL mit Zuckern (NBP)



Bahn	Substanz
1	Galactose
2	Rhamnose

Bahn	Substanz
3	W-RUL
4	Glucose

Bahn	Substanz
5	Fructose
6	Saccharose

Aufgrund der Färbung der Banden von Glucose, Fructose und Saccharose und ihrer Laufstrecken, die auch bei Anwendung unterschiedlicher mobiler Phasen und Detektionsreagenzien mit Komponenten von W-RUL übereinstimmten, konnte gezeigt werden, dass diese 3 Zucker in hoher Konzentration in W-RUL enthalten waren.

3.3 Aufarbeitung des unlöslichen Anteils i-RUL

Im Zuge der Flüssig-Flüssig-Verteilung des methanolischen Extraktes der unterirdischen Pflanzenteile von *Eriosema laurentii* wurden 1,3 g dieses in Wasser und Chloroform/Isopropanol nicht löslichen Anteils abgetrennt.

Im DC-Vergleich der 3 Fraktionen W-RUL, i-RUL und Ci-RUL (siehe Abbildung 3, Seite 8) zeigte sich bei dieser Fraktion eine Hauptkomponente, die im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm grünlich fluoreszierte.

Zur Abklärung der Reinheit dieser Substanz wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt (Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 6).

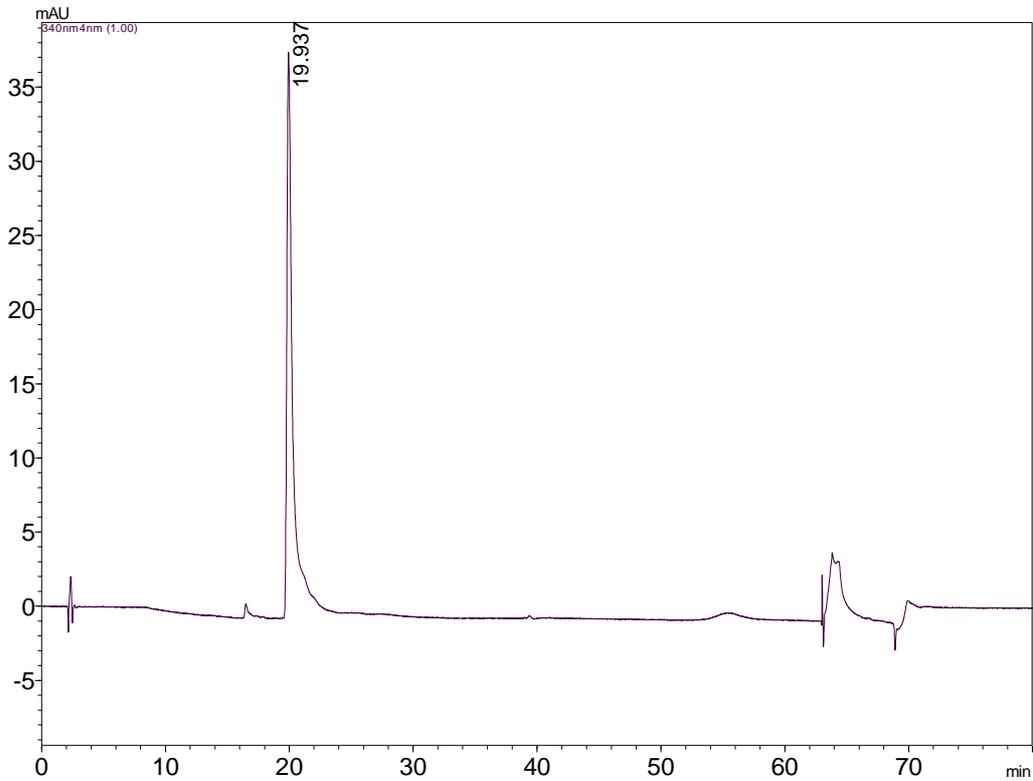
3.3.1 HPLC – i-RUL

Für die Analyse wurde 1 mg i-RUL in 1 ml MeOH/H₂O (75:5) gelöst und 10 µl der Lösung analysiert.

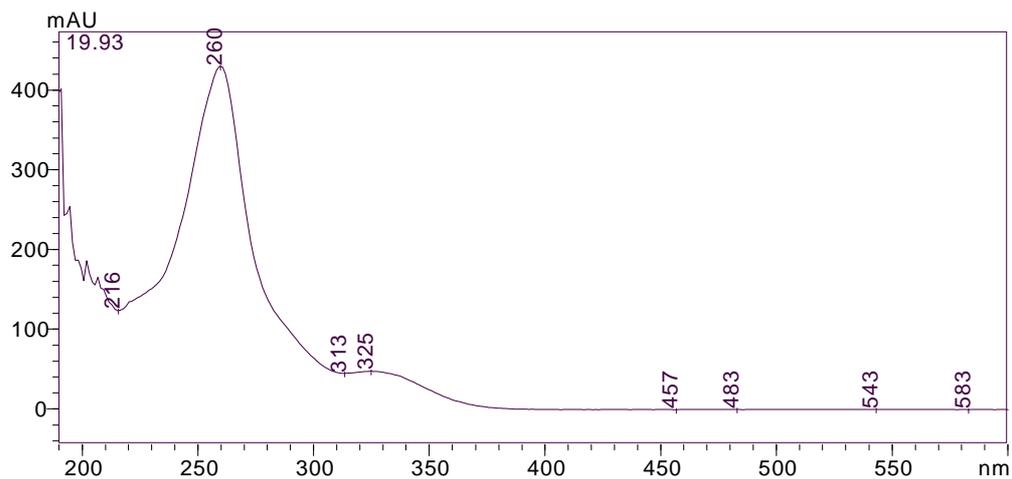
3. Ergebnisse

Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm von i-RUL

Bedingungen siehe Seite 6.



UV-Spektrum:



Das erhaltene Chromatogramm zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 19,93 min. Da das UV-Spektrum der Substanz Ähnlichkeit mit Genistin zeigte, wurde ein dünn-schicht-chromatographischer Vergleich mit einer authentischen Substanz durchgeführt.

3.3.2 Dünnschichtchromatographischer Vergleich von i-RUL mit Genistin

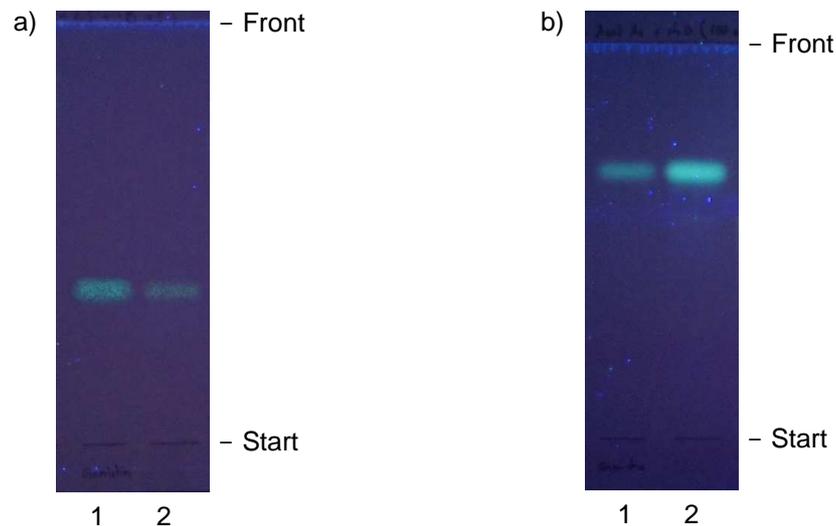
Um das Resultat der HPLC zu bestätigen, wurden zwei DC-Platten mit unterschiedlichen mobilen Phasen entwickelt.

Abbildung 8: DC - Vergleich von i-RUL mit Genistin

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 3,5 x 10 cm

Mobile Phase: a) Chloroform + Essigsäure conc. + Methanol + Wasser (70 + 25 + 10 + 5)
b) Ethylacetat + Ameisensäure conc. + Essigsäure conc. + Wasser (100 + 11 + 11 + 20)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)



Bahn	Substanz
1	Genistin
2	i-RUL

Auf den DCs war zu erkennen, dass die Substanz in i-RUL, auch bei Anwendung unterschiedlicher mobiler Phasen, die gleiche Laufstrecke und Fluoreszenz bei Betrachtung unter UV-Licht aufwies wie Genistin.

Aufgrund der HPLC-Analyse und des dünnschichtchromatographischen Vergleiches konnte Genistin fast rein in i-RUL nachgewiesen werden.

3.4 Aufarbeitung der Chloroform/Isopropanol-Phase

Die Chloroform/Isopropanol-Phase (Ci-RUL) enthielt ein komplexes Gemisch an Inhaltsstoffen (siehe Abbildung 3, Seite 8). Um dieses Gemisch weiter aufzutrennen, wurden zusätzliche Fraktionierungsschritte durchgeführt.

3.4.1 Extraktion von Fraktion Ci-RUL mit Hexan

16 g Ci-RUL wurden mit 100 ml Hexan im Ultraschallbad suspendiert und die Hexan-Phase (H-CiRUL) nach dem Zentrifugieren (20 min, 3500 U/min) abgenommen und am Rotovapor zur Trockene eingedampft.

Der in Hexan unlösliche Rest (R) wurde im Exsiccator getrocknet.

Aus diesem Extraktionsschritt resultierten 0,48 g der gelben und öligen Hexan-Fraktion (H-CiRUL) und 15,27 g unlöslicher Anteil (R).

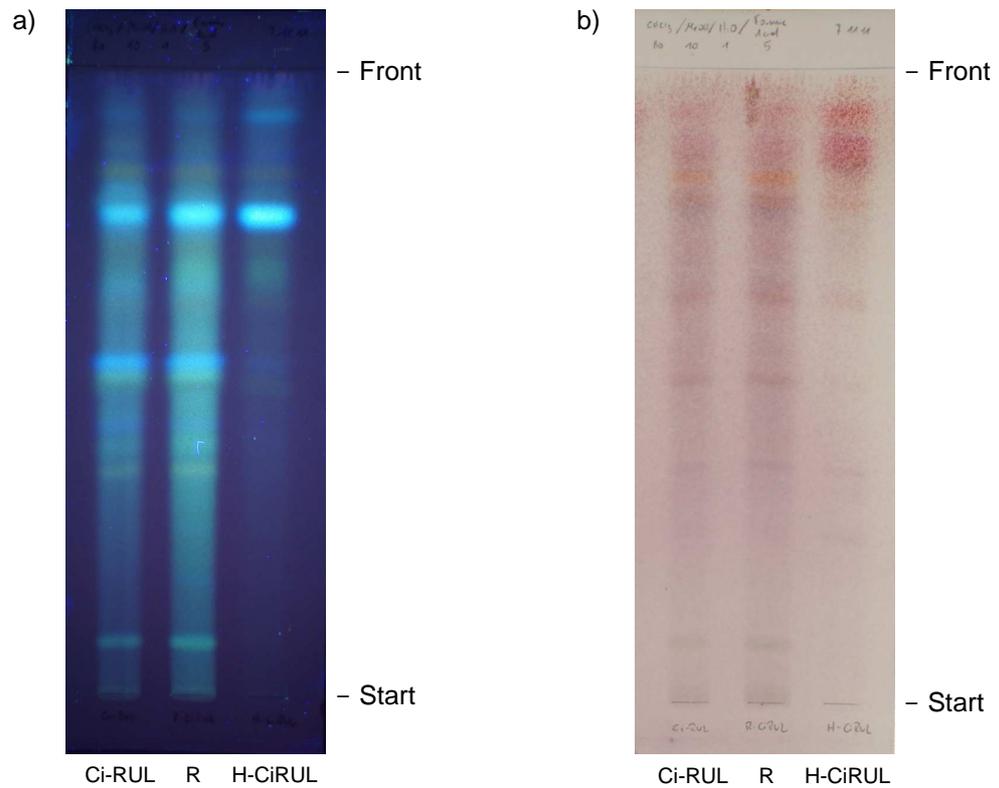
Die Auftrennung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft.

Abbildung 9: DC – Vergleich Ci-RUL, R und H-CiRUL

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 7 x 20 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)
b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)



Die Dünnschichtchromatographie zeigte, dass mit der Hexan-Extraktion apolare, ölige Substanzen abgetrennt werden konnten.

Aufgrund der Färbung einzelner Komponenten nach Detektion mit AAS, wurde dünnschicht-chromatographisch überprüft, ob in Fraktion R Sterole enthalten waren.

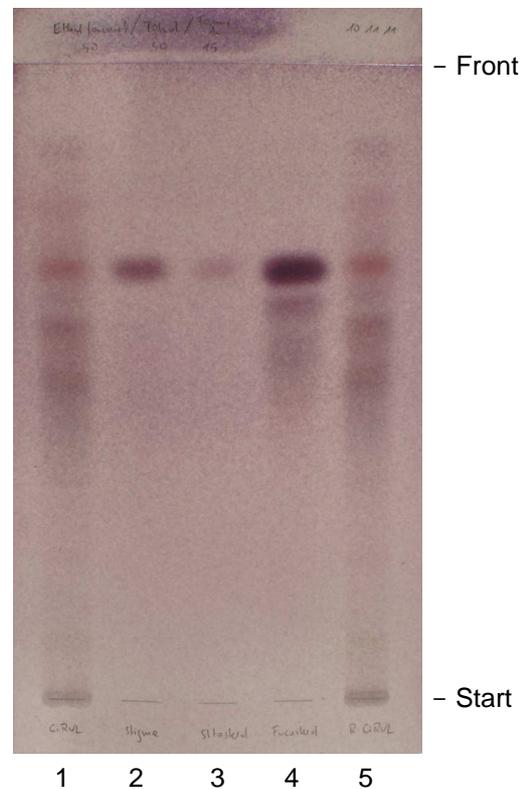
3. Ergebnisse

Abbildung 10: DC - Vergleich von R mit Sterolen

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 11 x 20 cm

Mobile Phase: Ethylformiat + Toluol + Ameisensäure conc. (50 + 50 + 15)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)



Bahn	Substanz
1	Ci-RUL
2	Stigmasterol
3	Sitosterol
4	Fucosterol
5	R

Aus dem dünnschichtchromatographischen Vergleich ging hervor, dass die Banden der Referenzsubstanzen zwar auf selber Höhe lagen wie Komponenten in Fraktion R und Fraktion Ci-RUL (Rf 0,69). Doch aufgrund des Unterschiedes in der Färbung der Banden wurde ein Vorliegen von Stigmasterol, Sitosterol und Fucosterol in R ausgeschlossen.

3.4.2 Extraktion von Fraktion R mit Methanol und Ethylacetat

Zur Auftrennung der in Fraktion R enthaltenen Komponenten wurde eine Extraktion mit Methanol vorgenommen.

15,27 g Fraktion R wurden im Ultraschallbad in 100 ml Methanol suspendiert, nach dem Zentrifugieren (20 min, 3500 U/min) wurde der Überstand abgenommen und am Rotovapor zur Trockene eingedampft. Dabei wurden 12,21 g Methanol-Fraktion (MR) gewonnen.

Der verbliebene Rest wurde im Ultraschallbad in 100 ml Ethylacetat suspendiert, zentrifugiert (30 min, 3500 U/min), der Überstand abgenommen und am Rotovapor zur Trockene eingedampft. Dabei wurden 2,98 g Ethylacetat-Fraktion (ER) und 71,07 mg in Methanol und Ethylacetat unlöslicher Rest (RR) gewonnen.

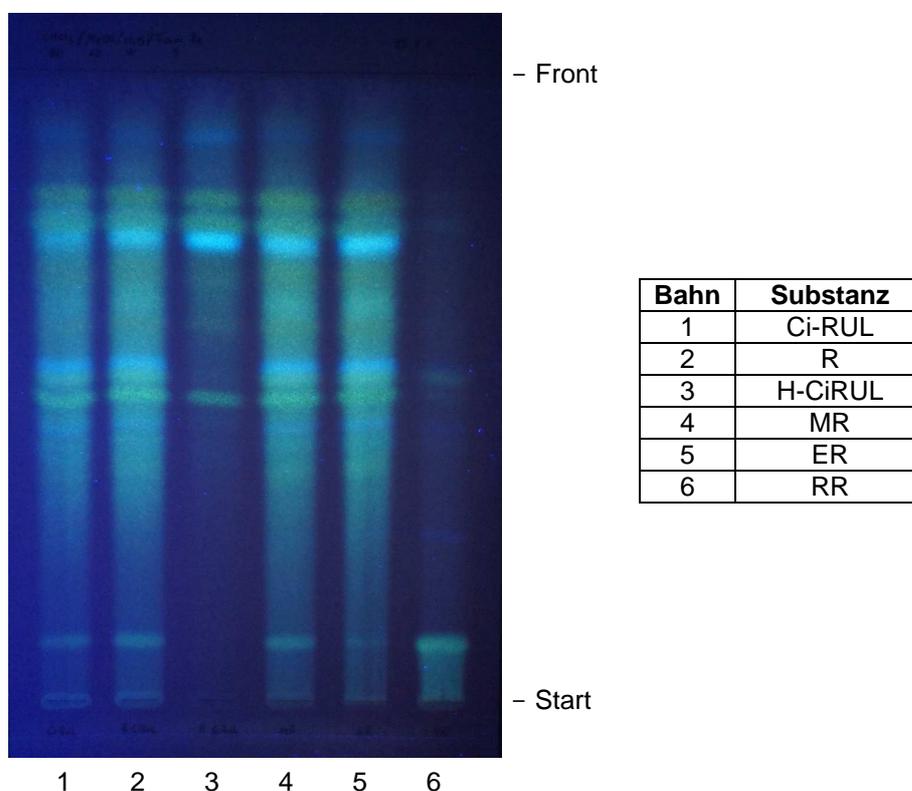
Die Auftrennung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft.

Abbildung 11: DC der Fraktionen aus Ci-RUL

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 13 x 20 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)



3. Ergebnisse

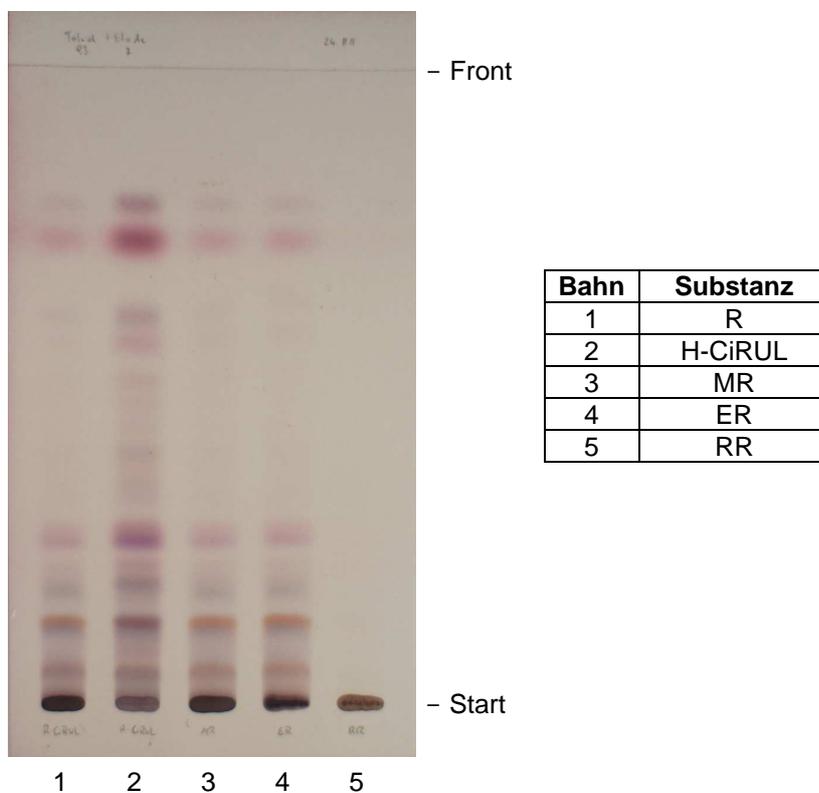
Die Fraktionen MR und ER zeigten sehr ähnliche Banden im dünn-
schichtchromatographischen Vergleich. Zur weiteren Überprüfung ihrer Übereinstimmung
im apolaren Bereich wurde eine DC mit anderer mobiler Phase gemacht.

Abbildung 12: DC der Fraktionen aus Ci-RUL

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 11 x 20 cm

Mobile Phase: Toluol + Ethylacetat (93 + 7)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)

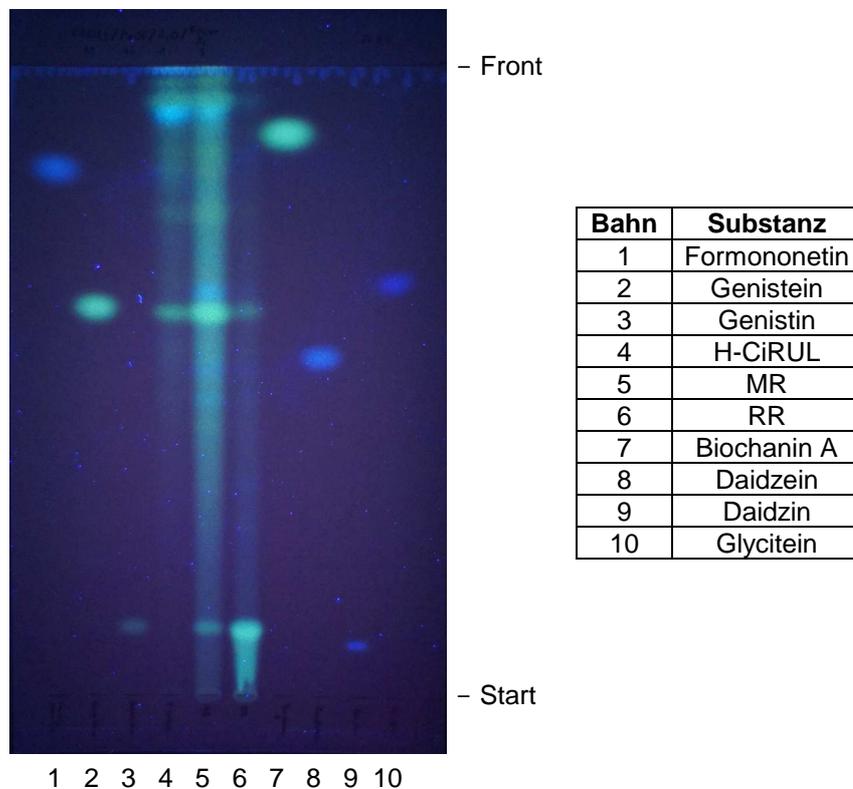


Auch diese DC zeigte kaum einen Unterschied zwischen MR und ER. Daher wurden
die beiden Fraktionen zu 15 g Fraktion MER vereinigt.

Außerdem wurde MR mit einigen Isoflavonen mittels DC verglichen, um eine
etwaige Übereinstimmung zu überprüfen.

Abbildung 13: DC - Vergleich von MR mit IsoflavonoidenStationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 12,5 x 20 cmMobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)



Der dünnschichtchromatographische Vergleich von MR mit einigen Isoflavonoiden zeigte, dass in dieser Fraktion Genistin (bläulich-grüne Bande bei Rf 0,1) und Genistein (bläulich-grüne Bande bei Rf 0,6) in MR enthalten waren.

3.4.3 Säulenchromatographie an Sephadex

Zur weiteren Auftrennung von Fraktion MER wurden zwei Säulenchromatographien an Sephadex® LH-20 durchgeführt.

SC 1

Säule: Durchmesser: 3 cm
Füllhöhe: 50 cm
Stationäre Phase: Sephadex® LH-20 (Sigma)
Mobile Phase: Isokratische Elution mit Methanol/Wasser (90:10)

Auftragelösung: 6,9 g MER wurden in 30 ml Methanol im Ultraschallbad gelöst und auf die Säule aufgetragen.
Flussrate: 15 ml / 20 min

Es wurden insgesamt 310 Fraktionen gesammelt.

Jede 5. Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft.

Anschließend wurden die Fraktionen zu 10 Sammelfraktionen vereinigt.

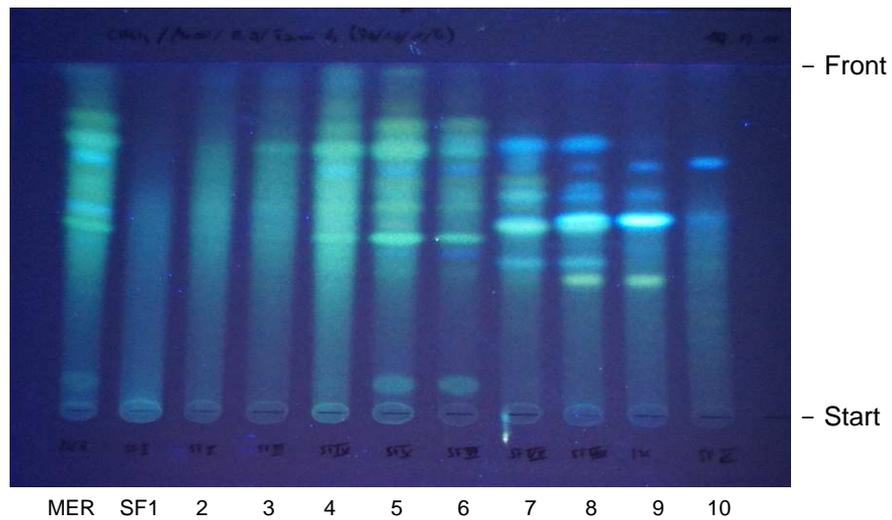
Tabelle 1: Sammelfraktionen SC 1

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gewicht (g)
1	1 - 92	0,68
2	93 - 97	0,95
3	98 - 102	1,09
4	103 - 117	2,04
5	118 - 157	0,86
6	158 - 165	0,48
7	166 - 185	0,31
8	186 - 195	0,11
9	196 - 225	0,05
10	226 - 310	0,21

Von den Sammelfraktionen wurde eine Dünnschichtchromatographie angefertigt.

Abbildung 14: DC der Sammelfraktionen von SC 1

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 12,5 x 10 cm
 Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
 (80 + 10 + 1 + 5)
 Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)

**SC 2**

Säule: Durchmesser 3 cm
 Füllhöhe: 50 cm
 Stationäre Phase: Sephadex® LH-20 (Sigma)
 Mobile Phase: Isokratische Elution mit Methanol/Wasser (90:10)
 Auftragslösung: 7,11 g MER wurden in 30 ml Methanol im Ultraschallbad gelöst und auf die Säule aufgetragen.
 Flussrate: 15 ml / 10 min

Es wurden insgesamt 240 Fraktionen gesammelt.

Zur Vereinigung der Fraktionen zu Sammelfraktionen, wurde jede 5. Fraktion dünnschichtchromatographisch überprüft.

3. Ergebnisse

Tabelle 2: Sammelfractionen SC 2

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Gewicht (g)
1	Vorlauf	0,01
2	1 - 3	0,27
3	4 - 11	2,48
4	12 - 18	1,93
5	19 - 31	1,56
6	32 - 37	0,19
7	38 - 47	0,32
8	48 - 60	0,07
9	61 - 240	0,18

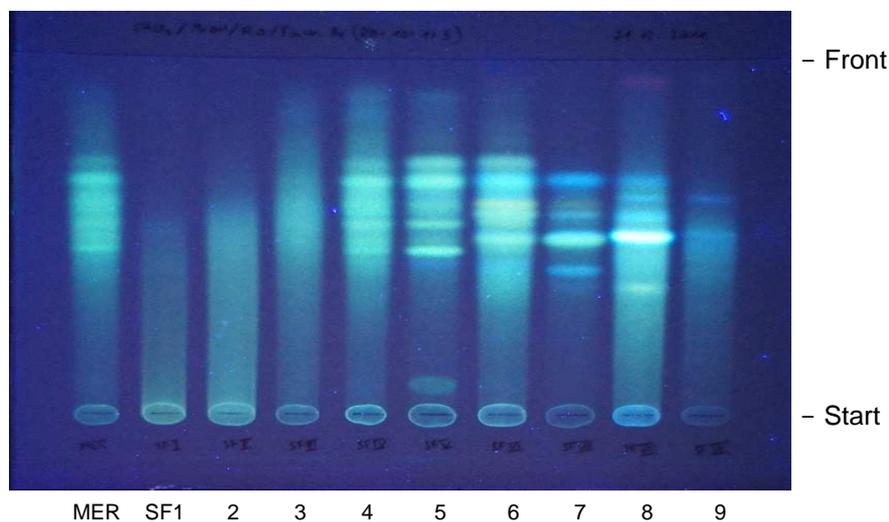
Von den Sammelfractionen wurde eine Dünnschichtchromatographie angefertigt.

Abbildung 15: DC der Sammelfractionen von SC 2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 11,5 x 10 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)

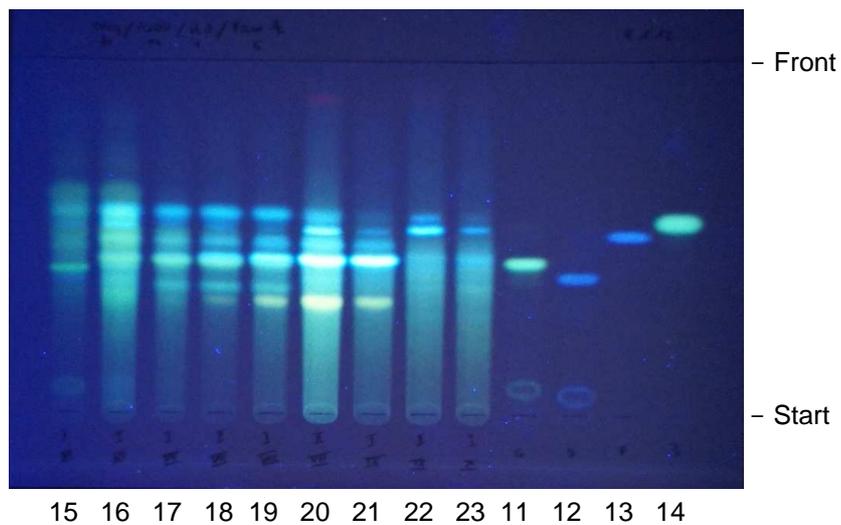
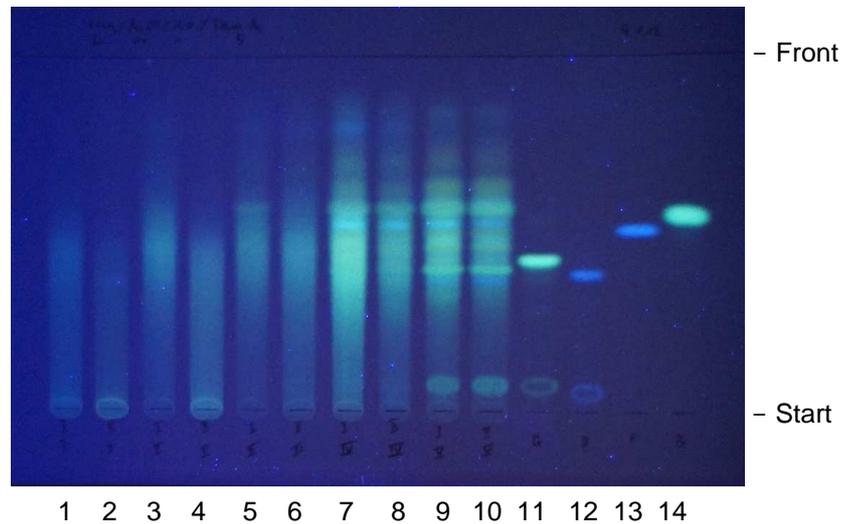


Im Anschluss wurden die Sammelfractionen von SC 1 und SC 2 dünnschichtchromatographisch gegenübergestellt, um Fractionen mit übereinstimmender Zusammensetzung zu vereinigen.

Außerdem wurden die SF mit einigen Isoflavonoiden verglichen.

Abbildung 16: DC - Vergleich der SF von SC 1 und SC 2 (NP/PEG)Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 15,5 x 10 cmMobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)



Bahn	Substanz
1	SC1 SF1
2	SC2 SF1
3	SC1 SF2
4	SC2 SF2 (B)
5	SC1 SF3
6	SC2 SF3
7	SC1 SF4
8	SC2 SF4
9	SC1 SF5
10	SC2 SF5
11	Genistein & Genistin
12	Daidzein & Daidzin

Bahn	Substanz
13	Formononetin
14	Biochanin A
15	SC1 SF6 (F)
16	SC2 SF6 (G)
17	SC1 SF7
18	SC2 SF7
19	SC1 SF8 (I)
20	SC2 SF8 (J)
21	SC1 SF9 (K)
22	SC2 SF9
23	SC1 SF10

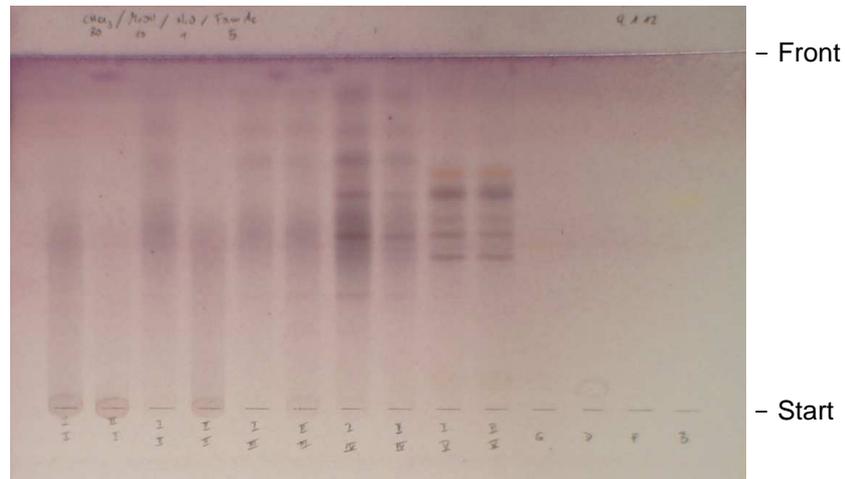
3. Ergebnisse

Abbildung 17: DC - Vergleich der SF von SC 1 und SC 2 (AAS)

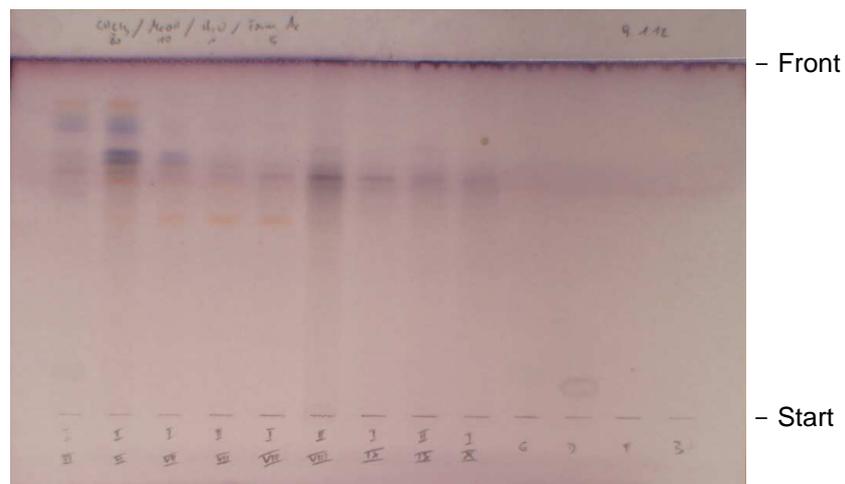
Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 15,5 x 10 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



15 16 17 18 19 20 21 22 23 11 12 13 14

Bahn	Substanz
1	SC1 SF1
2	SC2 SF1
3	SC1 SF2
4	SC2 SF2 (B)
5	SC1 SF3
6	SC2 SF3
7	SC1 SF4
8	SC2 SF4
9	SC1 SF5
10	SC2 SF5
11	Genistein & Genistin
12	Daidzein & Daidzin

Bahn	Substanz
13	Formononetin
14	Biochanin A
15	SC1 SF6 (F)
16	SC2 SF6 (G)
17	SC1 SF7
18	SC2 SF7
19	SC1 SF8 (I)
20	SC2 SF8 (J)
21	SC1 SF9 (K)
22	SC2 SF9
23	SC1 SF10

Aufgrund der Laufstrecke der Banden und der bläulich-grünen Färbung nach Detektion mit Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 wurde deutlich, dass die SF 5 und 6 beider Säulenchromatographien Genistin (Rf 0,07) und die SF 7 jeweils Genistein (Rf 0,4) enthielten.

Basierend auf den DC-Vergleichen wurden Sammelfractionen mit ähnlicher Zusammensetzung kombiniert.

Tabelle 3: Kombinierte Sammelfractionen von SC 1 und SC 2

Kombinierte Sammelfraktion	Sammelfractionen	Gewicht (g)	Weiterbearbeitung
A	SC1 SF1 SC2 SF1	0,69	
B	SC2 SF2	0,27	
C	SC1 SF2 SC1 SF3 SC2 SF3	4,42	
D	SC1 SF4 SC2 SF4	3,58	
E	SC1 SF5 SC2 SF5	2,28	HPCCC 1-4 siehe 3.4.4, S. 27
F	SC1 SF6	0,48	
G	SC2 SF6	0,19	
H	SC1 SF7 SC2 SF7	0,59	
I	SC1 SF8	0,11	
J	SC2 SF8	0,07	
K	SC1 SF9	0,05	
L	SC1 SF10 SC2 SF9	0,39	

Die erhaltenen Fractionen wurden nochmals dünnschichtchromatographisch überprüft.

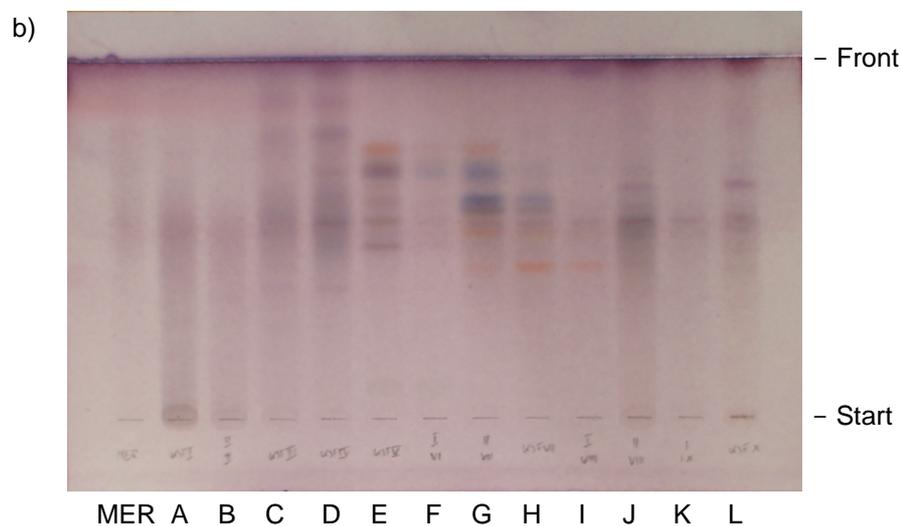
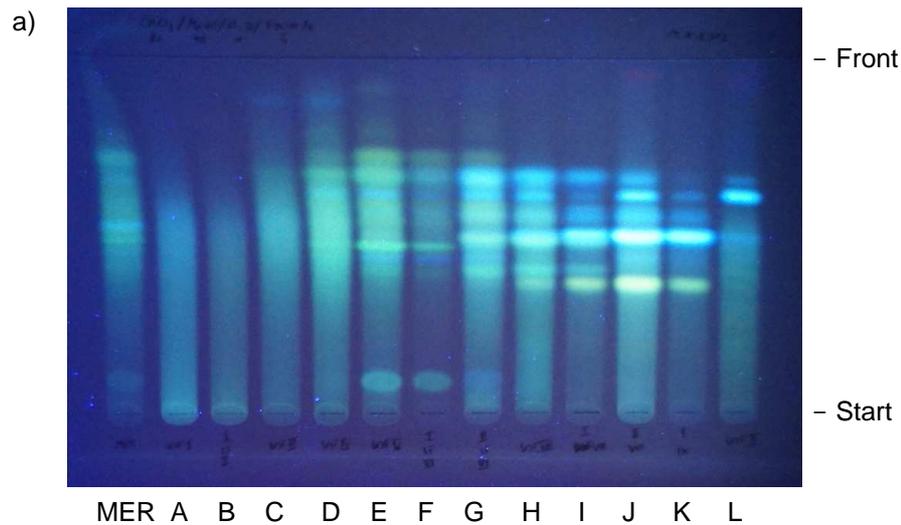
3. Ergebnisse

Abbildung 18: DC der Sammelfractionen von SC 1 und SC 2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 14,5 x 10 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)
b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)



Da die Fraktion E nach dem Besprühen der DC-Platten mit NP/PEG zahlreiche grün bis blau fluoreszierende Banden aufwies, die auf das Vorliegen von Flavonoiden bzw. Isoflavonoiden hindeuteten (siehe Referenzsubstanzen, Abbildung 13, Seite 19 und Abbildung 16, Seite 23) wurden die 2,28 g Fraktion E über HPCCC weiter aufgetrennt.

3.4.4 High Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC)

3.4.4.1 Auswahl des Fließmittelsystems

Zur Auswahl eines geeigneten Fließmittelsystems wurde in mehreren Systemen der Verteilungskoeffizient von Fraktion E ermittelt, der sich aus dem Verhältnis der Konzentrationen der Fraktion in der mobilen bzw. der stationären Phase ergibt.

Ein Fließmittelsystem eignet sich üblicherweise dann, wenn der Verteilungskoeffizient des zu trennenden Gemisches zwischen 0,5 und 2 liegt.

Es wurde jeweils ein kleiner Teil der Fraktion E zwischen Ober- und Unterphase des entsprechenden Systems verteilt. Anschließend wurden die Phasen getrennt, zur Trockene eingedampft und der Gewichtsanteil an Fraktion E der sich in der Ober- bzw. Unterphase gelöst hatte bestimmt. Aus dem Verhältnis der Menge an Fraktion E in der jeweiligen Phase resultierte der Verteilungskoeffizient für das entsprechende FM-System.

Für das Fließmittelsystem Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser (1 + 4 + 1 + 4) (FM-System 2, siehe Tabelle 5, Seite 30) ergab sich ein Verteilungskoeffizient von 1,3.

Für die Durchführung des ersten HPCCC-Experiments wurde die Oberphase als mobile Phase eingesetzt.

Abbildung 19: Spectrum HPCCC Anlage und Pumpe



3. Ergebnisse

3.4.4.2 HPCCC 1

Gerät und Methode siehe Abschnitt 2.2.3, Seite 4

Fließmittelsystem: FM-System 2 (siehe Tabelle 5, S. 30)

Auftragelösung: 520,3 mg Fraktion E in 5 ml mobiler und stationärer Phase
(50:50) des FM-Systems 2

Es wurden 170 Fraktionen zu jeweils 6 ml gesammelt.

Die Fraktionen wurden nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle zu Sammel-
fraktionen vereinigt.

Tabelle 4: Sammelfraktionen HPCCC 1

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gewicht (mg)
1	1 - 8	0,6
2	9 - 11	154,0
3	12	151,3
4	13 - 16	41,1
5	17 - 23	1,7
6	24 - 25	1,0
7	26 - 29	0,02
8	30 - 42	3,2
9	43 - 170	78,3

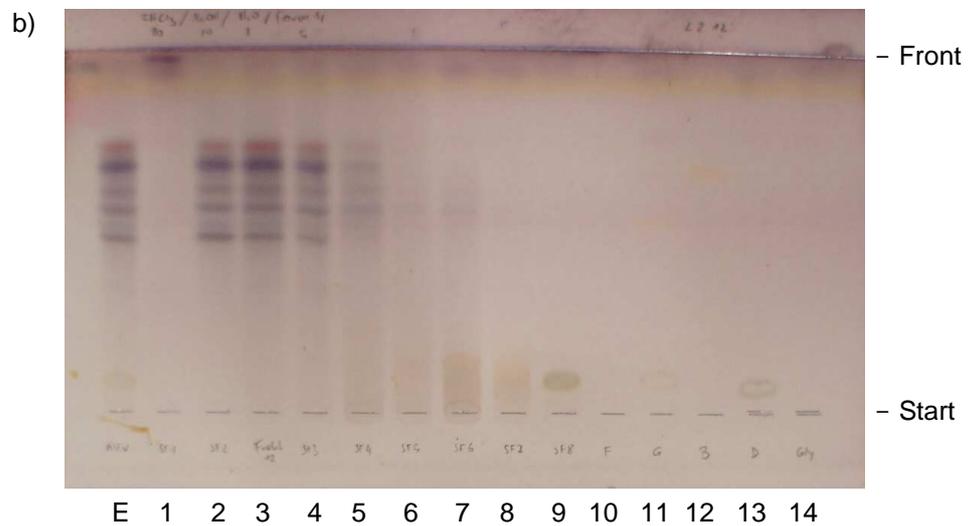
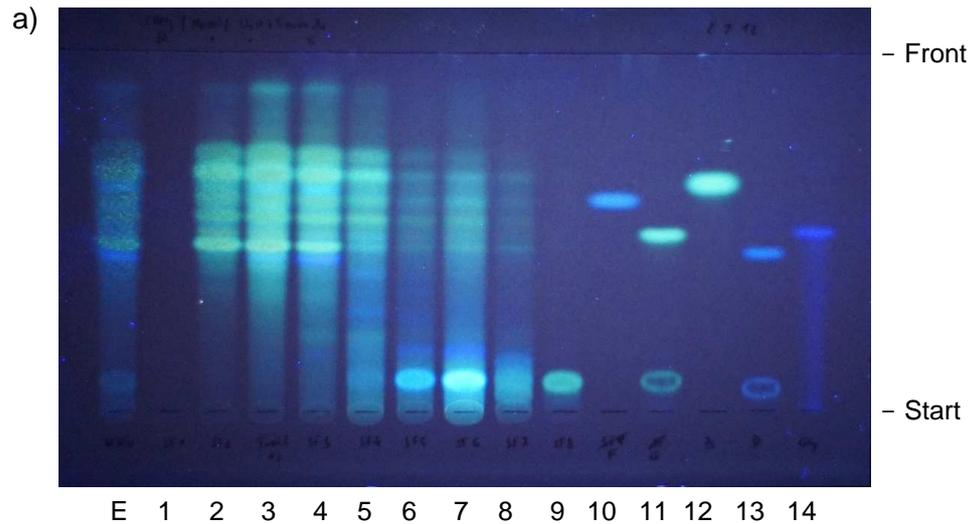
Im Anschluss wurde das Ergebnis der Auftrennung dünnschichtchromatographisch
überprüft.

Abbildung 20: DC der Sammelfractionen von HPLCCC 1

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 16,5 x 10 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

- Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)
b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)



Bahn	Substanz
E	Fraktion E
1	SF 1
2	SF 2
3	SF 3
4	SF 4
5	SF 5
6	SF 6
7	SF 7

Bahn	Substanz
8	SF 8
9	SF 9
10	Formononetin
11	Genistein & Genistin
12	Biochanin A
13	Daidzein & Daidzin
14	Glycitein

3. Ergebnisse

3.4.4.3 Optimierung des Fließmittelsystems

Aus den DCs ging hervor, dass die Trennleistung mit diesem Fließmittelsystem nicht optimal war, da der Großteil der in Fraktion E enthaltenen Substanzen bereits in den ersten 25 Fraktionen ungetrennt eluiert worden war.

Daher wurden zur Ermittlung eines optimierten Trennsystems dünnschichtchromatographische Untersuchungen durchgeführt, wobei jeweils die Oberphase als mobile Phase für die Trennung von Fraktion E verwendet wurde.

Tabelle 5: Fließmittelsysteme für die HPCCC

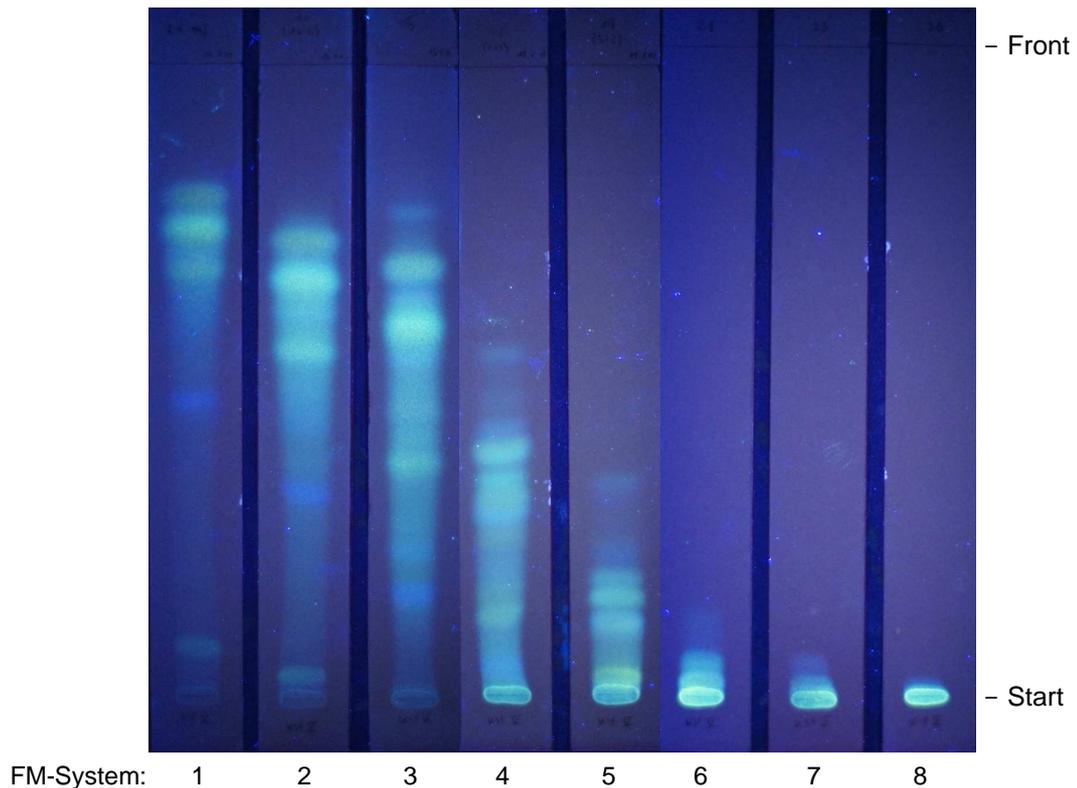
Fließmittelsystem	Hexan + Ethylacetat + Methanol + Wasser	Verwendet bei
1	1 + 19 + 1 + 19	
2	1 + 4 + 1 + 4	HPCCC 1 / S. 28
3	2 + 3 + 2 + 3	HPCCC 2 / S. 31
4	1 + 1 + 1 + 1	HPCCC 3 / S. 35
5	3 + 2 + 3 + 2	
6	5 + 2 + 5 + 2	
7	4 + 1 + 4 + 1	HPCCC 4 / S. 38
8	9 + 1 + 9 + 1	

Abbildung 21: DC - Optimierung des Fließmittelsystems für die HPCCC

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 2,5 x 20 cm

Mobile Phase: jeweilige Oberphasen der Fließmittelsysteme aus Tabelle 5

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)



Die DCs zeigten erwartungsgemäß, dass mit abnehmender Polarität der mobilen Phase (von 1 bis 8) die Laufstrecke der Komponenten von Fraktion E verringert wurde. Durch Verwendung des FM-Systems 3 sollten daher die Komponenten von Fraktion E langsamer eluiert werden, was die Trennleistung erhöhen sollte.

3.4.4.4 HPLCCC 2

Gerät und Methode siehe Abschnitt 2.2.3, S. 4

Mobile und stationäre Phase: Fließmittelsystem 3 (siehe Tabelle 5, S. 30)

Auftragelösung: 424,9 mg Fraktion E in 5 ml mobiler und stationärer Phase (50:50) des FM-Systems 3

Es wurden 134 Fraktionen zu jeweils 6 ml gesammelt.

Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch überprüft und anschließend zu Sammelfraktionen vereinigt.

Tabelle 6: Sammelfractionen HPCCC 2

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Gewicht (mg)
1	1	15,3
2	2 - 12	291,3
3	13 - 15	90,2
4	16 - 21	23,6
5	22 - 23	6,8
6	24 - 26	5,4
7	27 - 28	3,1
8	29 - 32	0,6
9	33 - 37	2,0
10	38 - 72	10,2
11	73 - 106	7,9
12	107 - 112	4,2
13	113 - 134	19,8

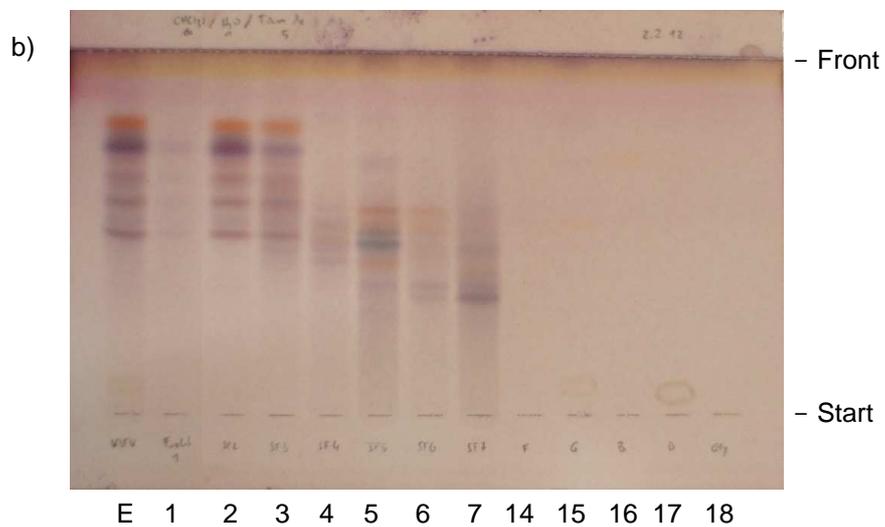
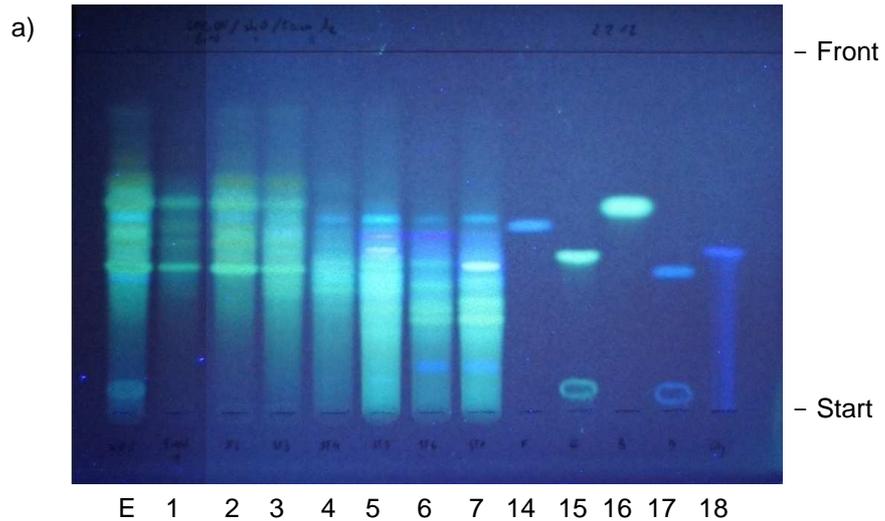
Im Anschluss wurde das Ergebnis der Auftrennung dünnschichtchromatographisch überprüft.

Abbildung 22: DC der Sammelfraktionen von HPLCCC 2

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 14,5 bzw. 15,5 x 10 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)
b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)

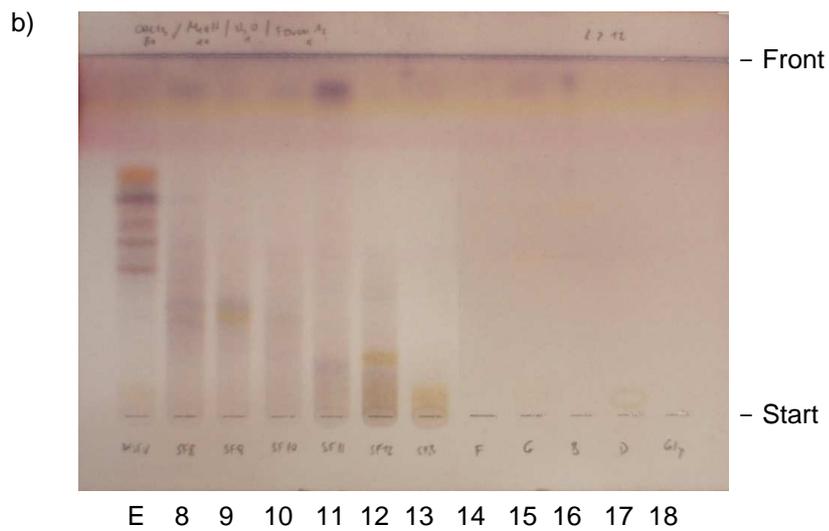
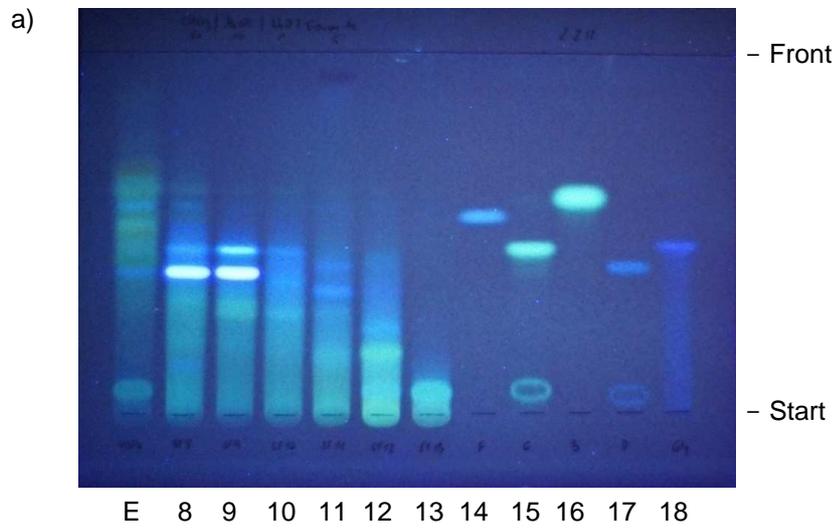


Bahn	Substanz
E	Fraktion E
1	SF 1
2	SF 2
3	SF 3
4	SF 4
5	SF 5
6	SF 6

Bahn	Substanz
7	SF 7
8	SF 8
9	SF 9
10	SF 10
11	SF 11
12	SF 12
13	SF 13

Bahn	Substanz
14	Formononetin
15	Genistein & Genistin
16	Biochanin A
17	Daidzein & Daidzin
18	Glycitein

3. Ergebnisse



Bahn	Substanz
E	Fraktion E
1	SF 1
2	SF 2
3	SF 3
4	SF 4
5	SF 5
6	SF 6

Bahn	Substanz
7	SF 7
8	SF 8
9	SF 9
10	SF 10
11	SF 11
12	SF 12
13	SF 13

Bahn	Substanz
14	Formononetin
15	Genistein & Genistin
16	Biochanin A
17	Daidzein & Daidzin
18	Glycitein

Da auch bei der HPCCC 2 die Auftrennung von Fraktion E nicht ausreichend war, wurde für den nächsten Lauf ein stärker apolares FM-System verwendet, um die Trennleistung zu verbessern.

3.4.4.5 HPCCC 3

Gerät und Methode siehe Abschnitt 2.2.3, S. 4

Mobile und stationäre Phase: Fließmittelsystem 4 (siehe Tabelle 5, S. 30)

Auftragelösung: 422,8 mg Fraktion E in 5 ml mobiler und stationärer Phase (50:50) des FM-Systems 4

Es wurden 166 Fraktionen zu jeweils 6 ml gesammelt.

Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch überprüft und anschließend zu Sammelfractionen vereinigt.

Tabelle 7: Sammelfractionen HPCCC 3

Sammelfraction	Einzelfractionen	Gewicht (mg)
1	1 - 8	0,2
2	9 - 11	5,9
3	12 - 16	222,4
4	17 - 18	26,8
5	19 - 20	18,9
6	21 - 25	16,0
7	26 - 30	10,8
8	31 - 37	8,1
9	38 - 45	5,1
10	46 - 52	2,6
11	53 - 57	5,7
12	58 - 72	8,5
13	73 - 113	13,7
14	114 - 132	1,0
15	133 - 137	8,0
16	138 - 145	3,1
17	146 - 154	27,0
18	155 - 166	0,02

Im Anschluss wurde das Ergebnis der Auftrennung dünnschichtchromatographisch überprüft.

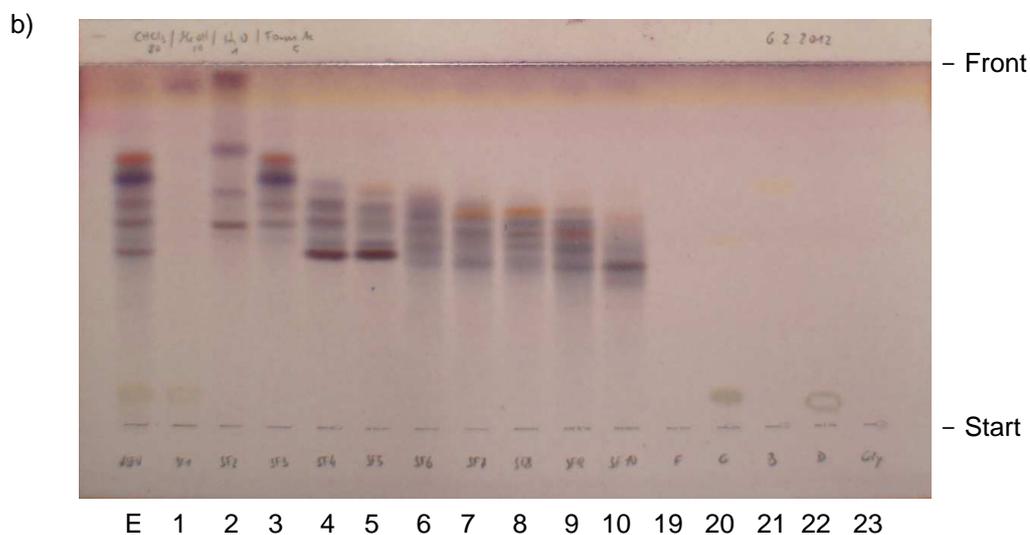
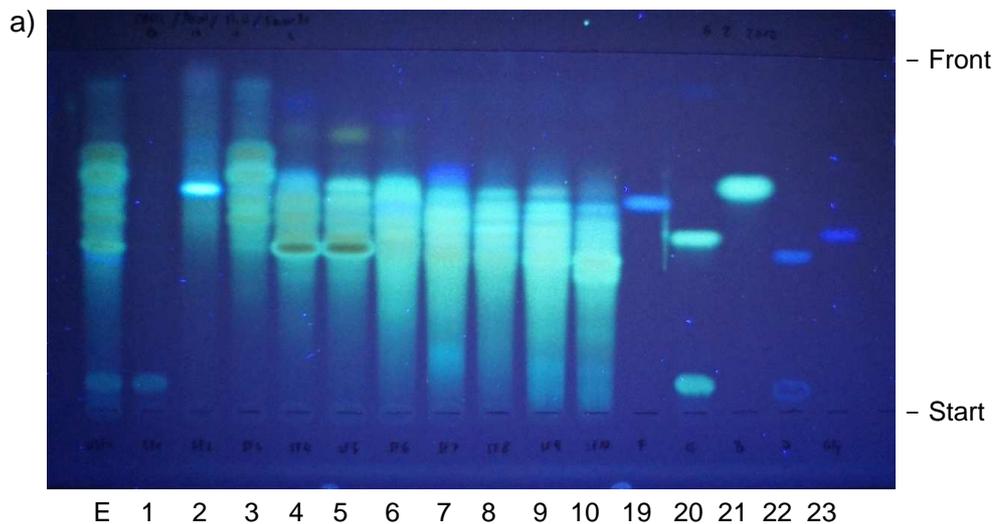
3. Ergebnisse

Abbildung 23: DC der Sammelfractionen von HPLCC 3

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 16,5 bzw. 17,5 x 10 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

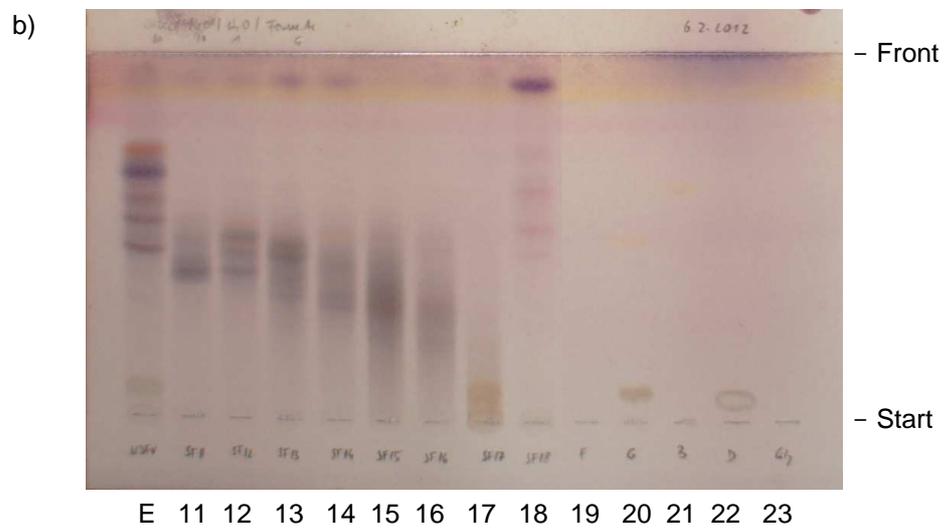
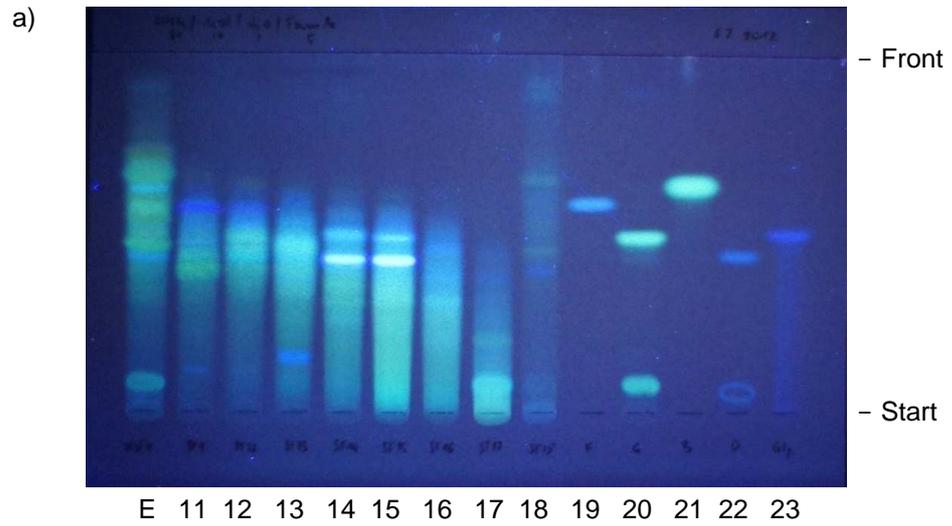
Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)
b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)



Bahn	Substanz
E	Fraktion E
1	SF 1
2	SF 2
3	SF 3
4	SF 4
5	SF 5
6	SF 6
7	SF 7
8	SF 8

Bahn	Substanz
9	SF 9
10	SF 10
11	SF 11
12	SF 12
13	SF 13
14	SF 14
15	SF 15
16	SF 16
17	SF 17

Bahn	Substanz
18	SF 18
19	Formononetin
20	Genistein & Genistin
21	Biochanin A
22	Daidzein & Daidzin
23	Glycitein



Bahn	Substanz
E	Fraktion E
1	SF 1
2	SF 2
3	SF 3
4	SF 4
5	SF 5
6	SF 6
7	SF 7
8	SF 8

Bahn	Substanz
9	SF 9
10	SF 10
11	SF 11
12	SF 12
13	SF 13
14	SF 14
15	SF 15
16	SF 16
17	SF 17

Bahn	Substanz
18	SF 18
19	Formononetin
20	Genistein & Genistin
21	Biochanin A
22	Daidzein & Daidzin
23	Glycitein

3. Ergebnisse

Da auch HPCCC 3 nicht zur zufriedenstellenden Auftrennung von Fraktion E führte, wurde für den nächsten Lauf FM-System 7 verwendet (siehe Tabelle 5, Seite 30).

3.4.4.6 HPCCC 4

Gerät und Methode siehe Abschnitt 2.2.3, S. 4

Mobile und stationäre Phase: Fließmittelsystem 7 (siehe Tabelle 5, Seite 30).

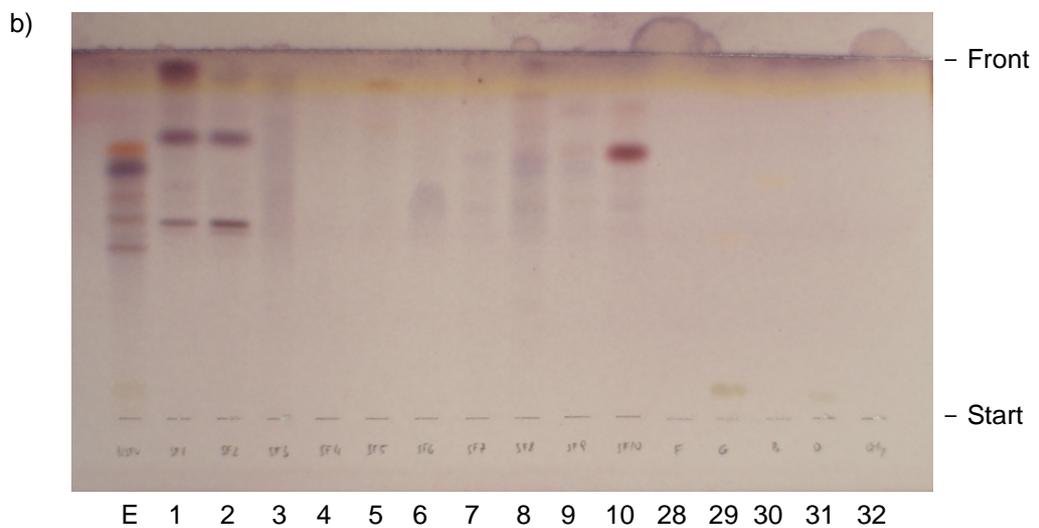
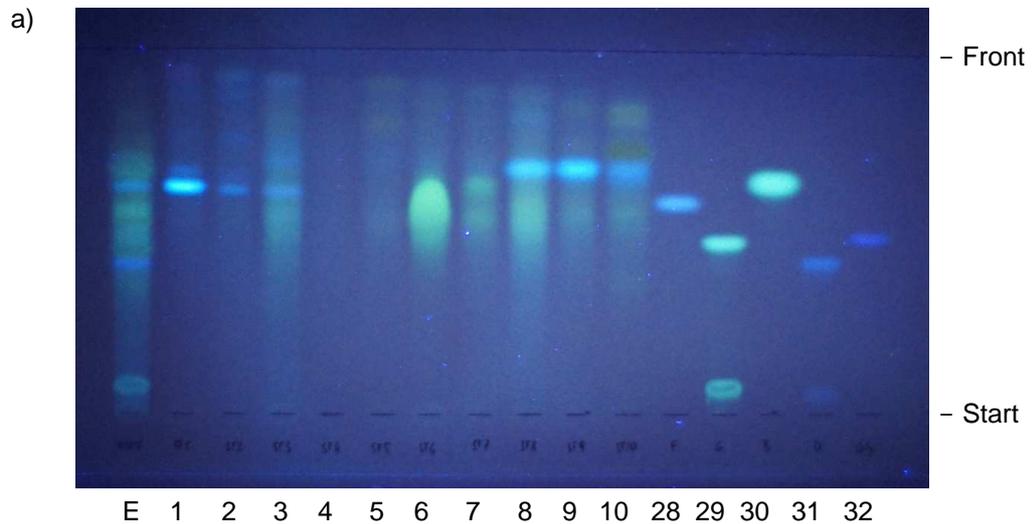
Auftragelösung: 418 mg Fraktion E in 5 ml mobiler und stationärer Phase (50:50) des FM-Systems 7

Es wurden 346 Fraktionen zu jeweils 6 ml gesammelt.

Tabelle 8: Sammelfraktionen HPCCC 4

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Gewicht (mg)
1	1 - 8	15,5
2	9 - 12	6,8
3	13 - 17	2,7
4	18 - 19	0,6
5	20 - 22	4,0
6	23 - 27	6,7
7	28 - 32	3,1
8	33 - 37	2,4
9	38 - 42	0,1
10	43 - 52	3,2
11	53 - 57	1,6
12	58 - 82	48,6
13	83 - 85	0,8
14	86 - 90	0,3
15	91 - 107	11,4
16	108 - 122	10,8
17	123 - 135	18,6
18	136 - 162	20,4
19	163 - 202	13,2
20	203 - 321	12,4
21	322 - 324	0,7
22	325 - 326	7,1
23	327 - 329	55,1
24	330 - 331	21,8
25	332 - 338	10,1
26	339	0,6
27	340 - 346	136,0

Im Anschluss wurde das Ergebnis der Auftrennung dünnschichtchromatographisch überprüft

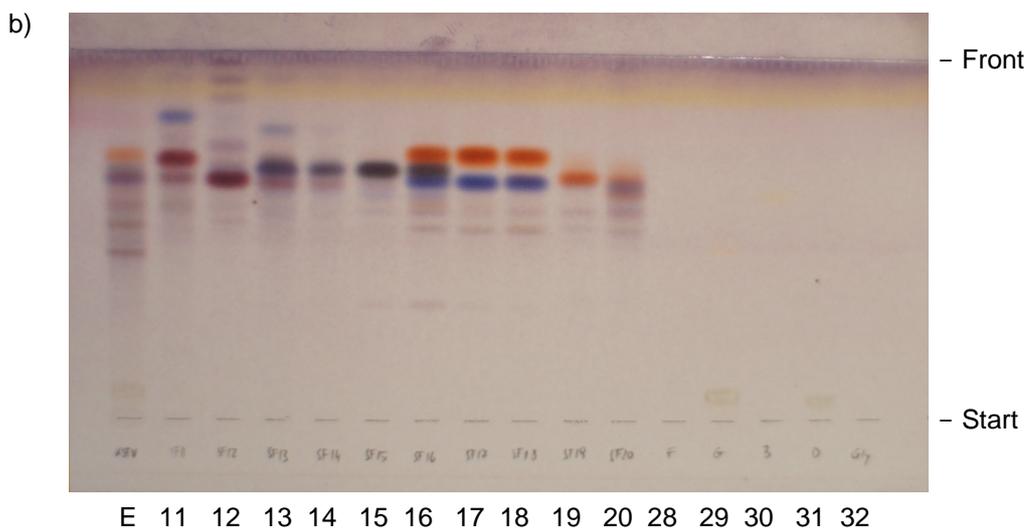
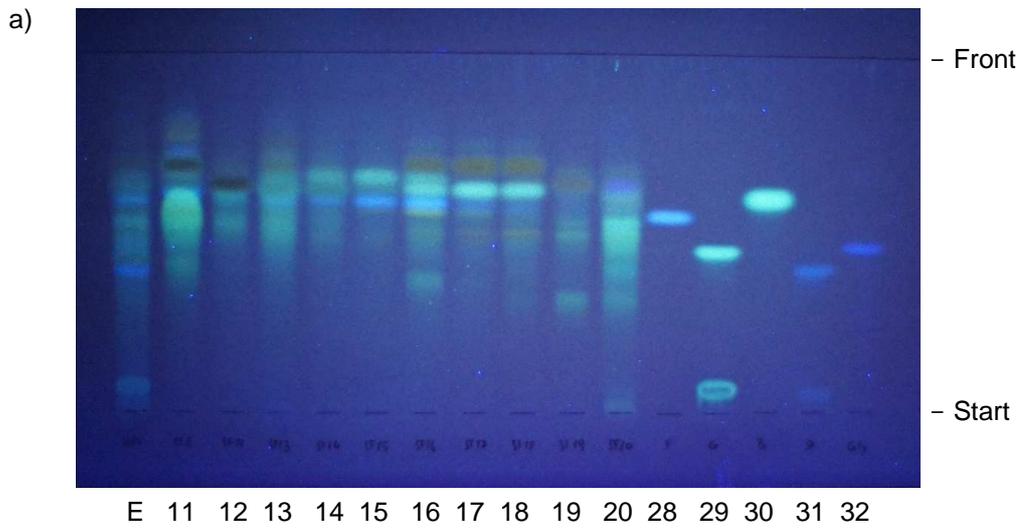
Abbildung 24: DC der Sammelfractionen von HPLCCC 4Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 16,5 bzw. 17,5 x 10 cmMobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)
b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)

Bahn	Substanz
E	Fraktion E
1	SF 1
2	SF 2
3	SF 3
4	SF 4
5	SF 5
6	SF 6
7	SF 7
8	SF 8
9	SF 9
10	SF 10
11	SF 11

Bahn	Substanz
12	SF 12
13	SF 13
14	SF 14
15	SF 15
16	SF 16
17	SF 17
18	SF 18
19	SF 19
20	SF 20
21	SF 21
22	SF 22
23	SF 23

Bahn	Substanz
24	SF 24
25	SF 25
26	SF 26
27	SF 27
28	Formononetin
29	Genistein & Genistin
30	Biochanin A
31	Daidzein & Daidzin
32	Glycitein

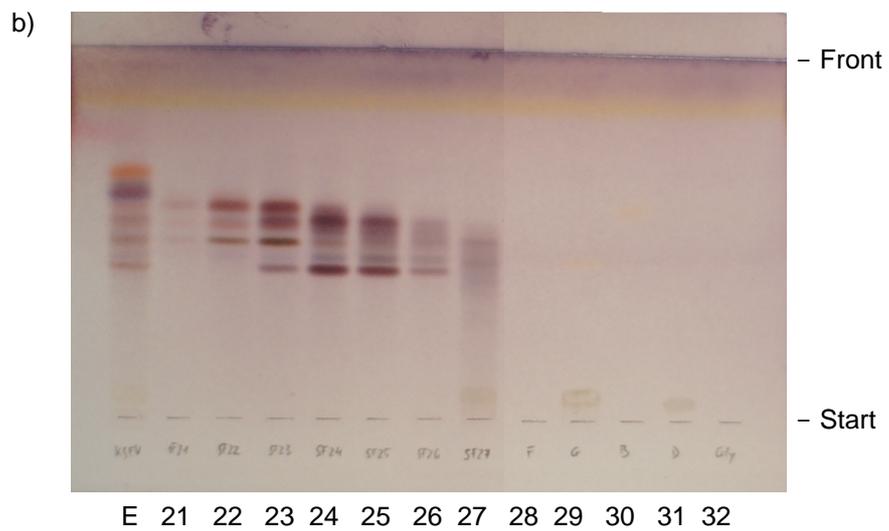
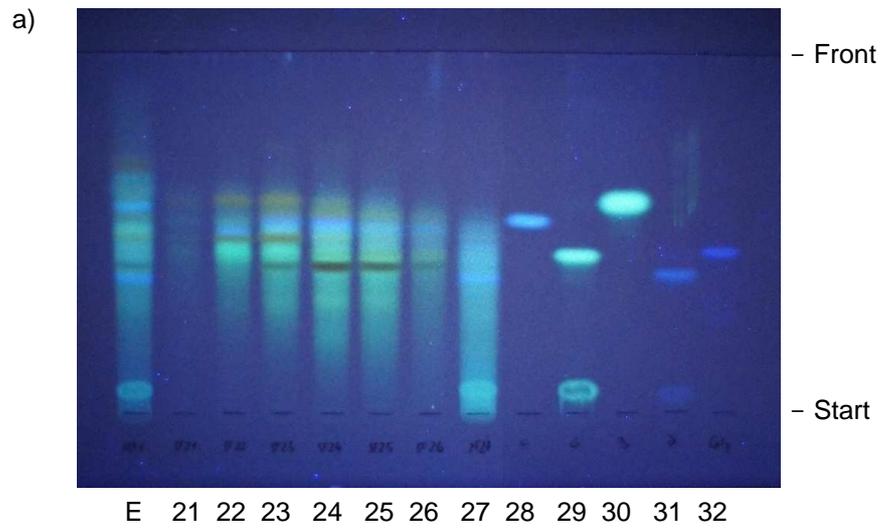
3. Ergebnisse



Bahn	Substanz
E	Fraktion E
1	SF 1
2	SF 2
3	SF 3
4	SF 4
5	SF 5
6	SF 6
7	SF 7
8	SF 8
9	SF 9
10	SF 10
11	SF 11

Bahn	Substanz
12	SF 12
13	SF 13
14	SF 14
15	SF 15
16	SF 16
17	SF 17
18	SF 18
19	SF 19
20	SF 20
21	SF 21
22	SF 22
23	SF 23

Bahn	Substanz
24	SF 24
25	SF 25
26	SF 26
27	SF 27
28	Formononetin
29	Genistein & Genistin
30	Biochanin A
31	Daidzein & Daidzin
32	Glycitein



Bahn	Substanz
E	Fraktion E
1	SF 1
2	SF 2
3	SF 3
4	SF 4
5	SF 5
6	SF 6
7	SF 7
8	SF 8
9	SF 9
10	SF 10
11	SF 11

Bahn	Substanz
12	SF 12
13	SF 13
14	SF 14
15	SF 15
16	SF 16
17	SF 17
18	SF 18
19	SF 19
20	SF 20
21	SF 21
22	SF 22
23	SF 23

Bahn	Substanz
24	SF 24
25	SF 25
26	SF 26
27	SF 27
28	Formononetin
29	Genistein & Genistin
30	Biochanin A
31	Daidzein & Daidzin
32	Glycitein

3. Ergebnisse

Der verbliebene Rest von 225,15 mg Fraktion E konnte aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr weiter aufgetrennt werden.

3.4.4.7 Zusammenfassung der HPCCC-Experimente

Die HPCCC wurde eingesetzt, um die Sammelfraktion E weiter aufzutrennen.

Hierzu wurde zunächst der Verteilungskoeffizient für einige FM-Systeme ermittelt.

Dazu wurde ein kleiner Teil der Fraktion E zwischen der Ober- und Unterphase des entsprechenden Systems verteilt und der Gewichtsanteil an Fraktion E der sich in der Ober- bzw. Unterphase gelöst hatte bestimmt. Aus dem Mengenverhältnis an Fraktion E in der jeweiligen Phase ergab sich der Verteilungskoeffizient für das entsprechende FM-System.

Für das FM-System 2 (siehe Tabelle 5, S. 30) ergab sich ein Wert von 1,3, woraus auf die Eignung dieses FM-Systems für die Trennung von Sammelfraktion E geschlossen wurde.

Wie man an der DC der Sammelfraktionen von HPCCC 1 (siehe Abbildung 20, S. 29) erkennen kann, war die Trennleistung dieses Systems nicht optimal. Der Großteil der Fraktion wurde bereits sehr früh und kaum getrennt eluiert.

Daher wurden zur Verbesserung der Fraktionierung die mobilen Phasen anderer FM-Systeme für die dünnschichtchromatographische Trennung von Fraktion E herangezogen (siehe Abbildung 21, S. 30).

Da die Trennung mit FM-System 3 auf der DC deutlich besser war, als mit FM-System 2, wurde für HPCCC 2 dieses FM-System eingesetzt.

Aus der DC der Sammelfraktionen von HPCCC 2 (siehe Abbildung 22, S. 33 u. 34) geht hervor, dass sich die Trennleistung verbesserte und die Auftrennung der in Fraktion E enthaltenen Komponenten sich nun über einen breiteren Bereich erstreckte.

Zur weiteren Optimierung der Methode wurde die Polarität des LM-Systems in den nächsten Trennversuchen (HPCCC 3 und 4) weiter verringert, was zu einer deutlichen Verbesserung der Fraktionierung führte (siehe Abbildung 23, S. 36 u. 37 sowie Abbildung 24, S. 39, 40 u. 41).

3.4.5 Dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgewählter Fraktionen mit Kaffeesäure

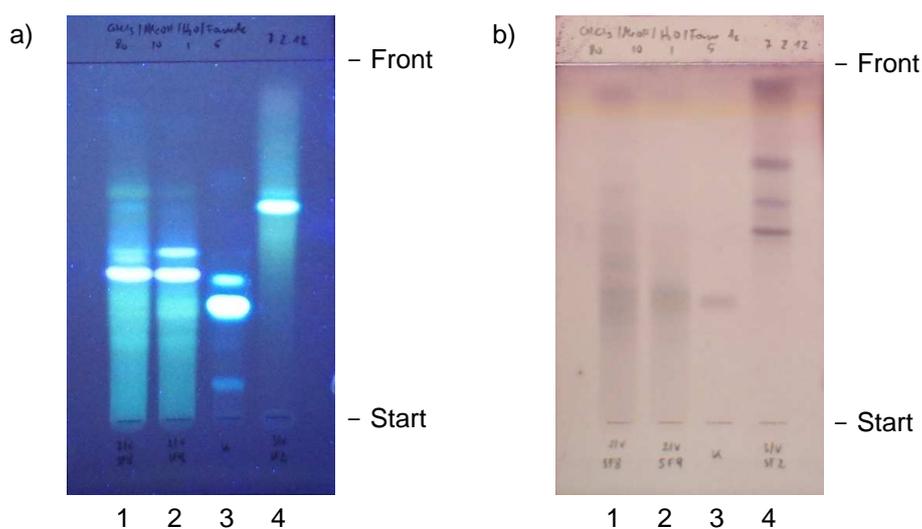
Zur Abklärung der Identität der intensiv fluoreszierenden Banden der Sammelfraktionen SF 8 und 9 (HPCCC 2) sowie SF 2 (HPCCC 3) (siehe Abbildung 22, S. 34 und Abbildung 23, S. 36), wurde ein dünnschichtchromatographischer Vergleich mit Kaffeesäure durchgeführt, da Kaffeesäure eine im Pflanzenreich häufig vorkommende Phenolcarbonsäure ist, ähnliche R_f-Werte im verwendeten DC-System zeigt und eine blaue Fluoreszenz im UV-Licht bei 366 nm aufweist [10].

Abbildung 25: DC - Vergleich ausgewählter SF mit Kaffeesäure

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck), 5,5 x 10 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: a) Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)
b) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (siehe 2.2.4.2)



Bahn	Substanz
1	HPCCC2 SF8
2	HPCCC2 SF9

Bahn	Substanz
3	Kaffeesäure
4	HPCCC3 SF2

3. Ergebnisse

Aus dem dünnschichtchromatographischen Vergleich ging hervor, dass die untersuchten Sammelfractionen keine Kaffeesäure enthielten, da sich die Laufstrecken der intensiv fluoreszierenden Banden der SF und der Kaffeesäure deutlich unterschieden.

Da nur geringe Mengen der beiden SF vorhanden waren, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr weiter untersucht.

3.5 Aufarbeitung der Sammelfraktion 6 von HPCCC 4

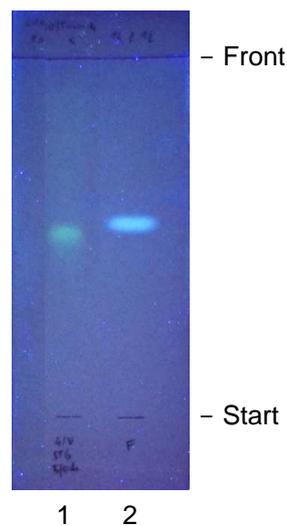
Beim dünnschichtchromatographischen Vergleich der Sammelfractionen der HPCCC-Trennungen zeigte sich in SF 6 von HPCCC 4 eine grün fluoreszierende Bande (siehe Abbildung 24, S. 39). Um diese näher zu untersuchen, wurde ein DC-Vergleich mit Formononetin durchgeführt.

Abbildung 26: DC - Vergleich von SF 6 mit Formononetin

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte (Merck), 3,5 x 10 cm

Mobile Phase: Chloroform + Methanol + Wasser + Ameisensäure conc.
(80 + 10 + 1 + 5)

Detektion: Naturstoffreagens A und Polyethylenglycol 400 (siehe 2.2.4.2)



Bahn	Substanz
1	SF 6
2	Formononetin

Die DC zeigte, dass die grün fluoreszierende Bande bei Rf 0,52 nicht mit Formononetin übereinstimmte. Da aufgrund der Elutionsfolge auch eine Übereinstimmung mit Daidzein, Daidzin, Biochanin A, Genistein, Genistin und Glycitein ausgeschlossen werden konnte, wurde die Fraktion mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie untersucht.

Dabei stellte sich heraus, dass die Fraktion offensichtlich einen relativ hohen Anteil an Salzen enthielt und die Konzentration der fluoreszierenden Komponente zu gering für eine Strukturaufklärung war.

4 Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Inhaltsstoffe eines methanolischen Extraktes der unterirdischen Pflanzenteile von *E. laurentii* durch unterschiedliche Fraktionierungsschritte aufzutrennen.

Dazu wurde das methanolische Extrakt (UEL) mit Wasser extrahiert, um enthaltene Zucker abzutrennen. Der in Wasser unlösliche Rest (RUL) wurde zwischen Chloroform-Isopropanol und Wasser verteilt.

Die daraus resultierenden Fraktionen W-RUL, i-RUL und Ci-RUL wurden im Anschluss weiter aufgetrennt und auf ihre Inhaltsstoffe untersucht.

Beim dünnschichtchromatographischen Vergleich von W-RUL mit Chlorogensäure, einigen Flavonoiden und Zuckern konnte das Vorliegen von Saccharose, Glucose und Fructose in der Wasserphase nachgewiesen werden.

In i-RUL konnte mittels HPLC und DC Genistin fast rein nachgewiesen werden.

Ci-RUL wurde mit Hexan extrahiert, wobei apolare Substanzen abgetrennt werden konnten.

Der in Hexan unlösliche Anteil wurde mit Methanol und Ethylacetat extrahiert. Das dabei entstandene Extrakt (MER) wurde mittels Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 fraktioniert (SC 1 und SC 2). Fraktion E wurde mittels High Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC) weiter fraktioniert.

Dabei konnte in SF6 von HPCCC 4 eine chromatographisch einheitliche Komponente, die nicht mit authentischen Vergleichssubstanzen identifiziert werden konnte, isoliert werden. Die Menge der Fraktion war allerdings aufgrund von enthaltenen Salzen nicht ausreichend für die Strukturaufklärung.

Die übrigen kombinierten Sammelfractionen von SC 1 und SC 2 sowie die Sammelfractionen der HPCCC-Trennungen konnten aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr aufgearbeitet werden.

Im dünnschichtchromatographischen Vergleich der Sammelfractionen von SC 1 und SC 2 konnten in mehreren Fractionen, wie den Sammelfractionen F, H und L zahlreiche unbekannte Komponenten detektiert werden. Da diese Fractionen in ausreichender Menge vorhanden sind, wäre eine weitere Aufarbeitung von Interesse.

5 Zusammenfassung

Abkochungen aus den Wurzeln verschiedener Vertreter der Gattung *Eriosema*, werden in der afrikanischen, chinesischen und südamerikanischen Volksmedizin zur Behandlung von Sterilität bei Frauen, Potenzstörungen und Harnwegsbeschwerden bei Männern eingesetzt [1, 4, 5].

Mitverantwortlich für ihre Wirkung sind meist Pyranoisoflavonoide, wie die Kraussianone in *E. kraussianum* Meisn. [2, 4 - 6]. *Eriosema laurentii* DeWild. wird in der traditionellen Medizin in Kamerun in ähnlicher Weise verwendet.

Da zu *E. laurentii* keine Daten zur chemischen Zusammensetzung vorlagen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein methanolisches Extrakt aus den Wurzeln fraktioniert und seine Inhaltsstoffe isoliert und identifiziert werden.

Die Auftrennung erfolgte mittels Flüssig-Flüssig-Verteilung, Gelpermeationschromatographie und HPLC.

In den wasserlöslichen Anteilen konnten dünn-schichtchromatographisch die Zucker Saccharose, Glucose und Fructose nachgewiesen werden.

Genistin stellte eine der Hauptkomponenten des Extraktes dar und wurde aus mehreren Fraktionen fast rein isoliert.

Mittels HPLC konnte eine weitere Komponente in chromatographisch einheitlicher Form dargestellt werden. Allerdings war eine Strukturklärung aufgrund der niedrigen Menge nicht möglich.

6 Summary

Root decoctions of different representatives of the genus *Eriosema*, are used in traditional african, chinese and southamerican folk medizin to treat sterility in women as well as virility problems and urinary complaints in men [1, 4, 5]. Pyranoisoflavonoids are obviously contributing to the effects, e.g. the kraussianones in *E. kraussianum* Meisn. [2, 4 - 6]. *Eriosema laurentii* DeWild. is used in the traditional medicine of Cameroon for similar indications.

Since no data on the chemical composition of *E. laurentii* was available, the objective of this diploma thesis was the fractionation of a methanolic extract from the roots and the isolation as well as the identification of its components.

The fractionation was performed by liquid-liquid-distribution, gelpermeation chromatography and HPCCC.

The presence of saccharose, glucose and fructose in the water-soluble fraction could be proved by TLC.

Genistin was found to be a major compound of the extract and was isolated almost purely from several fractions.

By HPCCC another compound was isolated in chromatographically uniform appearance. The structure elucidation was not possible due to low amounts.

Literaturverzeichnis

- [1] Ma WG, Fuzzati N, Li QS, Yang CR, Stoeckli-Evans H, Hostettmann K. (1995) Polyphenols from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry* 39, 1049- 1061
- [2] Awouafack MD, Kouam SF, Hussain H, Ngama D, Tane P, Schulz B, Green IR, Krohn K (2008) Antimicrobial Prenylated Dihydrochalcones from *Eriosema glomerata*. *Planta Med* 74, 50-54
- [3] Ma WG, Fukushi Y, Hostettmann K, Tahara S (1998) Isoflavonoid glycosides from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry* 49, 251-254
- [4] Drewes SE, Horn MM, Munro OQ, Dhlamini JTB, Meyer JJM, Rakuambo NC (2002) Pyrano-isoflavones with erectile-dysfunction activity from *Eriosema kraussianum*. *Phytochemistry* 59, 739-747
- [5] Drewes SE, Horn MM, Khan F, Munro OQ, Dhlamini JTB, Rakuambo C, Meyer JJM (2004) Minor pyrano-isoflavones from *Eriosema kraussianum*: activity-, structure-, and chemical reaction studies. *Phytochemistry* 65, 1955-1961
- [6] Ojewole JAO, Drewes SE, Khan F (2006) Vasodilatory and hypoglycaemic effects of two pyrano-isoflavone extractives from *Eriosema kraussianum* N. E. Br. [Fabaceae] rootstock in experimental rat models. *Phytochemistry* 67, 610-617
- [7] Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin, 1996
- [8] Rigler C. *Chemische Untersuchungen der apolaren Inhaltsstoffe von Metaxya rostrata*. Diplomarbeit, Universität Wien, 2005
- [9] Pemp E. *Analytik pharmazeutisch relevanter Flavonoide mittels HPLC/UV, HPLC/MS und HPLC/UV/MS*. Dissertation, Universität Wien, 2005
- [10] Sticher O, Hänsel R. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010; Seite 1061

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	<i>Eriosema laurentii</i> (Foto, Sylvain B. Ateba).....	1
Abbildung 2:	Details Herbarbeleg <i>E. laurentii</i>	2
Abbildung 3:	DC - Vergleich von W-RUL, i-RUL und Ci-RUL.....	7
Abbildung 4:	DC - Vergleich W-RUL und i-RUL mit Chlorogensäure und Flavonoiden	9
Abbildung 5:	DC - Vergleich W-RUL mit Zuckern (AAS).....	10
Abbildung 6:	DC - Vergleich W-RUL mit Zuckern (NBP).....	10
Abbildung 7:	HPLC-Chromatogramm von i-RUL	12
Abbildung 8:	DC - Vergleich von i-RUL mit Genistin	13
Abbildung 9:	DC - Vergleich Ci-RUL, R und H-CiRUL	14
Abbildung 10:	DC - Vergleich von R mit Sterolen	16
Abbildung 11:	DC der Fraktionen aus Ci-RUL	17
Abbildung 12:	DC der Fraktionen aus Ci-RUL	18
Abbildung 13:	DC - Vergleich von MR mit Isoflavonoiden.....	19
Abbildung 14:	DC der Sammelfraktionen von SC 1	21
Abbildung 15:	DC der Sammelfraktionen von SC 2	22
Abbildung 16:	DC - Vergleich der SF von SC 1 und SC 2 (NP/PEG).....	23
Abbildung 17:	DC - Vergleich der SF von SC 1 und SC 2 (AAS)	24
Abbildung 18:	DC der Sammelfraktionen von SC 1 und SC 2	26
Abbildung 19:	Spectrum HPCCC Anlage und Pumpe.....	27
Abbildung 20:	DC der Sammelfraktionen von HPCCC 1	29
Abbildung 21:	DC - Optimierung des Fließmittelsystems für die HPCCC.....	30
Abbildung 22:	DC der Sammelfraktionen von HPCCC 2	33
Abbildung 23:	DC der Sammelfraktionen von HPCCC 3	36
Abbildung 24:	DC der Sammelfraktionen von HPCCC 4	39
Abbildung 25:	DC - Vergleich ausgewählter SF mit Kaffeesäure	43
Abbildung 26:	DC - Vergleich von SF 6 mit Formononetin.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sammelfractionen SC 1	20
Tabelle 2: Sammelfractionen SC 2	22
Tabelle 3: Kombinierte Sammelfractionen von SC 1 und SC 2	25
Tabelle 4: Sammelfractionen HPCCC 1.....	28
Tabelle 5: Fließmittelsysteme für die HPCCC	30
Tabelle 6: Sammelfractionen HPCCC 2.....	32
Tabelle 7: Sammelfractionen HPCCC 3.....	35
Tabelle 8: Sammelfractionen HPCCC 4.....	38

Curriculum Vitae

Name: Gerald Pichler
Geburtsdatum und –ort: 2. Juli 1984, Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung

1990 – 1994 Volksschule Bernhardtstalgasse 19, 1100 Wien
1994 – 2002 Bundesrealgymnasium IV, Waltergasse 7,
1040 Wien
Juni 2002 Matura
Oktober 2002 Beginn des Studiums der Pharmazie,
Universität Wien

Oktober 2011 – Februar 2012 Praktischer Teil der Diplomarbeit,
Department für Pharmakognosie, Universität Wien

Beruflicher Werdegang

August 2002 Ferialpraktikum bei der Österreichischen Post AG
ab Juli 2004 Teilzeittätigkeit in der „Heilfried-Apotheke“,
1100 Wien
Juli 2007 – März 2008 Ableistung des Zivildienstes,
Österreichisches Rotes Kreuz, Generalsekretariat
Abt. „Geschäftsleitung I“ sowie „Recht
und Migration“

Anhang

Fraktionierung der unterirdischen Anteile von *Eriosema laurentii*

