



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

Analyse des Inhaltsstoffprofils von *Syzygium aromaticum*, *Kaempferia galanga* und *Pimenta dioica* mit Bioaktivitätstests zur Überprüfung der Wirksamkeit auf den TGR5–Rezeptor

verfasst von / submitted by

Christoph Hofstadler

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ. – Prof. Dr. Judith M. Rollinger

Danksagung

Mein Dank gilt, ...

... Univ. Prof. Dr. Judith M. Rollinger, die mich dankenswerterweise in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mir zum einen ein sehr spannendes Diplomarbeitsthema angeboten und zum anderen eine Diplomarbeitsstelle am Department für Pharmakognosie ermöglicht hat. Ich habe Frau Dr. Rollinger stets nett, freundlich, humorvoll, kompetent und hilfsbereit erlebt, was ich sehr schätze.

... Dr. Martin Zehl, der mich bei meiner praktischen Tätigkeit und auch bei der Verfassung meiner Arbeit begleitet und mir zu jeder Zeit unterstützend und helfend zur Seite stand. Ich danke dir auch herzlich für die Vorkorrektur meiner Diplomarbeit.

... Dr. Angela Ladurner danke ich auch besonders, weil du für mich alle aufwendigen Zelltests an den HEK293-Zellen erledigt und mir wichtige Endresultate der Bioaktivitäten der einzelnen Extrakte auf den TGR5-Rezeptor ausgearbeitet hast. Herzlichen Dank für diese Unterstützung!

... Mag. Dr. Ulrike Grienke und Mag. Christina Sykora, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und mir so immer weitergeholfen haben.

... allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und das Beisammensein um 15:00 h.

... ein besonderer Dank gilt auch Mag. Nadina Faur, die mir bei offenen Fragen zur der Diplomarbeit immer geholfen und mir wichtige Informationen ihrer Diplomarbeit überlassen hat und darüber hinaus auch Extrakte zur Verfügung stellte.

... meinen Eltern, meinem Bruder, meiner verstorbenen Oma und meinem Opa, die mich die gesamte Studienzeit hindurch vielfach unterstützten und immer an mich geglaubt haben. Ohne Eure Hilfe und Unterstützung wäre das Ganze sicher nicht möglich gewesen! Außerdem hattet ihr immer ein offenes Ohr für meine verschiedensten Anliegen. Die Heimreise von Wien nach Oberösterreich war immer Genuss und Freude, weil ich stets mit einem Lächeln empfangen wurde.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	<i>Syzygium aromaticum</i>	6
1.1.1	Botanische Merkmale	6
1.1.2	Chemische Merkmale	7
1.1.3	Pharmakologische Merkmale	8
1.2	<i>Pimenta dioica</i>	9
1.2.1	Botanische Merkmale	9
1.2.2	Chemische Merkmale	10
1.2.3	Medizinischer Einsatz	11
1.3	<i>Kaempferia galanga</i>	12
1.3.1	Botanische Merkmale	12
1.3.2	Chemische Merkmale	13
1.3.3	Pharmakologische Merkmale	14
1.4	Problemstellung und Zielsetzung.....	15
1.4.1	TGR5–Rezeptor	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Drogenmaterial.....	19
2.1.2	Lösungsmittel und Chemikalien	19
2.1.2.1	Lösungsmittel	19
2.1.2.2	Chemikalien	20
2.1.3	Referenzsubstanzen / Standardsubstanzen.....	21
2.1.4	Ausrüstung und Gerätschaften	22
2.1.5	Der Mäusekot	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Herstellung der Extrakte	23
2.2.2	Gewinnung des ätherischen Öls von <i>Kaempferia galanga</i>	25
2.2.3	Herstellung der Vergleichslösungen der Referenzsubstanzen.....	26
2.2.4	Herstellung der Verdünnungsreihe.....	27
2.2.5	HPLC–DAD–CAD.....	29
2.2.5.1	HPLC	29
2.2.5.2	DAD.....	31
2.2.5.3	CAD.....	32

2.2.5.4	Fließmittel und Methodenoptimierung	33
2.2.5.5	Quantifizierung der Triterpensäuren	39
2.2.6	LC-ESI-TOF	40
2.2.7	LC-ESI-Ionenfalle	41
2.2.8	Dünnschichtchromatographie	42
2.2.8.1	Stationäre Phase	43
2.2.8.2	Mobile Phase	43
2.2.8.3	Sprühreagenzien	44
2.2.8.4	DC-Auftragslösungen für den Nylon-6-Nachweis	44
2.2.9	Automatisierte Säulenchromatographie	45
2.2.10	Gaschromatographie	47
2.2.10.1	GC – FID	48
2.2.10.2	GC-MS	49
2.2.11	Luciferase Reportergen Assay	50
3	Resultate	54
3.1	Vorarbeit: Erhalt der Extrakte und Testergebnisse	54
3.2	<i>Syzygium aromaticum</i>	60
3.2.1	Dereplikation der Inhaltsstoffe	60
3.2.1.1	HPLC-DAD-CAD-Analyse des Extraktes	61
3.2.1.2	LC-ESI-TOF-Analyse des Extraktes	63
3.2.1.3	Nachweis mit Referenzsubstanzen	69
3.2.1.4	Einschub: Polyamid-Verunreinigung	70
3.2.2	Biotransformation der Probe Syzaro(DM) mit Mäusekot	76
3.2.3	Quantifizierung der enthaltenen Triterpensäuren	78
3.2.4	Bioaktivitätstests an HEK293-Zellen	81
3.3	<i>Pimenta dioica</i>	88
3.3.1	Dereplikation der Inhaltsstoffe	88
3.3.1.1	HPLC-DAD-CAD-Analyse des Extraktes	88
3.3.1.2	LC-ESI-TOF-Analyse des Extraktes	90
3.3.1.3	Nachweis mit Referenzsubstanzen	97
3.3.1.4	Einschub: Polyamid-Verunreinigungen	98
3.3.2	Biotransformation der Probe Pimdio(DM) mit Mäusekot	99
3.3.3	Quantifizierung der enthaltenen vier Triterpensäuren	102
3.3.4	Bioaktivitätstest an HEK293-Zellen	107
3.4	<i>Kaempferia galanga</i>	114

3.4.1	Dereplikation der Inhaltsstoffe	114
3.4.1.1	HPLC-DAD-CAD-Analyse des Extraktes.....	115
3.4.1.2	LC-ESI-TOF-Analyse des Extraktes.....	117
3.4.2	Biotransformation der Probe Kaegal_DM.....	125
3.4.3	Fraktionierung des Extraktes und Gewinnung des ätherischen Öls.....	130
3.4.3.1	Fraktionierung des Extraktes	130
3.4.3.1	Gewinnung des ätherischen Öls	135
3.4.4	Bioaktivitätstests an HEK293-Zellen.....	139
3.4.4.1	GC-Analysen des ätherischen Öls.....	143
3.4.4.2	Dereplikation der Fraktion 5	147
4	Zusammenfassung.....	151
5	Abstract	152
6	Literaturverzeichnis.....	154
6.1	URL-Adressen	156
6.1.1	Literaturrecherche	156
6.1.2	Bildrecherche.....	158
7	Anhang	161
7.1	Abkürzungsverzeichnis	161
7.2	Massenspektren von <i>Syzygium aromaticum</i>	164
7.3	Massenspektren von <i>Pimenta dioica</i>	169
7.4	Quantifizierung der Triterpensäure	171
7.5	Ergebnisse der Transaktivierungsassays.....	183
7.5.1	TGR5-Aktivierung: Triterpensäure-Vergleich	187

1 Einleitung

Dieses einführende Kapitel soll dazu dienen, einen kurzen Überblick über die Pflanzen zu geben, mit denen im Zuge dieser wissenschaftlichen Arbeit geforscht worden ist. Es werden sowohl botanische, chemische als auch pharmakologisch-medizinische Merkmale dargestellt. Dabei handelte es sich um *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (Blütenknospen), *Pimenta dioica* (L.) Merr. (Früchte) und *Kaempferia galanga* L. (Rhizom). Die Auswahl der Pflanzen begründete sich auf eine bereits vorangegangene Diplomarbeit [7]. Im Kapitel Problemstellung und Zielsetzung (S.15) wird die Entstehungsgeschichte des Diplomarbeitsthemas detailliert.

Die folgenden Kapitel sollen nun kurz einen zusammenfassenden Überblick über die zuvor erwähnten Pflanzen geben.

1.1 *Syzygium aromaticum*

1.1.1 Botanische Merkmale

Syzygium aromaticum (L.) Merr. & L.M.Perry, zu Deutsch die Gewürznelke, spielt vor allem in der Weihnachtszeit als aromatisch wohltuend riechendes Gewürz eine wichtige Rolle. Sie ist nicht nur Bestandteil verschiedener Punschgetränke; sie hat auch im Bereich der Medizin ihr Potenzial. Die Gewürznelke ist hauptsächlich auf den Molukken und den südlichen Philippinen beheimatet und gehört zu der großen Familie der Myrtengewächse. Es handelt sich um einen immergrünen, schlanken Baum mit einer Größe von bis zu 20 m. Von diesem gelangen vor allem nach vierjähriger Kultivierung die Blütenknospen, mit der lateinischen Bezeichnung *Caryophylli flos*, in den Handel. Abbildung 1, S.7 zeigt diese kurz vor ihrer Ernte. Die Droge besteht aus den getrockneten Gewürznelken mit einer Länge von 12–17 mm. Sie sind braun und bestehen aus einem langen, bis 4 mm dicken Unterkelch (Hypanthium). Der Geschmack ist brennend gewürzhaft mit einem stark aromatisch duftenden Geruch. Beim Einkerbigen der Gewürznelken ist es möglich, mit den Fingernägeln ätherisches Öl an der Druckstelle herauszudrücken. *Syzygium aromaticum* ist ein Baum der in der traditionellen Medizin

Einleitung

besonders aufgrund seiner pharmakologischen Effekte eingesetzt wurde und wird [1] [2]. Daher ist es folglich wichtig, einen Blick auf die chemischen Inhaltsstoffe dieses Baumes zu werfen.



Abbildung 1¹: Die Blütenknospen knapp vor der Ernte

1.1.2 Chemische Merkmale

Die Gewürznelke ist ein besonders ergiebiger Lieferant phenolischer Verbindungen wie beispielsweise Flavonoiden (Quercetin- und Kämpferolderivate), Hydroxyzimtsäure, Hydroxybenzoesäure oder aber auch von Eugenol, das mit einer hohen Konzentration zwischen 75–85 % die Hauptkomponente des ätherischen Öls darstellt. Andere wichtige Komponenten, die erwähnt werden sollten, sind Eugenolacetat, Caryophyllen und verschiedene Monoterpene. Des Weiteren können Gerbstoffe, freie Gallussäure, Sterole, Phenolcarbonsäuren und Triterpene vorkommen [1] [2]. Letzteren wurde in dieser Diplomarbeit besondere Aufmerksamkeit geschenkt, da die Triterpene den TGR5-Rezeptor modulieren konnten. Dabei handelte es sich im konkreten Fall um die Triterpensäuren Oleanolsäure und Maslinsäure, die in Abbildung 2, S.8 dargestellt sind.

¹ Für Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter blogspot.com

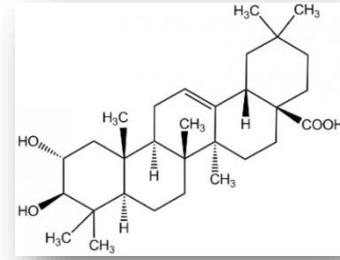
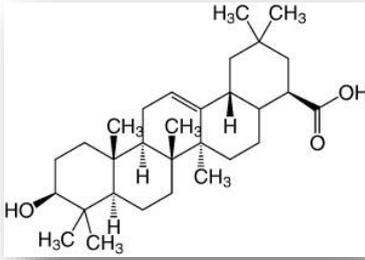


Abbildung 2: Die linke Abbildung zeigt die **Oleanolsäure**² und die rechte Abbildung die **Maslinsäure**³

1.1.3 Pharmakologische Merkmale

Die Gewürznelke ist schon lange in der traditionellen Medizin im Einsatz, daher ist es auch nicht verwunderlich, dass es bereits zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten über diese Droge gibt. Eine Vielzahl von Analysen schrieb der Gewürznelke verschiedene pharmakologische Wirkungen zu. Ganz besonders zu erwähnen ist deren antivirale Aktivität, vor allem gegen Herpesviren. Sie zeigt aber auch eine antiseptische Wirkung auf orale Mikroorganismen, die Plaque bilden können. *Syzygium aromaticum* besitzt ein großes Repertoire an chemischen Inhaltsstoffen. Die Phenylpropanverbindung Eugenol sollte dabei nicht vergessen werden, da sie die Cyclooxygenase-2, welche die Arachidonsäure zu dem Eicosanoid Prostaglandin H₂ oxidiert, hemmen kann [1].

Den Hauptanwendungsbereich der Gewürznelke verrät bereits ihr Name, der offenbart, dass sie als Küchengewürz Verwendung findet. Es gibt aber auch zahlreiche verschiedene galenische Zubereitungen, in denen das ätherische Öl verarbeitet ist. Dieses wird von den ganzen, zerkleinerten oder pulverisierten Blütenknospen (Abbildung 3, S.9) gewonnen und vorwiegend lokal appliziert. Im Vordergrund stehen hierbei die Behandlung entzündlicher Prozesse im Mund- und Rachenraum oder auch die Verwendung in der Zahnheilkunde zur lokalen Analgesie [1].

Syzygium aromaticum ist seit dem 13. Jahrhundert und bis heute als Aromatikum und in Kombination mit anderen Drogen als Karminativum, Stomachikum und Tonikum bekannt.

² Für Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter carlroth.com

³ Für Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter phyproof.phytolab.de



Abbildung 3⁴: Blütenknospen von *Syzygium aromaticum* in ganzer und pulverisierter Form

1.2 *Pimenta dioica*

1.2.1 Botanische Merkmale

Pimenta dioica (L.) Merr., Myrtaceae, ist ein im tropischen Jamaika gefundener immergrüner Baum mit einer Höhe von bis zu 12 m; andere Standorte sind in mittelamerikanischen Staaten wie beispielsweise Honduras, Kuba oder Mexiko belegt. Als Entdecker wird der Seefahrer Christopher Columbus erwähnt, der im Zuge seiner Expeditionen den Jamaikapfeffer, wie er im Deutschen unter anderem bezeichnet wird, entdeckt haben soll. Im Laufe der Zeit wurde Piment in zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen analysiert und eine Vielzahl von aromatischen Bestandteilen in den Blättern und den Beeren beschrieben. Abbildung 4, S.10 zeigt die pharmazeutisch relevanten Pflanzenteile. Die graudunklen Laubblätter sind gegenständig, ledrig, einfach und zeigen eine Länge von 4–8 cm. Die Ernte der beerenähnlichen Steinfrüchte erfolgt noch in grünem Zustand; diese werden dann mit Hilfe von Sonnenenergie getrocknet. Dabei erhalten sie ein Aussehen, das den Pfefferkörnern sehr nahekommt. Piment wird nicht nur als Gewürz, sondern auch in der Medizin angewendet. Daher sollen in den kommenden zwei Kapiteln die chemischen und pharmakologisch–medizinischen Aspekte näher beleuchtet werden⁵ [3].

⁴ Für Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter zutaten-shop.ch

⁵ Für Literaturrecherche siehe Kapitel 6.1.1, S.156 unter *Pimenta dioica*



Abbildung 4⁶: Laubblätter und beerenähnliche Steinfrüchte von *Pimenta dioica*

1.2.2 Chemische Merkmale

Pimenta dioica ist unter den klingenden Namen Jamaikapfeffer, Neugewürz und vielen anderen Synonymen bekannt. Piment erinnert aufgrund seines Aromas an zahlreiche andere Gewürze.

Im Laufe der Zeit hat es zahlreiche Analysen der Laubblätter und der Beeren gegeben. Dabei stachen vor allem verschiedenste aromatische Komponenten ins Auge. Wichtige isolierte phenolische Komponenten sind beispielsweise Eugenol, mit einer Konzentration von 65 bis 90 % im ätherischen Öl der Pimentfrüchte, Quercetin, Gallussäuren oder Ericifolin, um nur einige zu nennen. Auch terpenoide Verbindungen konnten gefunden werden. In dieser Diplomarbeit spielten die Triterpensäuren eine besonders wichtige Rolle, da sie, wie bei *Syzygium aromaticum*, den TGR5-Rezeptor modulieren konnten. Einziger Unterschied zur Gewürzlilie war, dass zwei zusätzliche Triterpensäuren auftraten. Dabei handelte es sich um die Corosolsäure und Ursolsäure, die in der Abbildung 5, S.11 dargestellt sind.

Abhängig vom Erntezeitpunkt beinhaltet der Jamaikapfeffer auch 2 bis 5 % ätherisches Öl, dessen Hauptaromakomponenten Eugenol und Methyleugenol sind. Auch Terpene wie 1,8 Cineol, α -Phellandren oder Myrcen konnten gefunden werden.

Bei den zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten konnten weder in den Blättern noch in den Beeren Alkaloide bestätigt werden⁷ [3] [4].

⁶ Für Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter gfnfoodsales.com

⁷ Für Literaturrecherche siehe Kapitel 6.1.1, S.156 unter spice-pages.com / 1

Einleitung



Abbildung 5⁸: Corosolsäure wird in der linken Abbildung und die Ursolsäure in der rechten Abbildung gezeigt

1.2.3 Medizinischer Einsatz

Der Jamaikapfeffer findet nicht nur auf medizinischer Ebene Anwendung. Der nicht-medizinische Einsatz ist im Bereich der Küche, wo er zur Würzung von Speisen und Getränken beispielsweise in Saucen, Desserts, Kuchen, Eintöpfen und Teemischungen eingesetzt wird. Jamaikaner verwenden Piment sogar um Liköre herzustellen. Diese vielfältige Handhabung macht den Jamaikapfeffer zu einem vielseitigen Gewürz, welches dieser Tage nahezu weltweit in ganzer oder pulverisierter Form gehandelt wird.

Vor allem die medizinische Ebene darf nicht vernachlässigt werden. *Pimenta dioica* besitzt die Fähigkeit sowohl antioxidativ, antiproliferativ als auch antihypertensiv zu wirken. Sogar am Einsatz im Bereich der Chemoprävention und Therapie von Krebs wird geforscht. So ist besonders das durch wässrige Extraktion gewonnene Ericifolin zu erwähnen, welches in vitro und auch in vivo Potenzial gegen Brust- und Prostatakrebs zeigt. Auch die Gallussäure und Quercetin haben ähnliche Eigenschaften wie Ericifolin bezüglich der antitumoralen Aktivität. In Tabelle 1, S.12 sind wichtige chemische Verbindungen vom Jamaikapfeffer und deren pharmazeutische Relevanz aufgeführt.

Auch die traditionelle Anwendung ist wichtig. *Pimenta dioica* wurde bereits in der Volksmedizin vielseitig verwendet, so zum Beispiel gegen Prellungen, Diabetes oder Menstruationsbeschwerden. Ein Einsatz gegen Muskel- und neuralgische Schmerzen, Dyspepsie und Magenverstimmungen sind weitere Anwendungsmöglichkeiten. Letztere

⁸ Für Bildrecherchen siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter phyproof.phytolab.de

Einleitung

Beschwerden sollen vor allem durch Eugenol verbessert werden, da dieses stimulierend auf Verdauungsenzyme wirkt [5] [3].

Tabelle 1: Wichtige chemische Verbindungen von *Pimenta dioica* und deren pharmazeutische Relevanz [3]

Chemische Verbindung	Pflanzenteil	Pharmazeutische Bedeutung
Ericifolin	Beeren	antibakteriell; Anti-Tumor-Aktivität
Eugenol	Ätherisches Öl aus Beeren und Laubblättern gewonnen	antibakteriell; antimykotisch; entzündungshemmend; antiproliferativ; Apoptose induzierend; antioxidativ
Quercetin	Beeren	antiviral; entzündungshemmend; Anti-Tumor-Aktivität
Gallussäure	Beeren	antiviral; entzündungshemmend; Anti-Tumor-Aktivität

1.3 *Kaempferia galanga*

1.3.1 Botanische Merkmale

Kaempferia galanga L., Zingiberaceae, ist eine im tropischen Asien beheimatete, krautige, ausdauernde Pflanze. Sie kann häufig in Südchina, Thailand, Malaysia, Indonesien und auch in Indien gefunden werden. In europäischen Breiten ist sie unter dem Namen Gewürzlilie bekannt, versteckt sich aber wie die beiden zuvor Erwähnten hinter zahlreichen Synonymen. Die indische Gewürzlilie bildet wunderschöne orchideenartige Blüten, die zwischen weiß und violett variieren können; dargestellt in der Abbildung 6, S.13. Die eher kleine Pflanze mit einer Wuchshöhe von 10 bis 15 cm bildet meist zwei bis vier violett-grüne Laubblätter aus, die 7 bis 14 cm lang und 4 bis 9 cm breit sein können. Bei dem arzneilich verwendeten Pflanzenteil handelt es sich um das Rhizom, zu Latein *Kaempferiae galangae rhizoma* - ein Vermehrungsorgan, welches circa 2 cm groß, und bräunlich ist, einen elliptischen Querschnitt aufweist, und zahlreiche, circa 1 cm dicke Seitenläufer mit einer Länge von bis zu 10 cm besitzt.

Einleitung

Der Geruch ist stark gewürzhaft und aromatisch, abgerundet mit einem adstringierenden, scharfen und bitteren Geschmack^{9,10} und [6].



Abbildung 6¹¹: Orchideenartige Blüte der indischen Gewürzllilie

1.3.2 Chemische Merkmale

Kaempferia galanga ist eine sehr gut dokumentierte Pflanze. Der Wurzelstock beinhaltet circa 2,5 % ätherisches Öl, von dem wiederum circa 99 % der Inhaltsstoffe vollständig aufgeklärt wurden. Bei den Hauptkomponenten handelt es sich vor allem um p-Methoxyzimtsäureethylester, Zimtsäureethylester und Pentadekan. In der Literatur können auch noch andere chemische Verbindungen nachgelesen werden, wie 1,8-Cineol, Borneol, Camphen, links- und rechtsdrehendes α -Pinen, Δ -3-Caren, Kaempferol, Eucalyptol, β -Caryophyllen, um nur einige wenige zu nennen (siehe Fußnote 9, S.13, Fußnote 12, S.13 und [6]). Kapitel 3.4.1.2, S.117 listet jene Verbindungen auf, die im Zuge dieser Diplomarbeit durch die Dereplikation des Rhizom-Extrakts von *Kaempferia galanga* aufgeschlüsselt wurden.

⁹ Für Literaturrecherche siehe Kapitel 6.1.1, S.156 unter padma.ch

¹⁰ Für Literaturrecherche siehe Kapitel 6.1.1, S.156 unter Gewürzllilie

¹¹ Für Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter gingersofindia.com

1.3.3 Pharmakologische Merkmale

Das Rhizom der indischen Gewürzlilie besitzt einen stark aromatischen und gewürzhaften Geruch, verbunden mit einem bitteren, adstringierenden und scharfen Geschmack. Durch diese Kombination macht der traditionelle Einsatz im Bereich des Magens als Stomachicum durchaus Sinn. Durch den scharfen Geschmack tritt des Weiteren ein wärmender Wirkmechanismus in den Vordergrund.

Es gibt eine lange Auflistung an positiven Wirkungen von *Kaempferia galanga*. So ist die entzündungshemmende und analgetische Wirkung zu erwähnen; Blätter und Rhizome werden gegen Kopfschmerzen, Rheumatismus, Zahnschmerzen oder Magenschmerzen eingesetzt. Auch die nematizide Wirkung gegen den Befall mit Fadenwürmern oder die Mosquito-abwehrende und larventötende Potenz sind Basis für weitere wichtige Einsatzbereiche der Extrakte. Verschiedene experimentelle Untersuchungen stellten zudem eine vasorelaxierende, antimikrobielle und antivirale Wirkung fest.

Die traditionell asiatische Medizin nutzt das Rhizom im Bereich Husten, Bluthochdruck oder aber auch gegen Infektionen der oberen Atemwege. Sogar gegen Schuppen soll sie wirksam sein. In den tibetischen Gebieten wird die Pflanze zum Auflösen von Blutgerinnsel oder bei Störungen im Bereich des Verdauungstraktes verwendet (für Literaturrecherche siehe sowohl Seite 13, Fußnote 9 als auch unter [6]).

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Der Rahmen dieser Diplomarbeit ergab sich aus einer vorangegangenen Arbeit [7] in der die Einflüsse des gastrointestinalen Traktes auf pflanzliche Inhaltsstoffe untersucht werden sollten. Zahlreiche Sekundärmetaboliten der oral eingenommenen pflanzlichen Heilmittel erreichen früher oder später das Darmmilieu, wo sie der im Darm angesiedelten mikrobiellen Flora ausgesetzt sind. Ziel war es, herauszufinden, ob und in welcher Form pflanzliche Triterpensäuren im Bereich des menschlichen Verdauungssystems durch Interaktion an im Darm lokalisierten Rezeptoren eine Wirkung erzielen können. Für die Untersuchung von biotransformierten Extrakten wurde das menschliche Magen-Darm-Milieu künstlich nachgeahmt: Nach Simulation des pH-Wertes der Magenpassage wurde eine mögliche Biotransformation durch eine 24 h Inkubation mit Mäusekot durchgeführt. In einem Transaktivierungsassay mit HEK293-Zellen¹² testete man anschließend die Bioaktivitäten der einzelnen Extrakte. Besonderes Interesse galt der Aktivierung des TGR5-Rezeptors¹³ und des FXR-Rezeptors¹⁴. Im Zuge der Bioaktivitätstests stellte sich heraus, dass bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine signifikante Stimulierung des TGR5-Rezeptors durch gewisse Extrakte eintrat. Dabei handelte es sich um *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (Blütenknospen), *Pimenta dioica* (L.) Merr. (Früchte) und *Kaempferia galanga* L. (Rhizom). Von den jeweils verwendeten Pflanzen kamen nur entsprechende, in Klammer stehende Pflanzenteile, zum Einsatz; diese in pulverisierter und gemahlener Form. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Zelltests war die nicht vorhandene bis sehr geringe Zelltoxizität. Von den drei erwähnten Pflanzen konnte *Syzygium aromaticum* bei einer Konzentration von 100 µg/ml den TGR5-Rezeptor am besten stimulieren, gefolgt von *Pimenta dioica* und *Kaempferia galanga* [7]. Die genaue Herstellung und wie die einzelnen Tests durchgeführt wurden, können den Kapiteln 2.2.1, S.23 (Herstellung der Extrakte) und 2.2.11, S.50 (Luciferase-Assay) entnommen werden. Aufgrund dieser ausreichenden und umfassenden Informationen konnte ein Angelpunkt für diese Diplomarbeit gefunden werden. Die Aufgabenstellung war folglich herauszufinden, welche chemischen Inhaltsstoffe in den jeweiligen Pflanzen für die TGR5-Aktivierung verantwortlich waren. Zuerst erfolgte die Analyse der Bioaktivitätstests der bereits getesteten

¹² HEK293-Zellen = menschliche embryonale Nierenzellen, Zelllinie 293

¹³ TGR5-Rezeptor = G-Protein gekoppelter Rezeptor 19

¹⁴ FXR-Rezeptor = Farnesoid X-Rezeptor (Kernrezeptor)

Einleitung

Extrakte [7]; dargestellt in Abbildung 7. Wie der Abbildung entnommen werden kann, war *Syzygium aromaticum* jene Pflanze mit bester Aktivierungsfähigkeit des TGR5-Rezeptors in HEK293-Zellen, daher sollte auch mit jener gestartet werden. Bei allen dreien wurde zuerst die Dereplikation der Inhaltsstoffe durchgeführt. Dafür kamen verschiedene Chromatographiegekoppelte Massenspektrometer wie die LC-ESI-TOF- und die LC-ESI-Ionenfallen-Anlage zum Einsatz. Nach erfolgreicher Aufschlüsselung des chemischen Profils, sollte mit Hilfe der Literaturrecherche herausgefunden werden, ob bereits Publikationen mit den dereplizierten Strukturen in Kombination mit der Pflanze und dem TGR5-Rezeptor vorlagen. Im Anschluss sollten entsprechende chemische Verbindungen einzeln an HEK293-Zellen getestet werden, um darauf die Wirkung des Extraktes letztlich begründen zu können. Alle Zelltests wurden dankenswerterweise am Department für Pharmakognosie der Universität Wien von Frau Dr. Angela Ladurner durchgeführt.

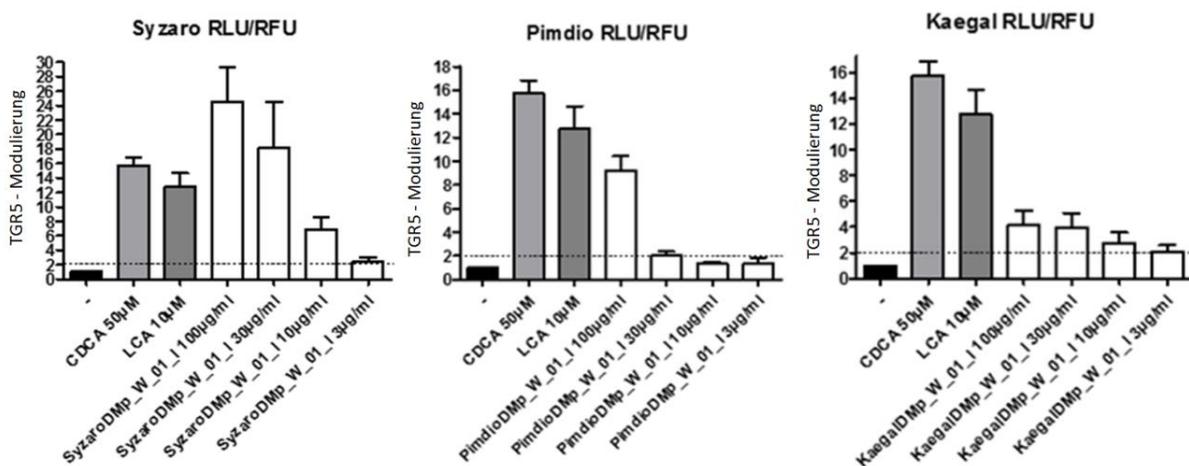


Abbildung 7 zeigt die **Resultate der Bioaktivitäts-Testung der Extrakte** von *Syzygium aromaticum* (rechts), *Pimenta dioica* (Mitte) und *Kaempferia galanga* (links). In den Darstellungen ist die TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen abgebildet. Als Positivkontrollen dienten zum einen CDCA¹⁵ (50 µM) und zum anderen LCA¹⁶ (10 µM). Bei RFU handelt es sich um den relativen Fluoreszenz-Wert und bei RLU um den relativen Lumineszenz-Wert. Auf der y-Achse geben daher die Werte RLU/RFU die Lumineszenz als Maß für die TGR5-Aktivität, normiert auf den Fluoreszenz-Wert, wieder, der als Kontrolle der Transfektion und zum Nachweis der Viabilität diene. Zum Einsatz kamen die Proben SyzaroDMP_W_01 bei *Syzygium aromaticum*, PimdioDMP_W_01 bei *Pimenta dioica* und KaegaiDMP_W_01 bei *Kaempferia galanga*. Mittelwert +/- Standardabweichung, n=3

¹⁵ CDCA = Chenodesoxycholsäure

¹⁶ LCA = Lithocholsäure

1.4.1 TGR5-Rezeptor

Der TGR5-Rezeptor [8, 9] spielte eine wichtige Rolle bei den Bioaktivitätstests. Die jeweiligen Extrakte wurden an transfizierten HEK293-Zellen getestet, um herauszufinden, ob diese in der Lage waren, den G-Protein gekoppelten Rezeptor zu stimulieren. Dieser Teil der Diplomarbeit soll nun einen kurzen Überblick über dessen Struktur und seine Funktionen im menschlichen Körper geben.

Im Jahr 2002 gelang es Maruyama et al. den ersten für Gallensäuren spezifischen membranären G-Protein gekoppelten Rezeptor zu beschreiben. Dabei handelte es sich um den TGR5-Rezeptor. Er ist in zahlreichen Geweben des Menschen unterschiedlich stark exprimiert; sehr hoch beispielweise im Gallenblasenepithel, Hüft- und Krummdarm. Es können unterschiedlichste intrazelluläre Signalwege durch den TGR5-Rezeptor aktiviert werden. Die Struktur baut sich grundsätzlich aus 330 Aminosäuren und 7 transmembranären Helices auf. Drei extrazelluläre Schleifen stehen für die Liganden-Wechselwirkungen zur Verfügung, während 3 intrazelluläre Schleifen für die Kommunikation mit Signalmolekülen dessen Wirkung komplementieren. Die intrazelluläre Schleife 3, der C- und der N-Terminus sind strukturell variabel. Abbildung 8, S.18 stellt den Rezeptor im Detail dar. Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass das menschliche TGR5-Gen auf dem Chromosom 2q35 vorkommt und eine hohe Sequenzhomologie unter den Säugertieren aufweist.

Im menschlichen Körper kann der TGR5-Rezeptor zahlreiche Effekte induzieren, von denen nun einige aufgezeigt werden. Einigen Studien zu Folge hat die Stimulierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors 19 eine entzündungshemmende Wirkung hervorgerufen. Diese zeigt sich durch eine reduzierte Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α [9]. Auch im Bereich des Stoffwechsels spielt er eine wichtige Rolle. Watanabe et al. fanden heraus, dass der TGR5-Rezeptor den Energieverbrauch, die Insulin-Sekretion und Fettleibigkeit beeinflussen kann [9]. Eine wichtige metabolische Regulation an Pankreas und Darm wird dem Rezeptor außerdem noch zugeschrieben. Er sorgt für eine Balance der Energie-Homöostase im braunen Fettgewebe und in den Muskeln und ist dadurch eine wichtige Zielstruktur zur Regulation des basalen Stoffwechsels [9].

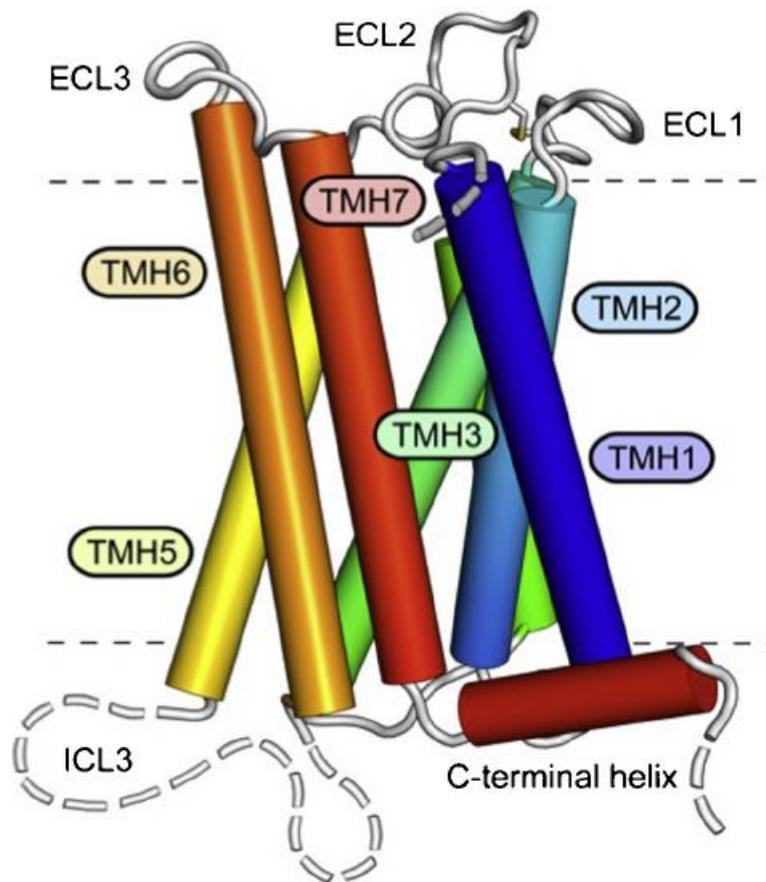


Abbildung 8¹⁷: G-Protein gekoppelter Rezeptor 1; ECL=extrazelluläre Schleifen; ICL=intrazelluläre Schleifen;
TMH=transmembranäre Helix

¹⁷ Für Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.159 unter researchgate.net

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Drogenmaterial

Die verwendeten Pflanzenmaterialien wurden dankenswerterweise von der Firma Padma AG, Motorenstraße 2a, 8623 Wetzikon, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Pflanzen und Pflanzenteile

Pflanze	Pflanzenteil	Chargennummer
<i>Syzygium aromaticum</i>	Caryophylli flos	21321101
<i>Pimenta dioica</i>	Pimentae fructus	21362100
<i>Kaempferia galanga</i>	Kaempferiae galangae rhizoma	21345300

2.1.2 Lösungsmittel und Chemikalien

2.1.2.1 Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel sind in Tabelle 3 angeführt:

Tabelle 3: Liste der verwendeten Lösungsmittel

Lösungsmittel	Bezugsquelle	Reinheit	Chargennummer
Acetonitril	VWR	HiPerSolv Chromanorm	14D001940
Aqua bidestillata	Eigenproduktion	-	-
Dichlormethan	VWR	ÖAB	-
Dichlormethan	VWR	AnalaR NORMAPUR	12A300505

Material und Methoden

Ethylacetat	VWR	ÖAB	-
Ethanol	-	96 % (ÖAB)	-
Methanol	VWR	ÖAB	-
Methanol für HPLC geeignet	VWR	HiPerSolv Chromanorm	15Z1684
n-Hexan	VWR	Min. 95 %	8I300512
Aceton	Roth	≥ 99,9 %	1027341
Toluol	Merck	≥ 99,5 %	K40820519

2.1.2.2 Chemikalien

Tabelle 4 listet die eingesetzten Chemikalien auf.

Tabelle 4: Liste der zum Einsatz gekommenen Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle	Reinheit	Chargennummer
Natrium sulfuricum siccum	-	-	-
Ninhydrin	-	-	-
Polyamidgel für Säulenchromatographie geeignet	Roth	-	205229263
Acidum formicicum conc.	Glatt-Koller	98 %	606000331

2.1.3 Referenzsubstanzen / Standardsubstanzen

Für die Bestätigung der Identifikation dereplizierter Verbindungen kamen verschiedene Referenzsubstanzen zum Einsatz. Im Zuge der Quantifizierung der Triterpensäuren wurden spezifisch gesonderte Standardsubstanzen verwendet; Tabelle 5 listet diese auf.

Tabelle 5: Liste der zum Einsatz gekommenen Referenz- und Standardsubstanzen

Referenzsubstanz	Bezugsquelle	Chargennummer	Produktnummer	Reinheit	Verwendung
4-Methoxy-Zimtsäure	Fluka	433173	65420	-	Referenz
Betulinsäure	Phytolab	1095	89529	-	Referenz
Chlorogensäure	Roth	799398	3878	> 95 %	Referenz
Corosolsäure	Phytolab	7053	80065	93,73 %	Standard
Eugenol	-	-	-	-	Referenz
Gallussäure	-	-	-	-	Referenz
Linolensäure	Acros	A0267278	215040050	Min. 98,5 %	Referenz
Maslinsäure	Phytolab	6695	83209	92,15 %	Standard
Oleanolsäure	Sigma - Aldrich	SLBD5617V	05504	≥ 97 %	Referenz
Oleanolsäure	Phytolab	7279	89383	98,04 %	Standard
Ölsäure	Sigma - Aldrich	75090	5508	-	Referenz
Palmitinsäure	Sigma - Aldrich	020M1581	P0500	-	Referenz
Stearinsäure	Fluka	BCBB2165	85679	-	Referenz
Ursolsäure	Phytolab	5684	89541	99,71 %	Standard

2.1.4 Ausrüstung und Gerätschaften

- Analysenwaagen, Präzisionswaagen u.a. Sartorius
- CAMAG TLC Visualizer
- CAMAG UV-Lampe für DC, Sprühkabinett
- Exsikkator
- Festphasen-Spritze: Phenomenex mit Fritte (Porengröße 20 µm), Volumen 3 ml
- Glasmaterial wie Rundkolben, Epprovetten, Bechergläser, Messkolben, Spitzkolben, Trichter, DC-Sprüher, Messzylinder, Wägeschiffchen, Glaspipetten, Scheidetrichter, Glasstäbe, ... u.a. der Firma Duran, Glasfira, Fortuna, Brand
- Heißluftfön, Kühlschrank, Gefrierschrank, Magnetprüher
- HPLC-Vials, Eppendorf-GefäÙe, RollrandgefäÙe
- Kolbenhubpipetten von Eppendorf
- Mikrokapillaren der Firma Blaubrand
- Muffen, Klammern, Ringe, Eisengestänge, Korkringe
- Probenkonzentrator von Techne
- Rotavapor der Firmen Büchi, Heidolph, u.a.
- Ultraschallbad: Transsomic T460 Elma
- verschiedene Zentrifugen u.a. von Eppendorf, Heidolph, IKA, Heraeus Instruments
- Vortexer: IKA Vortex Genius 3

2.1.5 Der Mäusekot

Die Biotransformation der Extrakte erfolgte mit aufgeschwemmtem Mäusekot, zur Verfügung gestellt von der Max F. Perutz Laboratories Animal Facility in Kooperation mit Prof. David Berry. Ziel war es, herauszufinden, ob durch die Behandlung aktive Metaboliten entstehen, die den TGR5-Rezeptor vermehrt stimulieren können. Mit Hilfe von TGR5-Transaktivierungsassays konnten entsprechende Daten erhalten werden. Nähere Informationen über die Handhabung des Mäusekotes und der Tests können der vorangegangenen Diplomarbeit von Mag. Nadina Faur entnommen werden [7].

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der Extrakte

Das Extraktionsverfahren wurde übernommen und adaptiert [10] und gliedert sich in zwei große Abschnitte:

1. Schritt–Eigentliche Extraktion:

- a. getrocknetes, zermahlendes Probenmaterial (300 mg) wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben
- b. mit n–Hexan (5 ml), für circa 1 min unter ständigem Schütteln am Ultraschallbad entfettet
- c. absitzen lassen und der Überstand mit Pasteurpipette entfernt
- d. die **1. Extraktion** mit Dichlormethan (7 ml) für 15 min am Ultraschallbad durchgeführt
- e. der Extrakt durch einen Trichter, der mit Watte ausgestopft war, filtriert und das Filtrat in einem Rundkolben aufgefangen = **Dichlormethan–Extrakt**
- f. die **2. Extraktion** erfolgte mit Methanol für 15 min am Ultraschallbad; dabei wurde der Rückstand aus dem Zentrifugenröhrchen inklusive der Watte, die bei der 1. Extraktion verwendet wurde, in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt, extrahiert und in weiterer Folge
- g. zentrifugiert (10 min bei 3500 UpM) und der Überstand dekantiert = **Methanol-Extrakt**
- h. beide Extrakte wurden in einem Rundkolben vereinigt (Methanol– und Dichlormethan–Extrakt) und am Rotavapor eingetrocknet

2. Schritt-Entfernung der Tannine:

- a. der getrocknete Extrakt wurde in einem Rundkolben mit Methanol (4 ml) am Ultraschallbad wiederaufgenommen
- b. eine Festphasen-Spritze (Volumen 3 ml) mit Fritte (Porengröße 20 µm) mit 600 mg Polyamid befüllt (Staubmaske!)
- c. der Extrakt durch das Polyamid filtriert und in einem Rundkolben aufgefangen
- d. 2-mal mit je 4 ml Methanol nachgewaschen
- e. die vereinten Eluate auf eine zähflüssige Konsistenz am Rotavapor eingengt (es muss aber die Pipettierfähigkeit erhalten bleiben)
- f. in ein zuvor beschriftetes und ausgewogenes Rollrandgefäß überführt
- g. **Finaler Schritt:** im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet

Die Extrakte von *Syzygium aromaticum*, *Pimenta dioica* und *Kaempferia galanga* wurden aus einer vorangegangenen Diplomarbeit bereitgestellt (siehe [7]). Im Zuge der Analysen wurde die vorhandene Menge an *Kaempferia galanga* jedoch aufgebraucht, daher musste erneut ein Extrakt hergestellt werden. Die eingesetzte Drogenmenge wurde so angepasst, dass mehr Extrakt gewonnen werden konnte. Es wurde 3g getrocknetes und gepulvertes Ausgangsmaterial eingesetzt und nach dem zuvor beschriebenen Verfahren extrahiert, wobei auch alle Lösungsmittelvolumina verzehnfacht wurden. Die Tabelle 6 zeigt, wie die jeweiligen Probenbezeichnungen lauten.

Tabelle 6: Probenbezeichnungen

Pflanze	Extrakt 1	Extrakt 2
<i>Syzygium aromaticum</i>	Syzaro(DM)	SyzaroDMp_W
<i>Pimenta dioica</i>	PimdioDM	PimdioDMp_W
<i>Kaempferia galanga</i>	Kaegal_DM	KaegalRDMp

2.2.2 Gewinnung des ätherischen Öls von *Kaempferia galanga*

Die Gewinnung des ätherischen Öls von *Kaempferia galanga* war ein wichtiger Schritt um herauszufinden, welche Inhaltsstoffe in der Lage waren, die HEK293-Zellen zu stimulieren. Der Einsatz einer Wasserdampfdestillation war dafür notwendig. Die Apparatur ermöglichte die Separierung der flüchtigen Inhaltsstoffe. Die genaue Vorgangsweise soll nun näher erläutert werden.

Zu Beginn erfolgte die Einwaage von 2,0 g gemahlener, pulverisierter Droge auf einem Wägeschiffchen. Der Inhalt wurde anschließend in einen 100 ml Erlenmeyerkolben ohne Schliff mit 20 ml Wasser überführt. Abbildung 9 zeigt die für die Gewinnung verwendete Apparatur.

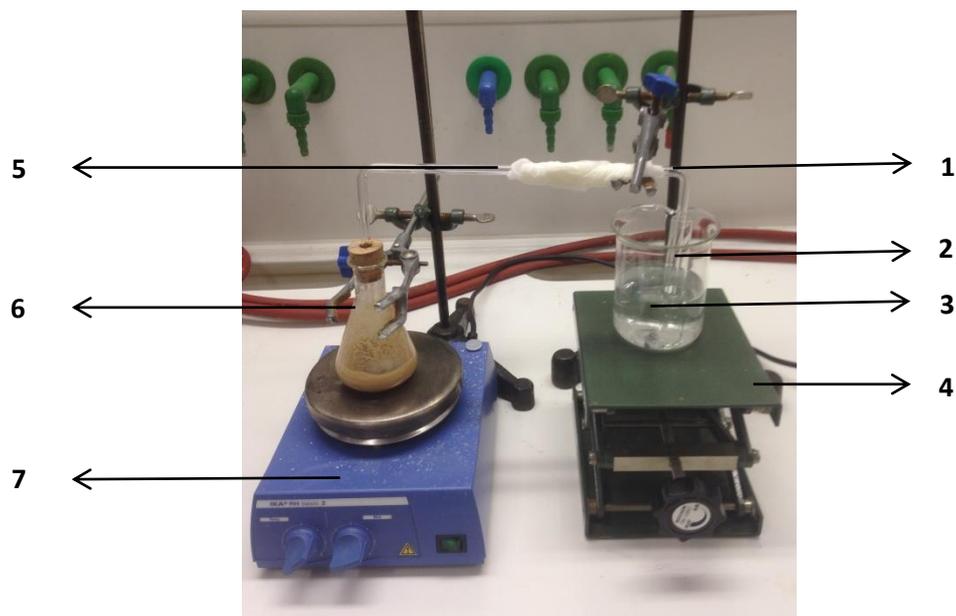


Abbildung 9: Apparatur zur Gewinnung des ätherischen Öls von *Kaempferia galanga*. 1: U-Rohr aus Glas; 2: kleine Epruvette vorgefüllt mit etwas Methanol; 3: Becherglas mit kaltem Wasser; 4: Laborboy; 5: in Wasser getränktes Papiertuch zur Kühlung; 6: Erlenmeyerkolben mit gemahlener, pulverisierter Droge mit 20 ml Wasser versetzt; 7: beheizbaren Magnetrührer

Um ausreichende Durchmischung zu gewährleisten, beinhaltete der Erlenmeyerkolben ein kleines Magnetrührstäbchen, welches den Siedeverzug durch Verwirbelung ausreichend verhinderte. Nachdem die Probe vorsichtig mit dem Magnetrührer erwärmt wurde, entstand Wasserdampf, der gezielt in einem U-Rohr aus Glas kondensierte. Dafür verwendete man ein nasses Papiertuch, welches das Rohr im letzten Drittel umwickelte. Als Auffangbehältnis diente eine kleine Epruvette, die in einem mit Eiswasser gefüllten Becherglas stand. Um die Aufnahme des ätherischen Öls zu fördern, wurde das untere Viertel der Epruvette mit Methanol befüllt.

Material und Methoden

Die Tabelle 7 beinhaltet alle für die Wasserdampfdestillation gewählten Parameter. Die gesamte Prozedur dauerte 1,5 h. Das Auffangbehältnis kam am Ende gut verschlossen mit Parafilm und Alufolie über Nacht in den Kühlschrank. Am nächsten Tag konnte ein kleiner, deutlich sichtbarer, intensiv riechender Tropfen, bestehend aus ätherischem Öl, erkannt werden. Der Tropfen wurde mit Hilfe einer GC-Spritze (10 µl) vorsichtig abgesaugt und in ein HPLC-Fläschchen mit 1000 µl Methanol überführt. Die Droge wurde als KaegalRM_AEO bezeichnet. Nähere Details über die weitere Verarbeitung und Verwendung des ätherischen Öls können dem Kapitel 3.4.3, S.130 entnommen werden. Das gewonnene ätherische Öl hatte einen intensiven würzigen Geruch mit einer leichten gelb / bräunlichen Verfärbung.

Tabelle 7: Parameter für die Wasserdampfdestillation

Gerät (Magnetrührer)	IKA RH basic 2
Temperatur	Stufe 4,2
Umdrehung	Stufe 4,5
Dauer der Destillation	1,5 h

2.2.3 Herstellung der Vergleichslösungen der Referenzsubstanzen

Der Nachweis zahlreicher Verbindungen mit Referenzsubstanzen war ein weiterer wichtiger Schritt zur Festigung der Ergebnisse, die durch die Dereplikation erhalten wurden. Tabelle 5, S.21 listet die verwendeten Referenzsubstanzen auf. Die Flüssigkeit in den HPLC-Fläschchen, die für die Vergleichsläufe Anwendung fanden, hatte eine Konzentration von 1,0 mg/ml. Die Referenzlösungen wurden durch Einwaage (1,0 mg) mit der Analysenwaage und anschließendem Lösen mit 1,0 ml Methanol am Ultraschallbad hergestellt, dicht verschlossen und lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.4 Herstellung der Verdünnungsreihe

Für die Quantifizierung der Triterpensäuren wurde eine **Verdünnungsreihe in 2 Abschnitten angelegt**:

1. Schritt: Herstellung der Stammlösungen

Es wurden 2,0 mg jeder einzelnen Triterpensäure (Oleanolsäure, Maslinsäure, Ursolsäure und Corosolsäure) jeweils in einen sauberen 2 ml Messkolben eingewogen und dieser mit Methanol bis zur Eichmarke aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Behandlung am Ultraschallbad, um ein vollständiges Auflösen zu gewährleisten. Die Endkonzentration in jedem einzelnen Messkolben betrug 1,0 mg/ml.

2. Schritt: Anlegung der Verdünnungsreihe

Von den vier hergestellten Lösungen wurde je 1,0 ml in einen 10 ml Messkolben überführt und mit Methanol bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die **Endkonzentration** im Messkolben, der am Schluss ein Gemisch aller vier Triterpensäuren beinhaltete, war **100,0 µg/ml** pro Analyt. Abbildung 10, S.28 zeigt den genauen Aufbau der Verdünnungsreihe. Für die Herstellung wurden verschiedenste Messkolben unterschiedlicher Fassungsvermögen (5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml und 50 ml) verwendet. Die schnelle Bereitung der Lösungen ist Voraussetzung, um Verdunstung weitgehend zu vermeiden. Ausgehend von den verschiedenen Endkonzentrationen (2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml und 100 µg/ml) erfolgte die Abfüllung der Triplikate in HPLC-Fläschchen. Außerdem wurde eine Qualitätskontrolle bei einer Konzentration von 16 µg/ml durchgeführt. Es wurden insgesamt 48 Fläschchen inklusive der Proben und Methanol-Leerproben hergestellt und analysiert; die Messkolben nach Gebrauch dicht mit Stoppel und Parafilm verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt. Der genaue Ablauf der eigentlichen Quantifizierung kann dem Kapitel 2.2.5.5, S.39 entnommen werden.

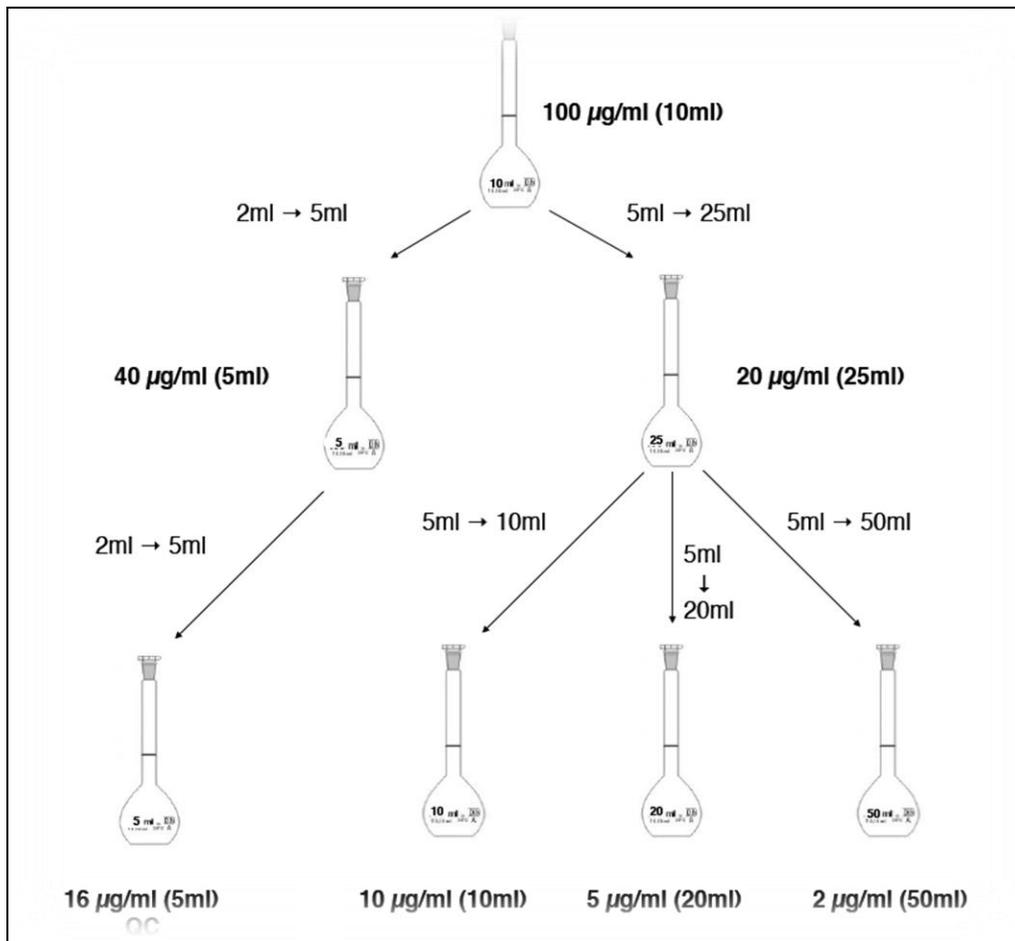


Abbildung 10: Verdünnungsreihe für die Quantifizierung der vier Triterpensäuren

2.2.5 HPLC–DAD–CAD

Von *Syzygium aromaticum*, *Pimenta dioica* und *Kaempferia galanga* konnten verschiedene Extrakte und Fraktionen erhalten und mit Hilfe eines HPLC–DAD–CAD-Instruments deren chemisches Profil aufgeschlüsselt werden. Mit der HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) gelang die Auftrennung der Analysengemische. Die Detektion erfolgte mit einem DAD (Diode-array detector) und einem universell einsetzbaren Detektor, dem CAD (Charged Aerosol Detector). Im Folgenden werden diese Gerätschaften erläutert.

2.2.5.1 HPLC^{18,19}

Der Begriff „Flüssigkeitschromatographie“ wurde im frühen 20. Jahrhundert vom russischen Botaniker und Biochemiker Mikail Semenowitsch Tswett definiert und geprägt. S. Tswett gelang es, ein Pflanzenfarbstoffgemisch in einer Säule zu trennen, welche mit einem entsprechenden Sorbent befüllt war. Die Versuchsanordnung zeigte eine unterschiedlich starke Wechselwirkung der Inhaltsstoffe mit einer stationären und einer mobilen Phase. Auf diesem Basisprinzip erfolgten verschiedene Weiterentwicklungen und Optimierungen, sodass Mitte des 20. Jahrhunderts die HPLC ins Leben gerufen und die ersten industriell hergestellten HPLC-Säulen der Firma Merck auf den Markt gebracht wurden. Die Abbildung 11, S.30 soll den allgemeinen Aufbau einer HPLC–Anlage zeigen.

Um nun eine erhaltene Probe analysieren zu können, muss diese so vorbereitet werden, dass sie in gelöster Form in HPLC–Fläschchen abgefüllt werden kann. Mit Hilfe eines Autosamplers erfolgt im Anschluss die Injektion eines zuvor eingestellten definierten Volumens einer Probe über ein Druckschleifenventil in die HPLC-Anlage. Dabei wird die Probe in einen zuvor aufgebauten kontinuierlichen Strom der mobilen Phase eingeleitet. Die Fließgeschwindigkeit beträgt typischerweise 100 µl/min–2 ml/min. Im Anschluss kommt es zur Auftrennung der Inhaltsstoffe durch Wechselwirkung mit der stationären Phase. Bei dieser

¹⁸ Literaturstelle im Kapitel 6.1.1, S.157 unter waters.com

¹⁹ Literaturstelle im Kapitel 6.1.1, S.157 unter web.archive.org

Material und Methoden

handelt es sich um eine Säule, deren Packungsdichte essentiell für die Trennung ist. Die Größe der Partikel kann zwischen 1–50 µm variieren und muss der jeweiligen Probe angepasst werden. Der Druckbereich herkömmlicher HPLC-Anlagen bewegt sich im Bereich 100–350 bar, aber auch höhere Drücke können möglich sein.²⁰

Wichtig ist, dass vor der eigentlichen Trennung die ideale Fließmittel-zusammensetzung und die geeignete Säule gefunden werden. Diese Prozedur wird als Methodenoptimierung bezeichnet. Nähere Informationen zu dieser sind im Kapitel 2.2.5.4, S.33 enthalten.

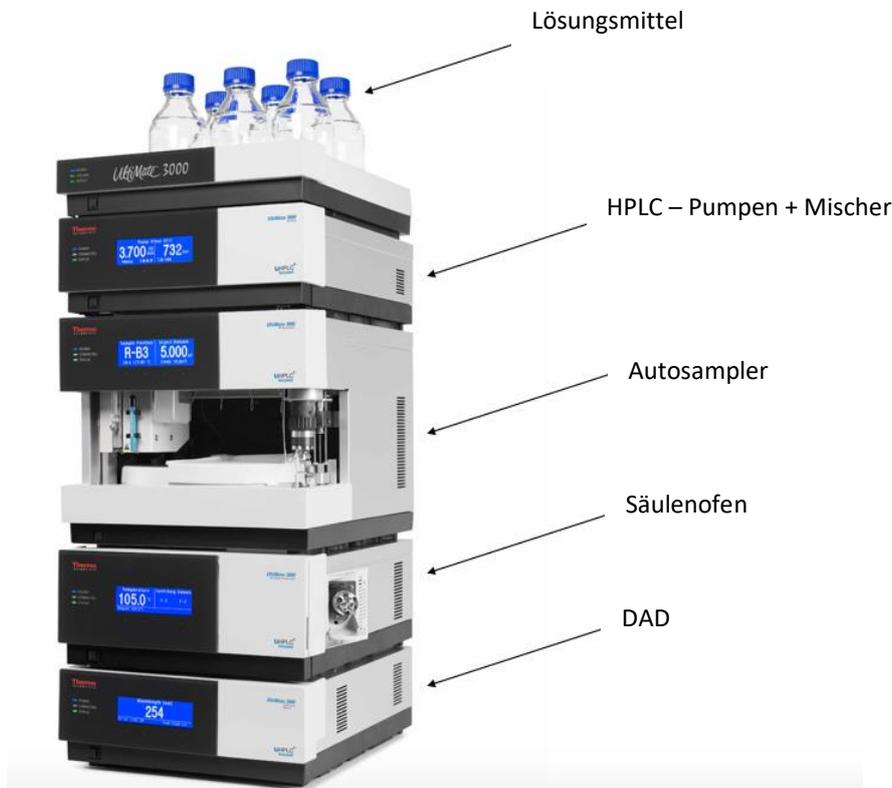


Abbildung 11²¹: Allgemeiner Aufbau einer HPLC-Anlage

Sind die richtigen Einstellungen gefunden, können die Probenkomponenten getrennt werden. Dabei verlassen die Inhaltsstoffe die HPLC-Säule gemäß der Stärke der Retention. Es wird im Allgemeinen zwischen der Normalphasen- und der Umkehrphasenchromatographie unterschieden. Bei der erstgenannten Chromatographie-Art kommen Materialien wie Kieselgel oder Aluminiumoxid zum Einsatz. Die Umkehrphasenchromatographie greift vorwiegend auf chemisch modifizierte Kieselgele (z.B. C18-modifiziertes Kieselgel) zurück. Im Zuge dieser Diplomarbeit kam immer letztere zum Einsatz.

²⁰ Literaturrecherche siehe Kapitel 6.1.1, S.156 unter kromidas.de

²¹ Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter Arellanolimitada.com

Das Eluat, welches die getrennten Probenkomponenten enthält, wird mit den an die HPLC gekoppelten Detektoren untersucht. Für diese Arbeit kamen sowohl der DAD als auch der CAD zum Einsatz. Mit diesen war es möglich, Chromatogramme zu erstellen, indem das Analysengemisch aufgetrennt vorlag. Auf der x-Achse befand sich die Zeit und auf der y-Achse die Intensität des Detektorsignals. Ein Beispiel für ein Chromatogramm kann unter der Abbildung 20, S.62 betrachtet werden. In den folgenden zwei Kapiteln werden nun die beiden Detektortypen näher beschrieben.

2.2.5.2 DAD²²

Die Abkürzung DAD steht für Diode-Array-Detector, ein UV/VIS-Detektor der bei allen Analysen zum Einsatz kam. Dieses Gerät misst die Lichtabsorption der Probe im ultravioletten bzw. visuellen Wellenlängenbereich. Dabei kommt ein polychromatischer Lichtstrahl zum Einsatz, der nach dem Durchtritt der Probe mit Hilfe eines optischen Gitters in seine spektralen Teilstrahlen zerlegt wird. Die Messung der Lichtintensität erfolgt nicht durch eine einzelne Photodiode, sondern durch die Anordnung vieler einzelner. Dabei kann die Anzahl der Dioden zwischen 512 bis 1024 schwanken. Der ausdrückliche Vorteil dieser Gerätschaft ist, dass durch die Anzahl der Dioden verschiedene Wellenlängen gleichzeitig erfasst werden können. Somit ermöglicht der DAD zu jedem einzelnen Messzeitpunkt im Chromatogramm das gesamte UV/VIS-Spektrum des Eluats aufzunehmen. Bei dem Endergebnis handelt es sich um ein dreidimensionales Chromatogramm, mit den Achsen Zeit, Wellenlänge und Absorption. Der große lineare Bereich trägt überdies zu einem guten Ergebnis bei.

²² Literaturrecherche im Kapitel 6.1.1, S.156 unter chemgapedia.de

2.2.5.3 CAD²³

Im Jahr 2002 wurde von Dixon und Peterson eine neuartige Technologie beschrieben, der Charged Aerosol Detector (CAD). Dabei handelt es sich um einen weitgehend universell einsetzbaren massenabhängigen Detektor, der jedoch nicht in der Lage ist flüchtige Verbindungen zu detektieren (siehe Abbildung 12, S.33). Bei den experimentellen Analysen im Zuge dieser Arbeit waren sowohl der DAD als auch der CAD häufig gekoppelt, damit Verbindungen, die mit dem einen nicht sichtbar waren, mit dem anderen jedoch detektiert werden konnten. Für die Analysen kam das Gerät Corona ultra RS Charged Aerosol Detector der Firma Thermo Scientific zum Einsatz.

Um nun Gemische mit dem CAD analysieren zu können, müssen diese zunächst aufgetrennt werden. Die Separierung erfolgte mittels der HPLC, wie bereits im Kapitel 2.2.5, S.29 erwähnt. Nachdem das HPLC–Eluat den DAD passiert hatte, erfolgte für die weitere Analyse im CAD die Zerstäubung des Eluates mit Stickstoff. Im Anschluss kam es zur Trocknung der entstandenen Tröpfchen. Durch die Trocknung konnte die mobile Phase entfernt und analytisch relevante Partikel der semi- und nichtflüchtigen Komponenten erhalten werden. Diese erhielten im Anschluss eine Ladung, welche von einem sekundären Stickstoffstrom übertragen wurde. Der sekundäre Stickstoffstrom erhält seine Ladung durch Ionisation während der Passage an einem hochspannungsführenden Platindraht. Der Fluß elektrisch-geladener Aerosol-Partikel wird schließlich mit Hilfe eines hochempfindlichen Elektrometers gemessen [12]. Dabei kommt es zu einem Signal, das im direkten Verhältnis zur Quantität des vorhandenen Analyten steht²⁴. Wichtig ist, dass der Response weitgehend unabhängig von den physikochemischen Eigenschaften des Analyten, aber stark abhängig von der Lösungsmittel-Zusammensetzung ist. Auch hier entsteht ein Chromatogramm, welches auf der x–Achse die Zeit und auf der y–Achse die Intensität widerspiegelt.

²³ Literaturrecherche im Kapitel 6.1.1, S.156 unter dionex.com

²⁴ Literaturrecherche im Kapitel 6.1.1, S.156 unter chemie.de



Abbildung 12²⁵: Corona ultra RS Charged Aerosol Detector der Firma Thermo Scientific

2.2.5.4 Fließmittel und Methodenoptimierung

Im Folgenden werden alle Parameter, Bedingungen und verwendete Geräte angegeben, die zur Auftrennung und Analyse der jeweiligen Proben notwendig waren. Für alle Extrakte ausgehend von *Syzygium aromaticum*, *Kaempferia galanga* und *Pimenta dioica* konnte eine geeignete Methode für eine optimale Auftrennung gefunden werden. Zusätzlich werden in diesem Kapitel auch Informationen bezüglich der für die Quantifizierung und die Analyse von Fraktion 5 (*Kaempferia galanga*) verwendeten Methoden gegeben.

Eine wirkliche Hilfe bei den Methodenoptimierungen war Dr. Martin Zehl, der durch die jahrelange praktische Erfahrung auch eine Vielzahl an Informationen lieferte, die gezielt für die Optimierung genutzt werden konnten. So war es möglich mit einigen wenigen Wiederholungen die Methode so auszureifen, dass sie für die entsprechenden Auftrennungen und Analysen eingesetzt werden konnte.

Im Anschließenden soll in die einzelnen Methodenoptimierungen im Detail Einblick gegeben werden.

²⁵ Bildrecherche siehe Kapitel 6.1.2, S.158 unter dionexsofttron.de

Methodenoptimierung 1: *Kaempferia galanga*

Die Tabelle 8 zeigt sowohl die eingesetzten Geräte als auch die eingestellten Parameter. Der Fließmittelgradient ist in Tabelle 9, S.34 dargestellt.

Tabelle 8: HPLC-Parameter für die Methodenoptimierung 1-3 von *Kaempferia galanga*, *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica*

Gerät	Dionex Ultimate 3000 RSLC
Stationäre Phase	Acclaim C ₁₈ der Firma Thermo Scientific Partikelgröße: 3 µm; Porengröße: 120 Å; Säulendimension: 2,1 x 150 mm Chargennummer: 018-01-139; Produktnummer: 059130
Mobile Phase	Fließmittel A: 0,1%ige wässrige Ameisensäure Fließmittel B: Acetonitril
Temperatur des Säulenofens	25° C
Detektion und UV – Bereich des DAD	DAD (180–400 nm) und CAD (Dionex Corona ultra RS Charged Aerosol Detektor der Firma Thermo Scientific)
Injektionsvolumen	2,000 µl (<i>Kaempferia galanga</i> und <i>Syzygium aromaticum</i>); 3,000 µl (<i>Pimenta dioica</i>)

Tabelle 9: Fließmittelgradient für die Methodenoptimierung 1 von *Kaempferia galanga*

Nummer	Zeit (min)	Fluss (ml/min)	% B
1	0,000	0,500	5,0
2	45,000	0,500	95,0
3	55,000	0,500	95,0
4	56,000	0,500	5,0
5	66,000	0,500	5,0
6	66,000	Stopp-Laufzeit	

Methodenoptimierung 2: *Pimenta dioica*

Die Tabelle 8, S.34 zeigt sowohl die eingesetzten Geräte als auch die eingestellten Parameter. Der Fließmittelgradient ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Fließmittelgradient für die Methodenoptimierung 2 für *Pimenta dioica*

Nummer	Zeit (min)	Fluss (ml/min)	% B
1	0,000	0,500	5,0
2	14,000	0,500	26,0
3	28,000	0,500	75,0
4	38,000	0,500	95,0
5	48,000	0,500	95,0
6	49,000	0,500	5,0
7	56,000	0,500	5,0
8	56,000	Stopp-Laufzeit	

Methodenoptimierung 3: *Syzygium aromaticum*

Die Tabelle 8, S.34 zeigt sowohl die eingesetzten Geräte als auch die eingestellten Parameter. Der Fließmittelgradient ist in der Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Fließmittelgradient für die Methodenoptimierung 3 für *Syzygium aromaticum*

Nummer	Zeit (min)	Fluss (ml/min)	% B
1	0,000	0,500	5,0
2	10,000	0,500	25,0
3	18,000	0,500	65,0
4	30,000	0,500	89,0
5	31,000	0,500	95,0
6	40,000	0,500	95,0
7	41,000	0,500	5,0
8	50,000	0,500	5,0
9	50,000	Stopp-Laufzeit	

Methodenoptimierung 4:**Quantifizierung der Triterpensäuren in *Pimenta dioica* und *Syzygium aromaticum***

Die Tabelle 12 zeigt sowohl die eingesetzten Geräte als auch die eingestellten Parameter. Der Fließmittelgradient ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12: Parameter für die Methodenoptimierung 4 für die Quantifizierung der Triterpensäuren in *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica*

Gerät	Dionex Ultimate 3000 RSLC
Stationäre Phase	Acclaim C ₁₈ der Firma Thermo Scientific; Partikelgröße: 3 µm; Porengröße: 120 Å; Säulendimension: 2,1 x 150 mm Chargennummer: 018-01-139; Produktnummer: 059130
Mobile Phase	Fließmittel A: 0,1%ige wässrige Ameisensäure Fließmittel B: Methanol
Temperatur des Säulenofens	10° C
Detektion	DAD und CAD (Dionex Corona ultra RS Charged Aerosol Detektor der Firma Thermo Scientific)
UV – Bereich des DAD	180–400 nm
Injektionsvolumen	3,000 µl

Tabelle 13: Fließmittelgradient für die Quantifizierung der Triterpensäuren in *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica*

Nummer	Zeit (min)	Fluss (ml/min)	% B
1	0,000	0,300	80,0
2	22,000	0,300	91,0
3	22,500	0,300	95,0
4	32,000	0,300	95,0
5	32,500	0,300	80,0
6	42,000	0,300	80,0
7	42,000	Stopp-Laufzeit	

Methodenoptimierung 5: Fraktion 5 von *Kaempferia galanga*

Die Tabelle 14 zeigt sowohl die eingesetzten Geräte als auch die eingestellten Parameter. Der Fließmittelgradient ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 14: Parameter für die Methodenoptimierung für die Fraktion 5 von *Kaempferia galanga*

Gerät	Dionex Ultimate 3000 RSLC
Stationäre Phase	Acclaim C ₁₈ der Firma Thermo Scientific; Partikelgröße: 3 µm; Porengröße: 120 Å; Säulendimension: 2,1 x 150 mm Chargennummer: 018-01-139; Produktnummer: 059130
Mobile Phase	Fließmittel A: 0,1%ige wässrige Ameisensäure Fließmittel B: Acetonitril
Temperatur des Säulenofens	35° C
Detektion	DAD und CAD (Dionex Corona ultra RS Charged Aerosol Detektor der Firma Thermo Scientific)
UV – Bereich des DAD	180–400 nm
Injektionsvolumen	2,000 µl

Tabelle 15: Fließmittelgradient für die Fraktion 5 von *Kaempferia galanga*

Nummer	Zeit (min)	Fluss (ml/min)	% B
1	0,000	0,300	65,0
2	30,000	0,300	95,0
3	40,000	0,300	95,0
4	40,500	0,300	65,0
5	49,500	0,300	65,0
6	49,500	Stopp-Laufzeit	

2.2.5.5 Quantifizierung der Triterpensäuren

In den Proben von *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica* erfolgte die Quantifizierung der enthaltenen Triterpensäuren. Bei *Syzygium aromaticum* handelte es sich um die Oleanolsäure als Hauptkomponente und die Maslinsäure. *Pimenta dioica* enthielt hingegen vier Triterpensäuren und zwar die Maslinsäure, Ursolsäure, Corosolsäure und die Oleanolsäure in fallenden Konzentrationen. Die gesamte Quantifizierung erfolgte mit der HPLC–DAD–CAD–Anlage mit der Methodenoptimierung 4, wie sie im Kapitel 2.2.5.4, S.33 erläutert wurde. Für die Quantifizierung wurde die in Kapitel 2.2.4, S.27 beschriebene Verdünnungsreihe verwendet, wobei von jeder Konzentration (2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml und 100 µg/ml) vier HPLC–Fläschchen befüllt wurden. Das ergab insgesamt 32 Fläschchen inklusive des QC–Standards und der Methanol–Leerproben. Für jede Konzentration erhielt man vier Werte, die die jeweilige Peakfläche im CAD-Chromatogramm in pAxmin repräsentierten. Daraus erfolgte die Berechnung der Mittelwerte, die für die Erstellung der Eichgerade angewendet wurden. Im Anhang unter Kapitel 7.4, S.171 sind alle erhaltenen Ergebnisse tabellarisch abgebildet. Außerdem werden alle ermittelten Eichgeraden für jede einzelne Triterpensäure dargestellt. Aus den Diagrammen können auch die Werte der analysierten Proben entnommen werden, die entsprechend markiert wurden. Tabelle 16 zeigt die Konzentrationen der eingesetzten Proben in den HPLC–Fläschchen. Die Vermessung der Proben erfolgte jeweils viermal, daher waren es letztlich 48 HPLC–Fläschchen, die für die gesamte Quantifizierung analysiert wurden.

Tabelle 16: Konzentration der Probenlösungen in den HPLC-Fläschchen

Arbeitsbezeichnung	Konzentration in den HPLC-Fläschchen
Syzaro(DM)	0,218 mg/ml
SyzaroDMp_W	0,272 mg/ml
PimdioDMp	5 mg/ml
PimdioDMp_W_01	6,025 mg/ml

2.2.6 LC–ESI–TOF²⁶

Die Anwendung der Gerätekombination LC–ESI–TOF spielte bei der Molekulargewichtsbestimmung der einzelnen Verbindungen in den Extrakten eine entscheidende Rolle. Dabei steht der Begriff LC–ESI–TOF in diesem Fall für die Kopplung der Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) mittels Elektrospray-Ionenquelle (ESI) an ein Flugzeit–Massenspektrometer (TOF=time of flight). Die Funktionsweise der UHPLC ähnelt der HPLC, wie sie im Kapitel 2.2.5, S.29 beschrieben wurde, allerdings kann hier unter höherem Betriebsdruck getrennt (1000-1300 bar) und somit kleiner Partikel als stationäre Phase verwendet werden. Die UHPLC bietet verschiedene Vorteile im Vergleich zur HPLC. So können Proben schneller und zeitsparender, mit einer höheren Auflösung getrennt und analysiert werden. Zudem wird eine höhere Sensitivität erreicht.

Das aus der UHPLC austretende Eluat wird über eine kleine Verbindungskapillare zur ESI–Einheit weitertransportiert und dabei circa 1:8 mit Hilfe eines T-Stücks gesplittet. Bei der Elektrospray–Ionisation handelt es sich um ein schonendes Ionisierungsverfahren. Dabei wird die eintretende Probe durch eine Mikrokapillare gepumpt und mit Hilfe eines angelegten elektrischen Feldes und einem regulierbaren Stickstoff-Zerstäubungsgasstroms in einen geladenen Spray verwandelt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels entstehen dabei Ionen der zumeist intakten Analytmoleküle mit unterschiedlichen Ladungszahlen. Es können sowohl Anionen als auch Kationen mit der ESI erhalten werden. Dabei entstanden unterschiedliche Verbindungen, so zum Beispiel protonierte Moleküle ($[M+nH]^{n+}$), deprotonierte Moleküle ($[M-nH]^{-n}$) oder Natrium-Adduktionen ($[M+Na]^+$).

Die entstehenden Ionen werden im Anschluss im Flugzeit Massenspektrometer analysiert. Im Falle dieser Diplomarbeit kam ein Reflektor–Flugzeit–Massenspektrometer zum Einsatz. Mit diesem war es möglich, auf vier Nachkommastellen genaue Molekülmassen zu erhalten. Für die eigentliche Messung ist es notwendig, dass die von der Ionenquelle erzeugten Ionen im Flugrohr beschleunigt werden. Dies geschieht durch einen kurzen Spannungsstoß; im Anschluss wird die Flugzeit der Ionen über eine gewisse Flugstrecke gestoppt, um auf das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) schließen zu können. Die Trägheit spielt dabei eine essentielle Rolle, denn je größer und schwerer das zu untersuchende Ion ist, desto träger ist es

²⁶ Literaturrecherche im Kapitel 6.1.1, S.156 unter tu-chemnitz.de

auch und umso länger benötigt es eine gewisse Distanz zu überwinden. Sowohl die hohe Massenauflösung als auch die Detektion fast aller erzeugten Ionen sind erklärte Vorteile dieser Gerätekombination. Die Summenformel-Bestimmung erfolgte mittels Smart Formula-Algorithmus (Bruker Compass DataAnalysis 4.2).

Für diese Diplomarbeit wurden sowohl im Positiv- als auch im Negativ-Ionenmodus Massenspektren aufgenommen, wodurch eine Dereplikation der Extrakte möglich war. Obwohl dieses Verfahren eine sehr hohe Massenauflösung besaß, entstand bei Massengleichheit ein Problem bei der Differenzierung möglicher Inhaltsstoffe. Durch Kombination der LC-ESI-TOF mit den Daten der LC-ESI-Ionenfalle war es möglich, nahezu alle Verbindungen zu dereplizieren. Letztere Methode wird im nächsten Kapitel beschrieben.

2.2.7 LC-ESI-Ionenfalle²⁷

Die Anwendung der LC-ESI-Ionenfalle erfolgte einerseits zur Überprüfung der LC-ESI-TOF Ergebnisse und andererseits um weitere Verbindungen zu identifizieren, die aufgrund gleicher Massen nicht eindeutig zu unterscheiden waren. Ein großer Vorteil der Ionenfalle ist, dass MS^n -Spektren aufgenommen werden können. Dadurch ist es möglich, Teilstrukturen einer chemischen Verbindung herauszufinden. Mit Hilfe der Ionenfalle kann man einzelne Strukturelemente wie etwa einen abgespaltenen Zucker detektieren. Die Masse der betroffenen Teilstruktur kann aus dem Massenspektrum herausgelesen werden, wodurch die Möglichkeit besteht, sukzessive eine Struktur aufzuklären. Bevor dies jedoch machbar ist, muss zunächst die Probe mit einer HPLC oder ähnlichem Gerät (siehe im Kapitel 2.2.5.1, S.29) aufgetrennt und anschließend über das ESI-Verfahren ionisiert (siehe im Kapitel 2.2.6, S.40) werden. Die durch diesen Prozess entstehenden Ionen werden nun in einem Quadrupolfeld „gefangen“ gehalten. Dort kreisen sie innerhalb der Falle in stabilen 3-dimensionalen Bahnen. Es werden entweder alle Ionen (in einem weiten m/z -Bereich) oder nur gewisse Ionen durch die angelegten Spannungen in der Falle gehalten. Werden nun die Spannungen geändert, können bestimmte Ionen die Ionenfalle über einen Spalt verlassen und so ein gezielter Massen-Scan der vorhandenen Ionen durchgeführt werden. Für die Erfassung werden die Ionen instabil gemacht und auf einen Detektor „geschossen“. Dabei entsteht ein Ionenstrom, der gemessen

²⁷ Literaturrecherche im Kapitel 6.1.1, S.156 unter univie.ac.at

Material und Methoden

wird; daraus kann das Massenspektrum durch eine geeignete Software generiert werden. Die Aufnahme kann sowohl im negativen als auch im positiven Modus erfolgen. Bei dem eingesetzten Gerät handelte es sich um eine HCT 3D Quadrupol-Ionenfalle der Firma Bruker Daltonics; Abbildung 13 zeigt das Gerät.

Die Fragmentierung ist ein wichtiger Punkt, der kurz angeführt werden soll. In der Ionenfalle können zunächst Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) isoliert werden. Durch anschließende Stöße mit einem Hintergrundgas (He) erfolgt eine Anregung der Vorläuferionen bis Teilstrukturen abgespalten und die entstehenden Fragmentionen in entsprechenden MS^n -Spektrum erfasst werden²⁸. Das Muster der Fragmentierung ist letztlich für jedes Molekül charakteristisch und kann als Fingerprint einer Verbindung angesehen werden²⁹.

Alle MS-Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Martin Zehl am Department für Pharmakognosie durchgeführt.

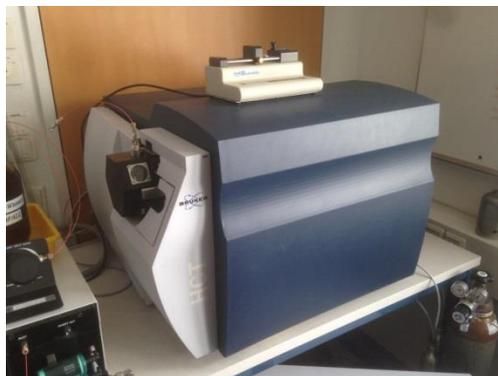


Abbildung 13: HCT 3D Quadrupol-Ionenfalle der Firma Bruker Daltonics

2.2.8 Dünnschichtchromatographie

Alle DC-Analysen erfolgten unter Kammersättigung, wobei stets klares und einphasiges Fließmittel zum Einsatz kam. Es wurde immer darauf geachtet, dass genügend Gemisch im Trog war. Die Beschriftung der Platten geschah immer vor dem Auftragen, wobei die Laufstrecke am Start mit 1,5 cm und an der Front mit 0,5 cm begrenzt wurde und die Platte eine Gesamtlänge von 10 cm hatte; somit betrug die Laufstrecke 8 cm. Für das Auftragen der Proben kamen

²⁸ Literaturrecherche im Kapitel 6.1.1, S.156 unter zimmermann.chemie.uni-rostock.de

²⁹ Literaturrecherche im Kapitel 6.1.1, S.156 unter univie.ac.at

Material und Methoden

Mikrokapillaren zum Einsatz, mit denen händisch und strichförmig die Proben zu gleichen Volumina aufgetragen wurden, um Mengenverteilungen bei der Analyse abschätzen zu können. Vor der Entwicklung der DC erfolgte immer eine Kontrolle unter UV 254 nm, um sicher zu gehen, dass eine ausreichende Menge aufgetragen wurde; dies konnte anhand der Intensität der Violett-färbung abgeschätzt werden.

Die Detektion fand unterschiedlich statt, meist jedoch durch Besprühen und anschließendes Erhitzen. Am häufigsten konnten die Spots mit Vanillin / Schwefelsäure-Lösung sichtbar gemacht werden, außer bei der Sichtbarmachung der Nylon-6-Derivate; hier kam Jodlösung zum Zug. Die Auswertung der Platten erfolgte sowohl an Tageslicht als auch mit den beiden Wellenlängen bei UV 254 + 366 nm.

2.2.8.1 Stationäre Phase

Hierbei kam Kieselgel 60 F₂₅₄ auf Aluminiumfolien unterschiedlicher Größen, der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz.

2.2.8.2 Mobile Phase

Für *Syzygium aromaticum* und *Kaempferia galanga* erfolgte die optimale Auftrennung des Inhaltsstoffprofils durch folgendes Fließmittel:

Fließmittel 1: Toluol + EtOAc + HCOOH + MeOH + Aceton + H₂O (4:2:1:0,5:0,25:0,25)

Eine Grundvoraussetzung war das Einhalten exakter Mengenverhältnisse, um eine Mehrphasenbildung zu vermeiden; das eingesetzte Fließmittel musste klar und einphasig sein.

2.2.8.3 Sprühreagenzien

Die nachstehende Tabelle 17 zeigt alle verwendeten Sprühreagenzien, die zum Nachweis dienen:

Tabelle 17: Liste der verwendeten Sprühreagenzien

Vanillin / Schwefelsäure-Lösung	0,5 ml Anisaldehyd + 10 ml CH ₃ COOH 96% + 85 ml Methanol + 5 ml konzentrierte H ₂ SO ₄
Jodlösung	0,5 ml 0,5 M Jodlösung + 5 ml 2N H ₂ SO ₄
Anisaldehyd-Sprühreagenz	425 ml Methanol + 50 ml konz. Essigsäure + 25 ml Schwefelsäure + 2,5 ml Anisaldehyd
0,2% ethanolische Ninhydrin-Lösung	10 ml 96% EtOH + 20 mg Ninhydrin
Naturstoffreagenz	5g Naturstoffreagens (A) + 495 ml Methanol

2.2.8.4 DC-Auftragslösungen für den Nylon-6-Nachweis

Eine Vergleichsprobe der löslichen Nylon-6-Derivate aus dem Polyamid-Gel wurde im Wesentlichen wie in Kapitel 2.2.1, S.23 beschrieben hergestellt. Der einzige Unterschied im Procedere war, dass kein pulverisiertes, gemahlenes Ausgangsmaterial verwendet wurde, sondern nur reiner Methanol wie er auch schon bei der Herstellung der Extrakte Verwendung fand. Die Festphasen-Extraktionsspritze wurde mit 900,0 mg Polyamid befüllt und mit Methanol durchfeuchtet. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit je 4,0 ml Methanol. Die Sammlung der Eluate (12,0 ml) erfolgte in einem Rundkolben mit anschließender Eintrocknung am Rotavapor.

Im trockenen Zustand waren dann im Gefäß weiße Schleier sichtbar. Zum Schluss erfolgte die Wiederaufnahme des Rückstandes in 500 µl Methanol.

Auch die Herstellung einer **Methanol-Vergleichslösung** war notwendig um allfällige Rückstände im Lösungsmittel nachweisen zu können. In diesem Fall wurde der reine Methanol (12 ml) in einem Rundkolben eingetrocknet und anschließend wieder in 500 µl Methanol gelöst.

2.2.9 Automatisierte Säulenchromatographie

Die automatisierte Säulenchromatographie wird auch als Flash-Chromatographie bezeichnet und kam für die Fraktionierung des Extraktes KaegalRDMp von *Kaempferia galanga* zum Einsatz (siehe Kapitel 3.4.3, S.130). Die Tabelle 18, S.46 zeigt die für die Separierung gewählten Parameter, während die Tabelle 19, S.46 den Fließmittelgradient wiedergibt.

Bevor die Trennung gestartet werden konnte, musste die Probe in Methanol gelöst und in einen tarierten Rundkolben überführt werden. Dieser beinhaltete exakt die gleiche Menge an Kieselgel 60 wie an Probe (1:1 = Probe:Kieselgel 60). Nachdem alles vereinigt war, erfolgte die Verdampfung des Methanols durch einen Rotavapor. Im Anschluss wurde der Rückstand in eine Kartusche mit Fritte übergeführt, welche bildlich in Abbildung 14 dargestellt ist. Die Probe wurde in diesem Fall in trockener Form auf die untere Fritte aufgebracht, mit reinem Kieselgel 60 bedeckt und mit einer oberen Fritte verschlossen. Anschließend wurde die Säule mit der Probe im Säulenkopf in die Puriflash-Anlage eingebaut. Zur Detektion ist der ELSD angewendet worden. Die Entscheidung, welche Peaks gemeinsam in Fraktionen gesammelt wurden, basierte auf dem ELSD-Signal. Hier waren es 22 Fraktionen. Die weitere Verarbeitung der gesammelten Fraktionen kann dem Kapitel 3.4.3, S.130 entnommen werden. Dort wird genau beschrieben, welche Fraktionen anhand der DC vereinigt wurden, um diese anschließend an HEK293-Zellen testen zu lassen.

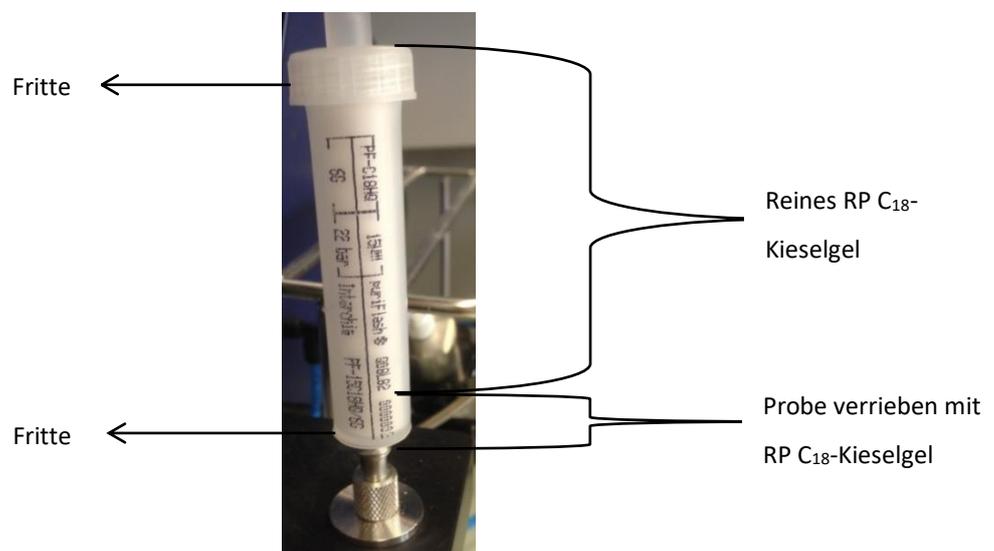


Abbildung 14: Kartusche für die Flashchromatographie mit Probe

Material und Methoden

Tabelle 18: Parameter für die Fraktionierung des Extraktes von *Kaempferia galanga*

Gerät	Puriflash 4250 von der Firma Interchim
Stationäre Phase	Puriflash RP-C18, HQ, 6 g, max. 22 bar der Firma Interchim
Mobile Phase	Fließmittel A: Wasser Fließmittel B: Acetonitril
Temperatur des Säulenofens	25° C
Detektion	ELSD

Tabelle 19: Fließmittelgradient für die Fraktionierung des Extraktes von *Kaempferia galanga*

Nummer	Zeit (min)	Fluss (ml/min)	% B
1	0,0	5,0	5,0
2	45,0	5,0	95,0
3	60,0	5,0	5,0

2.2.10 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) ist eine präzise, schnelle und einfache Methode, um flüchtige und temperaturunempfindliche Verbindungen trennen und detektieren zu können. Mittlerweile ist sie in analytischen Labors kaum mehr wegzudenken. Einer von vielen Vorteilen dieser Methode ist, im Vergleich zu älteren, die geringere Voraussetzung an technischem Knowhow. Vor jeder Analyse ist die Wahl der Säule, des Detektors und des Trägergases essentiell. Die Säule kann entweder flüssiges oder festes Packungsmaterial beinhalten. Neben diesem spielt auch die Länge der Säule eine wichtige Rolle. Je länger sie ist, desto länger ist die Retentionszeit und desto besser ist in der Regel die Trennleistung. Auch die Säulenofentemperatur bzw. der Temperaturgradient und die Flussrate des Trägergases haben enormen Einfluss auf die Auftrennung. Als Trägergas kommt häufig Stickstoff oder Helium zum Einsatz [13].

Die Probenvorbereitung ist ein weiterer wichtiger Schritt; so muss das Lösungsmittel beispielsweise leicht flüchtig sein. Im Anschluss erfolgt die Injektion eines definierten Volumens der Probe mit einer GC-Spritze. Dieses wird im Injektor schlagartig verdampft, mit dem Trägergas durch die Säule transportiert und dabei entsprechend dem Verteilungsgleichgewicht der einzelnen Komponenten zwischen mobiler und stationärer Phase aufgetrennt. Die separierten chemischen Inhaltsstoffe verlassen anschließend nacheinander die Säule und können hierauf mit unterschiedlichen Methoden detektiert werden. Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden zwei verschiedene GC-Systeme eingesetzt. Mit dem einem kann die Menge quantifiziert und mit dem anderen die einzelnen Verbindungen des ätherischen Öls von *Kaempferia galanga* identifiziert werden. Die nachfolgenden zwei Kapitel gehen auf diese nun näher ein.

2.2.10.1 GC-FID

Der Flammenionisationsdetektor ist ein sehr weit verbreiteter Detektor mit einer relativ hohen Nachweisgrenze. Er ist aufgrund seiner Robustheit und seiner Generalität sehr beliebt, weil nahezu alle organischen Verbindungen detektiert werden können.

Die GC-FID wurde in dieser wissenschaftlichen Arbeit für die Quantifizierung eingesetzt, um festzustellen, wie die Mengenverhältnisse der einzelnen Verbindungen im ätherischen Öl waren.

Abbildung 15, S.49 lichtet das eingesetzte GC-FID-Gerät ab, während die Tabelle 20 die verwendeten Parameter beinhaltet³⁰.

Tabelle 20: Parameter für die GC-FID

Gerät	Perkin Elmer GC Autosystem XL
Säule	Quarzglas; Länge: 10 m; Durchmesser: 0,25 mm
Stationäre Phase	SE-54 CB (0,25 µm)
Trägergas	N ₂ (5.0)
Dauer	35 min
Temperaturgradient	0–73 min; 50–270 °C; 3 °C/min
Flussrate	1,0 ml/min
Säulenfluss	1,67 ml/min
Einspritzmenge	1 µl des 1:1000 in CH ₂ Cl ₂ verdünnten ätherischen Öls
Detektion	FID, 270 °C

³⁰ Für Literaturrecherche siehe Kapitel 6.1.1, S.156 unter Flammenionisationsdetektor



Abbildung 15: Darstellung der GC-FID

2.2.10.2 GC-MS

Die Massen der Inhaltsstoffe des ätherischen Öls von *Kaempferia galanga* können mit der GC-MS aufgeklärt werden. Da das mittels Elektronenstoßionisation (EI) gebildete $M^{+\bullet}$ -Ion oft instabil ist und vollständig zerfällt, kann das Molekulargewicht nicht immer bestimmt werden. Allerdings eignet sich das Fragmentierungsmuster meist sehr gut zur Identifizierung.

Die Tabelle 21, S.50 beinhaltet alle wichtigen Parameter, mit denen die Massenbestimmung durchgeführt wurde. Abbildung 16 zeigt das verwendete Gerät.



Abbildung 16: Darstellung der GC-MS

Tabelle 21: Parameter für die GC-MS

Gerät	Shimadzu GC MS Serie QP 2010
Säule	Zebron ZB5; Länge: 60 m; Durchmesser: 0,25 mm; Schichtdicke: 0,25 µm
Trägergas	Helium 5.0; Druck 181,2 kPa
Dauer	45 min
Temperaturgradient	6 °C/min
Flussrate	13,0 ml/min
Säulenfluss	1,67 ml/min
Starttemperatur / finale Temperatur des Säulenofens	50 °C / 270°C
Einspritzmenge und Einspritztemperatur	1 µl des 1:1000 in CH ₂ Cl ₂ verdünnten ätherischen Öls; 50 °C
Detektion	Massenspektrometer; Messbereich m/z 40–500
Ionisation	EI bei 250 °C

2.2.11 Luciferase Reportergen Assay

Die Durchführung der gesamten zellulären Tests erfolgte dankenswerterweise durch Frau Dr. Angela Ladurner am Department für Pharmakognosie der Universität Wien. Die TGR5–Transaktivierungsassays waren essentiell für den Nachweis, ob einzelne Verbindungen oder aber auch Fraktionen eine Aktivität auf den TGR5–Rezeptor zeigten. Die folgenden Informationen sollen den Arbeitsverlauf der Tests wiedergeben. Alle hier angegebenen Daten wurden von Frau Dr. Angela Ladurner freundlicherweise bereitgestellt.

Tag 1

- 6×10^6 HEK293-Zellen auf eine 15 cm große Zellkulturschale ausbringen
- zur Kontrolle 4×10^6 HEK293-Zellen in eine andere 10 cm große Zellkulturschale ausbringen

Tag 2:

Calciumphosphat-Transfektion:

- die Zellen unter dem Mikroskop kontrollieren
- Transfektions-Mixtur herstellen
- im Allgemeinen werden die Plasmide (Response-Element, Expressionsplasmid und GFP) in entsprechenden Verhältnissen zugefügt und das Volumen der Mixtur auf 656 μ l mit ddH₂O aufgefüllt. Anschließend 750 μ l 2x HBS zugeben und die Proben mischen; letzter Schritt: mit 94 μ l 2M CaCl₂ ergänzen und die Proben sofort mit einem Vortexer homogenisieren.

für den TGR5:

- 5 μ g TGR5-Expressionsplasmid, 5 μ g CRE-Luc-Plasmid und 3 μ g EGFP-Plasmid verwenden
- die Mischungen bei Raumtemperatur 20 min stehen lassen
- nach diesem Inkubationsschritt werden die Lösungen tröpfchenweise den Zellplatten zugegeben und diese anschließend 6 h inkubiert

Vorbereitung der Probenlösungen und erneutes Aussäen

- generell werden für 1 ml Probenlösung 996 μ l gestripptes Medium + 4 μ l 1000 x Stammlösung der Probe benötigt
- 50 μ l der Probenlösung vor der erneuten Aussaat in jede Mikrotiterplatte zufügen

Erneutes Aussäen der Zellen

- nach 6-stündiger Transfektion wird die erneute Aussaat gestartet. Die Platten werden zuerst mit PBS gewaschen und dann 2 ml Tris/EDTA auf die 15 cm und 1 ml auf die 10 cm Zellkulturplatte aufgetragen; inkubieren lassen für 2–3 min. 8 ml des HEK293-Kulturmediums hinzugeben und die resuspendierte Zellsuspension in ein Falcon-Zentrifugenröhrchen transferieren; weiter waschen und die zurückbleibenden Zellen in ein anderes Falcon-Zentrifugenröhrchen geben. 8 min zentrifugieren bei 1400 Umdrehungen pro Minute. Anschließend die Pellets in 10 ml gestripptes Medium resuspendieren und die Zellen zählen.
- übertrage 50 000 Zellen pro 150 µl pro Well in der Zellkulturplatte; vorsichtig schütteln und für 24 h inkubieren lassen

Tag 3

- das Medium absaugen und die Zellkulturplatte sofort bei – 80 °C schockgefroren; die Platten müssen mind. 1 h gekühlt werden; messbar 1 Woche lang

Messung

- zuerst muss das Gerät Genios Pro entsprechend vorbereitet werden
- Die eigentliche Messung erfolgt mit folgendem Lysepuffer: für 2 Platten: 9,6 ml ddH₂O + 2,4 ml Lysis-Puffer + 12 µl CoA + 12 µl DTT
- Platten aus dem Kühlschrank holen und 50 µl Lysepuffer in jedes Well der Zellkulturplatte zugeben. 10 min schütteln und anschließend 40 µl auf eine schwarze Platte geben; für 1 min schütteln und anschließend mit dem Gerät Genios Pro messen.

Verwendete Medien und Plasmide

➤ HEK293–komplett-Kulturmedium

- DMEM weißes mit 4,5 g/l Glucose, Glutamin, Penicillin/Streptomycin, 10 % hitzeinaktiviertes FBS

➤ HEK293 behandeltes Medium

- DMEM weißes mit 4,5 g/l Glucose, Glutamin, Penicillin/Streptomycin, 5 % behandeltes FBS

➤ Plasmide

- TGR5: GPBAR 1 (nicht markiert) humaner G-Protein–gekoppelter Gallensäure Rezeptor 1 (GPBAR1), Transkript–Variante 3, NM_170699.1; gekauft von Origene (OG–SC123315)
- CRE–LUC: pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] Vector; gekauft von Promega (# E8471)
- EGFP: pEGFP–N1 Vektor Information PT3027–5 GenBank Zugang # U 557662; gekauft von BDBiosciences (#6085–1)

3 Resultate

3.1 Vorarbeit: Erhalt der Extrakte und Testergebnisse

Im nun folgenden Teil der Diplomarbeit wird die Herangehensweise besprochen und es werden Aufschlüsse darüber gegeben, wie diese wissenschaftliche Arbeit am Department für Pharmakognosie der Universität Wien angelegt wurde. Bevor jedoch „medias in res“ gegangen wird, soll noch einmal eine kurze Replik über die Entstehung des Diplomarbeitsthemas geben werden.

Die zentrale Fragestellung leitete sich aus einer bereits vorangegangenen Diplomarbeit ab, in der Einflüsse des gastrointestinalen Traktes auf pflanzliche Inhaltsstoffe untersucht werden sollten [7]. Da die Applikation vieler pflanzlicher Heilmittel oral erfolgt, werden die Inhaltsstoffe auch früher oder später dem Darmmilieu ausgesetzt und von der mikrobiellen Flora in unterschiedlicher Art und Weise umgewandelt.

Ziel dieser vorangegangenen Diplomarbeit war es, ein Darmmilieu nachzuahmen, um den Einfluss des Verdauungsprozesses auf die Inhaltsstoffe verschiedener pflanzlicher Extrakte zu beleuchten und zu verifizieren, ob dabei auch aktive Metaboliten entstehen. Die Untersuchung von biotransformierten und nicht-biotransformierten Extrakten stand hierbei im Vordergrund, wobei die Biotransformation durch eine 24-Stunden Inkubation mit Mäusekot durchgeführt wurde. In einem Transaktivierungsassay mit HEK293-Zellen wurden anschließend die Bioaktivitäten der einzelnen Extrakte getestet. Diese Zellen besitzen verschiedenste Rezeptoren, wobei in diesem Versuch der TGR5- und der FXR-Rezeptor essentielle Rollen spielten. Die verwendeten und getesteten pflanzlichen Extrakte wurden nach ihrem Gehalt an Triterpenoiden ausgewählt, da die Rezeptoren durch diese Verbindungen besonders gut aktiviert werden können. Anhand der Testergebnisse kristallisierten sich verschiedene Pflanzen heraus, die in der Lage waren, in einer Konzentration von 100 µg/ml den TGR5-Rezeptor signifikant zu stimulieren.

Dabei handelte es sich um *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (Blütenknospen), *Pimenta dioica* (L.) Merr. (Früchte), *Kaempferia galanga* L. (Rhizom), *Potentilla aurea* L. (Kraut) und *Glycyrrhiza glabra* L. (Wurzeln) [7].

Resultate

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden die Extrakte folgender drei Pflanzen für weiterführende Untersuchungen gewählt: *Syzygium aromaticum*, *Pimenta dioica* und *Kaempferia galanga*. Sie waren in der Lage den TGR5–Rezeptor zu aktivieren, wobei *Syzygium aromaticum* jene Pflanze war, die bei einer Konzentration von 100 µg/ml sogar eine bessere Bioaktivität erzielte als die entsprechenden Positivkontrollen (50 µM CDCA bzw. 10 µM LCA). *Pimenta dioica* hingegen zeigte eine geringere, aber doch eine deutlich vorhandene Modulierung, allerdings nur bei 100 µg/ml. *Kaempferia galanga* ergab eine noch etwas geringere Aktivierung als dies bei *Pimenta dioica* der Fall war (siehe Abbildung 7, S.16), wobei diese schon bei 30 µg/ml auftrat. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war die sehr geringe bis fehlende Zelltoxizität, die so aber bei allen erwähnten Pflanzenextrakten vorlag. Die Extrakte von *Syzygium aromaticum*, *Pimenta dioica* und *Kaempferia galanga*, die in der vorliegenden Diplomarbeit verwendet wurden, waren bereits fertig hergestellt, wobei auch die entsprechenden Testergebnisse bereits vorlagen. Nähere Informationen über die genaue Herstellung und wie die einzelnen Tests durchgeführt wurden, kann der Diplomarbeit von Mag. Faur entnommen werden [7].

Aufgrund dieser umfassenden Vorarbeiten konnte ein guter Startpunkt für diese Arbeit gefunden werden. Es sollte mit jener der drei Pflanzen begonnen werden, die am besten in der Lage war, den TGR5–Rezeptor an den HEK293–Zellen zu stimulieren.

Deshalb wurde **die wissenschaftliche Arbeit mit der Gewürznelke** begonnen, die nicht nur aufgrund ihres besonderen aromatischen Duftes aus der Weihnachtszeit gut bekannt sein sollte, sondern auch ihres besonderen Aussehens wegen. Der zum Einsatz gekommene Pflanzenteil war die Blütenknospe in pulverisierter, gemahlener Form. Daraus erfolgte die Herstellung des Extraktes nach dem Extraktionsverfahren, wie es im Kapitel 2.2.1, S.23 beschrieben ist. Dieser wurde nun in vier verschiedenen Konzentrationen gemessen (100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml, 3 µg/ml) [7]. Die Durchführung der Zelltests kann im Kapitel 2.2.11, S.50 nachgelesen werden; alle Zelltests wurden von Frau Dr. Angela Ladurner durchgeführt.

In Verwendung war die Probe mit der Bezeichnung SyzaroDMp_W_01, bei der sich eine ausgeprägte dosisabhängige Bioaktivität zeigte. Die Aktivierung des TGR5–Rezeptors war bei einer Konzentration von 100 µg/ml und 30 µg/ml größer als bei den Positivkontrollen, die mit

Resultate

CDCA³¹ (50 µM) und LCA³² (10 µM) durchgeführt wurden. Erst bei den getesteten Konzentrationen von 10 µg/ml und 3 µg/ml zeigte sich eine geringere Bioaktivität, als die der Kontrollsubstanzen (siehe Abbildung 17).

Bei den RFU³³-Werten handelt es sich um die Fluoreszenz-Intensität und bei RLU³⁴ um die Lumineszenz-Intensität. Auf der y-Achse geben daher die Werte RLU/RFU die gemessene Lumineszenz, als Indikator der TGR5-Aktivität, normiert auf den Fluoreszenz-Wert wieder, der uns als Kontrolle der Transfektion und zum Nachweis der Viabilität dient.

In der rechten Abbildung (Abbildung 17) kann man sehr gut erkennen, dass bei den Konzentrationen 100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml oder 3 µg/ml kein Absterben der Zellen eintrat.

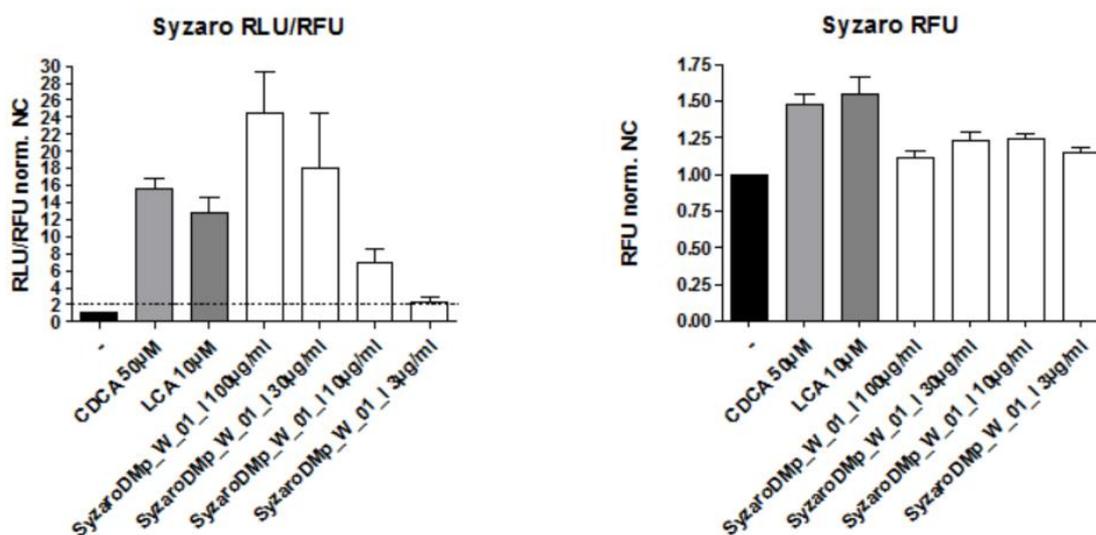


Abbildung 17: Die linke Abbildung zeigt die TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei wurde die nicht-biotransformierte Probe SyzaroDmp_W_01 verwendet. Die Aktivität ist bei den Konzentrationen 100 µg/ml und 30 µg/ml sogar größer, als die der Positivkontrollen CDCA (50 µM) und LCA (10 µM). Die rechte Abbildung demonstriert die nicht vorhandene Zelltoxizität. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Bei RFU handelt es sich um den normierten Fluoreszenz-Wert und bei RLU um den normierten Lumineszenz-Wert. Auf der y-Achse geben daher die Werte RLU/RFU die gemessene Lumineszenz, als Indikator der TGR5-Aktivität, normiert auf den Fluoreszenz-Wert, der uns als Kontrolle der Transfektion und zum Nachweis der Viabilität dient, wieder. Mittelwert +/- Standardabweichung

Durch die Analyse der Transaktivierungsassays im Vergleich mit den anderen beiden getesteten Pflanzenextrakten konnte festgestellt werden, dass es sich bei *Syzygium aromaticum* um jenen

³¹ CDCA = Chenodesoxycholsäure

³² LCA = Lithocholsäure

³³ RFU = Relative fluorescence unit = normalisierte Fluoreszenz-Intensität

³⁴ RLU = Relative luminescence unit = normalisierte Lumineszenz-Intensität

Resultate

Extrakt handelte, der bei einer Konzentration von 100 µg/ml am besten in der Lage war den TGR5–Rezeptors zu aktivieren. Der nächste logische Schritt konnte mit der Aufklärung der chemischen Mannigfaltigkeit der Inhaltsstoffe gefunden werden, da man wissen möchte, welche Verbindungen nun tatsächlich für die Wirkung verantwortlich waren. Das Hauptaugenmerk der analytischen Betrachtung richtet sich dabei aber auf die Identifizierung jener Inhaltsstoffe, die einerseits eine agonistische Aktivität auf den TGR5–Rezeptor besitzen und andererseits keine Zelltoxizität aufweisen sollten.

Der **zweite große Teil** dieser wissenschaftlichen Arbeit beschäftigte sich ausgiebig mit dem Extrakt, das aus den pulverisierten, gemahlene Früchten von *Pimenta dioica* gewonnen wurde. Die Herstellung des Extraktes ist im Kapitel 2.2.1, S.23 erläutert. Im Zuge der vorangegangenen Diplomarbeit [7] sind bereits sehr wichtige Vorarbeiten erledigt worden, sodass die Arbeit direkt mit diese Daten begonnen werden konnte; die Daten aber auch die Extrakte von *Pimenta dioica* wurden von Mag. Nadina Faur zur Verfügung gestellt.

Die zur Verfügung gestellten Proben wurden in vier verschiedenen Konzentrationen gemessen (100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml, 3 µg/ml). Bei der Probe PimdioDMP_W_01 konnte man erkennen, dass bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine deutliche, aber geringere Bioaktivität als bei den Positivkontrollen CDCA und LCA vorlag. Bei einer Konzentration von 30 µg/ml, 10 µg/ml, und 3 µg/ml war nur mehr eine sehr geringe oder gar keine Modulation ersichtlich; es war keine so schöne dosisabhängige Wirkung wie bei *Syzygium aromaticum* vorhanden; Abbildung 18, S.58 zeigt das Testergebnis. Die Werte RLU und RFU wurde bereits in diesem Kapitel diskutiert.

Der schwarze Balken in den jeweiligen Abbildungen zeigt die nur mit Vehikel-Kontrolle behandelten HEK293–Zellen. Es kann behauptet werden, dass die Testresultate vielversprechend ausfielen, da zum einen eine erwünschte positive TGR5–Modulation und zum anderen keine zellschädigende Eigenschaft der getesteten Extrakte vorlagen. In der rechten Abbildung ist ersichtlich, dass bei den Konzentrationen 100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml oder 3 µg/ml kein Absterben der Zellen vorlag.

Resultate

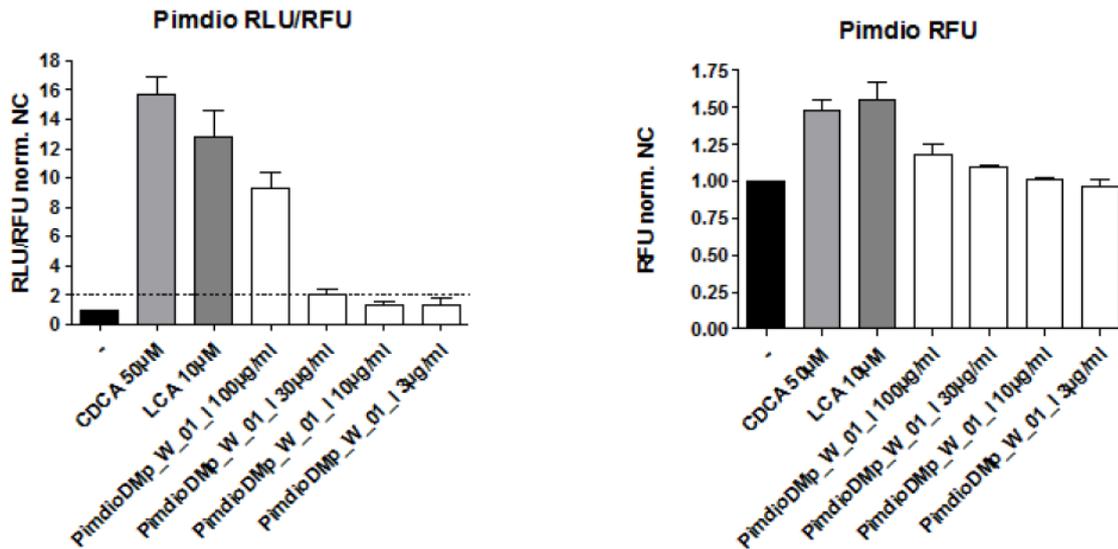


Abbildung 18 Die **linke Abbildung** zeigt die **TGR5– Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen**. Dabei wurde die nicht biotransformierte Probe PimdioDMP_W_01 verwendet. Die Aktivität ist bei der Konzentrationen 100 µg/ml groß, aber trotzdem kleiner als die der positiven Kontrollen CDCA (50 µM) und LCA (10 µM). Bei den Konzentrationen 30 µg/ml, 10 µg/ml und 3 µg/ml kam es nur mehr zu einer sehr geringen oder gar keine Modulation des TGR5–Rezeptors. Die **rechte Abbildung** demonstriert die **nicht vorhandene bis geringe Zelltoxizität**. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Bei RFU handelt es sich um den normierten Fluoreszenz–Wert und bei RLU um den normierten Lumineszenz–Wert. Auf der y–Achse geben daher die Werte RLU/RFU die gemessene Lumineszenz, als Indikator der TGR5–Aktivität, normiert auf den Fluoreszenz–Wert, der uns als Kontrolle der Transfektion und zum Nachweis der Viabilität dient, wieder. Mittelwert +/- Standardabweichung

Der nächste logische Schritt zum Ziel war die Aufklärung des chemischen Inhaltsstoffprofils von *Pimenta dioica*, da man, wie auch bei *Syzygium aromaticum*, herausfinden möchte, welche Inhaltsstoffe für die TGR5–Modulation verantwortlich waren. Die Vorgangsweise war prinzipiell die gleiche wie bei *Syzygium aromaticum*.

Der **dritte große Teil** dieser wissenschaftlichen Arbeit beschäftigte sich ausgiebig mit jenem Extrakt, welcher aus dem pulverisierten, gemahlene Rhizom von *Kaempferia galanga* gewonnen wurde. Die Herstellung des Extraktes ist im Kapitel 2.2.1, S.23 erläutert. Im Zuge der vorangegangenen Diplomarbeit [7] sind bereits sehr wichtige Vorarbeiten erledigt worden, sodass direkt mit den Daten losgestartet werden konnte. Frau Dr. Angela Ladurner führte alle Zelltests durch und anschließend wurden die daraus erhaltenen Daten von Mag. Nadina Faur zur Verfügung gestellt. Aus dieser Fülle erhaltener Informationen konnten verschiedene wichtige Erkenntnisse abgeleitet werden, auf die nun näher eingegangen wird.

Resultate

Die zur Verfügung gestellten Proben wurden in vier verschiedenen Konzentrationen gemessen (100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml, 3 µg/ml). Bei der Probe KaegalDmp_W_01 konnte man erkennen, dass bei einer Konzentration von 100 µg/ml und 30 µg/ml eine deutliche, aber geringere Bioaktivität als die der Positivkontrollen CDCA und LCA vorlag. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml und 3 µg/ml war nur mehr eine geringe Modulation ersichtlich (siehe Abbildung 17, S.56). Abbildung 19 zeigt das Testergebnis, wobei die rechte Abbildung demonstriert, dass bei den Konzentrationen 100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml und 3 µg/ml kein Absterben der Zellen eintrat.

Der nächste logische Schritt zum Ziel war die Aufklärung des chemischen Inhaltsstoffprofils des Extraktes von *Kaempferia galanga*, da man herausfinden wollte, analog wie bei *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica*, welche Inhaltsstoffe für die TGR5-Modulation verantwortlich waren.

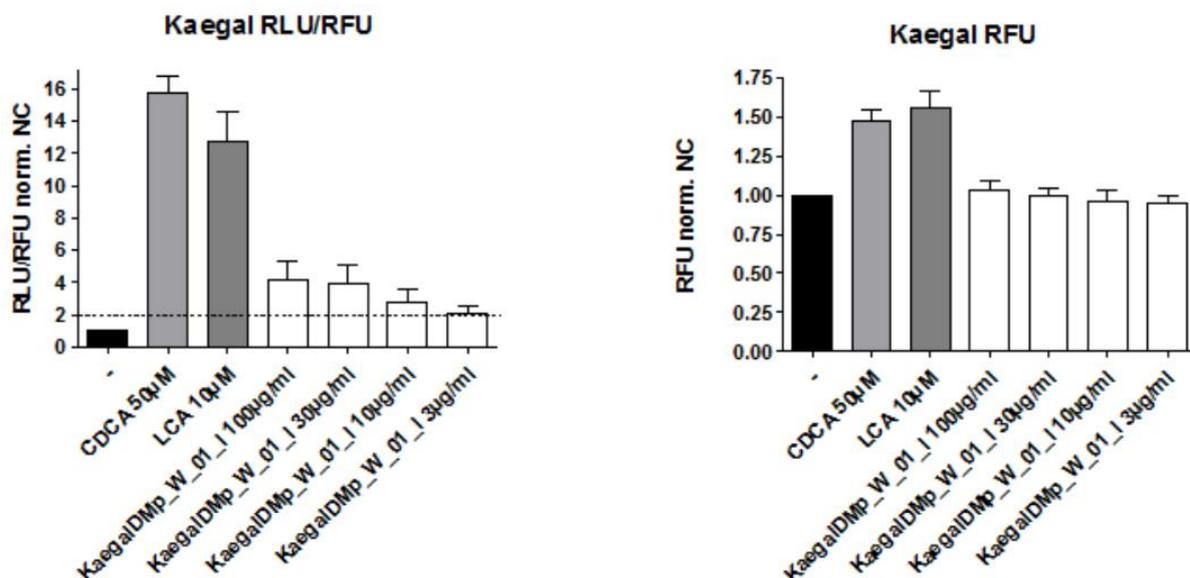


Abbildung 19 Die linke Abbildung zeigt die TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei wurde die nicht-biotransformierte Probe PimdioDmp_W_01 verwendet. Die Aktivität ist bei den Konzentrationen 100 µg/ml und 30 µg/ml groß, aber trotzdem kleiner als die der Positivkontrollen CDCA (50 µM) und LCA (10 µM). Bei den Konzentrationen 10 µg/ml und 3 µg/ml kam es nur mehr zu einer geringen Modulation des TGR5-Rezeptors. Die rechte Abbildung demonstriert die nicht vorhandene bis geringe Zelltoxizität. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Bei RFU handelt es sich um den normierten Fluoreszenz-Wert und bei RLU um den normierten Lumineszenz-Wert. Auf der y-Achse geben daher die Werte RLU/RFU die gemessene Lumineszenz, als Indikator der TGR5-Aktivität, normiert auf den Fluoreszenz-Wert, der uns als Kontrolle der Transfektion und zum Nachweis der Viabilität dienen. Mittelwert +/- Standardabweichung

3.2 *Syzygium aromaticum*

3.2.1 Dereplikation der Inhaltsstoffe

Die Dereplikation ist ein sehr wichtiger und zentraler Baustein in der Wirkstofffindung eines Extraktes, da sie eine rasche Identifizierung bereits bekannter Verbindungen ermöglicht. So kann man sehr schnell ein Bild über das Inhaltsstoffprofil eines Extraktes erhalten, vorausgesetzt, diese Verbindungen wurden auch schon publiziert [14]. Bevor jedoch die chemische Diversität analysiert wurde, war es stets wichtig, die chromatographischen Bedingungen zunächst durch Variation der Fließmittelzusammensetzung so zu optimieren, dass eine gute Trennung der einzelnen Komponenten möglich war. Der Einsatz einer HPLC-DAD-CAD-Anlage zur Erreichung dieses Vorhabens war unumgänglich (siehe Kapitel 2.2.5, S.29).

Nach erfolgreicher Trennung, musste auch eine genaue Massenbestimmung durchgeführt werden; mit der LC-ESI-TOF-Anlage war dies möglich. So konnten für sehr viele Komponenten akkurate Massen gefunden und mit der LC-ESI-Ionenfalle zusätzlich MS^n -Spektren aufgenommen werden. Anhand dieser erhaltenen Daten konnten schon publizierte Inhaltsstoffe, durch Abgleich mit der Datenbank SciFinder³⁵ und weiterer Literaturrecherche, identifiziert werden; das Hauptaugenmerk lag dabei auf der positiven Modulation des TGR5-Rezeptors. Im Idealfall und am spannendsten wäre die Dereplikation bekannter oder Charakterisierung strukturell unbekannter Substanzen, die noch nicht als TGR5-Modulator beschrieben wurden. Der Nachweis letzterer verlangte natürlich die Isolierung, Strukturaufklärung und Aktivitätstestung der neu gefundenen Verbindung.

³⁵ <https://scifinder.cas.org>

3.2.1.1 HPLC-DAD-CAD-Analyse des Extraktes

Der erste Schritt zum besagten Ziel erfolgte durch Verwendung der HPLC–DAD–CAD–Anlage, mit der eine Methodenoptimierung vorgenommen wurde. Dabei kam die Probe Syzaro(DM) zum Einsatz, die nach dem gleichen Prozedere, wie im Kapitel 2.2.1, S.23 beschrieben, hergestellt wurde. Die gewählte Gradientenelution sah einen Anstieg des organischen Anteils der mobilen Phase (A: 0,1%ige wässrige Ameisensäure, B: Acetonitril) von zunächst 5% auf 95% Acetonitril in 31 min mit einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 ml/min vor. Als stationäre Phase diente eine C₁₈-Umkehrphase, wobei hierfür eine passende Säule der amerikanischen Firma Dionex ausgewählt wurde.

Nach mehreren Optimierungsschritten war eine zufriedenstellende Auftrennung erreicht, wobei ein HPLC–Lauf schlussendlich insgesamt 50 min benötigte. Die genaue Erläuterung der Methodenoptimierung für *Syzygium aromaticum* sowie die korrekten Geräteeinstellungen werden im Kapitel 2.2.5.4, S.33 genau beschrieben; verwendet wurde hierbei die „Methodenoptimierung 3“.

Damit die Dereplikation erfolgreich abgeschlossen werden kann, ist nicht nur eine optimale Auftrennung notwendig, sondern auch eine genaue Massenbestimmung. Der Fokus lag dabei auf den Peaks SA₁₄ und SA₁₁, die in der Abbildung 20, S.62 gut zu erkennen sind; laut den CAD-Daten handelte es sich bei jenen um die Hauptkomponenten. Bei SA₇ und SA₉ könnte es sich um flüchtige Komponenten (daher relative Konzentrationen unbekannt) handeln. SA₄, SA₅ und SA₆ sind Verunreinigungen, die in der Probe enthalten waren. Für die genaue Massenbestimmung kam die LC–ESI–TOF–Anlage zum Zug, mit der die Massen der einzelnen aufgetrennten Komponenten nun bestimmt werden sollten. Dadurch erhoffte man sich auch jene Komponente(n) zu finden, die für die Aktivierung des TGR5–Rezeptors verantwortlich ist/sind. Die Durchführung der Massenbestimmung wird im folgenden Unterkapitel nun näher erläutert.

Resultate

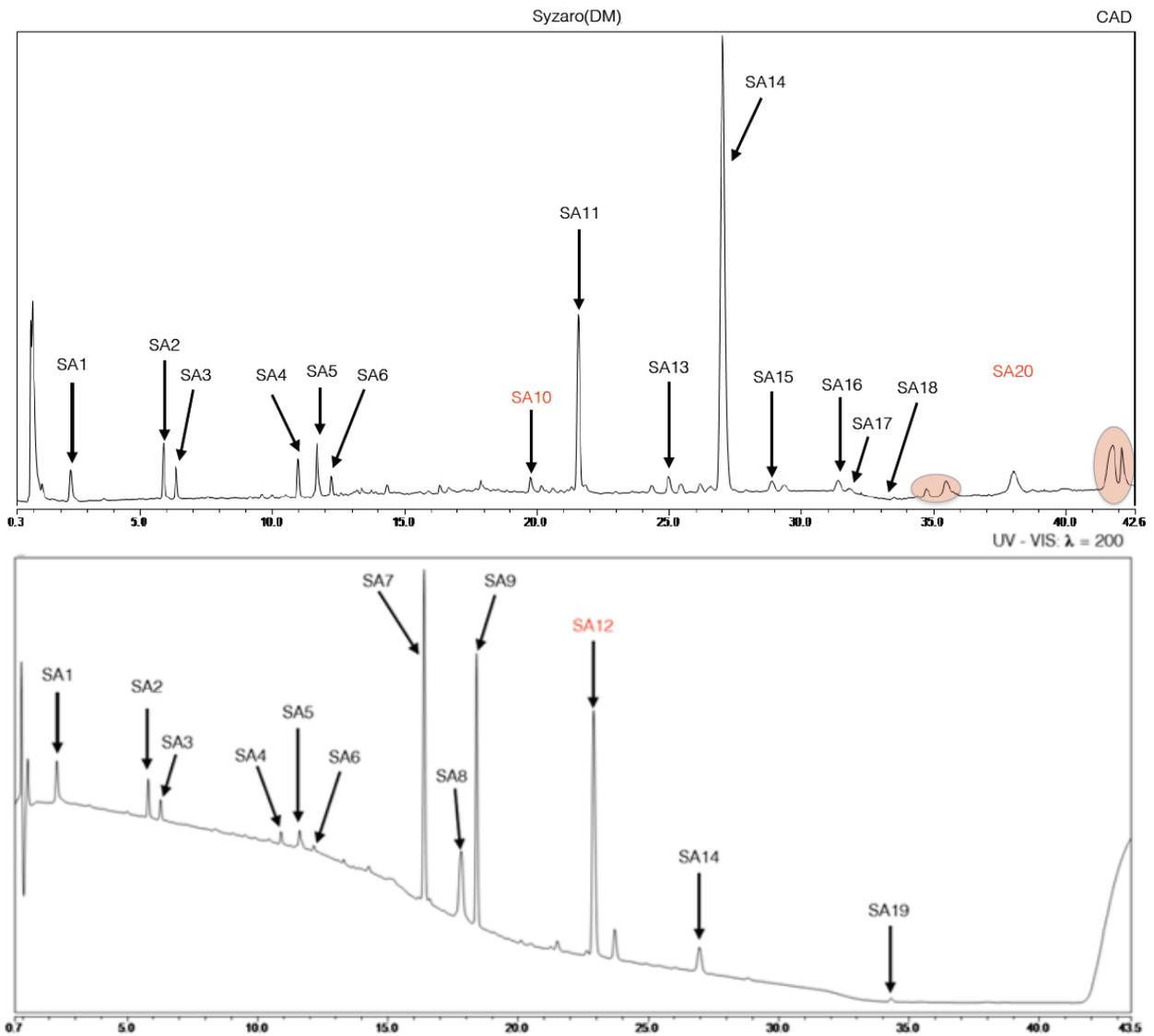


Abbildung 20: Gesamtes Inhaltsstoffprofil der Probe Syzaro(DM), aufgenommen mittels HPLC–DAD–CAD-Anlage. Das Chromatogramm zeigt dereplizierte Peaks (schwarz markiert) und nicht dereplizierte Peaks (rot markiert); rot schattig hinterlegt wurden die Peaks, die auch in der Methanol-Blindprobe gefunden wurden und daher nichts mit der Probe zu tun haben. Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD (oben) und DAD (200 nm, unten); Injektionsvolumen: 2 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 3

3.2.1.2 LC-ESI-TOF-Analyse des Extraktes

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte nach der Optimierung der HPLC-Trennung der Probe. Für die Massenbestimmung kam die LC-ESI-TOF-Anlage mit der Methodenoptimierung 3 zum Zuge (siehe 2.2.5.4, S.33); die erzielte Messgenauigkeit lag bei < 10 ppm. Durch diese Vorgangsweise war es möglich, die Masse der für die einzelnen Peaks verantwortlichen Komponenten zu bestimmen. Erst nach Erhalt dieser Information kann eine Dereplikation erfolgreich abgeschlossen werden.

Für diese Untersuchungen wurde ein Extrakt mit der Bezeichnung Syzaro(DM) (Synonym: Syzaro_DM) eingesetzt, der von einer vorangegangenen Diplomarbeit [7] übernommen wurde. Die Herstellung ist im Kapitel 2.2.1, S.23 näher erläutert. Nach einer automatisierten Injektion eines Volumens von 2 µl folgte die chromatographische Trennung. Im Anschluss wurden die getrennten Verbindungen mittels Elektrospray ionisiert und in einem Reflektor-Flugzeitmassenspektrometer analysiert. Detailinformationen über den Geräteaufbau und die Funktionsweise können dem Kapitel 2.2.6, S.40 entnommen werden. Die eingestellten HPLC-Parameter findet man im Kapitel 2.2.5.4, S.33 unter Methodenoptimierung 3. Grundlegend war, dass, bevor die eigentliche Probe in das Gerät injiziert wurde, obligatorisch zunächst reiner Methanol als Leerprobe vor wie nach jeder Testcharge injiziert wurde, um eventuelle Verunreinigungen zu entdecken beziehungsweise in der anschließenden Beurteilung berücksichtigen zu können. Es war auch immer notwendig, entsprechende Vergleiche zu machen, da es das eine oder andere Mal auch vorkam, dass Verunreinigungen in der Leerprobe bzw. dem HPLC-System enthalten waren. In den entsprechenden Chromatogrammen wurden diese Signale gesondert meist mit roter Farbe hinterlegt.

Die Testung der nicht biotransformierten Probe Syzaro(DM) stand im Vordergrund, da die chromatographischen Vergleiche mit der biotransformierten Variante keine chemischen Veränderungen zeigten (siehe Kapitel 3.2.2, S.76). Die Konzentration des Extraktes in den HPLC-Fläschchen betrug in etwa 3-4 mg/ml [7]. Die Vermessung mittels LC-ESI-TOF erfolgte sowohl im positiven als auch im negativen Modus. Im positiven Modus werden die Verbindungen üblicherweise als $[M+H]^+$ -Ion oder im Falle größerer Verbindungen auch als $[M+2H]^{2+}$ -Ion detektiert; im negativen zum Beispiel als $[M-H]^-$ -Ion oder $[M+HCOO]^-$ -Ion. Mit der LC-ESI-TOF können Molekülmassen genau bestimmt werden, auch mögliche Summenformeln werden vorgeschlagen, die mit der detektierten Masse und dem Isotopenmuster in Korrelation stehen.

Resultate

Meist schlägt der Algorithmus nur einige wenige Summenformeln vor, wobei es unter Beachtung gewisser Parameter oft möglich war abzuschätzen, welche davon für einen pflanzlichen Naturstoff wahrscheinlich ist. Oft werden auch Summenformeln vorgeschlagen, die aufgrund ihrer hohen Anzahl an Heteroatomen unrealistische oder im Vergleich mit der zu untersuchenden Pflanze a priori auszuschließen waren.

Alle massenspektrometrischen Analysen wurden dankenswerterweise von Dr. Martin Zehl am Department für Pharmakognosie der Universität Wien durchgeführt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die erstellten Basispeak-Chromatogramme (BPC) und Massenspektren, wobei sich die Auswahl auf einige besonders relevante Verbindungen beschränkt. Weitere interessante Massenspektren können im Kapitel 7.2, S.164 eingesehen werden. Da im Rahmen dieser Diplomarbeit die Bioaktivität der Triterpensäuren mit HEK293-Zellen getestet wurde, beleuchtet dieses Kapitel eben genau jene. Dabei handelt es sich bei *Syzygium aromaticum* auf der einen Seite um die Oleanolsäure SA₁₄ (siehe Abbildung 21, S.66) und auf der anderen Seite um die Maslinsäure SA₁₁ (siehe Abbildung 22, S.67). Die Abbildungen zeigen zunächst ein komplettes Übersichtschromatogramm der Probe Syzaro(DM). In diesem sind verschiedene Peaks mit unterschiedlicher Intensität und unterschiedlichen Retentionszeiten dargestellt. Es wurden von jenen Peaks, die auch entsprechende Zuordnungen besitzen, Massenspektren ausgewertet, wobei eine gewisse Intensität als Auswahlkriterium für die Untersuchung ausschlaggebend war. Durch die sehr hohe Massenauflösung des Gerätes, konnte das Masse/Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis) exakt bestimmt werden. Aufgrund dieser präzisen Messergebnisse konnte die Software mögliche Summenformeln berechnen und deren Übereinstimmung mit dem gemessenen Isotopenmuster bestimmen; z.B kann aus dem in Abbildung 21, S.66 gezeigten Massenspektrum für den monoisotopen Peak ein m/z -Wert von 455,3541 und im BPC eine Retentionszeit von 26,5 min abgelesen werden. Da die Aufnahme im negativen Modus erfolgte und die Verbindung als $[M-H]^-$ erschien, musste noch ein Wasserstoffproton (1,0073 Da) zugezählt werden, um auf die tatsächliche Molekülmasse von 456,3614 Da zu kommen. Die wahrscheinlichste Summenformel, die für diese Verbindung vorgeschlagen wurde, lautete $C_{30}H_{48}O_3$. Die Zusammenfassung aller Ergebnisse des negativen Modus' mit den Daten des positiven Modus' ist in Tabelle 22, S.68 ersichtlich. Der anschließende Abgleich mit der chemischen Datenbank „Scifinder“³⁶ erlaubte die Identifizierung einiger bekannter Inhaltsstoffe aus *Syzygium aromaticum*. Dabei kam zumeist die Kombination von

³⁶ <https://scifinder.cas.org>

Resultate

Schlagwörtern, wie die verwendete Pflanze und Pflanzenteil (bei *Syzygium aromaticum* handelte es sich um den pulverisierten, gemahlene Extrakt der Blütenknospe), mit einzelnen Eigenschaften wie Molekülgewicht oder vorhergesagter Summenformel, zum Einsatz. So konnte die Struktur der oben beschriebenen Verbindung mit der Summenformel $C_{30}H_{48}O_3$ vollständig derepliziert werden. Eine aufgefundene Publikation beschrieb die Oleanolsäure bereits als Bestandteil von *Syzygium aromaticum* [15]. Diese Prozedur wiederholte sich nun analog bei allen anderen Verbindungen; vorgeschlagene Summenformeln wurden auf Plausibilität überprüft und durch die Kombination von bestehendem Wissen mit entsprechenden chemischen Datenbanken auf bereits vorhandene Publikationen durchsucht. Durch diese Vorgehensweise konnte eine große Anzahl an detektierten Verbindungen Inhaltsstoffen zugeordnet werden, die aus der wissenschaftlichen Literatur bekannt sind (siehe Tabelle 22, S.68) und so Licht ins Dunkel der chemischen „Geheimnisse“ von *Syzygium aromaticum* gebracht werden. Tabelle 22, S.68 schlüsselt die Peaks nach entsprechender Retentionszeit, Masse zu Ladungsverhältnis im positiven und negativen Modus, Summenformel und Molekülgewicht in Dalton auf; auch die vorhergesagte Struktur sowie entsprechende Literaturangaben (sofern möglich), in denen jene Substanzen gefunden wurden, werden angegeben. Die grün markierten Balken sollen auf Verunreinigungen hindeuten, die im Lösungsmittel enthalten waren. Die Nylon-Derivate (SA_4 , SA_5 , SA_6) in einem Zeitbereich von 11,0 bis 12,3 min werden im Kapitel 3.2.1.4, S.70 näher besprochen. Das gesamte beschriftete Chromatogramm ist in der Abbildung 20, S.62 dargestellt. Die Abbildungen erlauben, trotz geringfügiger Unterschiede in den Retentionszeiten auf der HPLC-DAD-CAD- und der LC-ESI-TOF-Anlage, einen Vergleich der UV-Chromatogramme. Dadurch konnte ein Abgleich der Analysendaten und eine genaue Zuordnung der einzelnen Peaks im Chromatogramm getroffen werden. Dabei stellt die schwarze Beschriftung dereplizierte und rote Beschriftung nicht dereplizierte Peaks dar; rot schattig hinterlegte Peaks weisen auf Signale hin, die auch in der Methanol-Blindprobe gefunden wurden und daher nichts mit der Probe zu tun haben. Da eine Umkehrphasenchromatographie zur Anwendung kam, erfolgte zunächst die Elution hydrophiler Substanzen, wie beispielsweise die Gallussäure (SA_1), Isobiflorin (SA_2) oder Biflorin (SA_3). Am Ende des Chromatogramms erschienen hydrophobe Verbindungen. Dabei sind vor allem Fettsäuren zu nennen, wie die Linolensäure (SA_{15}), Palmitinsäure (SA_{16}), Ölsäure (SA_{17}) oder die Stearinsäure (SA_{19}).

Resultate

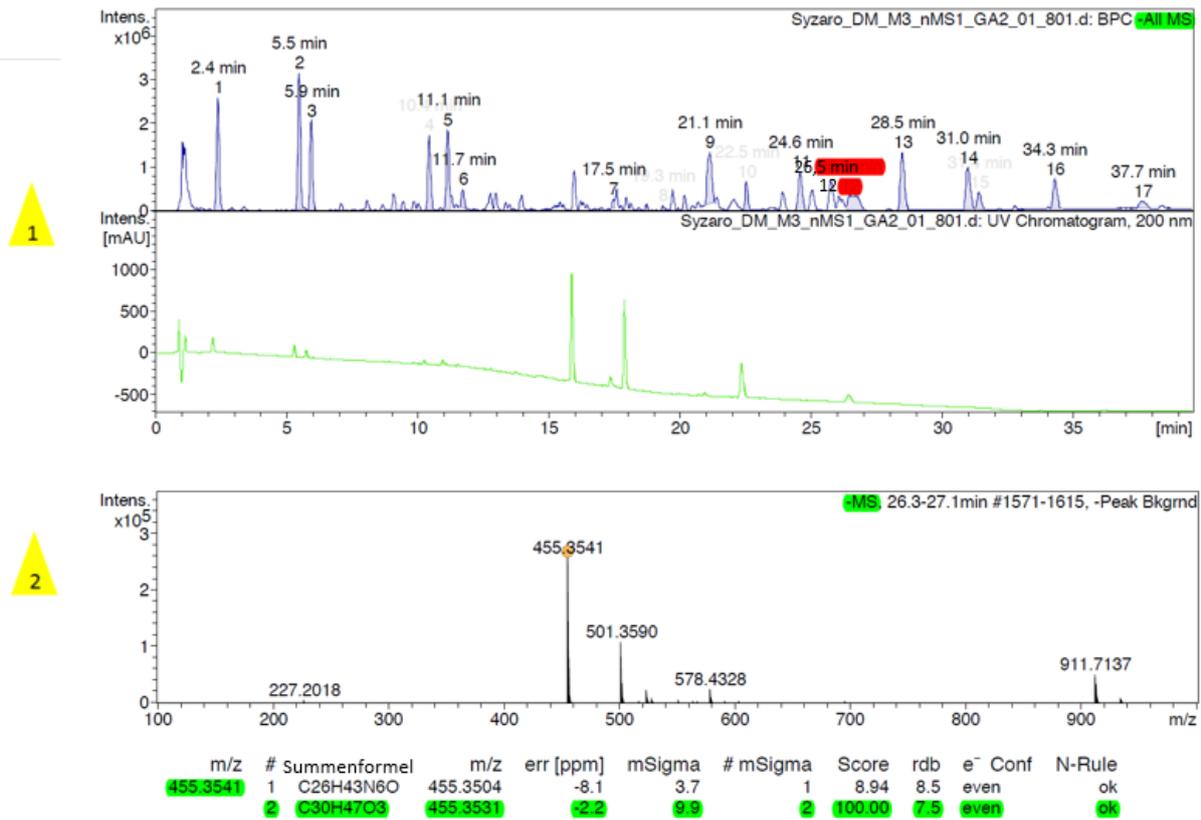


Abbildung 21 zeigt das **Massenspektrum der Oleanolsäure**, die in der Probe Syzaro_DM³⁷ enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit einem LC-ESI-TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Syzaro_DM, das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der Oleanolsäure wieder. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 26,3-27,1 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die Oleanolsäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 26,5 min und wurde vor allem als [M-H]⁻-Ion bei m/z 455,3541 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm zwei Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel C₃₀H₄₇O₃ die plausible ist. Um auf die Summenformel der Oleanolsäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt C₃₀H₄₈O₃.

³⁷ Syzaro_DM = Syzaro(DM)

Resultate

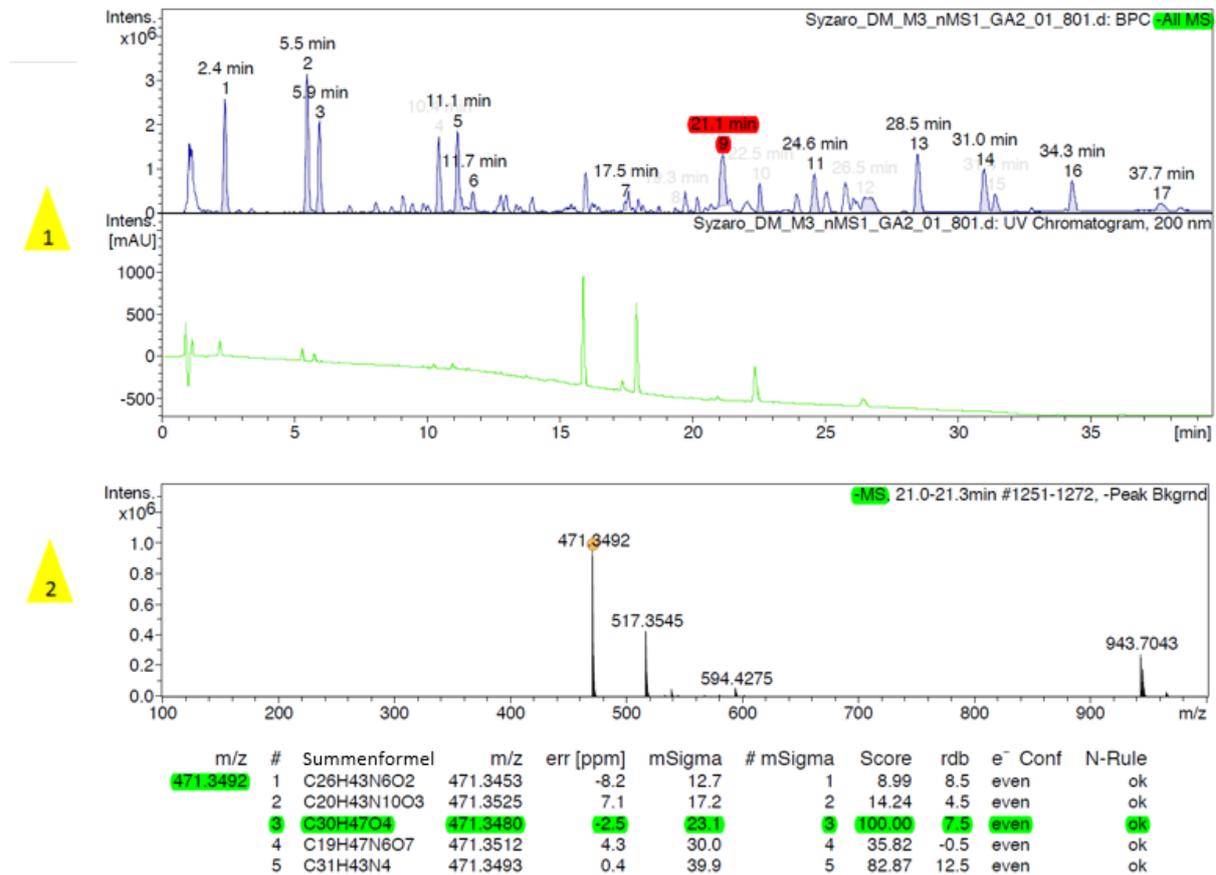


Abbildung 22 zeigt das **Massenspektrum der Maslinsäure**, die in der Probe Syzaro_DM enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit einem LC-ESI-TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Syzaro_DM, das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der Maslinsäure wieder. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 21,0-21,3 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die Maslinsäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 21,1 min und wurde vor allem als $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 471,3492 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm fünf Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte, Formel $C_{30}H_{47}O_4$ die plausiblere ist. Um auf die Summenformel der Maslinsäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_{30}H_{48}O_4$.

Resultate

Tabelle 22: Inhaltsstoffprofil der Probe Syzaro_DM; Analyse der Massen erfolgte mit der LC–ESI–TOF–Anlage. Die grün hinterlegten Balken SA₁₀, SA₁₂, SA₁₈ und SA₂₀ deuten Verunreinigung im System an; n. d. = nicht detektiert; MK₀ = Originalextrakt mit sterilem Mäusekot behandelt, MK₂₄ = 24h Inkubation des Originalextraktes mit nichtsterilem Mäusekot; die TGR5-Spalte zeigt an, ob eine Aktivität auf den TGR5-Rezeptor in der Literatur beschrieben ist.

Peak	RT [min]	m/z Pos.	m/z Neg.	Summenformel	MW [Da]	vorhergesagte Struktur	CAS Nr.	DM Extrakt	MK ₀ / MK ₂₄	TGR5	Kommentar/Literatur	Bestätigung
SA ₁	2,4	171,0300	169,0146	C ₇ H ₆ O ₅	170,0	Gallussäure	149-91-7	+	+ / +	X	[16]	Referenz
SA ₂	5,9	355,1046	353,0889	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,1	Isobiflorin	152041-16-2	+	+ / +	X	[17]	-
SA ₃	6,4	355,1045	353,0889	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,1	Biflorin	89701-85-9	+	+ / +	X	[17]	-
SA ₄	11,0	679,5127	723,5044	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	678,5	Nylon-6-Derivat (n=6)	-	+	+ / +	X	-	-
SA ₅	11,7	792,5971	836,5886	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	791,6	Nylon-6-Derivat (n=7)	-	+	+ / +	X	-	-
SA ₆	12,3	905,6813	949,6723	C ₄₈ H ₈₈ N ₈ O ₈	904,7	Nylon-6-Derivat (n=8)	-	+	+ / +	X	-	-
SA ₇	16,4	165,0921	n. d.	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164,1	Eugenol	97-53-0	+	+ / +	X	[18]	-
SA ₈	17,8	489,3574	487,3440	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488,4	Trihydroxytriterpensäure	-	+	+ / +	X	-	-
SA ₉	18,4	207,1029	n. d.	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	206,1	Eugenylacetat	93-28-7	+	+ / +	X	-	-
SA ₁₀	19,8	n. d.	313,2385	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	314,2	-	-	+	+ / +	X	Verunreinigung	-
SA ₁₁	21,6	473,3647	471,3492	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472,4	Maslinsäure	4373-41-5	+	+ / +	X	zweite Hauptkomponente	Referenz
SA ₁₂	22,9	n. d.	205,1603	C ₁₄ H ₂₂ O	206,2	-	-	+	+ / +	X	Verunreinigung	-
SA ₁₃	25,0	619,4007	617,3861	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	618,4	Coumaroylmalsinsäure	-	+	+ / +	X	-	-
SA ₁₄	27,0	457,3689	455,3541	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456,4	Oleanolsäure	0508-2-1	+	+ / +	✓	erste Hauptkomponente [14]	Referenz
SA ₁₅	28,9	n. d.	279,2340	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,2	Linolsäure	463-40-1	+	+ / +	X	[19]	Referenz
SA ₁₆	31,4	n. d.	255,2337	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,2	Palmitinsäure	57-10-3	+	+ / +	X	[19]	Referenz
SA ₁₇	31,8	n. d.	281,2495	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,3	Ölsäure	112-80-1	+	+ / +	X	[20]	Referenz
SA ₁₈	33,1	359,3179	403,3076	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	358,3	-	-	-	- / -	X	-	-
SA ₁₉	34,7	n. d.	283,2650	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,3	Stearinsäure	57-11-4	+	+ / +	X	[19]	Referenz
SA ₂₀	38,0	n. d.	621,4382	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	622,4	-	-	+	+ / +	X	Verunreinigung	-

3.2.1.3 Nachweis mit Referenzsubstanzen

Da die Identifizierung ausschließlich basierend auf LC-MS-Daten immer mit einer gewissen Unsicherheit behaftet war, wurden die dereplizierte Verbindungen teilweise mit Referenzsubstanzen bestätigt. Dies war ein weiterer wichtiger Schritt zur Festigung der Ergebnisse. Es erfolgte eine Bestätigung zahlreicher Substanzen, die in der Tabelle 22, S.68 aufgelistet wurden. Für die Evaluation der Daten kam die HPLC–DAD–CAD–Anlage zum Einsatz, mit der gleichen Geräteeinstellung und Methode, wie im Kapitel 3.2.1, S.60 erläutert. Die Startkonzentration der Referenzsubstanzen lag bei circa 1 mg/ml, gelöst in 1 ml Methanol (siehe Kapitel 2.2.3, S.26).

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde die Identität der Oleanolsäure über die Retentionszeit bestätigt. Deshalb versuchte man die Injektionsvolumina so anzupassen, dass die Peakintensität in der Probe und dem Vergleichsstandard in ihrer Größe ähnlich waren, damit ein besserer Vergleich erfolgen konnte. Die nun folgenden Chromatogramme zeigen die Identifikation der Oleanolsäure (siehe Abbildung 23) und der Maslinsäure (siehe Abbildung 24, S.70). Zur besseren Einordnung ist das gesamte Chromatogramm im rechten oberen Rand eingebildet. Zum Einsatz kam die Probe mit der Bezeichnung Syzaro(DM).

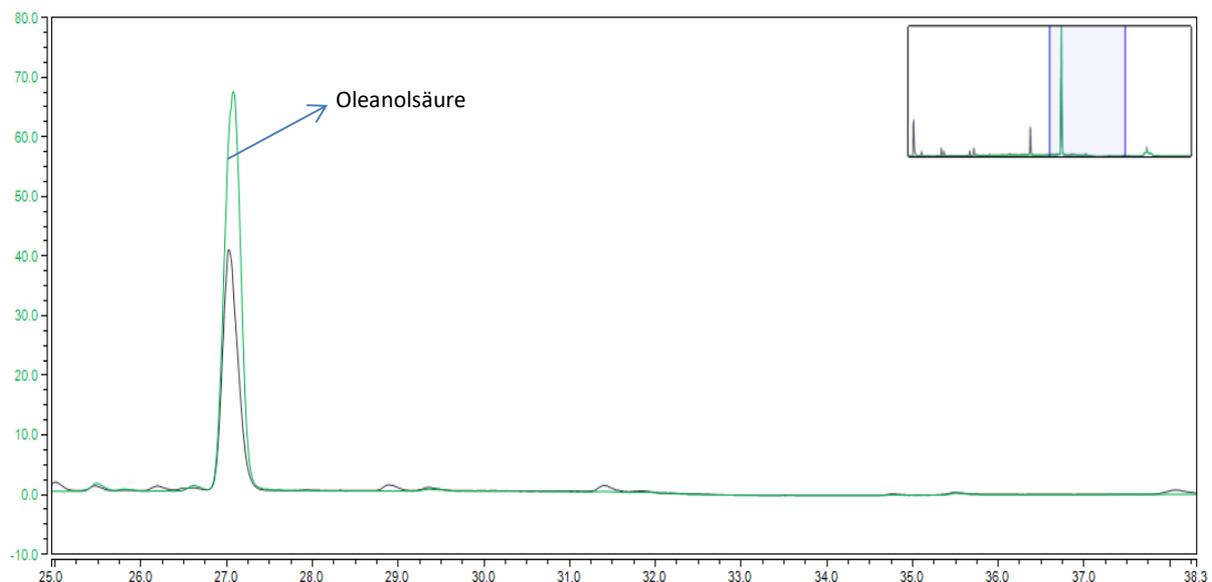


Abbildung 23: Bestätigung der Oleanolsäure: Im rechten oberen Eck ist das gesamte Chromatogramm der Probe Syzaro(DM) ersichtlich; Oleanolsäure: Grüne Linie, Probe: Schwarze Linie; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: jeweils 3 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 3

Resultate

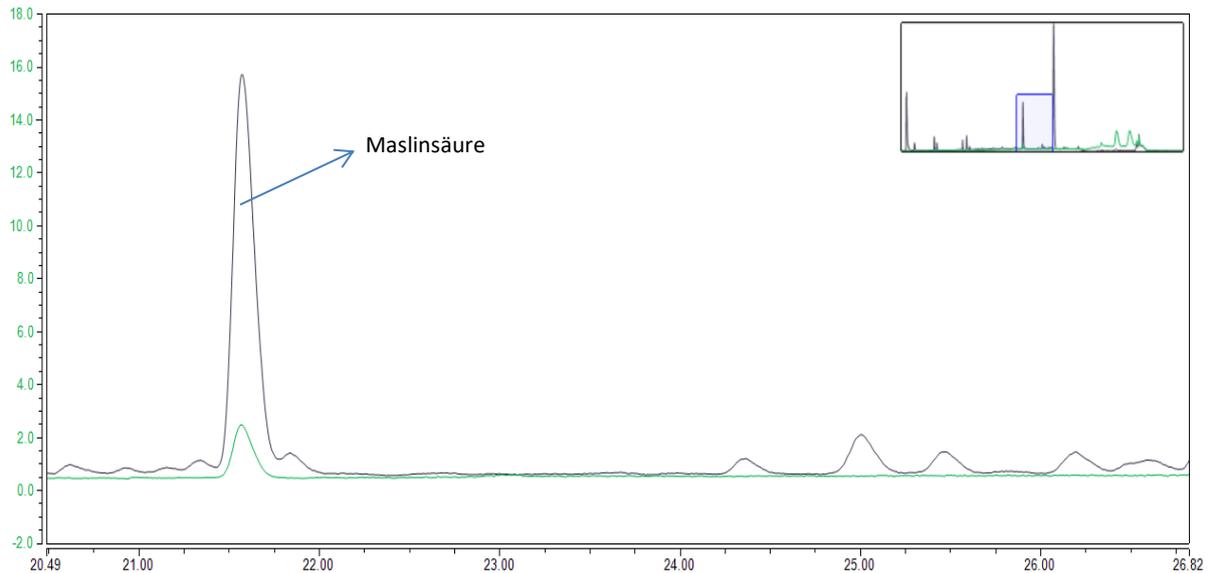


Abbildung 24: Bestätigung der Maslinsäure: Im rechten oberen Eck ist das gesamte Chromatogramm der Probe Syzaro_DM ersichtlich; Maslinsäure: schwarze Linie, Probe: grüne Linie; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: DAD–CAD; Injektionsvolumen: jeweils 3 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 3

3.2.1.4 Einschub: Polyamid-Verunreinigung

Dieser Teil der Diplomarbeit beschreibt ein Problem beim Herstellungsprozess der Extrakte, der auch für zukünftige phytochemische Arbeiten relevant sein dürfte. Alle verwendeten Extrakte von *Syzygium aromaticum*, *Pimenta dioica* und *Kaempferia galanga* zeigten im vorderen Teil der mittels HPLC–CAD–Anlage aufgenommenen Chromatogramme eine Gruppe sehr ähnlicher, intensiver Peaks. Der Verdacht lag nahe, dass es sich dabei um eine in allen Proben vorliegende Verunreinigung handeln könnte. Im Zuge der massenspektrometrischen Analyse mit der LC–ESI–TOF–Anlage konnten wir Molekülmassen von 678,5 Da, 791,6 Da und 904,7 Da für die drei intensivsten Komponenten feststellen und daher eine Massendifferenz von jeweils 113,1 Da. ausmachen. Die Detektion erfolgte sowohl im negativen als auch im positiven Modus, wobei im Erstgenannten ein [M+HCOO]⁻-Adduktion gebildet wurde. Die tatsächliche Masse berechnet sich daher durch das Abziehen des Formiat Anions (45,0 Da).

Aufgrund der langjährigen Erfahrung von Herrn Dr. Martin Zehl, konnten rasch die richtigen Schlüsse gezogen werden. Es stand die Vermutung im Raum, dass es sich bei den

Resultate

Verunreinigungen um bereits bekannte cyclische ϵ -Caprolactam Oligomere handle. Eine mögliche Quelle für Kontaminationen stellte der Herstellungsprozess dar, bei dem die Tannine mittels Polyamid (Nylon) abgereichert wurden. Nähere Informationen bezüglich der Herstellung sind im Kapitel 2.2.1, S.23 verankert. Im Falle von *Syzygium aromaticum* traten diese Verunreinigungen bei einer Retentionszeit von 11,0 bis 12,3 min auf. Bei den betreffenden Peaks handelte es sich um SA₄, SA₅ und SA₆ (siehe Abbildung 20, S. 62). Ein BPC und ein Massenspektrum sind in Abbildung 25, S.72 dargestellt, dabei zeigt die rote Umrandung jenen Bereich an, innerhalb dessen Grenzen die Verunreinigungen eluierten. Ein weiteres Chromatogramm kann im Anhang (Kapitel 7.2, S.164) eingesehen werden.

Für den eindeutigen Nachweis erfolgte die „Extraktion“ des Polyamids mit reinem Elutionsmittel. Dabei glich der Herstellungsprozess exakt dem, der auch bei den Extrakten angewendet wurde (siehe Kapitel 2.2.1, S.23), mit dem einzigen Unterschied, dass keine Probe zum Einsatz kam. Das Eluat trennte man mit der HPLC–CAD–Anlage und verglich im Anschluss das Chromatogramm mit jenen der Extrakte. Tatsächlich traten an den gleichen Positionen dieselben Peaks auf, wodurch die Hypothese, dass es sich um Verunreinigungen aus dem Polyamid handelte, bestätigt wurde. Neben dieser Erkenntnis fiel auch auf, dass die Detektion der cyclischen ϵ -Caprolactam Oligomere bevorzugt mittels des CAD–Detektors oder mit der Massenspektrometrie möglich war, sehr schwer aber mit dem UV–Detektor, mit dem sie nämlich leicht übersehen werden können (siehe Abbildung 25, S.72). Daraufhin wurde beschlossen, einen Schnellnachweis mittels DC zu entwickeln.

Resultate

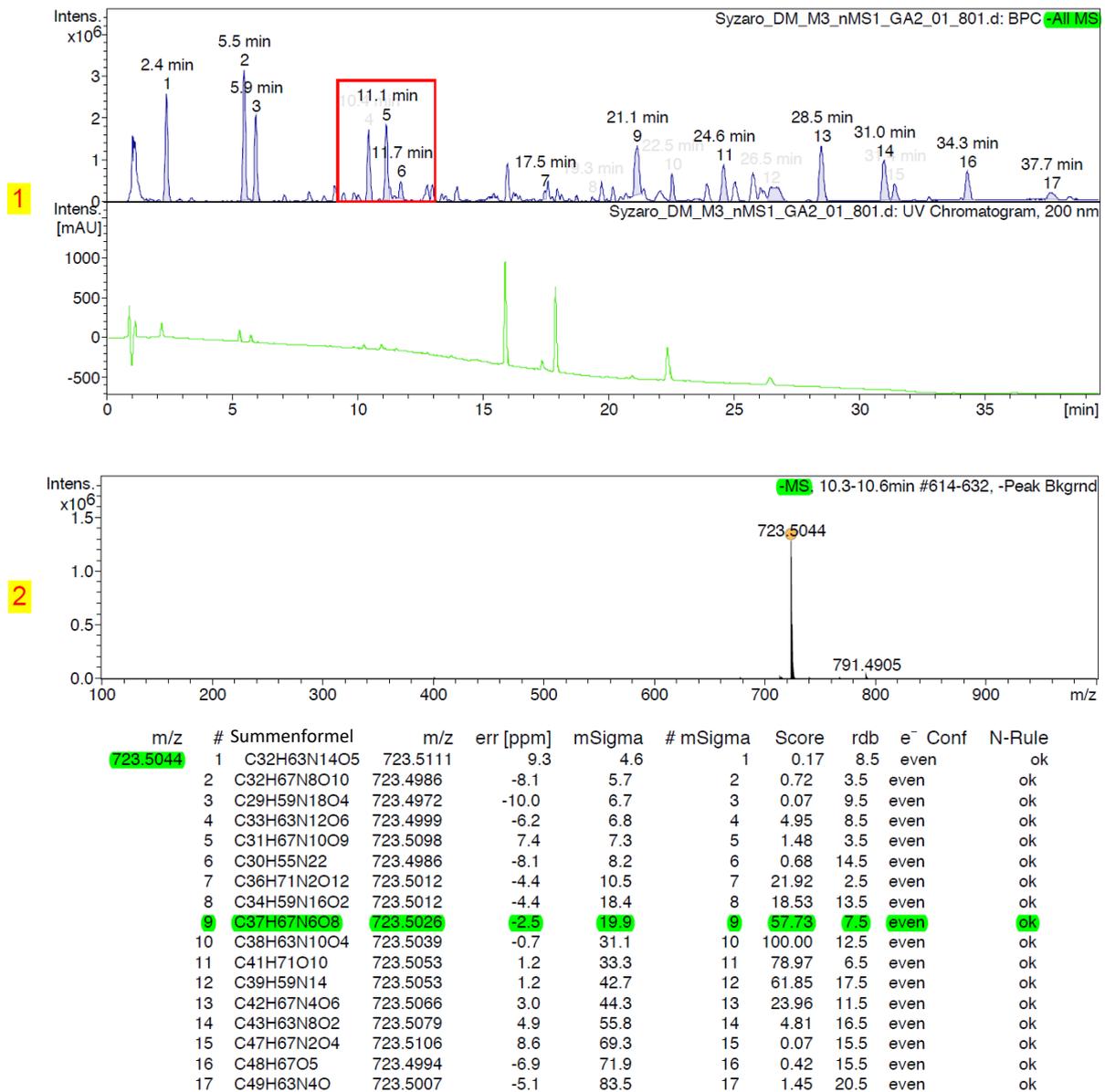


Abbildung 25 zeigt das **Massenspektrum einer Komponente der Polyamid-Verunreinigung**: Das gezeigte Resultat wurde im negativen Ionenmodus mit der LC-ESI-TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Syzaro_DM, das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der Verunreinigung wieder. Die Verunreinigung erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 10,4 min und wurde vor allem als $[M+HCOO]^-$ -Adduktion bei m/z 723,5044 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm siebzehn Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel $C_{37}H_{67}N_6O_8$ die plausible ist. Um auf die Summenformel der Verunreinigung zu kommen, musste das $HCOO^-$ -Addukt von dem tatsächlichen Wert abgezogen werden. Folglich lautet die Elementzusammensetzung jetzt $C_{36}H_{66}N_6O_6$.

3.2.1.4.1 DC–Nachweis der Polyamid–Verunreinigung

Da also die detektierten Verunreinigungen leicht mit dem UV–Detektor einer HPLC–Anlage übersehen werden können, kam es zur Entwicklung eines Schnelltests mittels Dünnschichtchromatographie. Dieser ist nicht nur kostengünstig und schnell, sondern auch einfach in der Handhabung. Der Vorteil dieser Methode liegt auf der Hand, weil man nicht zuletzt ohne großen Aufwand und Labortechnik die cyclischen ϵ –Caprolactam Oligomere aus diversen Nylon-Materialien, wie Polyamid-Partikeln für die SPE und Chromatographie oder Nylon-Filtermembranen, schnell und zuverlässig nachweisen kann. Der Test überzeugte eindrucksvoll bei der Aufgabenstellung die Polyamide sichtbar zu machen. Dabei kam die zuvor beschriebene und hergestellte Polyamid-Probe zum Einsatz (siehe Kapitel 3.2.1.4, S.70). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die DC–Auftrennung von *Syzygium aromaticum* und den eigentlichen Nachweis der Polyamide (Nylon) in der Probe Syzaro(DM) geben werden.

Für die Durchführung der Dünnschichtchromatographie wurde ein System gewählt, welches als mobile Phase eine Vielzahl von Komponenten beinhaltet, das sich aber bei vorherigen Versuchen als generelles System zur Trennung einer Vielzahl von Pflanzenextrakten bewährt hat. Das eingesetzte, komplexe Fließmittelgemisch und die verwendete stationäre Phase für die DC kann dem Kapitel 2.2.8, S.42 entnommen werden. Von der Probe Syzaro(DM) wurden händisch mit einer Mikrokapillare 15 μ l strichförmig auf die zuvor beschriftete DC–Platte aufgetragen. Vor deren Entwicklung erfolgte stets eine Kontrolle unter UV 254 nm auf ausreichende Violett-färbung, die ein Indikator für eine optimal aufgetragene Probenmenge war. Vor dem Entwickeln sowie vor und nach dem Besprühen wurde die DC bei Tageslicht, UV 254 und UV 366 nm abfotografiert. Für diesen Arbeitsschritt kam ein spezieller Visualizer der Firma CAMAG zur Anwendung, mit dem es möglich war, Dünnschichtchromatogramme bei unterschiedlichen Wellenlängen abzubilden. Nach anschließender Besprühung mit Vanillin/Schwefelsäure–Lösung und den obligatorischen Trocknungsprozessen vor und nach der Besprühung, erfolgte ein zwei- bis dreiminütiges Erhitzen mit einem Heißluftfön, das die chemischen Reaktionen einleitete. Es traten zahlreiche strichförmige Banden auf, die sowohl bei Tageslicht als auch mit UV254 und UV366 nm betrachtet und visualisiert wurden.

Abbildung 26, S.74 zeigt das DC-Chromatogramm der Inhaltsstoffe von Syzaro(DM). Die Entwicklungszeit betrug circa 20 – 30 min inklusive der Zeit für die Ablichtung.

Resultate

Durch die gute Auftrennung der Inhaltsstoffe mit diesem System, konnte nun der eigentliche Nachweis der Nylon-Verunreinigungen erfolgen. Als Referenzprobe diente das oben beschriebene Vergleichseluat der Polyamid-SPE-Kartusche (siehe Kapitel 2.2.8.4, S.44).

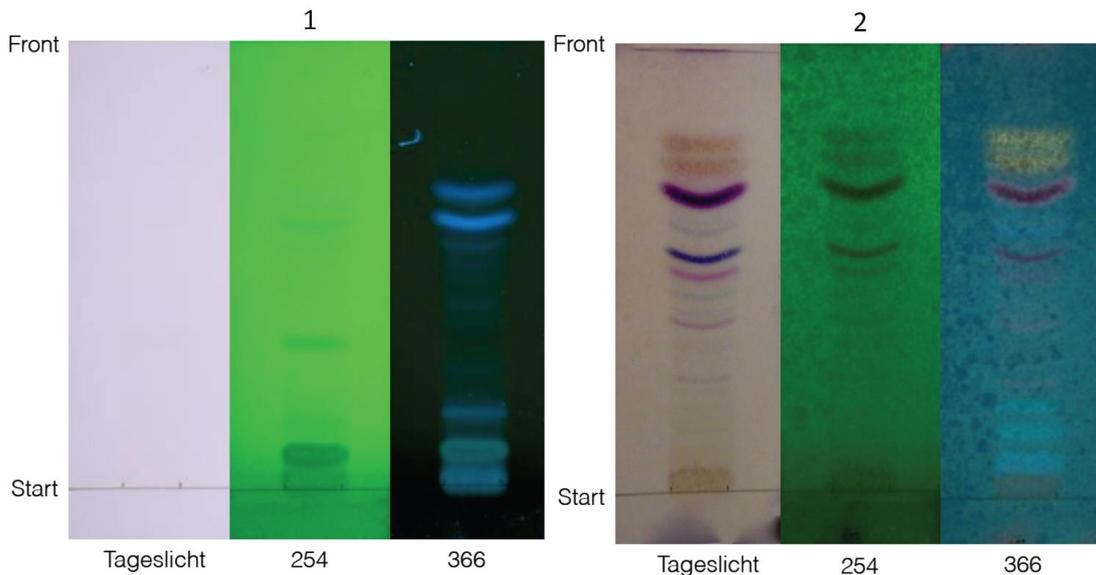


Abbildung 26 zeigt das DC-Chromatogramm der Probe Syzaro(DM) bei Tageslicht, UV 254 und UV 366 nm; links ohne Färbereaktion und rechts die mit Vanillin/Schwefelsäure besprühte Platte.

Es waren insgesamt fünf Dünnschichtchromatogramme notwendig, um ein geeignetes Sprühreagens zu finden, das in der Lage war, das Polyamid sichtbar zu machen. In der Tabelle 23, S.74 sind die zum Einsatz gekommenen Reagenzien aufgelistet. Die Visualisierung war nur mit Jodlösung, mit der auch Alkaloide nachgewiesen werden können möglich, wobei es zu blitzartig auftretenden braunen Spots kam. Alle anderen Sprühreagenzien zeigten keine positiven Reaktionen mit den ϵ -Caprolactam Oligomeren.

Tabelle 23: Liste der zum Einsatz gekommenen Sprühreagenzien und Darstellung ihrer Reaktion mit den ϵ -Caprolactam Oligomeren

DC-Nr.	Sprühreagenz	positiv / negativ
DC 1	Vanillin-Schwefelsäure-Lösung	negativ
DC 2	Naturstoffreagenz	negativ
DC 3	0,2% ethanolische Ninhydrin-Lösung	negativ
DC 4	Jodlösung	positiv
DC 5	Anisaldehyd-Sprühreagenz	negativ

Resultate

Da die aufgetretenen braunen Spots binnen 24 h sehr schnell auf der DC 4 wieder verblassten, war es notwendig, das Chromatogramm rasch abzulichten. Die Auftrennung wurde mit dem Fließmittel 1 durchgeführt (siehe 2.2.8.2, S.43) und die Analyse erfolgte bei Tageslicht und unter UV 254 sowie 366 nm, wie in Abbildung 27 nachzuvollziehen ist.

Es ist klar festzustellen, dass sowohl in der Probe als auch in der konzentrierten Polyamid–Probe deutliche Banden zu erkennen sind. In der reinen Methanol–Probe, die als Vergleich diente, war kein Spot ersichtlich. Wichtig dabei ist, dass die Polyamide nur mit Jodlösung sichtbar gemacht werden konnten und nicht mit Vanillin/Schwefelsäure. Daher kann aufgrund der Position der Banden festgehalten werden, dass das Nylon auch Substanzen in der Probe selbst überlagert, weil an derselben Position auch ohne Besprühen bzw. mit Vanillin/Schwefelsäure ebenso Banden auftraten (siehe Abbildung 26, S.74 Bild Nr. 2).

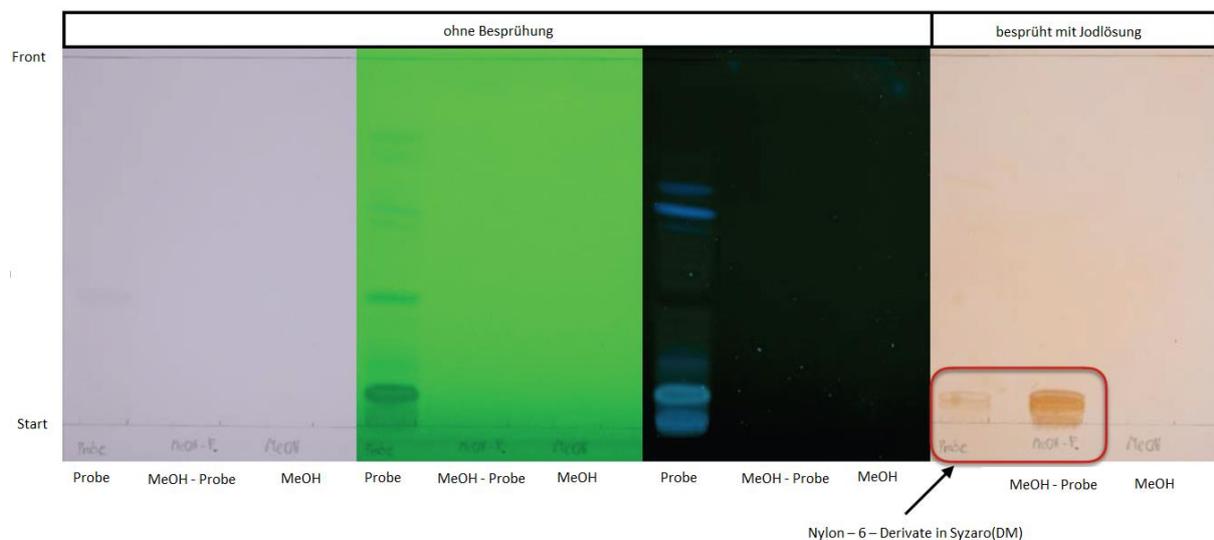


Abbildung 27 zeigt die DC-Chromatogramme der Probe Syzaro(DM) („Probe“), die konzentrierte Polyamid-Referenz-Probe („MeOH-Probe“) und den reinen Methanol („MeOH“). Von links beginnend sind jeweils drei Chromatogramme ohne Besprühung bei Tageslicht, UV 254 und UV 366 nm dargestellt. Auf der mit Jodlösung angefärbten DC-Platte kann man sehr schön die Jodbanden sowohl in der Probe als auch in der Polyamid-Referenz-Probe erkennen (rot eingekreist). Im reinen Methanol hingegen treten keinerlei Spots auf.

Dieser Schnelltest kam bei allen drei Extrakten zum Einsatz. Dadurch war es möglich, rasch, zuverlässig und unkompliziert die Polyamid–Verunreinigung in den Proben zu visualisieren, ohne dabei auf aufwendige Labortechnik zurückgreifen zu müssen. Auch die Erkenntnis, dass die Nylon–Derivate mit dem DAD–Detektor schwer, mit dem CAD–Detektor leicht detektiert werden können, war sehr hilfreich.

Die Massenspektrometrie ist natürlich eine andere und gute technische Alternative, allerdings ist hier neben der teuren Instrumentierung entsprechendes Knowhow und Erfahrung notwendig (siehe Kapitel 3.2.1.4, S.70)

3.2.2 Biotransformation der Probe Syzaro(DM) mit Mäusekot

Wie bereits Anfangs erwähnt, (siehe 3.1, S.54) ging dieser wissenschaftlichen Arbeit eine andere Diplomarbeit voran, deren Verfasserin Frau Mag. Nadina Faur war [7]. Von ihr wurden auch zahlreiche Daten zu den Zelltests zur Verfügung gestellt, die dann auch übernommen werden konnten. In der vorangegangenen Arbeit wurden die Einflüsse des gastrointestinalen Traktes auf pflanzliche Inhaltsstoffe untersucht. Im Vordergrund stand die Metabolisierung der Inhaltsstoffe durch die mikrobielle Flora, die im Darm angesiedelt ist. Ziel der Diplomarbeit von Fr. Mag. Faur war es, ein menschliches Darmmilieu nachzuahmen, um den Einfluss des Verdauungsprozesses auf die Inhaltsstoffe verschiedener pflanzlicher Extrakte zu beleuchten und auch zu verifizieren, ob dabei aktive Metaboliten entstehen.

Dieses Ziel wurde durch einen Vergleich der Bioaktivität und Zusammensetzung von biotransformierten und nicht-biotransformierten Extrakten erreicht, wobei die Biotransformation durch eine 24h Inkubation mit frischem Mäusekot durchgeführt wurde und die Vergleichsprobe mit sterilisiertem Mäusekot behandelt wurde. In einem Transaktivierungsassay mit HEK293-Zellen wurden anschließend die Bioaktivitäten der einzelnen Extrakte getestet. Diese Zellen besitzen verschiedenste Rezeptoren, wobei in diesem Versuch die Aktivität des TGR5- und der FX-Rezeptors gemessen wurden.

Auch die von *Syzygium aromaticum* gewonnen Proben wurden mit sterilem und nicht sterilem Mäusekot inkubiert; hier konnte kein Unterschied in der Bioaktivität festgestellt werden [7]. Der detaillierte Vergleich der HPLC–DAD–CAD- und LC-MS-Daten der unbehandelten bzw. mit sterilem Mäusekot versetzten Originalprobe Syzaro(DM) mit der biotransformierten Probe zeigte, dass es nur zu unwesentlichen Unterschieden zwischen der Originalprobe und den mit Mäusekot behandelten Proben gab. In der Abbildung 28, S.77 ist ein Vergleich der Chromatogramme der einzelnen Proben dargestellt, während die Abbildung 29, S.78 einen daraus vergrößerten Teil zeigt. Der rote Kreis soll auf jenen Unterschied hinweisen,

Resultate

der bei den chromatographischen Vergleichen sichtbar wurde. Es erschien ein zusätzlicher Peak bei einer Retentionszeit von circa 28,3 min. Da dieser Peak sowohl in der mit sterilem als auch in der mit nicht-sterilem Mäusekot behandelten Probe detektiert wurde, musste es sich dabei um eine Komponente des Mäusekots handeln, die in die Probe verschleppt wurde. Die Auftrennung der Inhaltsstoffe erfolgte mit der Methodenoptimierung 3 (siehe 2.2.5.4, S.33). Die Dereplikation, wie sie im Kapitel 3.2.1, S.60 erläutert wurde, machte nur bei der nicht biotransformierten Probe Sinn, da keine zusätzlichen Metaboliten aufgetreten waren.

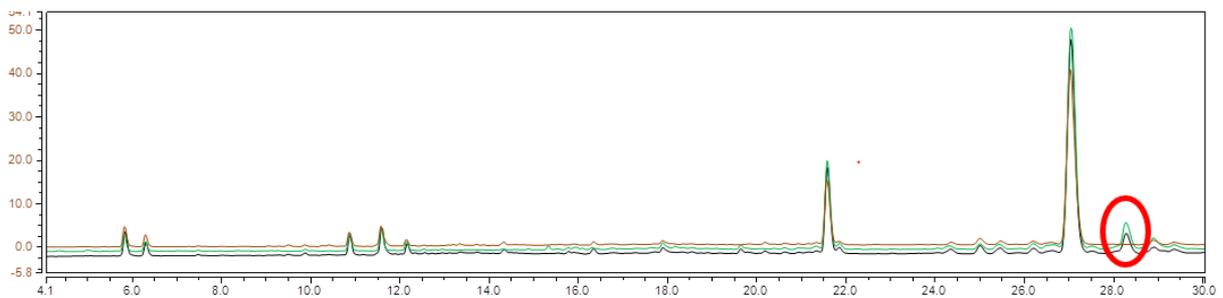


Abbildung 28 zeigt einen Vergleich der Chromatogramme der nicht-biotransformierten und biotransformierten Proben. Die braune Linie ist die Probe Syzaro(DM) in der genuinen Form. Die grüne Linie bezieht sich auf jenen Extrakt, der 24 Stunden mit nicht-sterilem Mäusekot inkubiert wurde und die schwarze Linie auf jenen Extrakt, der mit sterilem Mäusekot versetzt wurde. Es erschien fast keine Veränderung bis auf eine, die rot eingekreist wurde. Dabei handelte es sich um eine Komponente, die durch den Mäusekot in die Probe eingebracht wurde. Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 2 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 3

Resultate

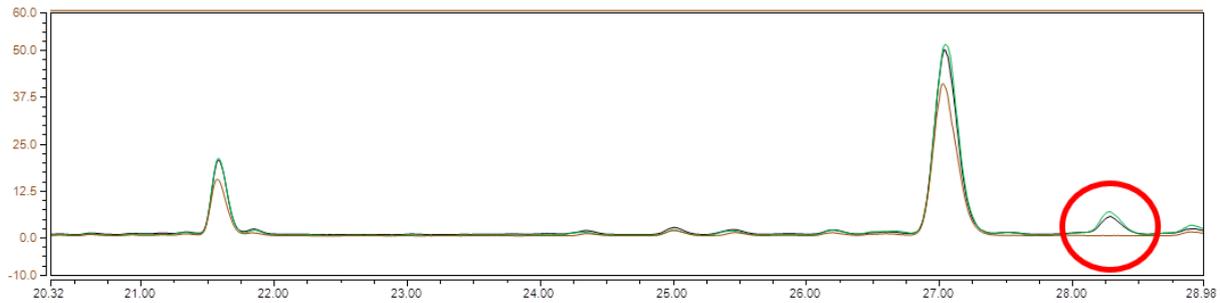


Abbildung 29 zeigt einen Ausschnitt des Vergleichs der Chromatogramme der nicht-biotransformierten und biotransformierten Proben. Die braune Linie ist die Probe Syzaro(DM) in der genuinen Form. Die grüne Linie bezieht sich auf jenen Extrakt (SyzaroEXTR24h), der 24 Stunden mit nicht-sterilem Mäusekot inkubiert wurde und die schwarze Linie auf jenen Extrakt (SyzaroEXTR0h), der mit sterilem Mäusekot versehen wurde. Es trat fast keine Veränderung auf bis auf eine, die rot eingekreist ist. Dabei handelt es sich um eine Kontamination, die durch den Mäusekot in die Probe verschleppt wurde. Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 2 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 3

3.2.3 Quantifizierung der enthaltenen Triterpensäuren

Im Kapitel 3.2.1.2, S.63 wurde das gesamte Inhaltsstoffprofil der Probe Syzaro(DM) gezeigt. Neben sehr hydrophilen Verbindungen wie der Gallussäure, das Isobiflorin oder das Biflorin, enthielt das Chromatogramm auch viele hydrophobe Substanzen wie verschiedenste Fettsäuren, beispielsweise die Ölsäure, die Stearinsäure oder die Linolensäure. Für die Aktivierung des TGR5-Rezeptors waren jedoch andere Verbindungen verantwortlich. Diese These wurde aufgrund eines Journalartikels aufgestellt, der berichtete, dass die Oleanolsäure eine agonistische Aktivität auf den TGR5-Rezeptor besitzt [21]. In dem Extrakt, der aus den Blütenknospen von *Syzygium aromaticum* erhalten wurde, konnten zwei verschiedene Triterpensäuren derepliziert werden, nämlich die Oleanolsäure als Hauptkomponente und die Maslinsäure als weitere bedeutende Nebenkomponente. Ziel war es nun herauszufinden, ob die enthaltenen Mengen an Triterpensäuren mit der Wirkung des Extraktes korrelieren. Für die Quantifizierung standen zwei Ausgangsextrakte zur Verfügung, nämlich Syzaro(DM) (Herstellung siehe Kapitel 2.2.1, S.23) und SyzaroDMp_W_01 (aus der vorangegangenen Diplomarbeit [7] übernommen).

Resultate

Die chromatographische Analyse ergab, dass sich die beiden Extrakte nur in einem Peak unterschieden, der Rest war chemisch völlig ident. Die Abbildung 30 zeigt den Vergleich der beiden Chromatogramme, dabei stellt der rote Kreis jenen Peak dar, der zusätzlich in der Probe SyzaroDMp_W aufgetreten war. Die Quantifizierung der Triterpensäuren erfolgte letztlich in beiden Proben, um einen Mittelwert und folglich ein genaueres Ergebnis zu erzielen.

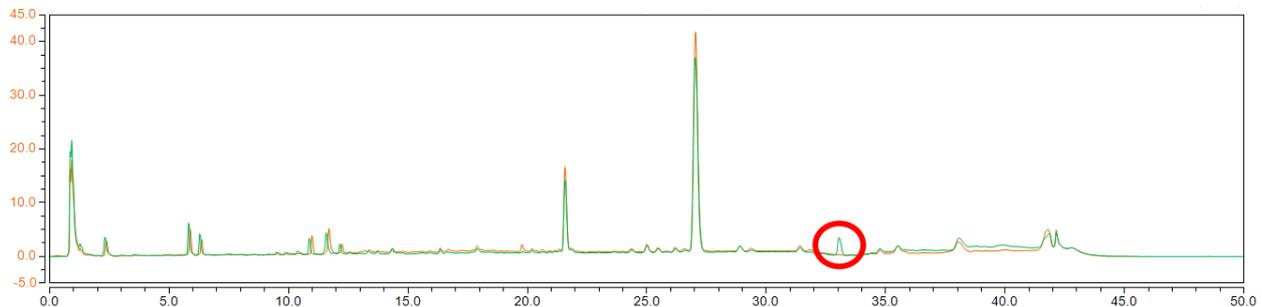


Abbildung 30: Vergleich der Chromatogramme zwischen den Proben Syzaro(DM) (braune Linie) und SyzaroDMp_W_01 (grüne Linie); der rote Kreis zeigt den zusätzlich aufgetretenen Peak in der Probe SyzaroDMp_W_01; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 2 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 3

Für die Quantifizierung der Triterpensäuren wurde je eine Eichgerade für die Oleanolsäure als auch für die Maslinsäure benötigt. Die Eichgeraden wurden unter Verwendung der Methodenoptimierung 4 mit der HPLC-DAD-CAD-Anlage erstellt. Dadurch konnte auf die Mengen an Triterpensäuren in den Proben geschlossen werden. Dem Kapitel 2.2.5.5, S.39 können alle verwendeten Parameter für die Quantifizierung entnommen werden, während im Anhang unter der Kapitelbezeichnung 7.4, S.171 die erhaltenen Eichgeraden der einzelnen Triterpensäuren mit den entsprechenden Detailergebnissen und den dazugehörigen relativen Residuen-Plots nachgelesen werden können. Die Tabelle 24, S.80 zeigt das Endergebnis der Quantifizierung der Proben Syzaro(DM) und SyzaroDMp_W_01. Es wurden jeweils insgesamt vier Versuche durchgeführt und daraus der Mittelwert der gemessenen Mengen in µg/ml gebildet. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Drogenmasse und der entsprechenden Reinheit der Referenzsubstanzen konnte die Menge in mg/g Extrakt berechnet werden. Die Tabelle 25, S.81 zeigt die Menge an Triterpensäuren in den Extrakt-Lösungen die in den Zelltests eingesetzt wurden. Dabei erfolgte die Umrechnung der Triterpensäure-Konzentrationen von µg/ml auf µM.

Resultate

Tabelle 24: Ergebnis der Quantifizierung/Teil 1: Es wurden jeweils vier Versuche durchgeführt, anhand derer die Mengen der Triterpensäuren Maslinsäure und Oleanolsäure in den Proben Syzaro(DM) und SyzaroDMP_W_01 berechnet wurden.

Probenbezeichnung	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert
	Menge µg/ml Maslinsäure CAD	Menge µg/ml Maslinsäure CAD	Menge µg/ml Maslinsäure CAD	Menge µg/ml Maslinsäure CAD	µg/ml
Syzaro(DM)	8,6062	8,4711	8,3040	8,4417	8,4558
SyzaroDMP_W_01	7,8999	7,9611	7,9130	8,1593	7,9833
	Varianz	Standardabweichung	Extraktkonzentration mg/ml	Menge (mg) pro g Extrakt	Menge (mg/g) inkl. Reinheit 92,15%
Syzaro(DM)	0,0154	0,1240	0,2180	38,9912	35,74 ± 0,52
SyzaroDMP_W_01	0,0145	0,1202	0,2720	29,4120	27,05 ± 0,41
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert
	M±enge µg/ml Oleanolsäure CAD	Menge µg/ml Oleanolsäure CAD	Menge µg/ml Oleanolsäure CAD	Menge µg/ml Oleanolsäure CAD	µg/ml
Syzaro(DM)	20,2002	20,3467	20,4273	21,1040	20,5196
SyzaroDMP_W_01	18,4809	17,3976	17,9905	18,6164	18,1214
	Varianz	Standardabweichung	Extraktkonzentration mg/ml	Menge (mg) pro g Extrakt	Menge (mg/g) inkl. Reinheit 98,40%
Syzaro(DM)	0,1607	0,4008	0,2180	94,0376	92,6 ± 1,8
SyzaroDMP_W_01	0,3051	0,5524	0,2720	66,5447	65,6 ± 2,0

Tabelle 25: Ergebnis der Quantifizierung/Teil 2: Es wurden jeweils vier Versuche durchgeführt, anhand derer die Mengen der Triterpensäuren Maslinsäure und Oleanolsäure in den Proben Syzaro(DM) und SyzaroDMP_W_01 berechnet wurden.

Bezeichnung	Substanz	in 100 µg/ml Extrakt sind µg/ml	MG g/mol	µM
Syzaro(DM)	Oleanolsäure	9,253	456,71	20,28
	Maslinsäure	3,593	472,71	7,56
SyzaroDMP_W_01	Oleanolsäure	6,548	456,71	14,35
	Maslinsäure	2,710	472,71	5,72
Bezeichnung	Substanz	µM bezogen auf 30 µg/ml	µM bezogen auf 10 µg/ml	
Syzaro(DM)	Oleanolsäure	6,08	2,03	
	Maslinsäure	2,27	0,76	
SyzaroDMP_W_01	Oleanolsäure	4,31	1,44	
	Maslinsäure	1,72	0,57	

3.2.4 Bioaktivitätstests an HEK293–Zellen

Eine ausdrückliche Zielsetzung dieser Diplomarbeit war es, herauszufinden, welche Inhaltsstoffe für die Aktivierung des TGR5-Rezeptors in *Syzygium aromaticum* verantwortlich waren. Basierend auf den Resultaten der Dereplikation und der Literaturrecherche wurde vermutet, dass die Oleanolsäure maßgeblich für den Effekt des Extrakts auf den TGR5-Rezeptor verantwortlich ist, und dass auch die strukturell sehr ähnliche Maslinsäure daran beteiligt sein könnte. Nach der oben beschriebenen Quantifizierung dieser beiden Verbindungen in dem Extrakt (Kapitel 3.2.3, S.78) konnte diese Hypothese nun durch Testung der beiden Reinsubstanzen bzw. einer rekonstituierten Mischung - d.h. einer Mischung der beiden Triterpensäuren in dem gleichen Verhältnis und der gleichen Konzentration, in der sie in den getesteten Extraktproben vorlagen, an HEK293–Zellen überprüft werden.

Um den EC₅₀-Wert der reinen Triterpensäuren auf den TGR5–Rezeptor zu bestimmen, wurden 1,0 mg in kristallinem Zustand präzise an der Analysenwaage jeweils in ein Eppendorf–Gefäß eingewogen. Für die rekonstituierte Mischung wurden die exakt berechneten Mengen an Triterpensäuren mit Hilfe einer geeichten Kolbenhubpipette aus den für die Quantifizierung benutzen Standardlösungen zusammenpipettiert. Hierauf erfolgte die Trocknung durch einen leichten Luftstrahl. Es war besonders darauf zu achten, dass nichts aus dem Gefäß

Resultate

herausspritzte! Nach verrichteter Arbeit folgte die Übergabe an Frau Dr. Angela Ladurner am Department für Pharmakognosie, die im Anschluss die Zelltests für diese wissenschaftliche Arbeit durchführte. Alle Informationen, die in den folgenden Abbildungen und Tabellen enthalten sind, wurden von Ihr dankenswerterweise zur Verfügung gestellt und für diese Diplomarbeit entsprechend adaptiert.

Die Messungen der Proben geschahen in vier verschiedenen Konzentrationsstufen (100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml und 3 µg/ml Extrakt bzw. entsprechend rekonstituierte Triterpensäure-Mischungen). Damit versuchte man die Wirkung bei unterschiedlichen Konzentrationen (Dosis-Wirkungs-Beziehung) festzuhalten. Das Arbeitsprotokoll der Tests kann im Kapitel 2.2.11, S.50 genau nachgelesen werden. In den Abbildungen stellt die y-Achse die TGR5-Aktivierung dar, während auf der x-Achse die verschiedenen Proben in den unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen sind. Alle Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen (n=3) erhalten und gemittelt. Die abgebildeten Balken zeigen zudem auch die Standardabweichung.

Die Abbildung 31, S.84 zeigt das Ergebnis, welches bei den Transaktivierungsassays mit den HEK293-Zellen erhalten wurde. Es kann sehr gut erkannt werden, dass auf der rechten Seite der Abbildung eine schön dosisabhängige Wirkung des Extraktes vorliegt. Diese ist am größten bei einer Konzentration von 100 µg/ml und nimmt im Anschluss durch Reduktion der Konzentration auf 30 µg/ml, 10 µg/ml bis 3 µg/ml kontinuierlich ab. Im Anschluss der Abbildung folgen die Ergebnisse der rekonstituierten Mischung, die bei den vergleichbaren Konzentrationen getestet wurde, wobei 100 µg/ml Syzaro-Mischung 1,43 µM Oleanolsäure und 0,573 µM Maslinsäure beinhaltet. Im Resultat ist ein leichter Unterschied zur Originalprobe bei der Testkonzentration 100 µg/ml zu erkennen. Die Mischung ist in der Lage den TGR5-Rezeptor 15,3-fach zu aktivieren und ist dabei etwas schwächer als das Extrakt mit einer 19,1-fachen TGR5-Aktivierung. Die Differenz von 3,8 zwischen diesen beiden Testproben lässt sich entweder so erklären, dass noch zusätzlich andere Verbindungen im Extrakt enthalten sind, die die Wirkung auf den TGR5-Rezeptor modulieren können, oder ist schlicht im Bereich der Ungenauigkeit des Assays zu suchen, der in der biologischen Variabilität begründet ist. Ähnliche geringfügige Unterschiede waren auch bei den Testkonzentrationen von 30 und 10 µg/ml zu beobachten. Alle erhaltenen Testdaten für *Syzygium aromaticum* können für die Konzentrationen 100 µg/ml der Tabelle 26, S.85 und für 30 µg/ml Tabelle 27, S.85 entnommen werden.

Resultate

Im Zuge der Analysen wurden auch die einzelnen Triterpensäuren entsprechend dem Gehalt in den zuvor erwähnten Extrakt-Lösungen (100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml und 3 µg/ml) gemessen. Die Einwaage in die Eppendorf-Gefäße orientierte sich dabei exakt an der im Extrakt vorkommenden Menge, um so das Resultat mit der Mischung vergleichen zu können. Das Ergebnis zeigte für die Oleanolsäure eine 8,35-fache und für die Maslinsäure eine 5,42-fache TGR5-Aktivierung bei den Konzentrationen die dem Extrakt mit 100 µg/ml entsprechen. Dieses Resultat zeigt, dass die Aktivität der rekonstituierten Mischung als Summe der Aktivitäten ihrer beiden Komponenten verstanden werden kann und es zu keiner nennenswerten Synergie kommt. Bei den niedrigeren Testkonzentrationen (30 µg/ml, 10 µg/ml und 3 µg/ml) spielt die Maslinsäure keine wesentliche Rolle mehr und die Wirkung der Mischung entspricht weitgehend der Wirkung der Oleanolsäure.

Im Zuge dieser umfangreichen Analysen wurde zusätzlich auch noch der EC₅₀-Wert jeder Triterpensäure ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass die Maslinsäure einen EC₅₀-Wert von 3,1 µM und die Oleanolsäure von 2,2 µM hatte; weitere Daten stehen in der Tabelle 44, S.187. Dort wird auch gezeigt, dass die Oleanolsäure bei 10 µM eine 13,04-fache und die Maslinsäure eine 7,23-fache TGR5-Aktivierung induziert. Es erfolgten auch Messungen mit Positivkontrollen. Dabei handelte es sich einerseits um die CDCA (Chenodesoxycholsäure) - sie konnte eine FXR-Aktivierung bei 10 µM um das 2,34-fache hervorrufen - und andererseits um die LCA (Lithocholsäure), der im Zuge dieser Diplomarbeit eine größere Bedeutung zugesprochen wurde, da sie die stärker wirksame Positivkontrolle für den TGR5-Rezeptor darstellt.

Interessant scheinen auch die maximalen Werte der TGR5-Aktivierung, die mit den verschiedenen Triterpensäuren erreicht werden konnten, deshalb sollen auch diese nun kurz beschrieben werden. Die maximale Modulation durch die Oleanolsäure lag mit 16,8-fach deutlich höher als die der Maslinsäure mit 7,8-fach. Bei den Positivkontrollen befand sich die Lithocholsäure deutlich im Vorsprung mit einer 36,4-fachen gegenüber der Chenodesoxycholsäure mit einer 11,6-fachen Aktivierung.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der erwähnt werden soll, ist in Abbildung 32, S.86 dargestellt. Im November 2015 erfolgte im Zuge der vorangegangenen Diplomarbeit [7] von Mag. Nadina Faur ein Transaktivierungsassay mit der Probe SyzaroDMP_W_01. In diesem Test zeigte sich bei keiner Extraktkonzentration eine Zellschädigung. Bei dem neueren, mit der gleichen Probe im Mai durchgeführten Test konnte jedoch eine leichte Zelltoxizität sowohl bei einer Konzentration

Resultate

von 100 µg/ml als auch bei 30 µg/ml erkannt werden. Dies ist natürlich nicht erwünscht, da man möglichst ungeschädigte Zellen mit positiver Modulation haben möchte. Bei allen anderen Konzentrationen lag keine Zellschädigung vor, (Abbildung 32, S.86 und Abbildung 33, S.87), was wiederum positiv ist. Noch entscheidender ist, dass weder die rekonstituierte Mischung noch die einzelnen Triterpensäuren in den hier getesteten Konzentrationen cytotoxisch waren. Der zellschädigende Effekt der Probe ist auch eine mögliche Erklärung für die geringen Unterschiede in der TGR5-Aktivierung zwischen der Probe und der rekonstituierten Mischung.

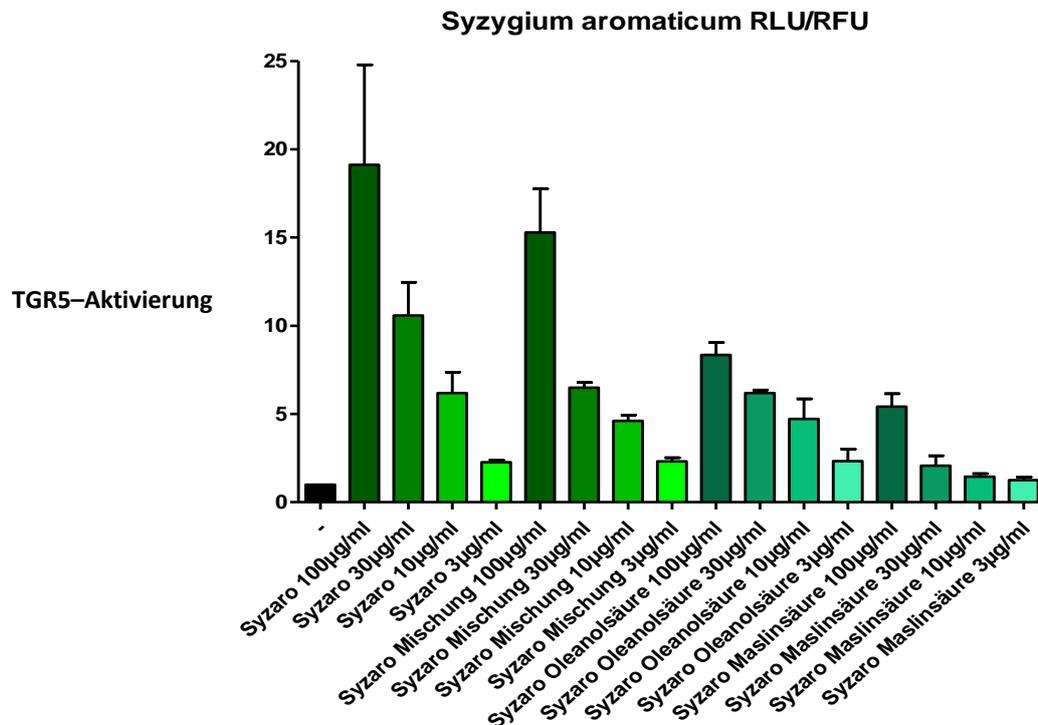


Abbildung 31 zeigt die **TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen**. Dabei wurde die nicht-biotransformierte Probe Syzaro, die rekonstituierte Mischung an Triterpensäuren und die einzelnen Triterpensäuren an HEK293-Zellen gemessen. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3) und dabei die Probe SyzaroDmp_W_01 verwendet. Bei RFU handelt es sich um den normierten Fluoreszenz-Wert und bei RLU um den normierten Lumineszenz-Wert. Auf der y-Achse geben daher die Werte RLU/RFU die gemessene Lumineszenz, als Indikator der TGR5-Aktivität, normiert auf den Fluoreszenz-Wert, der uns als Kontrolle der Transfektion und zum Nachweis der Viabilität dient. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Proben. In der linken Abbildung kann eine sehr schöne dosisabhängige Wirkung des Extraktes erkannt werden, während die rekonstituierte Mischung der enthaltenen Triterpensäuren eine Spur geringer wirksam ist. Im Anschluss folgen die getesteten einzelnen Triterpensäuren; zuerst die Oleanolsäure, dann die Maslinsäure. Mittelwert +/- Standardabweichung

Resultate

Tabelle 26 gibt die **Testergebnisse zu den Triterpensäuren bei einer Extrakt-Konzentration von 100 µg/ml wieder**. Der Test wurde an HEK293-Zellen durchgeführt. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3) und dabei die Probe SyzaroDMP_W_01 als Extrakt verwendet.

Probe	TGR5-Aktivierung bei 100 µg/ml	entspricht in [µM]
Extrakt	19,13	
Rekonstituierte Mischung	15,28	14.35 OS+5.72 MS
Oleanolsäure	8,35	14.35
Maslinsäure	5,42	5.72

Tabelle 27 gibt die **Testergebnisse zu den Triterpensäuren bei einer Extrakt-Konzentration von 30 µg/ml wieder**. Der Test wurde an HEK293-Zellen durchgeführt. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3) und dabei die Probe SyzaroDMP_W_01 als Extrakt verwendet.

Probe	TGR5-Aktivierung bei 30 µg/ml	entspricht in [µM]
Extrakt	10,59	
Rekonstituierte Mischung	6,49	4,31 OS+1,72 MS
Oleanolsäure	6,18	4,31
Maslinsäure	2,07	1,72

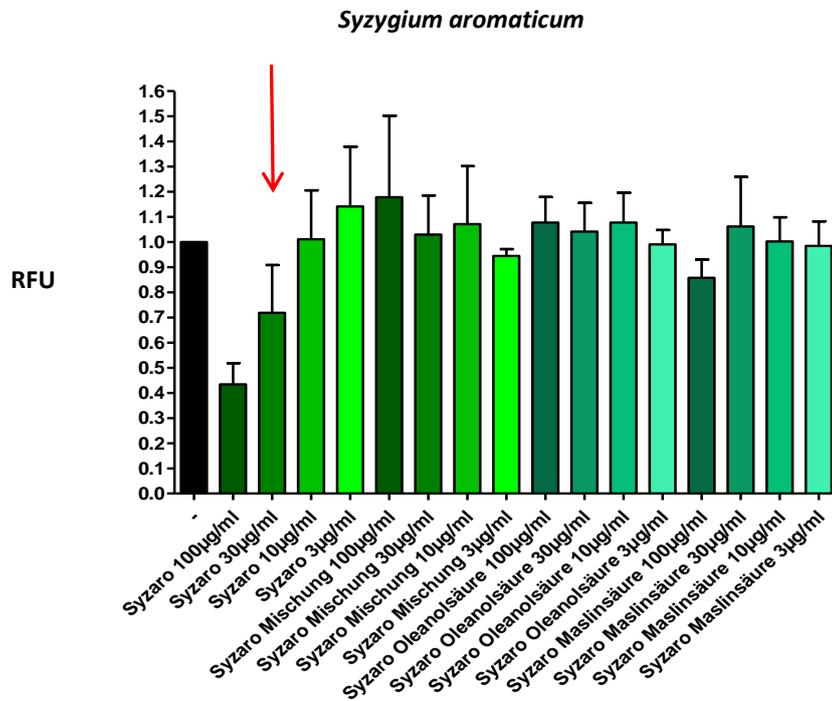


Abbildung 32 zeigt die Zellviabilitätsmessung bei unterschiedlichen Konzentrationen im Mai 2016-Versuch. Dabei wurde die nicht-biotransformierte Probe SyzaroDMp_W_01, die einzelnen Triterpensäuren und die rekonstituierte Mischung der Triterpensäuren an HEK293-Zellen gemessen. Bei RFU handelt es sich um den Fluoreszenz-Wert. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelten Zellen, während die anderen Balken die jeweilige Beschriftung widerspiegeln. Es zeigte sich, dass bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml und 30 µg/ml eine leichte Zelltoxizität vorlag (mit einem roten Pfeil markiert), während bei allen anderen getesteten Substanzen keine Zellschädigung eintrat. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit dem Ergebnis, welches einige Monate zuvor im Zuge einer vorangegangenen Diplomarbeit festgestellt wurde [7]. Dort trat bei keiner Extrakt-Konzentration eine Zellschädigung ein (siehe Abbildung 33, S.87). Die y-Achse zeigt die relativen Fluoreszenz-Werte, die ein Mass für die Expression des EGFP³⁸ darstellen, während die x-Achse die verschiedenen Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Proben wiedergibt. Mittelwert +/- Standardabweichung; n = 3; verwendete Probe SyzaroDMp_W_01

³⁸ EGFP = verbessertes grün fluoreszierendes Protein

Resultate

Abbildung 33 demonstriert die **nicht vorhandene**

Zelltoxizität im November 2015-Versuch an HEK293-

Zellen. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelten Zellen, die grauen Balken die beiden Positivkontrollen

und die weißen Balken den Extrakt in den angegebenen Konzentrationen. Es zeigte sich, dass

bei keiner Extraktkonzentration eine Zelltoxizität vorlag. Dieses im Zuge der vorangegangenen

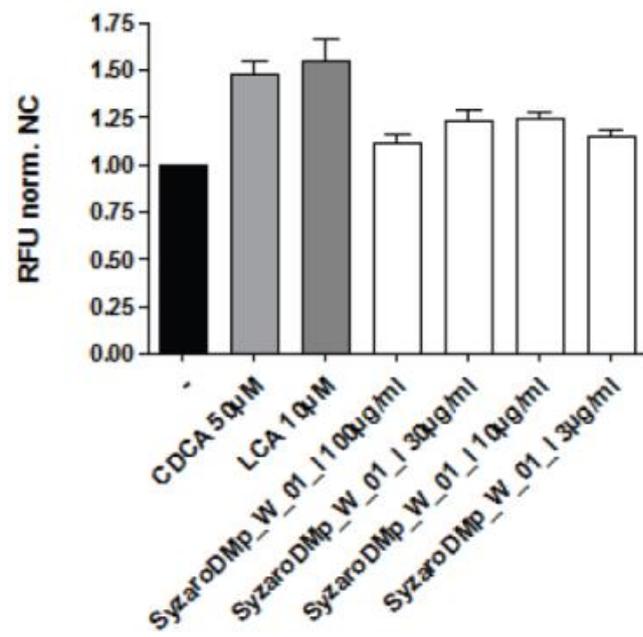
Diplomarbeit [7] erhaltene Ergebnis ist nicht stimmig mit dem Ergebnis, welches einige Monate später im

Mai gemessen wurde. (siehe Abbildung 32, S.86). Die y-Achse zeigt die relativen Fluoreszenz-Werte, die

ein Mass für die Expression des EGFP darstellen, während die x-Achse die verschiedenen

Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Proben wiedergibt. Mittelwert +/-

Standardabweichung; n = 3; verwendete Probe SyzaroDmp_W_01



Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wirkung von *Syzygium aromaticum* auf den TGR5-Rezeptor aufgrund der enthaltenen Triterpensäuren (Oleanolsäure und Maslinsäure) erklärt werden kann. In den Zelltests zeigte sich zudem, dass der Extrakt nur wenig besser wirkte als die reine Triterpensäure-Mischung. Der Unterschied in der Aktivierung des TGR5-Rezeptors kann verschiedene Gründe haben. So können eventuell zusätzliche chemische Inhaltsstoffe im Extrakt die Wirkung unterstützen oder aber der Extrakt in seiner Gesamtheit besser wirken als die Triterpensäure-Mischung. Des Weiteren wurde mit natürlichen Zellsystemen gearbeitet, dadurch sind Schwankungen im Ergebnis ganz normal.

3.3 *Pimenta dioica*

Im nun folgenden Teil wird die Vorgangsweise bei *Pimenta dioica* erklärt. Wie im Kapitel 3.1, S.54 bereits näher erläutert, wurden infolge einer vorangegangenen Diplomarbeit drei Pflanzenextrakte übernommen und mit diesen weitergearbeitet. Die zuvor abgearbeitete Pflanze *Syzygium aromaticum* (siehe Kapitel 3.2, S.60) war von allen dreien jene, die bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine besonders gute Bioaktivität auf den TGR5-Rezeptor erzielte. *Pimenta dioica* zeigte eine geringere, aber deutlich vorhandene Modulierung des TGR5-Rezeptors (siehe Kapitel 3.1, S.54). Genauso wie bei der Gewürznelke sollten auch hier die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe aufgedeckt werden.

3.3.1 Dereplikation der Inhaltsstoffe

Das Schema zur Analyse des Inhaltsstoffprofils bei *Pimenta dioica* war prinzipiell sehr ähnlich wie es bei *Syzygium aromaticum* angewendet wurde. Im Fachjargon spricht man auch von der Dereplikation, die ein zentraler Baustein in der Wirkstofffindung eines Extraktes ist und bereits im Kapitel 3.2.1, S.60 erläutert wurde.

3.3.1.1 HPLC-DAD-CAD-Analyse des Extraktes

Zu Beginn mussten die chromatographischen Bedingungen so optimiert werden, dass eine gute Trennung der einzelnen Komponenten möglich war. Zur Anwendung kam die Probe Pimdio(DM), die nach dem im Kapitel 2.2.1, S.23 erwähnten Verfahren hergestellt wurde. Die Optimierung erfolgte mit der HPLC-DAD-CAD-Anlage, wobei die gleichen Geräteeinstellungen wie bei der Methodenoptimierung von *Syzygium aromaticum* Anwendung fanden. Die Auftrennung erfolgte letztlich mit der Methodenoptimierung 2 (siehe Kapitel 2.2.5.4, S.33), welche durch Variation der Fließmittelzusammensetzung zustande kam. Die gewählte Gradientenelution sah einen Anstieg des organischen Anteils der mobilen Phase (A: 0,1% wässriger Ameisensäure, B: Acetonitril) von zunächst 5% Acetonitril auf 95% Acetonitril mit einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 ml/min und einer Säulenofentemperatur von 25 °C vor. Bei *Syzygium aromaticum* erfolgte die Auftrennung mittels Methodenoptimierung 3. Der Unterschied zwischen den für die einzelnen Extrakte optimierten Gradienten liegt lediglich in

Resultate

der Steilheit des Anstiegs, der bei der Methodenoptimierung 2 und 3 in mehreren Stufen erfolgte. Der HPLC–Lauf benötigte insgesamt 56 min.

Damit die Dereplikation positiv abgeschlossen werden konnte, erfolgte im Anschluss die Bestimmung der exakten Massen der getrennten Hauptkomponenten des Extrakts. Dafür kam die LC–ESI–TOF–Anlage zum Einsatz, mit der dieses Vorhaben erledigt werden konnte. Die Auswahl der Peaks lag auch wie bei *Syzygium aromaticum* auf jenen, die eine relativ hohe Intensität aufwiesen; der „Rasen“ war daher uninteressant. Zunächst lag der Fokus auf den Peaks mit der Bezeichnung PD₁₅, PD₁₆, PD₂₀ und PD₂₃, da es sich laut den CAD-Daten bei diesen um die Hauptkomponenten handeln sollte (siehe Abbildung 34). PD₂₉ ist eine Verunreinigung, die in der Probe enthalten war. Durch die Kombination der exakten Masse, dem verwendeten Pflanzenteil und der Pflanze selber erhoffte man sich durch Literaturrecherche jene Verbindung(en) zu dereplizieren, die für die Aktivierung des TGR5-Rezeptors verantwortlich ist /sind.

Das nun folgende Unterkapitel soll einen Einblick in die LC–ESI–TOF–Analyse des Extraktes von Pimdio(DM) geben.

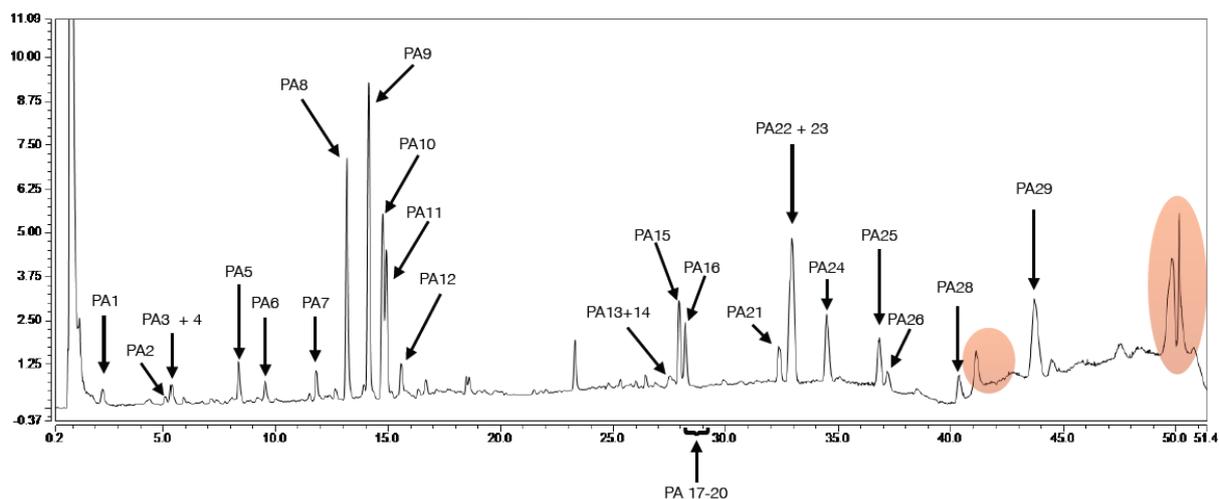


Abbildung 34 zeigt das **gesamte Inhaltsstoffprofil der Probe Pimdio(DM)**, aufgenommen mittels HPLC–CAD-Anlage. Das Chromatogramm beinhaltet Peaks (rot schattig hinterlegte Kreise), die auch in der Methanol-Blindprobe gefunden wurden und daher nichts mit der Probe zu tun haben. Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 2

3.3.1.2 LC-ESI-TOF-Analyse des Extraktes

Nachdem die Auftrennung der Probe optimiert war, erfolgte die massenspektrometrische Analyse sowohl der biotransformierten als auch der nicht-biotransformierten Proben. Zur Analyse mit der LC-ESI-TOF-Anlage wurden nun exakt die gleichen chromatographischen Bedingungen gewählt, die auch für die Methodenoptimierung Anwendung fanden (siehe Kapitel 2.2.5.4, S.33 unter Methodenoptimierung 2); die erzielte Messgenauigkeit lag bei < 10 ppm. Es wurde jeweils ein Volumen von 3 µl automatisch vom Autosampler injiziert, danach erfolgte die Auftrennung durch den gewählten und voreingestellten Gradienten. Auch bei den Proben von *Pimenta dioica* wurde jedes Mal vor den eigentlichen Proben obligatorisch reiner Methanol als Leerprobe injiziert, um eventuelle Verunreinigungen zu entdecken, beziehungsweise in der anschließenden Beurteilung berücksichtigen zu können. Es war auch immer notwendig, entsprechende Vergleiche zu machen, da es das eine oder andere Mal auch vorgekommen war, dass Verunreinigungen im System enthalten waren. In den entsprechenden Chromatogrammen wurden diese Fälle gesondert mit roter Farbe hinterlegt.

Die zu analysierenden Proben von *Pimenta dioica* wurden als Pimdio(DM), PimdioEXTR0 und PimdioEXTR24 bezeichnet. Die chromatographischen Vergleiche zwischen der Originalprobe und den mit aufgeschwemmtem Mäusekot behandelten Proben, wird im Kapitel 3.3.2, S.99 näher beleuchtet. Die Konzentrationen der Extrakte in den HPLC-Fläschchen betragen in etwa 3-4 mg/ml, gelöst in 1 ml Methanol, die von der vorgehenden Diplomarbeit von Mag. Nadina Faur übernommen wurden [7]. Die Vermessung erfolgte mittels LC-ESI-TOF-Anlage sowohl im positiven als auch im negativen Modus. Informationen über den Geräteaufbau und die Funktionsweise können dem Kapitel 2.2.6, S.40 entnommen werden. Im Kapitel 3.2.1.2, S.63 wurde bereits näher auf die Vermessung mit der LC-ESI-TOF-Anlage und die Analyse der Testergebnisse eingegangen. Um eine Redundanz zu vermeiden, soll auf jene Kapitel verwiesen werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen die erstellten Basispeak-Chromatogramme (BPC) und Massenspektren, wobei sich die Auswahl auf einige besonders relevante Verbindungen beschränkt; weitere Interessante Massenspektren können im Kapitel 7.3, S.169 eingesehen werden. Bei *Pimenta dioica* waren vor allem die Peaks mit der Bezeichnung PD₁₅, PD₁₆, PD₂₂ und

Resultate

PD₂₃ von Bedeutung, weil es sich dabei um Triterpensäuren handelte; wie bereits bekannt, können diese den TGR5-Rezeptor positiv beeinflussen. Bei PD₁₅ handelte es sich um die Maslinsäure, PD₁₆ wurde als Corosolsäure identifiziert (siehe Abbildung 35, S.93), PD₂₂ als Oleanolsäure (siehe Abbildung 36, S.94) und PD₂₃ als Ursolsäure (siehe Abbildung 36, S.94). Die Abbildungen zeigen zunächst ein komplettes Übersichtschromatogramm der Probe Pimdio(DM), in jenen sind verschiedene Peaks mit unterschiedlicher Intensität und unterschiedlichen Retentionszeiten dargestellt. Es wurden von allen Peaks, die auch entsprechende Zuordnungen besitzen, Massenspektren ausgewertet, wobei eine gewisse Intensität als Auswahlkriterium für die Untersuchung ausschlaggebend war. Durch die sehr hohe Messgenauigkeit des Gerätes, konnte das Masse/Ladungsverhältnis (m/z-Verhältnis) exakt bestimmt werden. Aufgrund dieser Präzision war es der Software möglich, Summenformeln zu berechnen und deren Übereinstimmung mit dem gemessenen Isotopenmuster zu bestimmen; z.B. kann aus dem in Abbildung 35, S.93 gezeigten Massenspektrum für den monoisotopen Peak ein m/z-Verhältnis von 471,3502 Da und im BPC eine Retentionszeit von 28,2 min abgelesen werden. Da die Aufnahme im negativen Modus erfolgte und die Verbindung als [M-H]⁻ erschien, musste noch ein Wasserstoffproton (1,0073 Da) zugezählt werden, um auf die tatsächliche Molekülmasse von 472,3575 Da zu kommen. Die wahrscheinlichste Summenformel, die für diese Verbindung vorgeschlagen wurde, lautete C₃₀H₄₈O₄ (Corosolsäure); alle Ergebnisse des negativen Modus' mit den Daten des positiven Modus' werden in Tabelle 28, S.95 und Tabelle 29, S.96 dargestellt. Im Anschluss erfolgte der Abgleich mit der chemischen Datenbank „SciFinder“, der die Identifizierung einiger bekannter Inhaltsstoffe aus *Pimenta dioica* ermöglichte. Die Vorgangsweise war hierbei identisch wie bei *Syzygium aromaticum* und ist im Kapitel 3.2.1.2, S.63 beschrieben worden.

Das in Abbildung 36, S.94 gezeigte Massenspektrum stellt eine Überlagerung der Ursolsäure und der Oleanolsäure dar, wobei beide Triterpensäuren die gleiche molekulare Masse und das gleiche Isotopenmuster besitzen. Die Form des chromatographischen Peaks zeigt zwar deutlich die Anwesenheit zweier Komponenten, die mit der gewählten HPLC-Methode jedoch nur unzureichend voneinander getrennt werden können. Für die Quantifizierung, die im Kapitel 3.3.3, S.102 besprochen wird, musste daher zunächst eine Gradientenelution gefunden werden, mit der eine bessere Trennung der beiden Triterpensäuren möglich war. Wie bei *Syzygium aromaticum* war die Quantifizierung essentiell für die exakte Mengenbestimmung der einzelnen Triterpensäuren im Extrakt. Im Zuge der

Resultate

Zelltests versuchte man dann jenes Mengenverhältnis so gut es ging zu mischen und an HEK293-Zellen zu testen. Nähere Informationen darüber können dem Kapitel 3.3.3, S.102 entnommen werden.

Im Allgemeinen waren sehr ähnliche Verbindungen wie in *Syzygium aromaticum* enthalten. So kamen auch in Pimdio(DM) verschiedene Fettsäuren vor, wie die Stearinsäure, die Palmitinsäure oder die Linolensäure, aber auch bereits erwähnte Triterpensäuren wie die Oleanolsäure oder die Maslinsäure. Die gezeigten Tabellen (Tabelle 28, S.95 und Tabelle 29, S.96) schlüsseln die Peaks nach entsprechender Retentionszeit, Masse zu Ladungsverhältnis im positiven und negativen Modus, Summenformel und Molekülgewicht in Dalton auf; auch die vorhergesagte Struktur sowie Literaturangaben (sofern möglich), in denen die Substanzen beschrieben sind, werden angegeben. Der grün markierte Balken von PD₂₉ soll auf eine Verunreinigung hindeuten, die im Lösungsmittel enthalten war. Die Nylon-Derivate (PD₇, PD₈, PD₉, PD₁₁, PD₁₂) in einem Zeitbereich von 11,8 bis 15,5 min werden im Kapitel 3.3.1.4, S.98 näher besprochen. Das gesamte beschriftete Chromatogramm ist in der Abbildung 34, S.89 auffindbar. Da eine Umkehrphasenchromatographie zur Anwendung kam, erfolgte zunächst die Elution hydrophiler Substanzen wie Gallussäure (PD₁) oder Ericifolin (PD₁₀), am Ende jedoch eluieren hydrophobe Substanzen wie die bereits erwähnten Fettsäuren.

Resultate

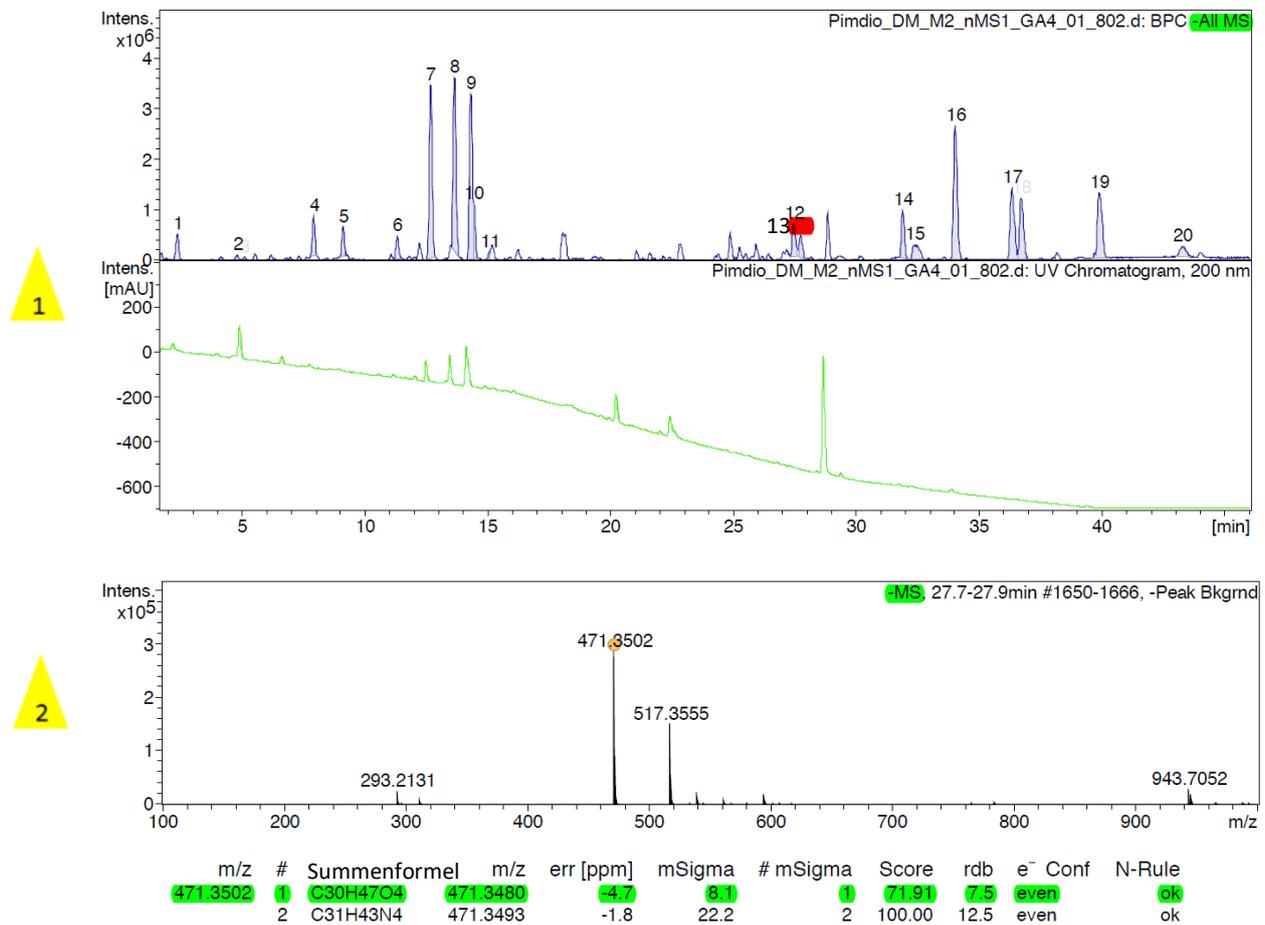


Abbildung 35 zeigt das **Massenspektrum der Corosolsäure**, die in der Probe Pimdio(DM) enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit der LC-ESI-TOF-Anlage aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Pimdio(DM), das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der Corosolsäure wieder. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 27,7-27,9 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die Corosolsäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 27,7 min und wurde vor allem als $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 471,3502 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm zwei Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel $C_{30}H_{47}O_4$ die plausible ist. Um auf die Summenformel der Corosolsäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden; folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_{30}H_{48}O_4$.

Resultate

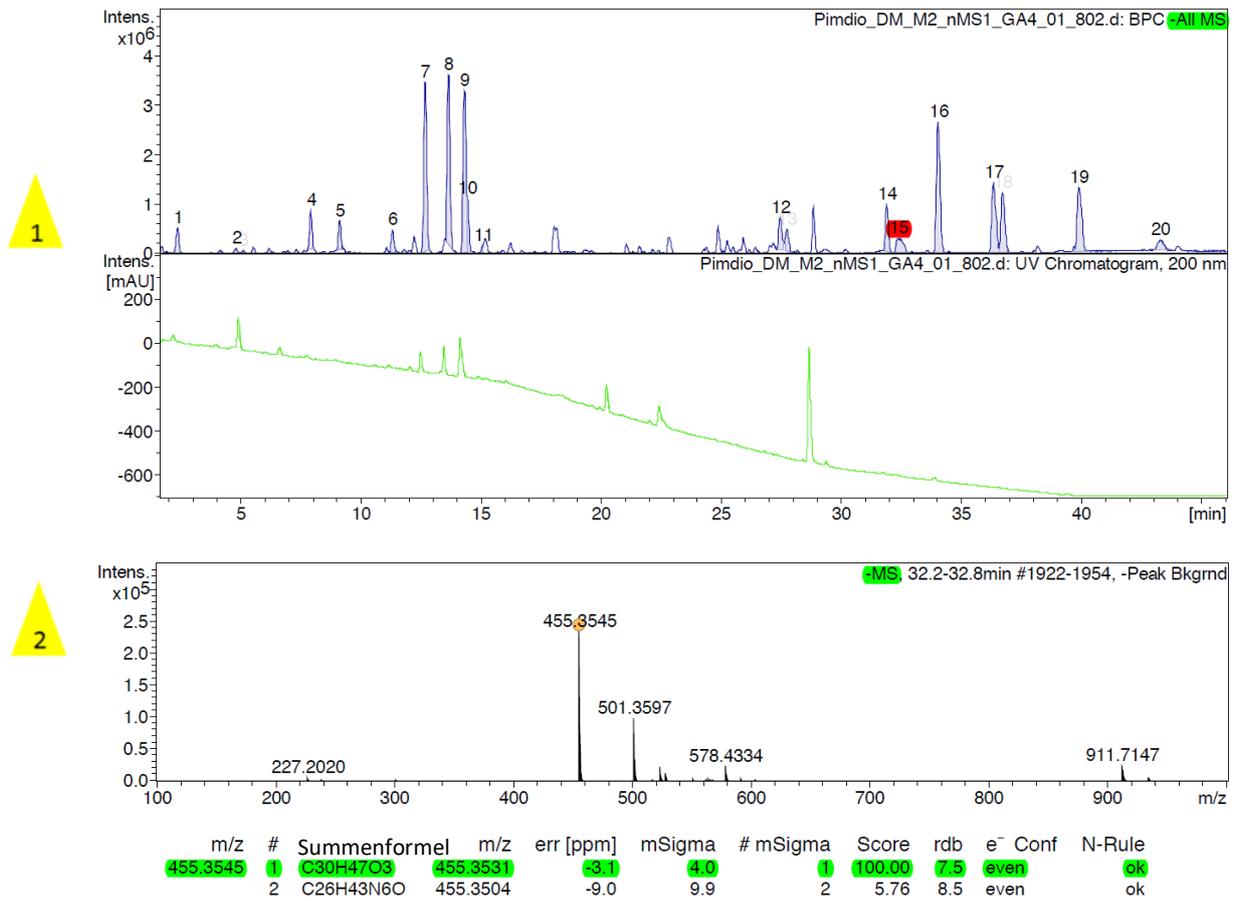


Abbildung 36. das Massenspektrum der Oleanolsäure und Ursolsäure, die in der Probe Pimdio(DM) enthalten sind: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit der LC–ESI–TOF-Anlage aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Pimdio(DM), das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der Oleanolsäure und Ursolsäure wieder. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 32,2–32,8 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die Oleanolsäure und Ursolsäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 32,5 min und wurde vor allem als $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 455,3545 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm zwei Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel $C_{30}H_{47}O_3$ die plausible ist. Um auf die Summenformel der Corosolsäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden; folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_{30}H_{48}O_3$.

Resultate

Tabelle 28 Inhaltsstoffprofil der Probe Pimdio(DM) Teil 1; Analyse der Massen erfolgte mit der LC-ESI-TOF-Anlage. Der grün hinterlegte Balken PD₂₉ deutet eine Verunreinigung im System an; n. d. = nicht detektiert; blau hinterlegte Balken zeigen die enthaltenen vier Triterpensäuren

Peak	RT [min]	m/z Pos.	m/z Neg.	Summenformel	MW [Da]	vorhergesagte Struktur	CAS Nr.
PD ₁	2,3	171,0299	169,0148	C ₇ H ₆ O ₅	170,0	Gallussäure	149-91-7
PD ₂	5,1	361,1504	359,1359	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	360,1	PD4 mit Hexose	-
PD ₃	5,4	361,1502	359,1360	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	360,1	PD4 mit Hexose	-
PD ₄	5,4	n. d.	197,0825	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	198,1	Dihydroxyeugenol-Derivat	-
PD ₅	8,3	389,1821	387,1677	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	388,2	-	-
PD ₆	9,5	227,1296	225,1140	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	226,1	-	-
PD ₇	11,8	566,4303	610,4208	C ₃₀ H ₅₅ N ₅ O ₅	565,4	Nylon-6-Derivat (n=5)	-
PD ₈	13,1	679,5146	723,5058	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	678,5	Nylon-6-Derivat (n=6)	-
PD ₉	14,1	792,5988	836,5902	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	791,6	Nylon-6-Derivat (n=7)	-
PD ₁₀	14,7	495,1524	493,1373	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₂	494,1	Ericifolin	141913-95-3
PD ₁₁	14,9	905,6828	949,6734	C ₄₈ H ₈₈ N ₈ O ₈	904,7	Nylon-6-Derivat (n=8)	-
PD ₁₂	15,5	1018,7662	1062,7560	C ₅₄ H ₉₉ N ₉ O ₉	1017,7	Nylon-6-Derivat (n=9)	-
PD ₁₃	27,7	279,2336	n. d.	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,2	-	-
PD ₁₄	27,7	n. d.	295,2287	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	296,2	-	-
PD ₁₅	28,0	473,3648	471,3500	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472,4	Maslinsäure	4373-41-5
PD ₁₆	28,2	473,3648	471,3502	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472,4	Corosolsäure	4547-24-4
PD ₁₇	28,5	295,2284	n. d.	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294,2	-	-
PD ₁₈	28,7	295,2285	n. d.	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294,2	-	-
PD ₁₉	29,0	n. d.	297,2444	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	298,2	-	-
PD ₂₀	29,1	n. d.	297,2442	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	298,2	-	-
PD ₂₁	32,4	279,2334	277,2188	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,2	alpha-Linolensäure	-
PD ₂₂	32,8	457,3689	455,3545	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456,4	Oleanolsäure	0508-2-1
PD ₂₃	32,9	457,3689	455,3545	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456,4	Ursolsäure	77-52-1
PD ₂₄	34,5	281,2491	279,2342	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,2	Linolsäure	463-40-1
PD ₂₅	36,8	257,2493	255,2341	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,2	Palmitinsäure	0057-10-3
PD ₂₆	37,2	n. d.	281,2499	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,3	Ölsäure	112-80-1
PD ₂₇	40,1	371,3174	n. d.	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370,3	-	-
PD ₂₈	40,3	n. d.	283,2653	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,3	Stearinsäure	0057-11-4
PD ₂₉	43,7	n. d.	621,4384	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	622,4	-	-

Resultate

Tabelle 29 Inhaltsstoffprofil der Probe Pimdio(DM) Teil 2; Analyse der Massen erfolgte mit der LC–ESI–TOF–Anlage.

Der grün hinterlegte Balken PD₂₉ deutet eine Verunreinigung im System an; MK₀ = Originalextrakt mit sterilem Mäusekot behandelt, MK₂₄ = 24h Inkubation des Originalextraktes mit nicht sterilem Mäusekot; Zeichenerklärung: + = Intensität ungefähr gleich wie Originalextrakt, - = Intensität stark verringert oder Peak nicht mehr vorhanden, + (+) = Intensität deutlich höher; die TGR5-Spalte zeigt an, ob eine Aktivität auf den TGR5-Rezeptor in der Literatur beschrieben ist.

Peak	Bestätigung	DM Extrakt	MK ₀	MK ₂₄	TGR5	Kommentar	Literatur
PD ₁	✓	+	+	+	X		[22]
PD ₂	-	+	+	-	X		
PD ₃	-	+	+	-	X		
PD ₄	-	+	+	+	X		[23]
PD ₅	-	+	+(+)	-	X		
PD ₆	-	+	+	+	X		
PD ₇	-	+	+	+	X		
PD ₈	-	+	+	+	X		
PD ₉	-	+	+	+	X		
PD ₁₀	-	+	+	-	X	Synonym: Pimentol	[4]
PD ₁₁	-	+	+	+	X		
PD ₁₂	-	+	+	+	X		
PD ₁₃	-	+	+	+(+)	X		
PD ₁₄	-	+	+(+)	+	X		
PD ₁₅	✓	+	+	+	X		
PD ₁₆	✓	+	+	+	X		
PD ₁₇	-	+	+	+(+)	X		
PD ₁₈	-	+	+	+(+)	X		
PD ₁₉	-	+	+(+)	+	X		
PD ₂₀	-	+	+(+)	+	X		
PD ₂₁	-	+	+	+	X		
PD ₂₂	✓	+	+	+	✓		[24]
PD ₂₃	✓	+	+	+	✓	Hauptkomponente	[25]
PD ₂₄	✓	+	+	+	X		
PD ₂₅	✓	+	+	+	X		[26]
PD ₂₆	✓	+	+	+	X		
PD ₂₇	-	-	-	-	X		
PD ₂₈	✓	+	+	+	X		
PD ₂₉	-	+	+	+	X	Verunreinigung	

Da mit der LC–ESI–TOF–Anlage nur full-scan Massenspektren aufgenommen wurden, es aber öfters mehrere verschiedene mögliche Verbindungen zu einer gefundenen Summenformel gab, wurde der gewonnene Extrakt aus *Pimenta dioica* zusätzlich noch mit der LC–ESI–Ionenfalle vermessen, mit der MSⁿ-Spektren aufgenommen wurden. Bei der Fragmentierung wurden Teilstrukturen abgespalten, und dadurch im Idealfall die Identifizierung der tatsächlichen Verbindung ermöglicht. Diese Analysen führte dankenswerterweise Herr Dr. Martin Zehl durch. Nähere Details zum Instrument und den verwendeten Geräteeinstellungen können dem Kapitel 2.2.7, S.41 entnommen werden.

In Folge dieser Arbeitsabläufe konnte nun das chemische Geheimnis um *Pimenta dioica* sukzessive gelüftet werden. Da sich diese Diplomarbeit vorwiegend auf die Wirkung der Triterpensäuren auf den TGR5-Rezeptor fokussierte, standen diese auch im Vordergrund und sollten im Anschluss quantifiziert und an HEK293-Zellen getestet werden; mit der Quantifizierung der Triterpensäuren beschäftigt sich Kapitel 3.3.3, S.102 insbesondere. Im Anschluss erfolgten die Zelltests sowohl mit dem Extrakt als auch mit den einzelnen und gemischten Triterpensäuren in entsprechenden Mengenverhältnissen; prinzipiell war die Vorgangsweise wie bei *Syzygium aromaticum* (siehe 3.2, S.60)

3.3.1.3 Nachweis mit Referenzsubstanzen

Der Nachweis zahlreicher Verbindungen mit Referenzsubstanzen war ein weiterer wichtiger Schritt zur Festigung der Ergebnisse, die durch die Dereplikation erhalten wurden. Es erfolgte eine Bestätigung zahlreicher Substanzen, die in der Tabelle 28, S.95 aufgelistet wurden. Für die Evaluation der Daten kam die HPLC–DAD–CAD–Anlage zum Einsatz, mit der gleichen Geräteeinstellung und Methode, wie im Kapitel 3.3.1.1, S.88 erläutert. Die Startkonzentration der Referenzsubstanzen lag bei circa 1 mg/ml, gelöst in 1 ml Methanol, (siehe Kapitel 2.2.3, S.26). Die nun folgenden Chromatogramme zeigen die Identifikation der Corosolsäure (siehe Abbildung 37, S.98) und der Maslinsäure (siehe Abbildung 38, S.98) Zur besseren Einordnung ist ein Übersichtschromatogramm im rechten oberen Rand eingeblendet.

Resultate

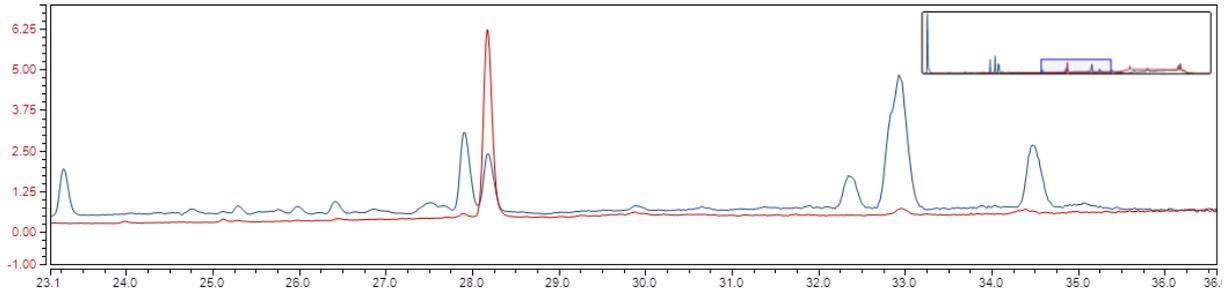


Abbildung 37 Bestätigung der Corosolsäure: Im rechten oberen Eck ist das gesamte Chromatogramm der Probe Pimdio(DM) ersichtlich; Corosolsäure: rote Linie, Probe: blaue Linie; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 2

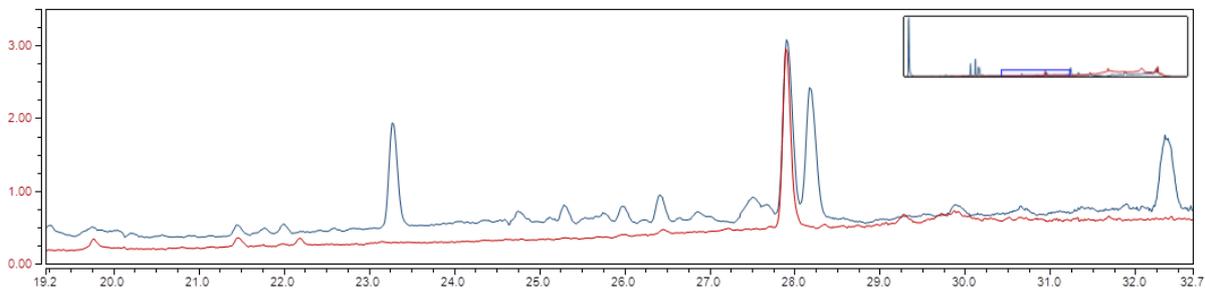


Abbildung 38 Bestätigung der Maslinsäure: Im rechten oberen Eck ist das Chromatogramm der Probe Syzaro(DM) ersichtlich; Maslinsäure: rote Linie, Probe: blaue Linie; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 2

3.3.1.4 Einschub: Polyamid-Verunreinigungen

Dieser Teil der Diplomarbeit soll nocheinmal kurz auf die Problematik des Herstellungsprozesses verweisen. Wie im Kapitel 3.2.1.4, S.70 schon näher besprochen, kam es auch bei den Proben von *Pimenta dioica* zu Verunreinigungen, die im Zuge des Extraktionsverfahrens in die Proben gelangten. Sowohl in den Chromatogrammen, die mit der HPLC–DAD–CAD–Anlage aufgenommenen wurden, als auch in der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse fielen nahezu identische Peaks im Chromatogramm auf, wie sie auch bei den Extrakten von *Syzygium aromaticum* vorkamen. Im Zuge der massenspektrometrischen Analyse mit der LC–ESI–TOF–Anlage konnten zudem die gleichen

Molekülmassen von z.B. 678,5 Da, 791,6 Da und 904,7 Da festgestellt werden. Da es sich hierbei um das gleiche Problem handelte wie bei *Syzygium aromaticum*, soll an dieser Stelle auf das Kapitel 3.2.1.4, S.70 mit folgendem Unterkapitel 3.2.1.4.1, S.73 verwiesen werden. Ein eigentlicher DC-Nachweis erfolgte bei *Pimenta dioica* nicht mehr, da der Schnelltest einwandfrei funktionierte und die Proben bei beiden Pflanzen komplett ident hergestellt wurden. Deshalb war auch klar, dass die gleichen Verunreinigungen auch hier vorkommen müssen.

3.3.2 Biotransformation der Probe Pimdio(DM) mit Mäusekot

Wie bereits im einleitenden Kapitel 3.1, S.54 erläutert, ging dieser wissenschaftlichen Arbeit eine andere Diplomarbeit [7] voraus. Im Vordergrund stand die Erforschung der Metabolisierung von pflanzlichen Inhaltsstoffen durch die mikrobielle Flora, die im Darm angesiedelt ist. In Anlehnung an diese Arbeit erfolgte ein Vergleich der Bioaktivität und der Zusammensetzung von biotransformierten und nicht-biotransformierten Extrakten, die gewonnen wurden aus *Syzygium aromaticum*, *Pimenta dioica* und *Kaempferia galanga*. Der genaue Ablauf der Biotransformation bei *Syzygium aromaticum* kann im Kapitel 3.2.2, S.76 nachgelesen und für *Pimenta dioica* als gleich angesehen werden.

Die Aufgabe bestand in der Analyse der biotransformierten und nicht-biotransformierten Extrakte und in der Beantwortung der Frage, ob bei *Pimenta dioica* aktive Metaboliten entstünden und ob irgendwelche bedeutsamen Veränderungen festzustellen wären, genauso, wie bei *Syzygium aromaticum* (Kapitel 3.2, S.60). Dadurch erhoffte man sich eventuell chemische Verbindungen zu entdecken, die durch die Metabolisierung der Darmflora zu aktiven Stoffen werden und in Folge durch Zelltests an HEK293-Zellen zeigen, dass sie den TGR5-Rezeptor modulieren können. Jene zu untersuchenden Extrakte wurden freundlicherweise von Frau Mag. Nadina Faur zur Verfügung gestellt, bei *Pimenta dioica* handelte es sich um die Extrakte mit der Bezeichnung Pimdio_DM, Pimdio_EXTR_0h und Pimdio_EXTR_24h. Zur Erreichung des Ziels mussten die Extrakte aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert werden. Dafür verwendete man bei allen nun folgenden Chromatogrammen die LC-ESI-TOF-Anlage mit der Methodenoptimierung 2. Die entsprechenden Parameter können im Kapitel 2.2.5.4, S.33. nachgelesen werden.

Resultate

Die Abbildung 39, S.100 stellt im Negativionenmodus aufgenommene Basispeak-Chromatogramme (BPCe) dar, in denen in einem Retentionszeitfenster von 27–29 min die Peaks PD₁₄, ₁₉ und ₂₀ zu erkennen sind. Alle drei können im Zuge der Dereplikation (siehe Tabelle 28, S.95) und erfolgter Literaturrecherche keiner chemischen Struktur zugeordnet werden. Die Wahrscheinlichkeit liegt zudem nahe, dass es sich um Bestandteile des Mäusekotes handelte was deshalb bedeutungslos war.

PD₂₄, ₂₅, ₂₆ und ₂₈ (grün markiert) sind die Peaks, die eindeutig derepliziert werden konnten. Dabei handelte es sich aber um Fettsäuren, die bei der Modulation des TGR5–Rezeptors leider keine Rolle spielten. Um welche Fettsäuren es sich dabei handelt, zeigt Tabelle 28, S.95.

Abbildung 40, S.101 zeigt einen Vergleich der BPCe im Positivionenmodus. Hier können Peaks erkannt werden, die nur im Zuge der Behandlung mit Mäusekot auftraten (PD₁₃, ₁₇ und ₁₈). Um welche Verbindungen es sich dabei handelt, konnte im Zuge der Dereplikation und Literaturrecherche nicht festgestellt werden. Die grün markierten Peaks sind bereits bekannte Verbindungen in *Pimenta dioica* (siehe Tabelle 28, S.95).

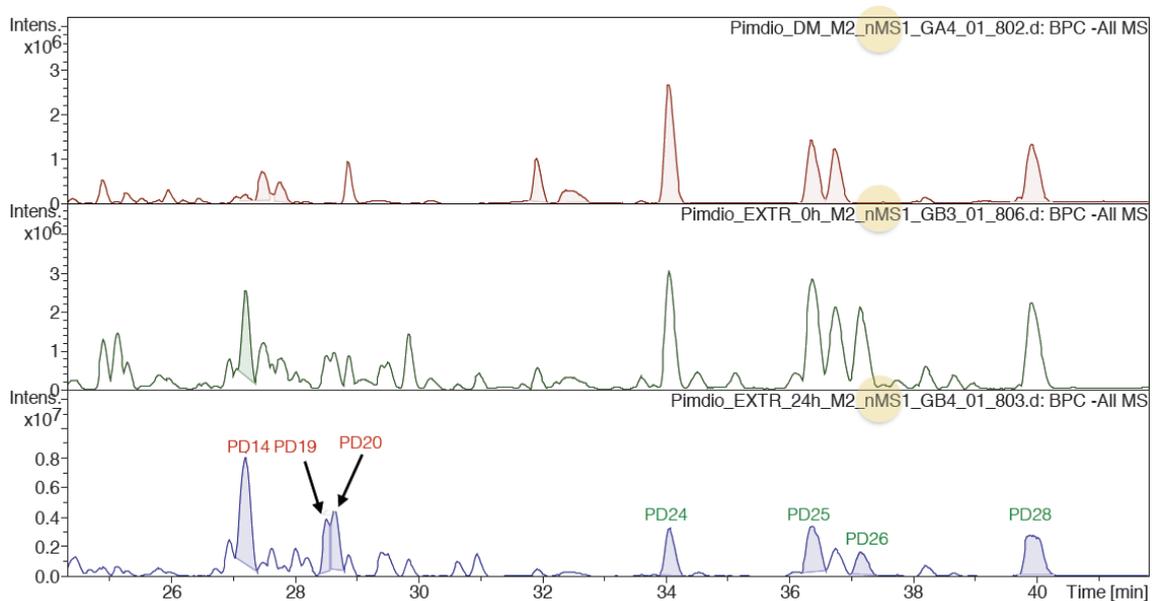


Abbildung 39 zeigt einen Vergleich der im Negativionenmodus aufgenommenen BPCe der unterschiedlich behandelten Extrakte von *Pimenta dioica*. Ganz oben befindet sich die genuine (Pimdio_DM), dann die nicht-biotransformierte (Pimdio_EXTR_0) und die biotransformierte Probe (Pimdio_EXTR_24h). Es traten unbedeutende Veränderungen auf, wie beispielsweise PD₁₄, ₁₉ und ₂₀. Bei diesen Peaks handelt es sich vermutlich um Komponenten des Mäusekots, die nicht derepliziert werden konnten. PD₂₄, ₂₅, ₂₆ und ₂₈ sind Fettsäuren und für die Modulation des TGR5–Rezeptors unbedeutend. Alle grün markierten Peaks sind derepliziert, während die roten unbekannte Verbindungen sind. Gerätschaft: LC–ESI–TOF–Anlage; Modus: negativ; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 2

Resultate

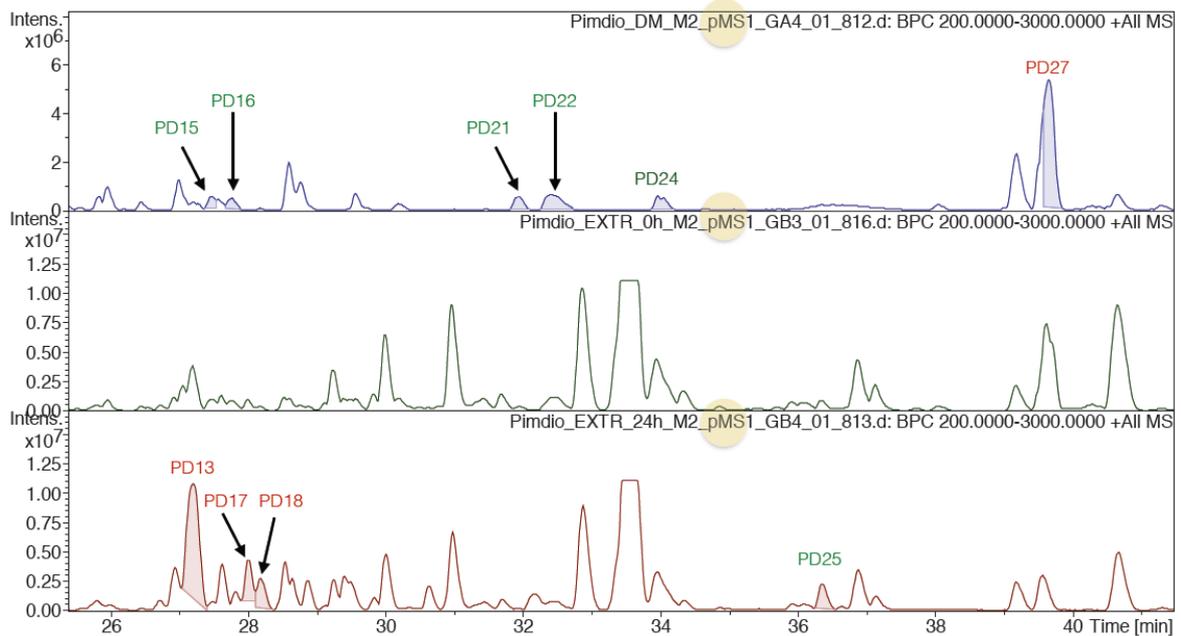


Abbildung 40 zeigt einen Vergleich der im Positionenmodus aufgenommenen BPCs der unterschiedlich behandelten Extrakte von *Pimenta dioica*. Ganz oben befindet sich die genuine (Pimdio_DM), dann die nicht-biotransformierte (Pimdio_EXTR_0) und die biotransformierte Probe (Pimdio_EXTR_24h). Alle grün markierten Peaks sind derepliziert, während die roten unbekannte Verbindungen sind. PD₁₃, PD₁₇ und PD₁₈ sind Peaks, die nur im Zuge der Inkubation mit nicht-sterilem Mäusekot auftraten. Diese konnten im Zuge der Dereplikation nicht aufgeklärt werden. Gerätschaft: LC-ESI-TOF-Anlage; Modus: positiv; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 2

Abbildung 41, S.102 ist spannend, weil das Ericifolin sowohl im genuine Extrakt (Pimdio_DM) als auch im mit sterilem Mäusekot (Pimdio_EXTR_0h) behandelten Extrakt unzerstört vorlag; nach der 24-Stunden Inkubation mit nicht-sterilem aufgeschwemmtem Mäusekot (Pimdio_EXTR_24h) jedoch verschwand. Die Vermutung lag nahe, dass die im Mäusekot enthaltenen Bakterien das Ericifolin verstoffwechselten und letzteres somit nicht mehr in der Probe enthalten war. Durch Literaturrecherchen konnte das Ericifolin nicht mit dem TGR5-Rezeptor in Verbindung gebracht werden.

Resultate

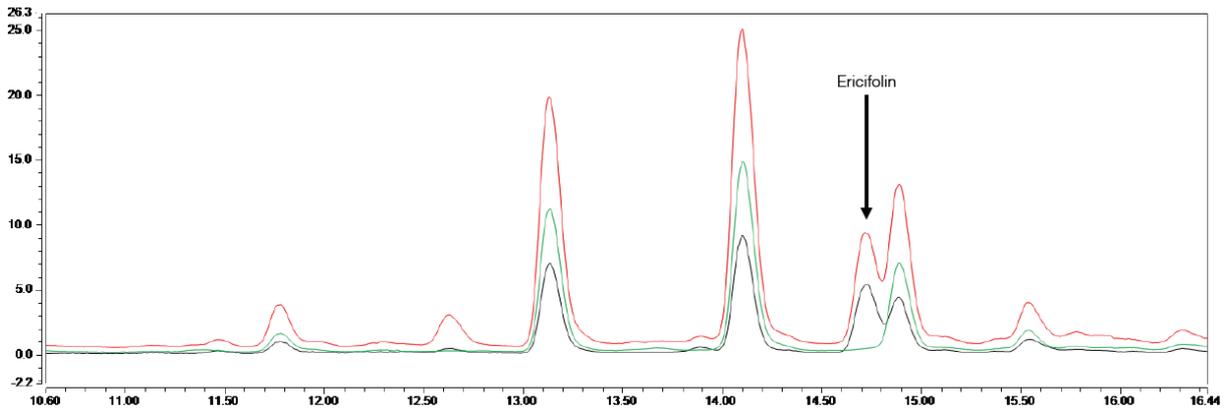


Abbildung 41 zeigt einen Ausschnitt der übereinandergelegten CAD-Chromatogramme der nicht-biotransformierten und der biotransformierten Proben. Die schwarze Linie zeigt die Probe Pimdio_DM in der genuinen Form. Die grüne Linie bezieht sich auf jenen Extrakt (Pimdio_EXTR_24h), der 24 Stunden mit nicht-sterilem, aufgeschwemmtem Mäusekot inkubiert wurde und die rote Linie zeigt jenen Extrakt (Pimdio_EXTR_0h), der mit sterilem Mäusekot behandelt wurde. Es trat fast keine Veränderung auf, bis auf jenen Bereich, der mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. Dabei handelt es sich um die Verbindung Ericifolin, welche bei der 24-Stunden-Inkubation mit Mäusekot jedoch verschwand. Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: DAD - CAD; Injektionsvolumen: 3µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 2

3.3.3 Quantifizierung der enthaltenen vier Triterpensäuren

Im Kapitel 3.3.1.1, S.88 wurde das gesamte Inhaltsstoffprofil der Probe Pimdio_DM gezeigt. Neben sehr hydrophilen Verbindungen, wie der Gallussäure, enthielt das Chromatogramm auch viele hydrophobe Substanzen, wie beispielsweise die Fettsäuren Ölsäure, Stearinsäure und Linolensäure. Für die Aktivierung des TGR5-Rezeptors waren jedoch andere Verbindungen verantwortlich. Diese Hypothese wurde infolge der genaueren Untersuchung von *Syzygium aromaticum* aufgestellt, bei der nicht die Fettsäuren, sondern die Triterpensäuren für die Wirkung verantwortlich waren. Im Extrakt, der aus den Früchten von *Pimenta dioica* erhalten wurde, wurden sogar vier verschiedene Triterpensäuren derepliziert, nämlich die Maslinsäure und Ursolsäure als Hauptkomponenten und die Oleanolsäure und die Corosolsäure in etwas geringeren Mengen. Ziel war es nun herauszufinden, ob die enthaltenen Mengen an Triterpensäuren mit der Wirkung des Extraktes korrelieren. Es standen für die Quantifizierung zwei Ausgangsextrakte zur Verfügung. Die chromatographische Analyse ergab, dass das Inhaltsstoffmuster der beiden Extrakte ident ist. Bei den Proben handelte es sich um

Resultate

PimdioDMp versus PimdioDMp_W_01. Die Quantifizierung der Triterpensäuren erfolgte letztlich in beiden Proben, um einen Mittelwert und folglich ein besseres Ergebnis zu erzielen. Durch Erstellen einer Eichgeraden konnte auf die Mengen an Triterpensäuren geschlossen werden. Die Analyse erfolgte mit der HPLC–DAD–CAD-Anlage unter Verwendung der Methodenoptimierung 4 (siehe Kapitel 2.2.5.4, S.33 für eingestellte Parameter). Im Kapitel 7.4, S.171 können die erhaltenen Eichgeraden der einzelnen Triterpensäuren mit den entsprechenden Ergebnissen und die dazugehörenden relativen Residuen-Plots nachgelesen werden. Die Tabelle 30, S.104 Tabelle 31, S.105 zeigt das Endergebnis der Quantifizierung der Proben PimdioDMp und PimdioDMp_W_01. Es wurden jeweils insgesamt vier Versuche durchgeführt und daraus der Mittelwert der gemessenen Mengen in $\mu\text{g}/\text{ml}$ gebildet. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Drogenmasse und der entsprechenden Reinheit der Referenzsubstanzen konnte die Menge in mg/g Extrakt berechnet werden. Die Tabelle 32, S.106 zeigt die Menge an Triterpensäure pro 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Extrakt.

Im Anschluss erfolgte die Umrechnung der Extraktkonzentration von $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf μM , da die durchgeführten Zelltestergebnisse sich auf diese Konzentrationsangabe bezogen.

Resultate

Tabelle 30 Ergebnis der Quantifizierung Teil 1: Es wurden jeweils vier Versuche durchgeführt, anhand derer die Mengen der Triterpensäuren Maslinsäure und Oleanolsäure in den Proben PimdioDMp und PimdioDMp_W_01 berechnet wurden. In der Tabelle 31, S.105 finden sich die beiden weiteren Triterpensäuren Corosolsäure und Ursolsäure.

Proben- bezeichnung	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert
	Menge	Menge	Menge	Menge	µg/ml
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	
	Maslin- säure	Maslinsäure	Maslinsäure	Maslin- säure	
CAD	CAD	CAD	CAD		
PimdioDMp	19,1366	18,8667	19,3424	21,1536	19,6248
PimdioDMp_W_01	17,4253	19,7820	18,4476	20,1560	18,9527
Proben- bezeichnung	Varianz	Standard- abweichung	Extrakt- konzentration	Menge (mg) pro g Extrakt	Menge (mg/g) inkl. Reinheit 92,15%
			mg/ml		
PimdioDMp	1,0767	1,0376	5,0000	3,9200	3,6123
PimdioDMp_W_01	1,5746	1,2548	6,0250	3,1540	2,9064
Proben- bezeichnung	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert
	Menge	Menge	Menge	Menge	µg/ml
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	
	Oleanol- säure	Oleanolsäure	Oleanolsäure	Oleanol- säure	
CAD	CAD	CAD	CAD		
PimdioDMp	11,7688	11,3379	11,8463	12,6043	11,8893
PimdioDMp_W_01	8,7141	8,7881	9,0283	9,6287	9,0398
Proben- bezeichnung	Varianz	Standard- abweichung	Extrakt- konzentration	Menge (mg) pro g Extrakt	Menge (g) inkl. Reinheit 98,40%
			mg/ml		
PimdioDMp	0,2772	0,5265	5,0000	2,3800	2,3419
PimdioDMp_W_01	0,1721	0,4149	6,0250	1,4940	1,4701

Resultate

Tabelle 31 Ergebnis der Quantifizierung Teil 2: Es wurden jeweils vier Versuche durchgeführt, anhand derer die Mengen der Triterpensäuren Corosolsäure und Ursolsäure in den Proben PimdioDMp und PimdioDMp_W_01 berechnet wurden. In der Tabelle 30, S.104 finden sich die beiden weiteren Triterpensäuren Oleanolsäure und Maslinsäure.

Proben- bezeichnung	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert
	Menge µg/ml Corosol- säure CAD	Menge µg/ml Corosolsäure CAD	Menge µg/ml Corosolsäure CAD	Menge µg/ml Corosolsäure CAD	Menge µg/ml Corosol- säure CAD
PimdioDMp	12,3612	12,2372	12,5438	12,9724	12,5287
PimdioDMp_W_01	12,0414	12,7435	12,5394	13,5147	12,7098
Proben- bezeichnung	Varianz	Standard- abweichung	Extrakt- konzentration mg/ml	Menge (mg) pro g Extrakt	Menge (mg/g) inkl. Reinheit 92,15%
PimdioDMp	0,1034	0,3215	5,0000	2,5000	2,3433
PimdioDMp_W_01	0,3749	0,6123	6,0250	2,1082	1,9760
Proben- bezeichnung	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert
	Menge µg/ml Ursolsäure CAD	Menge µg/ml Ursolsäure CAD	Menge µg/ml Ursolsäure CAD	Menge µg/ml Ursolsäure CAD	µg/ml
PimdioDMp	17,0151	17,1252	17,0731	18,4553	69,6687
PimdioDMp_W_01	14,9982	14,8984	15,4481	16,4666	61,8113
Proben- bezeichnung	Varianz	Standard- abweichung	Extrakt- konzentration mg/ml	Menge (mg) pro g Extrakt	Menge (mg/g) inkl. Reinheit 98,40%
PimdioDMp	0,4810	0,6935	5,0000	3,4800	3,4699
PimdioDMp_W_01	0,5139	0,7169	6,0250	2,5730	2,5655

Resultate

Tabelle 32 Ergebnis der Quantifizierung Teil 3: Es wurden jeweils vier Versuche durchgeführt, anhand derer die Mengen der Triterpensäuren Oleanolsäure, Maslinsäure, Corosolsäure und Ursolsäure in den Proben PimdioDMp und PimdioDMp_W_01 berechnet wurden.

Bezeichnung	Substanz	in 100 µg/ml Extrakt sind µg/ml	MG g/mol	µM
PimdioDMp	Oleanolsäure	0,234	456,71	0,513
	Maslinsäure	0,361	472,71	0,764
	Corosolsäure	0,234	472,71	0,496
	Ursolsäure	0,347	456,71	0,760
PimdioDMp_W_01	Oleanolsäure	0,147	456,71	0,322
	Maslinsäure	0,291	472,71	0,615
	Corosolsäure	0,198	472,71	0,418
	Ursolsäure	0,257	456,71	0,562
Bezeichnung	Substanz	bezogen auf 30 µg/ml µM	bezogen auf 10 µg/ml µM	
PimdioDMp	Oleanolsäure	0,154	0,051	
	Maslinsäure	0,229	0,076	
	Corosolsäure	0,149	0,050	
	Ursolsäure	0,228	0,076	
PimdioDMp_W_01	Oleanolsäure	0,097	0,032	
	Maslinsäure	0,184	0,061	
	Corosolsäure	0,125	0,042	
	Ursolsäure	0,169	0,056	

3.3.4 Bioaktivitätstest an HEK293–Zellen

Auch bei *Pimenta dioica* war die Zielsetzung herauszufinden, welche Inhaltsstoffe für die Aktivierung des TGR5-Rezeptors im Extrakt verantwortlich waren. Infolge der Dereplikation, mit der die Aufschlüsselung der Inhaltsstoffe gelang (siehe Kapitel 3.3.1, S.88), und anschließender Literaturrecherche konnten in dem Extrakt von *Pimenta dioica* sogar vier Triterpensäuren aufgefunden werden. Neben der Oleanolsäure und der Maslinsäure kamen auch noch zwei weitere vor, nämlich die Corosolsäure und die Ursolsäure. Da bei *Syzygium aromaticum* die Triterpensäuren für die Wirkung am TGR5-Rezeptor verantwortlich waren, wurde der Fokus klarerweise erneut auf diese gelegt. Ziel der Arbeit war es ja herauszufinden, welche Komponenten in *Pimenta dioica* für die TGR5-Aktivierung wichtig waren. Daher musste zunächst eine Quantifizierung, wie im Kapitel 3.3.3, S.102 beschrieben, durchgeführt werden, um die Menge an enthaltenen Triterpensäuren genau feststellen zu können. Mit diesem Wissen ausgestattet, konnten nun die Testproben für die Transaktivierungsassays hergestellt werden. Neben dem eigentlichen Extrakt von *Pimenta dioica*, testete man auch die einzelnen Triterpensäuren und eine rekonstituierte Mischung daraus – d.h. eine Mischung der vier Triterpensäuren in dem gleichen Verhältnis und der gleichen Konzentration, in der sie in den getesteten Extraktproben vorlagen – an HEK293-Zellen. Die einzeln getesteten Triterpensäuren wurden präzise an der Analysenwaage jeweils in ein Eppendorf–Gefäß in kristallinem Zustand eingewogen, während die rekonstituierten Mischungen mit Hilfe einer geeichten Kolbenhubpipette aus den für die Quantifizierung benutzten Standardlösungen zusammenpipettiert wurde. Hierauf erfolgte, wie bei *Syzygium aromaticum*, die Übergabe an Frau Dr. Angela Ladurner am Department für Pharmakognosie, die im Anschluss die Zelltests für diese wissenschaftliche Arbeit durchführte. Alle Informationen, die in den folgenden Abbildungen und Tabellen enthalten sind, wurden dankenswerterweise zur Vervollständigung dieser Diplomarbeit entsprechend zur Verfügung gestellt und adaptiert.

Die Messungen der Proben geschahen in vier verschiedenen Konzentrationsstufen (100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml und 3 µg/ml Extrakt bzw. entsprechend rekonstituierte Triterpensäure-Mischung). Damit versuchte man die Wirkung bei unterschiedlichen Konzentrationen (Dosis-Wirkungs-Beziehung) festzustellen. Das Arbeitsprotokoll der Tests kann im Kapitel 2.2.11, S.50 genau nachgelesen werden. In den Abbildungen stellt die y–Achse die

Resultate

TGR5-Aktivierung dar, während auf der x-Achse die verschiedenen Proben in den unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen sind. Alle Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen (n=3) erhalten und gemittelt. Die abgebildeten Balken zeigen zudem auch die Standardabweichung.

Die Abbildung 42, S.110 zeigt das Ergebnis, welches bei den Transaktivierungsassays mit den HEK293-Zellen erhalten wurde. Es kann auf der linken Seite der Abbildung sehr gut erkannt werden, dass eine schön dosisabhängige Wirkung des Extraktes vorliegt. Diese ist am größten bei einer Konzentration von 100 µg/ml und nimmt im Anschluss durch Reduktion der Konzentration auf 30 µg/ml, 10 µg/ml bis 3 µg/ml kontinuierlich ab. Im Anschluss folgen die Ergebnisse der rekonstituierten Triterpensäure-Mischung, getestet bei entsprechenden Konzentrationen. 100 µg/ml Pimdio-Mischung beinhaltetete 0,322 µM Oleanolsäure, 0,615 µM Maslinsäure, 0,418 µM Corosolsäure und 0,562 µM Ursolsäure. Im Resultat ist ein leichter Unterschied zur Originalprobe bei der Testkonzentration 100 µg/ml zu erkennen. Die Mischung ist in der Lage, den TGR5-Rezeptor 4,27-Fach zu aktivieren und ist dabei etwas schwächer als das Extrakt mit einer 5,23-fachen TGR5-Aktivierung. Dadurch ergibt sich eine Differenz von 0,96 zwischen diesen beiden Testproben. Dieser Unterschied ist aber sehr gering und statistisch nicht signifikant, weshalb er auch vernachlässigt werden kann.

Alle erhaltenen Testdaten für *Pimenta dioica* können für die Konzentrationen 100 µg/ml der Tabelle 33, S.111 und für 30 µg/ml der Tabelle 34, S.111 entnommen werden.

Im Zuge der Analysen wurden auch die einzelnen Triterpensäuren entsprechend dem Gehalt in den zuvor erwähnten Extrakt-Konzentrationen (100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml und 3 µg/ml) gemessen. Die Einwaage in die Eppendorf-Gefäße orientierte sich dabei exakt an der im Extrakt vorkommenden Menge, um so das Resultat mit der Mischung vergleichen zu können. Mit bestem Wissen und Gewissen, präzise und genau erfolgte die Herstellung der Testproben. Das Ergebnis ergab für die Oleanolsäure eine 1,42-fache, für die Maslinsäure eine 1,49-fache, für die Corosolsäure eine 1,25-fache und für die Ursolsäure eine 2,92-fache TGR5-Aktivierung. Die Ursolsäure ist bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml also vorrangig für die TGR5-Aktivierung verantwortlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, wie auch bei *Syzygium aromaticum*, die Wirkung durch die Triterpensäuren ausgelöst wird.

Resultate

Im Zuge dieser umfangreichen Analysen wurde auch noch der EC₅₀-Wert von jeder Triterpensäure festgestellt. Dabei stellte sich heraus, dass die Oleanolsäure einen EC₅₀-Wert von 2,2 µM, die Maslinsäure von 3,1 µM, die Corosolsäure von 0,5 µM und die Ursolsäure von 1,1 µM hatte; weitere Daten bezüglich der maximalen TGR5-Aktivierung und der Modulation bei 10 µM stehen in der Tabelle 44, S.187. Es wurden auch Messungen mit Positivkontrollen vorgenommen. Dabei handelte es sich um die CDCA (Chenodesoxycholsäure) - sie konnte eine FXR-Aktivierung bei 10 µM um das 2,34-fache hervorrufen - und andererseits um die LCA (Lithocholsäure), der im Zuge dieser Diplomarbeit eine größere Bedeutung zugesprochen wurde, da sie die stärker wirksame Positivkontrolle für den TGR5-Rezeptor darstellt.

Interessant erscheinen auch die maximalen Werte der TGR5-Aktivierung, die mit den verschiedenen Triterpensäuren erreicht werden konnten. Die maximale Modulation durch die Oleanolsäure lag mit 16,8-fach deutlich höher als die der Maslinsäure (7,8-fach). Die Corosolsäure schob mit 3,6-facher Aktivierung die Ursolsäure (3,4-fach) an die letzte Position der maximalen TGR5-Aktivierung. Bei den Positivkontrollen befand sich die LCA (36,4-fach) vor der CDCA (11,6-fach).

Ein weiterer wichtiger Punkt der erwähnt werden soll, ist in den Abbildung 43, S.112 und Abbildung 44, S.113 dargestellt. Im November 2015 erfolgte im Zuge der vorangegangenen Diplomarbeit [7] von Mag. Nadina Faur ein Transaktivierungsassay mit der Probe PimdioDMP_W_01. In diesem Test zeigte sich bei keiner Extraktkonzentration eine Zellschädigung. Bei der neuerlichen Testung, mit der Probe Pimdio_DM, konnte ebenso keine Zelltoxizität sowohl bei einer Konzentration von 100 µg/ml als auch bei 30 µg/ml festgestellt werden. Die Probe wurde nach dem gleichen Herstellungsverfahren, wie im Kapitel 2.2.1, S.23 dargestellt, produziert. Festzuhalten ist, dass bei allen getesteten Konzentrationen keine Zellschädigung vorlag (Abbildung 43, S.112 als auch in der Abbildung 44, S.113).

Ziel war es, wirksame Verbindungen auf den TGR5-Rezeptor zu finden, die sich möglichst nicht zellschädigend auswirken.

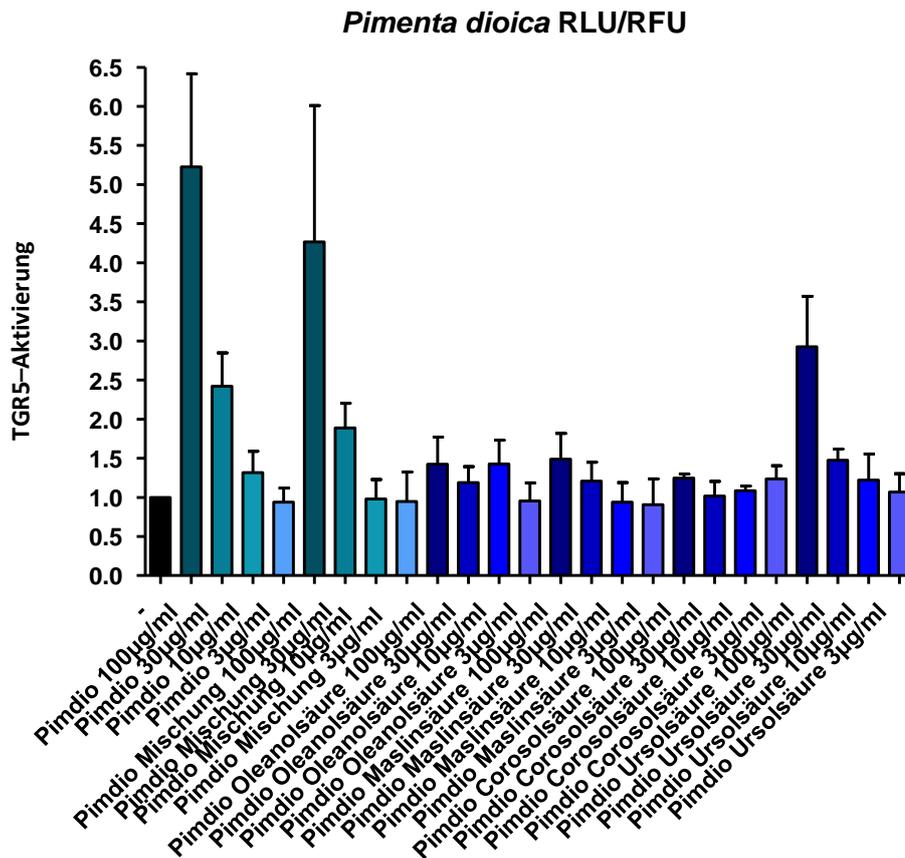


Abbildung 42 zeigt die **TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen**. Dabei wurden die nicht-biotransformierte Probe, die einzelnen Triterpensäuren und die rekonstituierte Mischung an Triterpensäuren an HEK293-Zellen gemessen. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3) und dabei die Probe Pimdio_DM verwendet. Bei RFU handelt es sich um den normierten Fluoreszenz-Wert und bei RLU um den normierten Lumineszenz-Wert. Auf der y-Achse geben daher die Werte RLU/RFU die gemessene Lumineszenz, als Indikator der TGR5-Aktivität, normiert auf den Fluoreszenz-Wert, der uns als Kontrolle der Transfektion und zum Nachweis der Viabilität dient, an. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Proben. Im linken Teil der Abbildung ist eine sehr schöne dosisabhängige Wirkung des Extraktes ersichtlich, während die rekonstituierte Mischung der Triterpensäuren eine Spur geringer wirksam ist. Im Anschluss folgen die getesteten einzelnen Triterpensäuren; zuerst die Oleanolsäure, dann die Maslinsäure, Corosolsäure und zuletzt die Ursolsäure. Mittelwert +/- Standardabweichung

Resultate

Tabelle 33 gibt die **Testergebnisse zu den Triterpensäuren bei einer Extrakt-Konzentration von 100 µg/ml wieder**. Der Test wurde an HEK293-Zellen durchgeführt. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3) und dabei die Probe Pimdio_DM als Extrakt verwendet.

Substanz	TGR5-Aktivierung bei 100 µg/ml	entspricht in [µM]
Extrakt	5,23	-
Mischung	4,27	-
Oleanolsäure	1,42	0,322
Maslinsäure	1,49	0,616
Corosolsäure	1,25	0,419
Ursolsäure	2,92	0,563

Tabelle 34 gibt die **Testergebnisse zu den Triterpensäuren bei einer Extrakt-Konzentration von 30 µg/ml wieder**. Der Test wurde an HEK293-Zellen durchgeführt. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3) und dabei die Probe Pimdio_DM als Extrakt verwendet.

Substanz	TGR5-Aktivierung bei 30 µg/ml	entspricht in [µM]
Extrakt	2,42	-
Mischung	1,89	-
Oleanolsäure	1,19	0,097
Maslinsäure	1,21	0,185
Corosolsäure	1,02	0,126
Ursolsäure	1,47	0,169

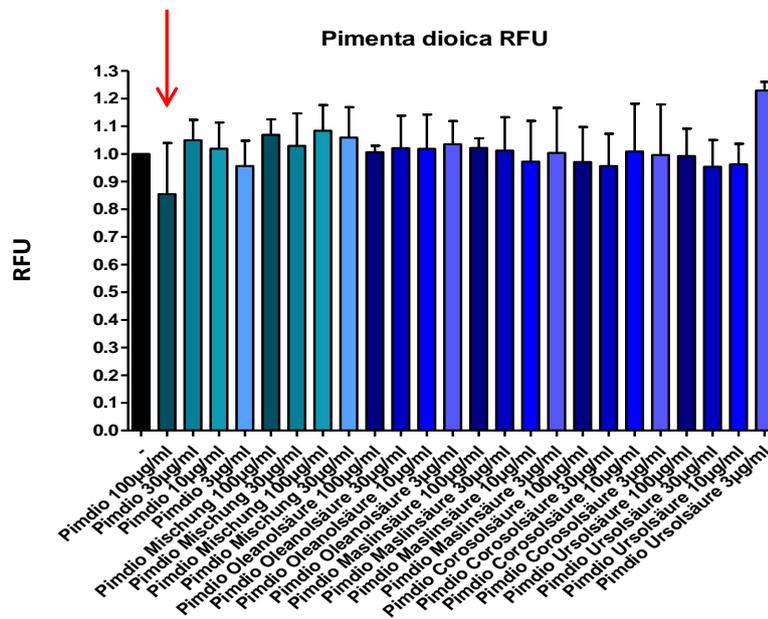
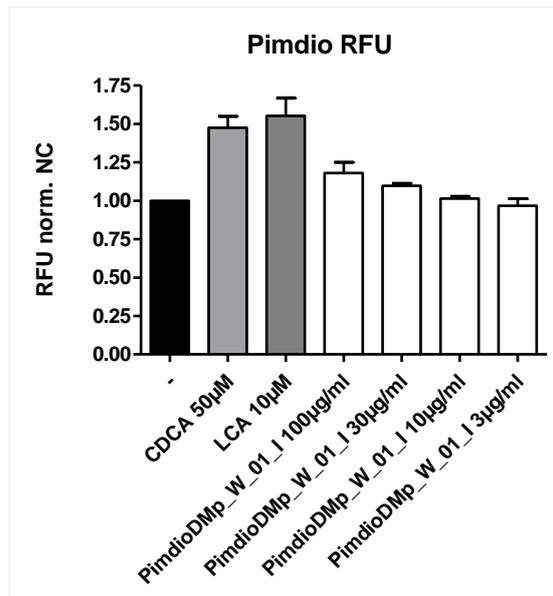


Abbildung 43 zeigt die Zellviabilitätsmessung bei unterschiedlichen Konzentrationen im Mai 2016-Versuch. Dabei wurde die nicht-biotransformierte Probe Pimdio_DM, die einzelnen Triterpensäuren und die rekonstituierte Mischung an Triterpensäuren an HEK293-Zellen gemessen. Bei RFU handelt es sich um den Fluoreszenz-Wert. Der schwarze Balken zeigt die nur mit Vehikel-Kontrolle behandelten Zellen, während die anderen Balken die jeweilige Beschriftung widerspiegeln. Es zeigte sich, dass bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml eine leichte, allerdings nicht signifikante Abnahme zu sehen war (mit einem roten Pfeil markiert), während bei allen anderen Konzentrationen und getesteten Substanzen keine Zellschädigung eintrat. Dieses Ergebnis korreliert nicht ganz mit dem Ergebnis, welches einige Monate zuvor im Zuge einer vorangegangenen Diplomarbeit festgestellt wurde [7]. Dort trat bei keiner Konzentration eine Zellschädigung ein (siehe Abbildung 44, S.113). Die x-Achse zeigt die verschiedenen Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen, während die y-Achse die relativen Fluoreszenz-Werte, die ein Mass für die Expression des EGFP³⁹ ist, darstellt. Mittelwert +/- Standardabweichung; n=3; verwendete Probe Pimdio_W_01

³⁹ EGFP = verbessertes grün fluoreszierendes Protein

Resultate

Abbildung 44 demonstriert die **nicht vorhandene Zelltoxizität** im November 2015-Versuch an HEK293-Zellen. Bei RFU handelt es sich um den Fluoreszenz-Wert. Der schwarze Balken zeigt die nur mit Vehikel-Kontrolle behandelten Zellen, die grauen Balken die Positivkontrollen und die weißen Balken den Extrakt in den angegebenen Konzentrationen. Es zeigte sich, dass bei keiner Extraktkonzentration eine Zelltoxizität vorlag. Dieses Ergebnis ist anders, als im Mai 2016-Versuch. Dort trat bei der Extraktkonzentration 100 µg/ml eine kleine Zellschädigung ein (siehe Abbildung 43, S.112). Die x-Achse zeigt die Bezeichnung mit entsprechenden Konzentrationen, während die y-Achse die relativen Fluoreszenz-Werte, die ein Mass für die Expression des EGFP sind, darstellt. Mittelwert +/- Standardabweichung; n=3; verwendete Probe PimdioDMp_W_01



Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wirkung von *Pimenta dioica* auf den TGR5-Rezeptor aufgrund der enthaltenen Triterpensäuren (Oleanolsäure, Maslinsäure, Corosolsäure und Ursolsäure) erklärt werden kann. In den Zelltests zeigte sich zudem, dass der Extrakt merklich besser wirkte, als die reine Triterpensäure-Mischung. Der Unterschied war jedoch eher gering und im Bereich der experimentellen Unsicherheit, sodass er vernachlässigt werden kann. Die Durchführung der Tests erfolgte an natürlichen Zellsystemen. In solchen Systemen sind Schwankungen im Ergebnis ganz normal, was auch den Unterschied erklärbar macht.

3.4 *Kaempferia galanga*

Im nun folgenden Teil wird die letzte Pflanze abgearbeitet, die im Zuge dieser Diplomarbeit auf Ihre Wirksamkeit auf den TGR5–Rezeptor untersucht wurde. Wie im Kapitel 3.1, S.54 bereits näher erläutert, wurden infolge einer vorangegangenen Diplomarbeit drei Pflanzenextrakte übernommen und mit diesen weitergearbeitet. In dieser Arbeit untersuchte man den Einfluss des Darmmilieus auf oral eingenommene pflanzliche Stoffe. Verschiedene Extrakte wurden dabei von unterschiedlichsten Pflanzen hergestellt und in einer 24–Stunden Inkubation mit aufgeschwemmtem sterilem und nicht-sterilem Mäusekot behandelt. In einem Transaktivierungsassay mit HEK293–Zellen testete man anschließend die Bioaktivitäten der Extrakte. Dabei spielten der TGR5– und der FXR–Rezeptor eine jeweils essentielle Rolle, wobei sich diese Diplomarbeit auf den TGR5–Rezeptor beschränkt. Die im Kapitel 3.2, S.60 beschriebene Pflanze *Syzygium aromaticum* war von allen dreien jene, die bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine besonders gute Bioaktivität aufwies. *Pimenta dioica* (Kapitel 3.3, S.88) zeigte eine geringere, aber deutlich vorhandene Modulierung des TGR5–Rezeptors. *Kaempferia galanga* hatte von allen die geringste Aktivierung (siehe den Bioaktivitätsvergleich der genannten Pflanzen im Kapitel 3.1, S.54). Genauso wie bei den zuvor erwähnten Pflanzen sollten auch hier die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe aufgedeckt werden.

3.4.1 Dereplikation der Inhaltsstoffe

Wie bei *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica* war es auch bei *Kaempferia galanga* notwendig, zunächst das Inhaltsstoffprofil aufzuschlüsseln. Bei der Dereplikation handelt es sich um einen zentralen Baustein in der Wirkstofffindung eines Extraktes. Der genaue Ablauf der Dereplikation kann im Kapitel 3.2.1, S.60 nachgelesen werden.

3.4.1.1 HPLC-DAD-CAD-Analyse des Extraktes

Zu Beginn musste auch bei *Kaempferia galanga* eine Methodenoptimierung durchgeführt werden, um anschließend die Probe KaegalRDMp mit der LC-ESI-TOF-Anlage analysieren zu können. Die Optimierung erfolgte mit der HPLC-DAD-CAD-Anlage, wobei modifizierte Geräteeinstellungen Anwendung fanden. Die Auftrennung erfolgte mit der Methodenoptimierung 1, welche durch Variation der Fließmittelzusammensetzung erreicht wurde. Die gewählte Gradientenelution sah einen Anstieg der mobilen Phase (A: 0,1% wässrige Ameisensäure / B: Acetonitril) von zunächst 5% Acetonitril auf 95% Acetonitril mit einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 ml/min und einer Säulenofentemperatur von 25 °C vor. Der HPLC-Lauf benötigte insgesamt 66 min, dabei kam auch wieder eine C₁₈-Umkehrphasenchromatographie zum Einsatz. Die korrekt gewählten Geräteeinstellungen sowie genauere Detailinformationen können dem Kapitel 2.2.5.4, S.33 entnommen werden; verwendet wurde hierbei die „Methodenoptimierung 1“.

Damit die Dereplikation positiv abgeschlossen werden kann, erfolgte im Anschluss die Bestimmung der exakten Massen der getrennten Hauptkomponenten des Extrakts. Die Auswahl der Peaks lag auch wie bei *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica* zunächst auf jenen, die eine gewisse Intensität aufwiesen; der „Rasen“ war daher unbedeutend. Allerdings war es bei *Kaempferia galanga* nicht so einfach bei der Auswahl als bei den vorherigen Pflanzen, da keine eindeutigen Peaks hervorstachen; KG₁₅ hatte die höchste Intensität laut den DAD-Daten, konnte aber aufgrund der Flüchtigkeit mit dem CAD-Detektor nicht gefunden werden. Deshalb waren bei den experimentellen Analysen im Zuge dieser Arbeit sowohl der DAD als auch der CAD häufig gekoppelt. So war es möglich, Verbindungen, die mit dem einen nicht sichtbar waren, mit dem anderen zu detektieren.

Die Abbildung 45, S.116 bzw. Abbildung 46, S.116 zeigen sehr große Peaks, die vermutlich wieder Nylon-6-Derivate sind. Für die genaue Massenbestimmung kam wieder die LC-ESI-TOF-Anlage zum Einsatz, mit der die Massen der einzelnen aufgetrennten Komponenten bestimmt werden sollten. Dadurch erhoffte man sich auch jene Komponente(n) zu finden, die für die Aktivierung des TGR5-Rezeptors verantwortlich ist/sind; folgendes Unterkapitel spezialisiert sich auf die Massenbestimmung.

Resultate

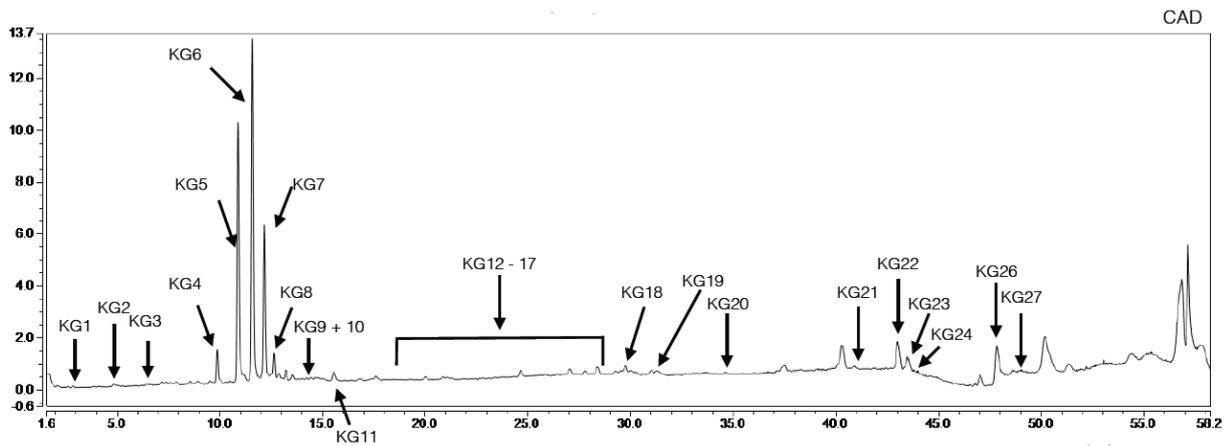


Abbildung 45 zeigt das **gesamte Inhaltsstoffprofil der Probe Kaegal_DM**, welches mittels HPLC-CAD aufgenommen wurde. Gradient: 5-95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 2 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 1

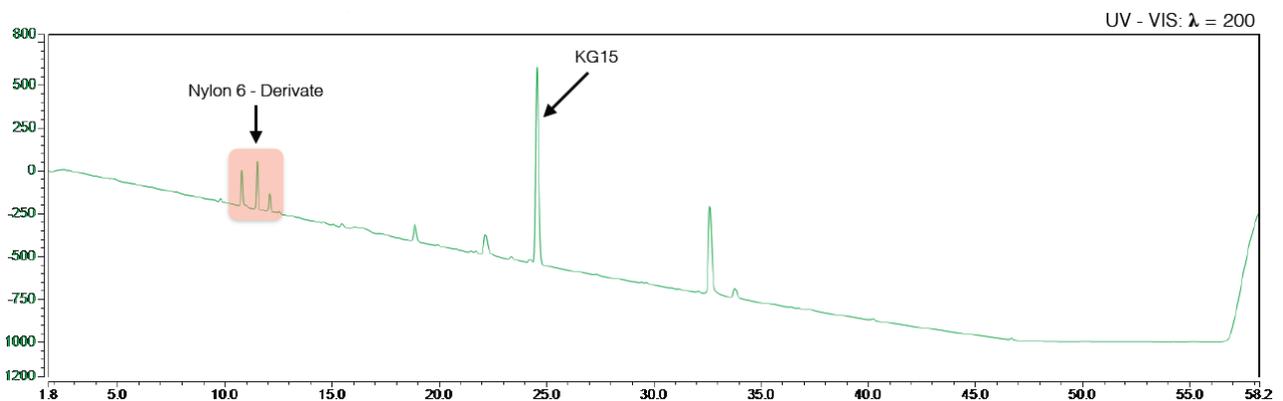


Abbildung 46 zeigt das **gesamte Inhaltsstoffprofil der Probe Kaegal_DM**, welches mittels HPLC-DAD aufgenommen wurde; mit roter Farbe hinterlegt die Nylon-6-Derivate; Gradient: 5-95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: DAD; Injektionsvolumen: 2 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 1, UV-VIS 200 nm

3.4.1.2 LC-ESI-TOF-Analyse des Extraktes

Wie auch bei den zuvor abgehandelten Pflanzen kam es auch hier zur massenspektrometrischen Analyse sowohl der biotransformierten als auch der nicht-biotransformierten Proben; mit dem selben Ziel, herauszufinden, welche Verbindungen in diesen Extrakten enthalten sind. Zur Analyse wurden nun exakt die gleichen Systemeinstellungen der LC-ESI-TOF-Anlage gewählt, die auch für die Methodenoptimierung Anwendung fanden (siehe Kapitel 2.2.5.4, S.33 unter Methodenoptimierung 1); die erzielte Messgenauigkeit lag bei < 10 ppm. Es wurde jeweils ein Volumen von 2 μ l des Extraktes automatisch injiziert, danach erfolgte die chromatographische Trennung. Im Anschluss wurden die getrennten Verbindungen mittels Elektrospray ionisiert und in einem Reflektor-Flugzeitmassenspektrometer analysiert. Detailinformationen über den Geräteaufbau und die Funktionsweise können dem Kapitel 2.2.6, S.40 entnommen werden. Um eventuelle Verunreinigungen ausschließen beziehungsweise in der anschließenden Beurteilung berücksichtigen zu können, wurde, wie auch bei den anderen Proben, zunächst obligatorisch reiner Methanol als Leerprobe injiziert.

Die zu analysierenden Proben von *Kaempferia galanga* wurden als Kaegal_DM, KaegalEXTR0 und KaegalEXTR24 bezeichnet. Die chromatographischen Vergleiche zwischen der Originalprobe und den mit aufgeschwemmtem Mäusekot behandelten Proben, werden im Kapitel 3.4.2, S.125 näher beleuchtet. Die Konzentrationen der Extrakte in den HPLC-Fläschchen betragen in etwa 3-4 mg/ml, gelöst in 1 ml Methanol. Die Vermessung erfolgte auch hier mit der LC-ESI-TOF-Anlage sowohl im Positiv- als auch im Negativionenmodus.

Der Ablauf ist nahezu identisch wie bei *Syzygium aromaticum*, daher soll an dieser Stelle auf das Kapitel 3.2.1.2, S.63 verwiesen werden. Alle massenspektrometrischen Analysen wurden von Herrn Dr. Martin Zehl durchgeführt.

Aufgrund der präzisen Messergebnisse der LC-ESI-TOF-Anlage können Molekülmassen genau bestimmt werden, auch mögliche Summenformeln werden vorgeschlagen, die mit der detektierten Masse und dem Isotopenmuster in Korrelation stehen. Jeder einzelne Peak wurde dabei herangezogen, die entsprechenden Summenformeln in den Abbildungen dargestellt. In Abbildung 47, S.120 kann beispielsweise im Massenspektrum ein m/z -Verhältnis von 177,0552 und im Chromatogramm eine Retentionszeit von 15,6 min abgelesen werden. Da die Aufnahme im Negativionenmodus erfolgte und die Verbindung als $[M-H]^-$ erschien, musste noch ein

Resultate

Wasserstoffproton zugezählt werden, um auf die tatsächliche Molekülmasse von 178,1 Da zu kommen. Die Summenformel, die für diese Verbindung vorgeschlagen wurde, lautete $C_{10}H_{10}O_3$; dabei sollte es sich um die 4-Methoxyzimtsäure handeln. Die Abbildung aller Ergebnisse des negativen Modus' mit den Daten des positiven Modus' ist in Tabelle 35, S.122 und Tabelle 36, S.123 ersichtlich. Der anschließende Abgleich mit der chemischen Datenbank „SciFinder“ erlaubte die Identifizierung einiger bekannter Inhaltsstoffe aus *Kaempferia galanga*. Es wurde genauso vorgegangen wie bei den anderen beiden Pflanzen (*Syzygium aromaticum* – Kapitel 3.2, S.60 - und *Pimenta dioica* – Kapitel 3.3, S.88).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit lautete die Zielsetzung, jene Inhaltsstoffe zu entdecken, die in der Lage waren, den TGR5-Rezeptor an HEK293-Zellen zu stimulieren. Eine positive Modulation konnte aus den vorangegangenen Bioaktivitätstests bereits nachgewiesen werden (unter Kapitel 3.1, S.54). Nun galt es herauszufinden, welche chemischen Verbindungen dafür in Frage kommen könnten. Deshalb erfolgte zuerst ein Literaturabgleich, um Publikationen zu finden, die über eine Aktivierung des TGR5-Rezeptors mit Verbindungen aus *Kaempferia galanga* berichten würden; dies war allerdings nicht erfolgreich. Bei *Pimenta dioica* und *Syzygium aromaticum* konnte sofort über Publikationen festgestellt werden, welche Stoffgruppe für die positive Modulation verantwortlich war, bei *Kaempferia galanga* tappte man jedoch im Dunklen. Daher wurde der neu hergestellte Originalextrakt (Kaegal_DM) einer Fraktionierung unterzogen, um letztlich die einzelnen Fraktionen an HEK293-Zellen testen zu können. Diese Vorgehensweise sollte Aufschluss geben, welche Fraktion wirksam ist, um dadurch eine Eingrenzung zu erreichen. Kapitel 3.4.3, S.130 beschäftigt sich mit der Fraktionierung des Extraktes.

Die dargestellten Massenspektren in Abbildung 47, S.120 und Abbildung 48, S.121 zeigen zwei verschiedene Zimtsäure-Derivate, wobei die Ethyl-p-Hydroxyzimtsäure die Hauptkomponente im ätherischen Öl war (siehe Kapitel 3.4.4.1, S.143). Die gezeigten Tabellen (siehe Tabelle 35, S.122 und Tabelle 36, S.123) schlüsseln jeden einzelnen Peak nach entsprechender Retentionszeit, Masse zu Ladungsverhältnis im positiven und negativen Modus, Summenformel und Molekulgewicht in Dalton (Da) auf. Auch die vorhergesagte Struktur wird angegeben. Grün hinterlegte Komponenten wurden nicht derepliziert und hautfarbige Markierung deutet auf flüchtige Verbindungen hin. Im Allgemeinen waren in *Kaempferia*

Resultate

galanga sehr viele verschiedene Zimtsäure-Derivate enthalten; auch flüchtige Verbindungen entschlüsselte man mit der GC-MS in Folge weiterer Untersuchungen. Die in den Extrakten von *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica* enthaltenen Triterpensäuren kamen in dem Extrakt von *Kaempferia galanga* nicht vor, wodurch die Wirkung auf den TGR5-Rezeptor bis zu dem Zeitpunkt nicht geklärt werden konnte. Die Nylon-Derivate (KG₄₋₈=Nylon-6-Derivate) in einem Zeitbereich von 9,9 bis 12,7 min werden im Kapitel 3.4.1.2.2, S.124 näher besprochen. Das gesamte beschriftete Chromatogramm, sowohl unter Verwendung des DAD als auch des CAD aufgenommen, ist in der Abbildung 45, S.116 und Abbildung 46, S.116 dargestellt.

Resultate

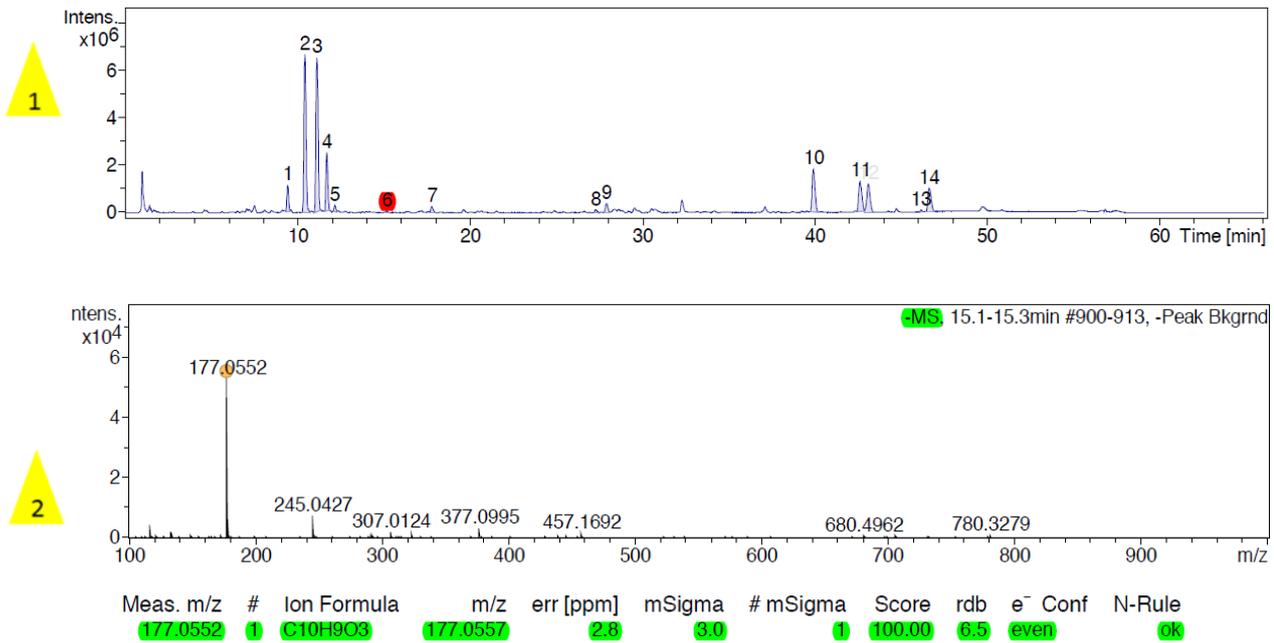


Abbildung 47 zeigt das Massenspektrum der 4-Methoxyzimtsäure, die in der Probe Kaegal_DM enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit der LC-ESI-TOF-Anlage aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers der Probe Kaegal_DM. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der 4-Methoxyzimtsäure wieder. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 15,1-15,3 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die 4-Methoxyzimtsäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 15,2 min und wurde vor allem als $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 177,0552 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm nur eine Summenformel vor ($C_{10}H_9O_3$). Um auf die Summenformel der 4-Methoxyzimtsäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden; folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_{10}H_{10}O_3$.

Resultate

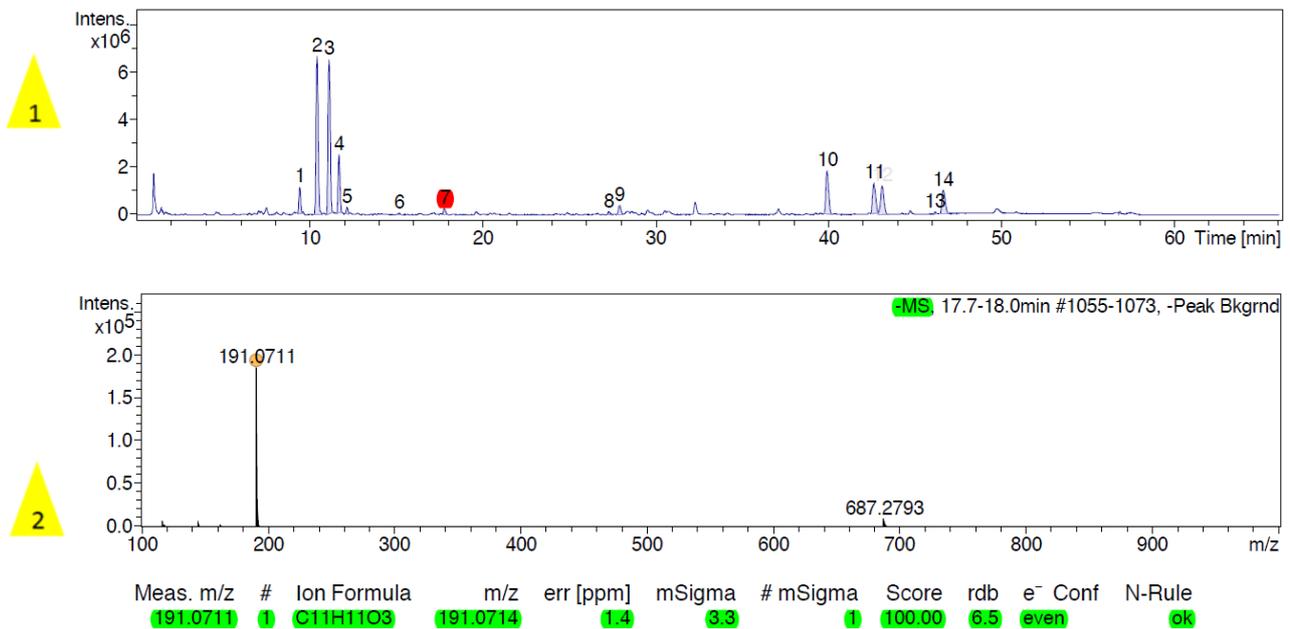


Abbildung 48 zeigt das **Massenspektrum der Ethyl-p-Hydroxyzimtsäure**, die in der Probe Kaegal_DM enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit der LC-ESI-TOF-Anlage aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers der Probe Kaegal_DM. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der Ethyl-p-Hydroxyzimtsäure wieder. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 17,7-18,0 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die Ethyl-p-Hydroxyzimtsäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 17,8 min und wurde vor allem als $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 191,0711 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm nur eine Summenformel vor ($C_{11}H_{11}O_3$). Um auf die Summenformel der Ethyl-p-Hydroxyzimtsäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden; folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_{11}H_{12}O_3$.

Resultate

Tabelle 35 Inhaltsstoffprofil der Probe Kaegal_DM Teil 1; Analyse der Massen erfolgte mit der LC–ESI–TOF–Anlage; grün hinterlegte Verbindungen wurden nicht derepliziert; hautfarbig markierte Balken entsprechen flüchtigen Komponenten; n. d. = nicht detektiert

Peak	RT [min]	m/z Pos	m/z Neg	Summenformel	MW [Da]	vorhergesagte Struktur
KG ₁	2,9	n. d.	164,0718	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,1	-
KG ₂	5,0	188,0718	n. d.	C ₁₁ H ₉ NO ₂	187,1	-
KG ₃	6,0	n. d.	137,0244	C ₇ H ₆ O ₃	138,0	-
KG ₄	9,9	566,4310	610,4193	C ₃₀ H ₅₅ N ₅ O ₅	565,4	Nylon-6 - Derivat (n=5)
KG ₅	10,9	679,5151	723,5030	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	678,5	Nylon-6 - Derivat (n=6)
KG ₆	11,6	792,5991	836,5869	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	791,6	Nylon-6 - Derivat (n=7)
KG ₇	12,2	905,6836	949,6706	C ₄₈ H ₈₈ N ₈ O ₈	904,7	Nylon-6 - Derivat (n=8)
KG ₈	12,7	1018,7674	1062,7538	C ₅₄ H ₉₉ N ₉ O ₉	1017,7	Nylon-6 - Derivat (n=9)
KG ₉	14,5	n. d.	149,0609	C ₉ H ₁₀ O ₂	150,1	-
KG ₁₀	14,6	n. d.	179,0717	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180,1	-
KG ₁₁	15,6	179,0716	177,0562	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178,1	4-Methoxyzimtsäure
KG ₁₂	18,3	n. d.	191,0711	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	192,1	Ethyl-p-Hydroxyzimtsäure
KG ₁₃	21,8	237,1144	n. d.	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	236,1	2-Propenoic acid, 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-, ethyl ester, (2E)-
KG ₁₄	23,6	207,1035	n. d.	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	206,1	Propyl-p-Hydroxyzimtsäure
KG ₁₅	25,0	207,1036	n. d.	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	206,1	Ethyl-p-Methoxyzimtsäure
KG ₁₆	27,5	231,1400	n. d.	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	230,1	-
KG ₁₇	27,6	221,1189	n. d.	C ₁₃ H ₁₆ O ₃	220,1	Butyl-p-Hydroxyzimtsäure oder Propyl-p-Methoxyzimtsäure
KG ₁₈	27,8	n. d.	723,3802	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₆	724,4	-
KG ₁₉	28,5	520,3429	564,3304	C ₂₉ H ₄₁ N ₇ O ₂	519,3	Linoeyl-lyso-phosphatidylcholin
KG ₂₀	34,3	n.d.	299,2601	C ₁₈ H ₃₆ O ₃	300,3	Hydroxystearinsäure
KG ₂₁	40,3	281,2497	279,2331	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,2	Linolsäure
KG ₂₂	43,1	n. d.	255,2331	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,2	Palmitinsäure
KG ₂₃	43,6	n. d.	281,2496	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,3	Ölsäure
KG ₂₄	44,0	n. d.	281,2487	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,3	C ₁₈ :1 Fettsäure
KG ₂₅	46,6	n. d.	605,4056	C ₄₁ H ₅₄ N ₂ O ₂	606,4	-
KG ₂₆	47,1	n. d.	283,2645	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,3	Stearinsäure
KG ₂₇	49,0	487,4385	n. d.	C ₂₉ H ₅₈ O ₅	486,4	-

Resultate

Tabelle 36 Inhaltsstoffprofil der Probe Kaegal_DM Teil 2; Analyse der Massen erfolgte mit der LC–ESI–TOF–Anlage; grün hinterlegte Verbindungen wurden nicht derepliziert; MK₀ = Originalextrakt mit sterilem Mäusekot behandelt, MK₂₄ = 24h Inkubation des Originalextraktes mit nicht sterilem Mäusekot; Zeichenerklärung: + = Intensität ungefähr gleich wie Originalextrakt, - = Intensität stark verringert oder Peak nicht mehr vorhanden, + (+) = Intensität deutlich höher; die TGR5-Spalte zeigt an, ob eine Aktivität auf den TGR5-Rezeptor in der Literatur beschrieben ist.

Peak	Bestätigung	DM Extrakt	MK ₀	MK ₂₄	TGR5	Kommentar / Literatur
KG ₁	-	-	+	+ (+)	X	
KG ₂	-	-	+	+	X	
KG ₃	-	+	+	+	X	nur mit LC-MS detektierbar
KG ₄	-	+	+	+	X	
KG ₅	-	+	+	+	X	
KG ₆	-	+	+	+	X	
KG ₇	-	+	+	+	X	
KG ₈	-	+	+	+	X	nur mit LC-MS detektierbar
KG ₉	-	-	-	-	X	erst im EXTR24 aufgetreten / nur mit LC-MS detektierbar
KG ₁₀	-	-	-	-	X	erst im EXTR24 aufgetreten
KG ₁₁	Referenz	+	+	+ (+)	X	
KG ₁₂		-	-	-	X	Zimtsäure-Derivat / nur mit LC-MS detektierbar / [27]
KG ₁₃		-	-	-	X	Zimtsäure-Derivat / nur mit LC-MS detektierbar
KG ₁₄		-	+ (+)	+ (-)	X	Zimtsäure-Derivat / nur mit LC-MS detektierbar / [28]
KG ₁₅		-	-	-	X	nur mit LC-MS detektierbar / [28]
KG ₁₆		-	-	-	X	Zimtsäure-Derivat / nur mit LC-MS detektierbar
KG ₁₇		-	-	-	X	
KG ₁₈		+	+ (+)	-	X	
KG ₁₉		+	+ (+)	-	X	
KG ₂₀		-	+	+	X	keine MS–Daten erfasst
KG ₂₁	Referenz	+	+	+	X	
KG ₂₂	Referenz	+	+	+	X	
KG ₂₃	Referenz	+	+	+	X	
KG ₂₄		-	+	+	X	
KG ₂₅		-	-	-	X	nur mit LC-MS detektierbar
KG ₂₆	Referenz	+	+	+	X	
KG ₂₇		-	-	-	X	nur mit LC-MS detektierbar

3.4.1.2.1 Nachweis mit Referenzsubstanzen

Der Nachweis zahlreicher Verbindungen mit Referenzsubstanzen war ein weiterer wichtiger Schritt zur Festigung der Ergebnisse, die durch die Dereplikation erhalten wurden. Es erfolgte eine Bestätigung zahlreicher Substanzen, die in den Tabelle 35, S.122 und Tabelle 36, S.123 aufgelistet wurden. Für die Evaluation der Daten kam die HPLC–DAD–CAD–Anlage zum Einsatz, mit der gleichen Geräteeinstellung und Methode, wie im Kapitel 3.4.1.1, S.115 erläutert. Die Startkonzentration der Referenzsubstanzen lag bei circa 1 mg/ml, gelöst in 1 ml Methanol, wobei das genaue Herstellungsverfahren der Vergleichslösungen im Kapitel 2.2.3, S.26 nachgelesen werden kann.

3.4.1.2.2 Einschub: Polyamid-Verunreinigung

Die Peaks KG₄₋₈ (siehe Tabelle 35, S.122 und Tabelle 36, S.123) wurden als Nylon–Derivate identifiziert, wie sie auch schon in *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica* vorgekommen waren. Da diese aufgrund des Herstellungsprozesses in die Proben gelangten und deshalb auch kein Unterschied zu den anderen Pflanzen bestand, wird auf die Kapitel 3.2.1.4, S.70 (*Syzygium aromaticum*) und 3.3.1.4, S.98 (*Pimenta dioica*) verwiesen, die dieses Thema bereits im Detail abhandelten.

Abbildung 49, S.125 zeigt das Chromatogramm der vereinten Fraktionen, der Probe und des AEOs nach Besprühen mit Jodlösung. Bei den braunen Spots am Startpunkt der DC handelte es sich um die Nylon–Verunreinigungen, die durch den Extraktionsprozess in die Extrakte gelangten.

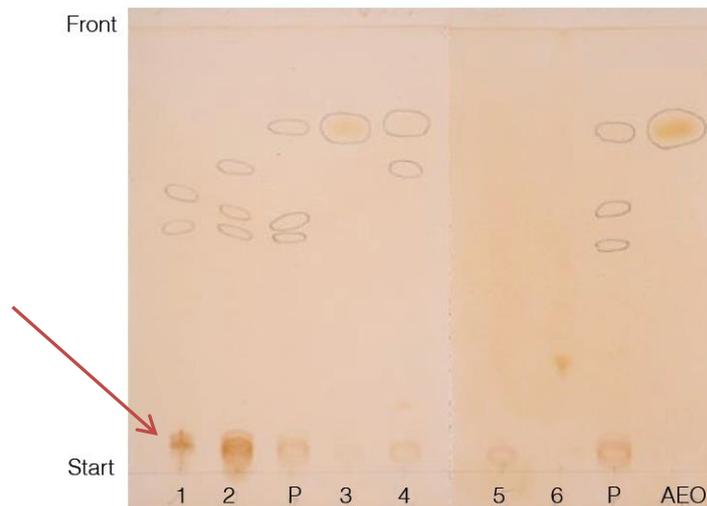


Abbildung 49 zeigt die **Fraktionen 1–6+AEO+Probe** nach Besprühen mit Jodlösung, dabei stellen die braunen Spots im unteren Bereich Verunreinigungen dar (roter Pfeil deutet die Ebene an, wo sich die Polyamid-Derivate befanden), die infolge des Herstellungsprozesses in die Probe gelangten.

3.4.2 Biotransformation der Probe Kaegal_DM

Die Biotransformation mit Mäusekot war ein Schritt, der in den vorangegangenen zwei großen Kapiteln schon näher beschrieben wurde. Auch bei *Kaempferia galanga* versuchte man die Extrakte sowohl mit sterilem als auch nicht-sterilem Mäusekot zu inkubieren. Wie bereits eingangs erwähnt, (siehe Kapitel 3.1, S.54) ging dieser wissenschaftlichen Arbeit eine andere Diplomarbeit voraus; dort können auch alle weiteren Informationen zu den Tests nachgelesen werden [7]. In Anlehnung an diese Arbeit erfolgte nicht nur der Vergleich der Chromatogramme bei *Syzygium aromaticum* (siehe Kapitel 3.2, S.60) und *Pimenta dioica* (siehe Kapitel 3.3, S.88), sondern auch bei *Kaempferia galanga*. Die Aufgabe bestand in der Analyse der biotransformierten und nicht-biotransformierten Extrakte und in der Beantwortung der Frage ob bei *Kaempferia galanga* aktive Metaboliten entstünden und ob irgendwelche bedeutsamen Veränderungen festzustellen wären. Dadurch erhoffte man sich eventuell chemische Verbindungen zu entdecken, die durch die Metabolisierung der Darmflora zu aktiven Stoffen werden und in Folge durch Zelltests an HEK293-Zellen zeigen, dass sie den TGR5-Rezeptor modulieren können. Jene zu untersuchenden Extrakte wurden freundlicherweise von Frau Mag. Nadina Faur zur Verfügung gestellt, bei *Kaempferia galanga* handelte es sich um die Extrakte

Resultate

mit der Bezeichnung Kaegal_DM (Originalextrakt), Kaegal_EXTR_0h (Originalextrakt mit sterilem Mäusekot versetzt) und Kaegal_EXTR_24h (24h Inkubation mit nicht sterilem Mäusekot).

Die Untersuchung von biotransformierten und nicht-biotransformierten Extrakten stand nun an. Nähere Informationen über die Inkubation sind dem Kapitel 2.1.5, S.22 zu entnehmen. Zur Erreichung des Ziels mussten die Extrakte aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert werden. Dafür verwendete man bei allen nun folgenden Chromatogrammen die LC-ESI-TOF-Anlage mit der Methodenoptimierung 1. Die entsprechenden Parameter können im Kapitel 2.2.5.4, S.33 unter „Methodenoptimierung 1“ nachgelesen werden.

Die nun folgenden Abbildungen sollen einen kurzen Einblick geben, welche Veränderungen aufgetreten sind. Dabei wurden nur einige wenige Chromatogramme in diese Diplomarbeit aufgenommen, da die Veränderungen oft verschwindend gering waren beziehungsweise einige Peaks, welche erst durch die 24-Stunden Inkubation auftraten, teilweise nicht derepliziert werden konnten.

Die Abbildung 50, S.127 stellt im Negativionenmodus aufgenommene Chromatogramme dar, indem die Peaks KG_1 und KG_3 zu erkennen sind. Beide waren im Originalextrakt (Kaegal_DM) und in Kaegal_EXTR_0 zwar enthalten, nahmen jedoch massiv an Intensität in dem mit nicht-sterilem Mäusekot behandelten Extrakt Kaegal_EXTR_24 zu. Es war leider nicht möglich, diese beiden Strukturen zu dereplizieren, sodass auch keine Literaturrecherche möglich war, die eventuell Hinweise auf eine TGR5-Rezeptor-Aktivierung gaben.

Abbildung 51, S.128 zeigt ebenfalls einen Vergleich der im Negativionenmodus aufgenommenen Chromatogramm; in ihr befindet sich ganz oben der genuine, dann der nicht-biotransformierte (Kaegal_EXTR_0) und zu guter Letzt der biotransformierte Extrakt (Kaegal_EXTR_24). KG_{10} erschien in der mit nicht-sterilem Mäusekot behandelten Probe in Form eines vergrößerten Peaks, auch KG_{11} (4-Methoxyzimtsäure) zeigte dies. Jene Peaks, die mit einer grünen Schrift markiert wurden, sind dereplizierte; rot beschriftete nicht. Es ist auch zu erkennen, dass KG_{20} und KG_{24} im Extrakt Kaegal_EXTR_24h in größerer Konzentration vertreten waren. Dabei handelte es sich um eine Hydroxystearinsäure (KG_{20}) und um eine $C_{18} : 1$ Fettsäure (KG_{24}). Die Menge an KG_{20} stieg vermutlich aufgrund der Metabolisierung im Darmmilieu an. Dabei stand die Vermutung im Raum, dass dies mit einer höheren lipolytischen Aktivität in Zusammenhang steht. KG_{22} und KG_{23} (Palmitin- und Ölsäure) sind allerdings in allen drei Extrakten etwa in gleicher Menge enthalten. Bei den Fettsäuren handelte es sich aber leider um

Resultate

keine Modulatoren des TGR5–Rezeptors. Welche anderen Fettsäuren noch in dem Extrakt gefunden wurden, kann in der Tabelle 35, S.122 und Tabelle 36, S.123 nachgelesen werden.

Die Abbildung 52, S.129 zeigt einen Ausschnitt der Chromatogramme, diesmal im Positivionenmodus. Abbildung 53, S.129 zeigt die 4–Methoxyzimtsäure (KG₁₁), die in Kaegal_EXTR_24 durch die Metabolisierung aufgrund der Darmflora im Chromatogramm an Intensität zunahm. Ob diese Säure zu einer Aktivierung des TGR5–Rezeptor beiträgt, konnte im Zuge dieser Diplomarbeit nicht festgestellt und auch nicht nachgewiesen werden, da sie nicht an HEK293–Zellen getestet wurde. Auch keinerlei Literaturstellen deuteten auf eine positive Wirkung auf den TGR5–Rezeptor hin.

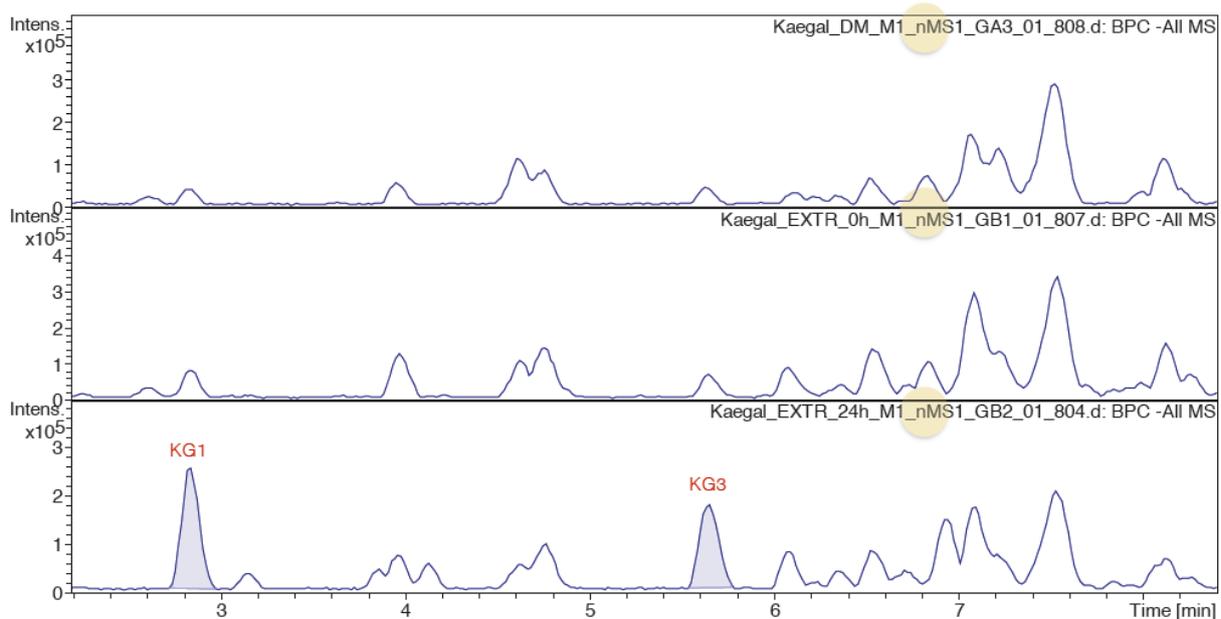


Abbildung 50 zeigt einen Vergleich der im Negativionenmodus aufgenommenen BPCe der unterschiedlich behandelten Extrakte von *Kaempferia galanga*. Ganz oben befindet sich die genuine (Kaegal_DM), dann die nicht-biotransformierte (Kaegal_EXTR_0h) und die biotransformierte Probe (Kaegal_EXTR_24h). Es traten geringe Veränderungen auf, wie, dass KG₁ und KG₃ in dem Originalextrakt und dem Kaegal_EXTR_0 nur minimal vorhanden waren, jedoch im Extrakt Kaegal_EXTR_24 auffallend an Intensität zunahm. Gerätschaft: LC–ESI–TOF-Anlage; Modus: negativ; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Injektionsvolumen: 2 µl; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 1

Resultate

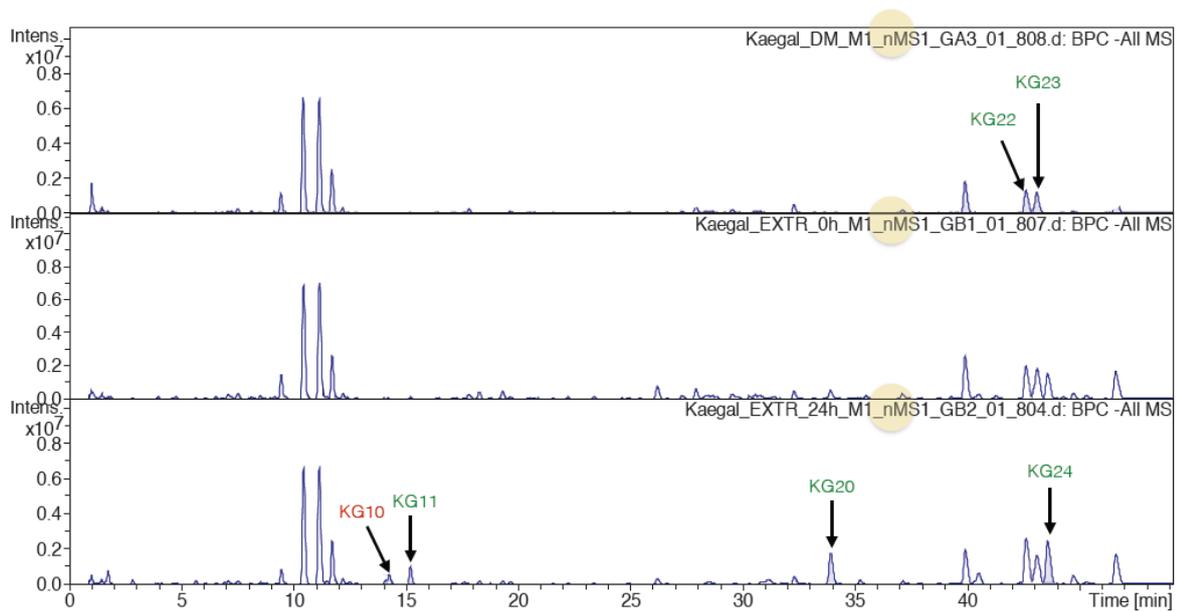


Abbildung 51 zeigt einen Vergleich der im Negativionenmodus aufgenommenen BPCe der unterschiedlich behandelten Extrakte von *Kaempferia galanga*. Ganz oben befindet sich die genuine (Kaegal_DM), dann die nicht-biotransformierte (Kaegal_EXTR_0h) und die biotransformierte Probe (Kaegal_EXTR_24h). KG₁₀ erschien in der mit nicht-sterilem Mäusekot behandelten Probe in Form eines vergrößerten Peaks, auch KG₁₁ (4-Methoxyzimtsäure) tat dies. Jene Peaks, die mit einer grünen Schrift markiert sind, sind dereplizierte; der rote nicht. Es ist auch zu erkennen, dass KG₂₀ und KG₂₄ im Extrakt Kaegal_EXTR_24h in größerer Konzentration vertreten waren. Dabei handelte es sich um eine Hydroxystearinsäure (KG₂₀) und um eine C₁₈ : 1 Fettsäure (KG₂₄). KG₂₂ und KG₂₃ (Palmitin- und Ölsäure) sind in allen drei Extrakten etwa in gleicher Menge enthalten. Gerätschaft: LC-ESI-TOF-Anlage; Modus: negativ; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 μm , 120 \AA , 2,1 x 150 mm; Injektionsvolumen: 2 μl ; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 $^{\circ}\text{C}$; Methodenoptimierung 1

Resultate

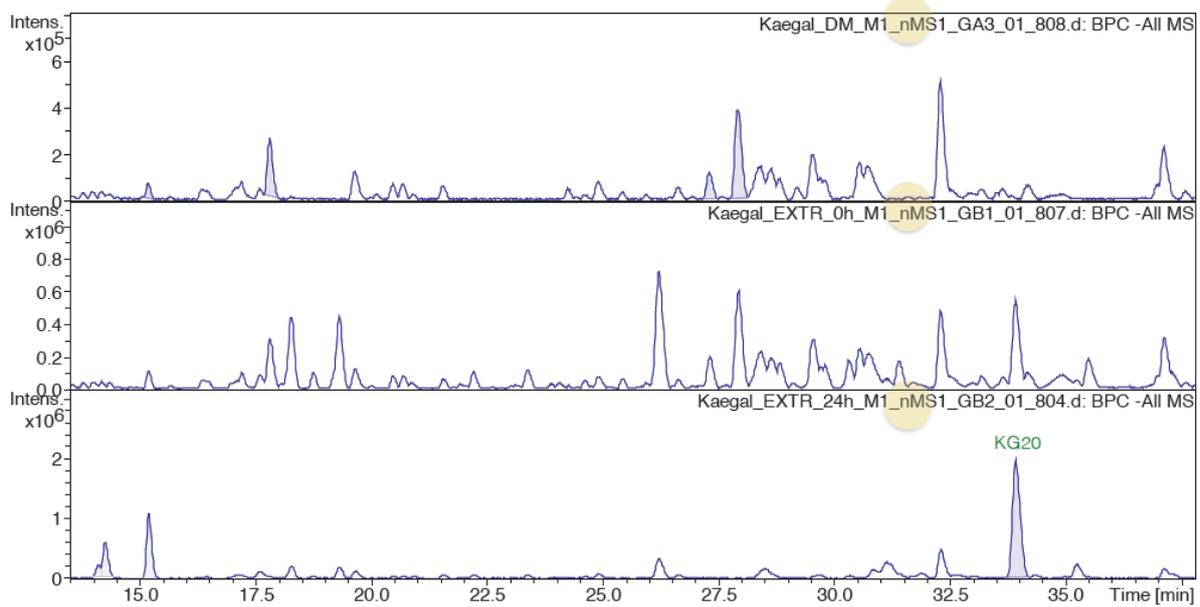


Abbildung 52 zeigt den **Peak KG₂₀ (Hydroxystearinsäure)** in vergrößerter Form. Die Probe, die dabei zum Einsatz kam, war Kaegal_DM. KG₂₀ erschien verstärkt sowohl im Extrakt Kaegal_EXTR_0 als auch im Extrakt Kaegal_EXTR_24. Es ist anzunehmen, dass die Menge an Hydroxystearinsäure vermutlich infolge der Metabolisierung durch die Darmflora anstieg. Gerätschaft: LC–ES–TOF; Modus: negativ; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 μ m, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Injektionsvolumen: 2 μ l; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 1

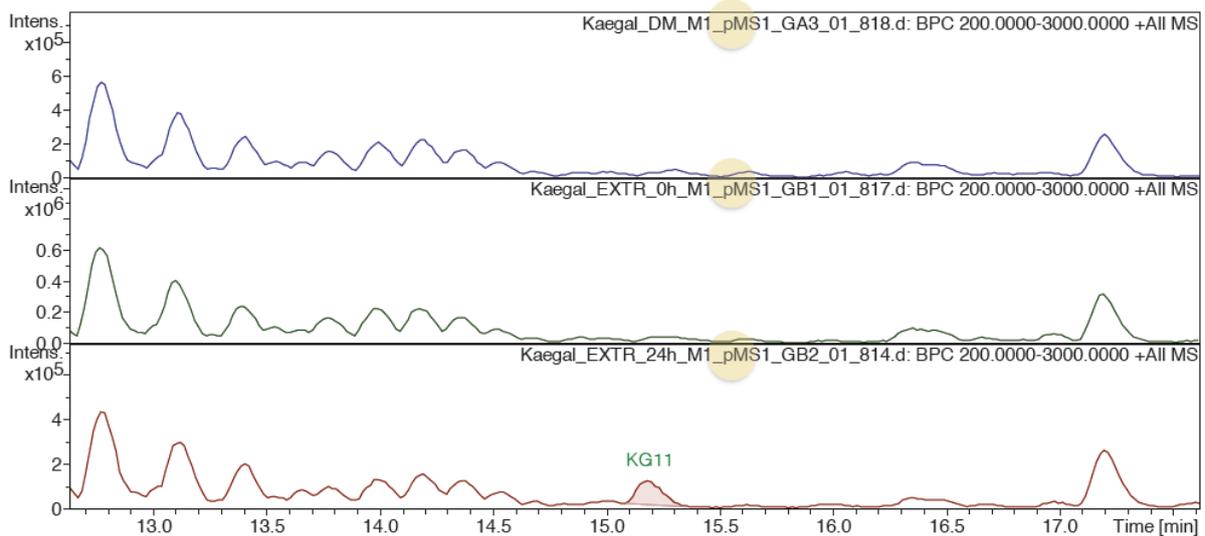


Abbildung 53 zeigt einen **Vergleich der im Positionenmodus aufgenommenen BPCe der unterschiedlich behandelten Extrakte von *Kaempferia galanga***. Ganz oben befindet sich die genuine (Kaegal_DM), dann die nicht-biotransformierte (Kaegal_EXTR_0h) und die biotransformierte Probe (Kaegal_EXTR_24h). KG₁₁ kam in größerer Konzentration in Kaegal_EXTR_24 vor, dabei handelte es sich um die 4-Methoxyzimtsäure. Gerätschaft: LC–ESI–TOF-Anlage; Modus: positiv; Gradient: 5–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 μ m, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Injektionsvolumen: 2 μ l; Flussrate: 0,5 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C; Methodenoptimierung 1

Abschließend kann gesagt werden, dass im Zuge der Biotransformation zwar einige Veränderungen auftraten, allerdings handelte es sich dabei oft um eine Zunahme der Menge an Fettsäuren, die für die Zielsetzung uninteressant waren. Des Weiteren erschienen teilweise Peaks, die in einer beachtlichen Größe im Chromatogramm auftraten, oft aber nicht derepliziert werden konnten. Ob diese Verbindungen eine Aktivierung des TGR5-Rezeptors bewirkt hätten, wurde mit Zelltests an HEK293-Zellen nicht bestätigt.

3.4.3 Fraktionierung des Extraktes und Gewinnung des ätherischen Öls

3.4.3.1 Fraktionierung des Extraktes

Durch die Dereplikation (siehe Kapitel 3.4.1, S.114) war es bei *Kaempferia galanga* nicht möglich, herauszufinden, welche chemischen Verbindungen für die positive TGR5-Rezeptoraktivierung verantwortlich waren. Bei den zuvor abgehandelten Pflanzen (*Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica*) konnten jene Inhaltsstoffe sehr schnell gefunden werden. Da dies bei der Gewürznelke nicht so rasch funktionierte, musste ein neuer Ansatz zur Lösung des Problems erarbeitet werden, mit dem Ziel, herauszufinden, welche der Fraktionen eine positive Modulation bewirkt. Zunächst erfolgte eine Fraktionierung des Extraktes (KaegalRDMp), hergestellt nach der Prozedur wie in Kapitel 2.2.1, S.23 beschrieben. Die Gesamtprobenmenge, die zur Verfügung stand, waren 93,54 mg von der letztlich circa 70 mg tatsächlich separiert wurden. Die Flash-Chromatographie eignete sich hervorragend für die Fraktionierung des Extraktes. Das Gerät stammte von der Firma Interchim. Die Durchführung sowie die eingestellten Parameter und der Fließmittelgradienten sind im Kapitel 2.2.9, S.45 zusammengefasst.

Der ELSD-Detektor steuerte die Fraktionierung nach der Intensität des Signals, so dass die einzelnen Peaks möglichst separat in Eprövetten gesammelt wurden; insgesamt kamen 22 Fraktionen mit jeweils 5–16 ml Flüssigkeit pro Eprövette zusammen. Bei der eingesetzten stationären Phase handelte es sich um eine Umkehrphasensäule (RP-C₁₈), wodurch die polaren Stoffe in den anfänglichen und die lipophilen Stoffe in den letzteren Fraktionen anzutreffen waren. Nachdem nun die Fraktionen erhalten wurden, erfolgte eine DC-Analyse, um ähnlich aussehende Fraktionen zu vereinigen (siehe Kapitel 3.4.3.1.1, S.131).

3.4.3.1.1 DC-Analyse der erhaltenen Fraktionen

Aufgrund der großen Anzahl an erhaltenen Fraktionen (insgesamt 22) war es notwendig, diese mittels eines DC-Vergleiches so zu vereinigen, dass ähnlich aussehende zusammengeführt werden; genau dies wurde unternommen. Die eingesetzte stationäre und mobile Phase kann dem Kapitel 2.2.8, S.42 entnommen werden. Die einzelnen Fraktionen wurden mit einer speziell präparierten Pasteurpipette auf die DC-Platte aufgetragen. In der Mitte befand sich immer der Originalextrakt, um einen entsprechenden Vergleich zu haben. Weiters wurde das Säulenwasch-Eluat aufgetragen, um zu analysieren, ob auch in diesem noch Interessantes enthalten war. Abbildung 54, S.132 und Abbildung 56, S.133 zeigen eine allgemeine Übersicht über die Fraktionen bei Tageslicht und wie diese zusammengeführt wurden, während die Abbildung 55, S.132 und die Abbildung 57, S.133 die Fraktionenvereinigung bei UV 254 nm darstellen. Durch die Vereinigung reduzierte man die Anzahl an Fraktionen von 22 auf 6. Die am Rotavapor eingeeengten Fraktionen wurden anschließend jeweils in ein tariertes HPLC-Fläschchen und in ein tariertes Eppendorf-Gefäß aufgeteilt, um letztlich auf eine Konzentration von circa 1 µg/ml in den HPLC-Fläschchen und circa 2–3 µg/ml in den Eppendorf-Gefäßen zu kommen. Erstere dienten für die DC-Vergleiche und zweitere für die Bioaktivitätstests an den HEK293-Zellen.

Nach der Reduktion der Fraktionen von 22 auf 6, erfolgte eine weitere DC-Analyse zur Überprüfung, ob die nun aufgetretenen Spots mit jenen zuvor erschienenen vergleichbar sind. Zusätzlich wurde auch das durch eine Wasserdampfdestillation gewonnene ätherische Öl von *Kaempferia galanga* (siehe Kapitel 2.2.2, S.25) aufgetragen, weil eine Wirkung auf den TGR5-Rezeptor vermutet wurde.

Es kam das gleiche DC-System zum Einsatz wie zuvor. Einziger Unterschied war, dass zusätzlich auch noch eine Besprühung mit Vanillin-H₂SO₄-Lösung erfolgte. Es wurden je 2 DC's mit 6 x 9,5 cm und 5 x 9,5 cm angefertigt und die Fraktionen, die Probe und das AEO mit einer speziell präparierten Pasteurpipette aufgetragen. Die Tabelle 37, S.134 gibt die aufgetragenen Extraktvolumina in µl wieder.

Resultate

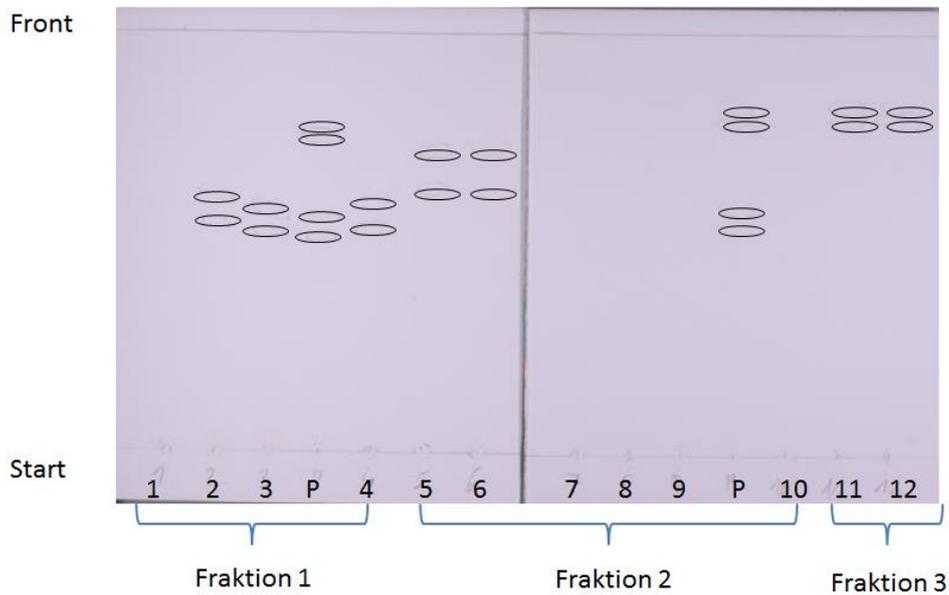


Abbildung 54 zeigt eine **Übersicht über die Fraktionen 1–12** und wie die einzelnen Fraktionen im Anschluss vereinigt wurden. Dabei stehen die Ziffern für die entsprechende Fraktion und das P für Probe. Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufstrecke: 8 cm; nicht besprüht

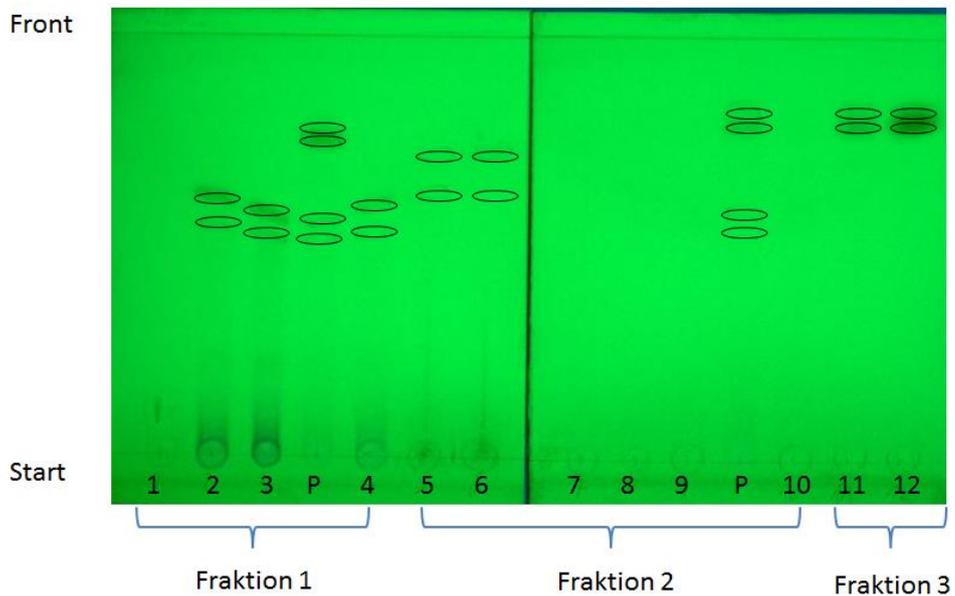


Abbildung 55 zeigt eine **Übersicht über die Fraktionen 1–12** und wie die einzelnen Fraktionen im Anschluss vereinigt wurden. Dabei stehen die Ziffern für die entsprechende Fraktion und das P für Probe. Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufstrecke: 8 cm; nicht besprüht; UV 254 nm

Resultate

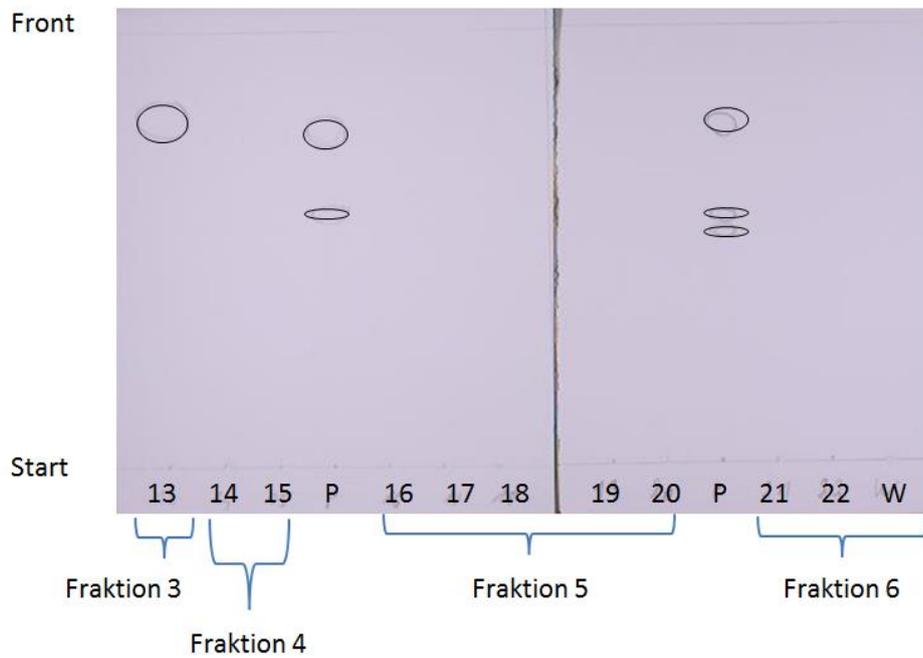


Abbildung 56 zeigt eine Übersicht über die Fraktionen 13–22+W und wie die einzelnen Fraktionen im Anschluss vereinigt wurden. Dabei stehen die Ziffern für die entsprechende, das P für Probe und das W für Säulenwasch-Eluat. Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufstrecke: 8 cm; nicht besprüht

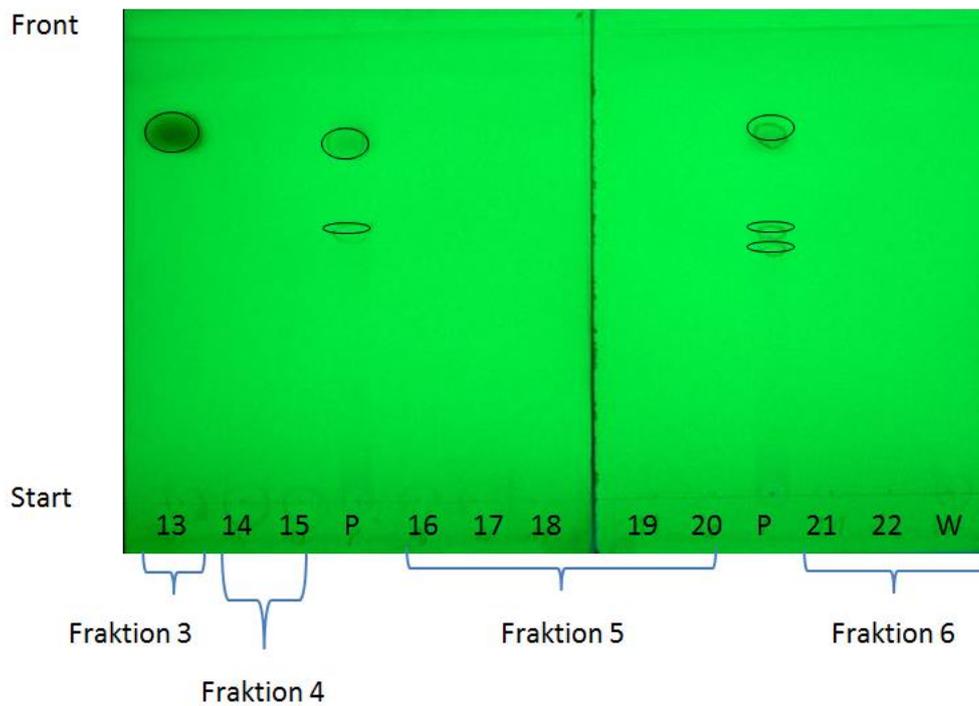


Abbildung 57 zeigt eine Übersicht über die Fraktionen 13–22+W und wie die einzelnen Fraktionen im Anschluss vereinigt wurden. Dabei stehen die Ziffern für die entsprechende Fraktion, das P für Probe und das W für Säulenwasch-Eluat. Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufstrecke: 8 cm; nicht besprüht; UV 254 nm

Resultate

Abbildung 58 zeigt das erhaltene, nicht besprühte Chromatogramm sowohl bei Tageslicht als auch bei UV 254 nm. Sehr deutlich waren die Spots zu erkennen, deren Position mit einem roten Pfeil markiert wurde. Der Vergleich mit den zuvor gewonnenen Chromatogrammen zeigte eine Übereinstimmung mit den aufgetretenen Spots.

Abbildung 59, S.135 zeigt die Chromatogramme nach der Besprühung mit Vanillin-H₂SO₄-Lösung sowohl bei Tageslicht als auch bei UV 366 nm. Auch hier können die Spots gut erkannt werden, es erschienen jedoch noch zusätzliche Spots durch die Besprühung.

Tabelle 37 zeigt die aufgetragenen Volumina der jeweiligen Fraktion, Probe und des ätherischen Öls in µl

Probenbezeichnung	µl	Probenbezeichnung	µl
KaegalRDMp_F1	10	KaegalRDMp_F5	10
KaegalRDMp_F2	10	KaegalRDMp_F6	30
KaegalRDMp_F3	10	P = KaegalDMP	25
KaegalRDMp_F4	10	AEO = KaegalRM_AEO	8

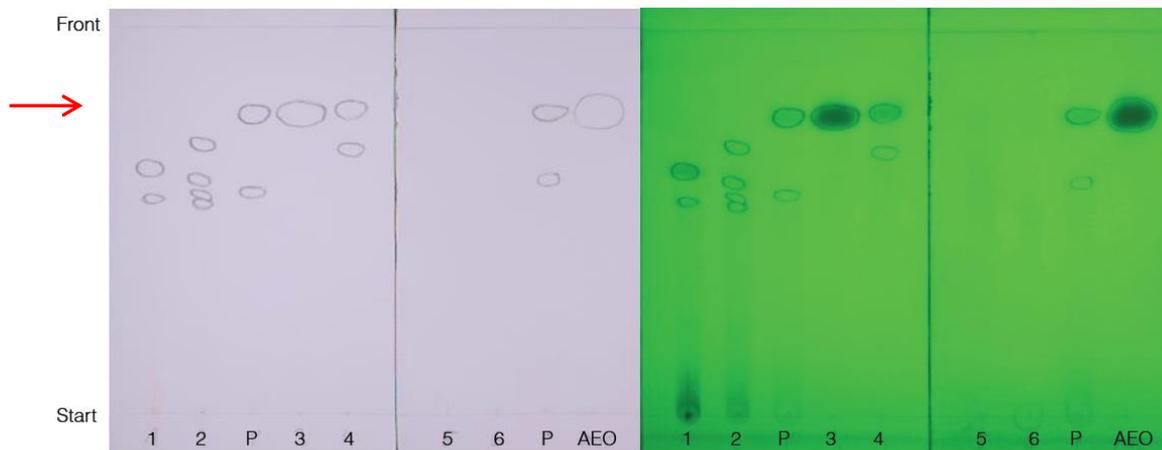


Abbildung 58 zeigt übersichtlich die **Fraktionen 1–6+AEO+Probe**. Die Ziffern stehen für die jeweilige Fraktion, das P für Probe (KaegalDMP) und AEO für ätherisches Öl. Die Spots sind deutlich zu erkennen (die ungefähre Position wurde mit einem roten Pfeil markiert). Zur Anwendung kam als stationäre Phase eine Kieselgel 60 F₂₅₄ Folie mit einer Laufstrecke von 8 cm; nicht besprüht; linkes Chromatogramm bei Tageslicht und rechtes Chromatogramm bei UV 254 nm

Resultate

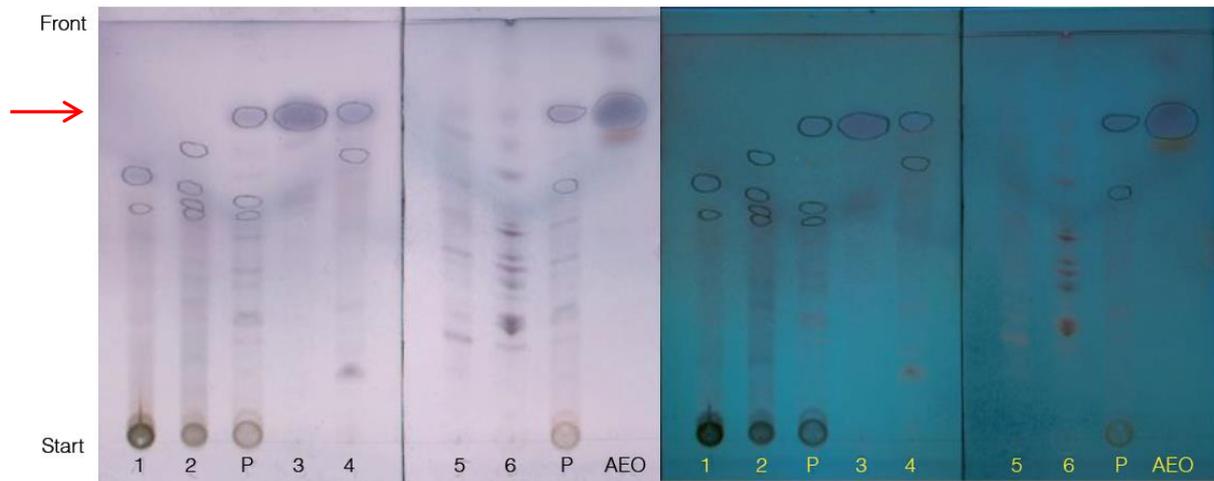


Abbildung 59 zeigt übersichtlich die **Fractionen 1–6+AEO+Probe** nach Besprühen mit Vanillin–H₂SO₄–Lösung. Die Ziffern stehen für die jeweilige Fraktion, das P für Probe (KaegalDMP) und AEO für ätherisches Öl. Die Spots sind deutlich zu erkennen (deren ungefähre Position mit einem roten Pfeil markiert). Im Allgemeinen traten durch die Besprühung zahlreiche gefärbte Banden auf. Zur Anwendung kam als stationäre Phase eine Kieselgel 60 F₂₅₄ Folie mit einer Laufstrecke von 8 cm; das linke Chromatogramm wurde bei Tageslicht und das rechte Chromatogramm bei UV 366 nm aufgenommen.

Abschließend kann gesagt werden, dass durch die Flash–Chromatographie der Extrakt erfolgreich in 22 Fraktionen separiert wurde, die im Anschluss durch Vereinigung nach DC–Analysen von 22 auf 6 reduziert werden konnten. Mit diesen 6 Fraktionen und dem ätherischen Öl erfolgten im Anschluss die Bioaktivitätstests an HEK293–Zellen, um die auf den TGR5–Rezeptor wirksamen Fraktionen zu finden; im Kapitel 3.4.4, S.139 werden alle Tests näher erläutert.

3.4.3.1 Gewinnung des ätherischen Öls

In Folge der Dereplikation und der Literaturrecherche konnten keine für eine TGR5–Rezeptor–Aktivierung offensichtlich verantwortlichen Verbindungen ausfindig gemacht werden. Daher versuchte man, wie bereits erwähnt, auf der einen Seite den Extrakt zu fraktionieren (siehe Kapitel 3.4.3.1, S.130) und auf der anderen Seite das ätherische Öl zu gewinnen, um anschließend an HEK293–Zellen eine mögliche TGR5–Aktivierung nachzuweisen. Das ätherische Öl wurde zusätzlich ausgewählt, weil immerhin circa 2,5 % im Wurzelstock von *Kaempferia galanga* enthalten sind. Bei den Hauptkomponenten handelt es sich vor allem um p–Methoxyzimtsäureethylester, Zimtsäureethylester und Pentadekan. Erstere wurde,

zusammen mit einigen ähnlichen Zimtsäurederivaten, tatsächlich bei der Dereplikation im Extrakt nachgewiesen (siehe Kapitel 3.4.1, S.114). In der Literatur können auch noch andere chemische Verbindungen nachgelesen werden, wie 1,8–Cineol, Borneol, Camphen, links- und rechtsdrehendes α -Pinen, Δ -3-Caren, Kaempferol, Eucalyptol, β -Caryophyllen, um nur einige wenige zu nennen (Fußnote 9, S.13, Fußnote 40, S.134 und [6]).

Die genaue Prozedur der Gewinnung des ätherischen Öls steht in Kapitel 2.2.2, S.25; die eingesetzte Ausgangsdroge war das Rhizom in pulverisierter, gemahlener Form. Das daraus gewonnene ätherische Öl hatte einen intensiv würzigen Geruch mit einer leicht gelb / bräunlichen Verfärbung. Die Extraktbezeichnung lautete KaegalRM_AEO. Das Öl wurde zum einen für die DC-Analyse (siehe Kapitel 3.4.3.1.1, S.136) eingesetzt, und zum anderen für die Tests an HEK293-Zellen, um zu sehen, ob eine Wirkung auf den TGR5-Rezeptor besteht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden im Kapitel 3.4.4, S.139 näher erläutert; auch die weitere Vorgangsweise mit dem ätherischen Öl wird besprochen.

3.4.3.1.1 DC-Analyse

Aus dem pulverisierten, gemahlene Rhizom von *Kaempferia galanga* konnten diverse Extrakte gewonnen werden. Die Inhaltsstoffe sollten in Folge mittels einer DC-Überprüfung sichtbar gemacht werden, um Ähnlichkeiten oder Abweichungen feststellen zu können. Es kamen insgesamt 5 verschiedene Extrakte zum Einsatz:

1. **KaegalDMP**: Dieser Extrakt wurde neu hergestellt. Die Arbeitsanweisung kann im Kapitel 2.2.1, S.23 nachgelesen werden.
2. **KaegalRM_AEO**: Das wasserdampfdestillierte ätherische Öl aus dem Rhizom von *Kaempferia galanga*. Die exakte Herstellung kann im Kapitel 3.4.3.1, S.135 nachgelesen werden.
3. **KaegalRH**: Originalextrakt (Kaegal_DM), gelöst in 10 ml n-Hexan gelöst.
4. **Kaegal_DM**: Extrakt, der von der vorangegangenen Diplomarbeit von Mag. Nadina Faur übernommen wurde.
5. **KaegalRM / 0,1 % FA**: Hierbei handelt es sich um einen Extrakt, der aus dem entfetteten Anteil (Rückstand) von *Kaempferia galanga* extrahiert wurde. Der entfettete Rückstand befand sich bereits in einem Rollrandgefäß, der direkt mit 1,11 ml n-Hexan versetzt

Resultate

wurde. Im Anschluss wurden daraus 0,555 ml entnommen und in ein anderes Glasgefäß überführt; dort mit 0,5 ml Methanol und 0,56 ml einer 0,1 % wässrigen Ameisensäure versetzt. Dabei traten 2 Phasen auf und etwas Bodensatz. Die untere klare Phase wurde vorsichtig mit einer Spritze entnommen und in ein HPLC-Fläschchen hinein filtriert (Filter: Interchim PTFE 13 mm 0,45 µm). Die Lösung hatte einen gelb / bräunlichen Anschein.

Im Anschluss folgen nun verschiedene DC's, um das Resultat der Auftrennung begutachten zu können. Es wurden sowohl Chromatogramme bei Tageslicht als auch bei UV254+366 nm dargestellt; auch mit Vanillin-H₂SO₄-Lösung besprüht sind dabei. Für die optimale Auftrennung war eine gut aufeinander abgestimmte mobile und stationäre Phase von Bedeutung. Alle Informationen darüber beinhaltet das Kapitel 2.2.8, S.42.

Abbildung 60, S.138 stellt die Extrakte bei UV 254+366 nm unbesprüht dar. Der Spot der ätherischen Öl-Komponente(n) kam in allen Extrakten auf gleicher Höhe sehr schön zur Geltung.

Abbildung 61, S.138 und Abbildung 62, S.139 zeigen hingegen die aufgetrennten Extrakte nach Besprühen mit Vanillin-H₂SO₄-Lösung bei Tageslicht und UV 254+366 nm. Leicht zu erkennen sind die Spots der ätherischen Öl-Komponente(n), welche in allen fünf Extrakten deutlich enthalten waren. Infolge dieser DC-Analysen trat ein wichtiger Aspekt hervor, nämlich auch das ätherische Öl an HEK293-Zellen zu testen. Der Grund lag in der offensichtlich großen Konzentration an ätherischen Öl Komponenten in den Extrakten von *Kaempferia galanga*, die in den zuvor durchgeführten Tests bereits eine positive Wirkung auf den TGR5-Rezeptor zeigten. In Folge der Dereplikation im Zuge dieser Diplomarbeit konnten keine potenziellen Inhaltsstoffe gefunden werden, die bekanntermaßen den TGR5-Rezeptor modulieren. Eine Möglichkeit bestand eventuell darin, dass das ätherische Öl eine entscheidende Rolle spielen könnte; deshalb wurde es in Folge auch getestet. Nähere Informationen zur Gewinnung des ätherischen Öls können dem Kapitel 3.4.3.1, S.135 entnommen werden und die erhaltenen Testresultate werden im Kapitel 3.4.4, S.139 erläutert.

Resultate

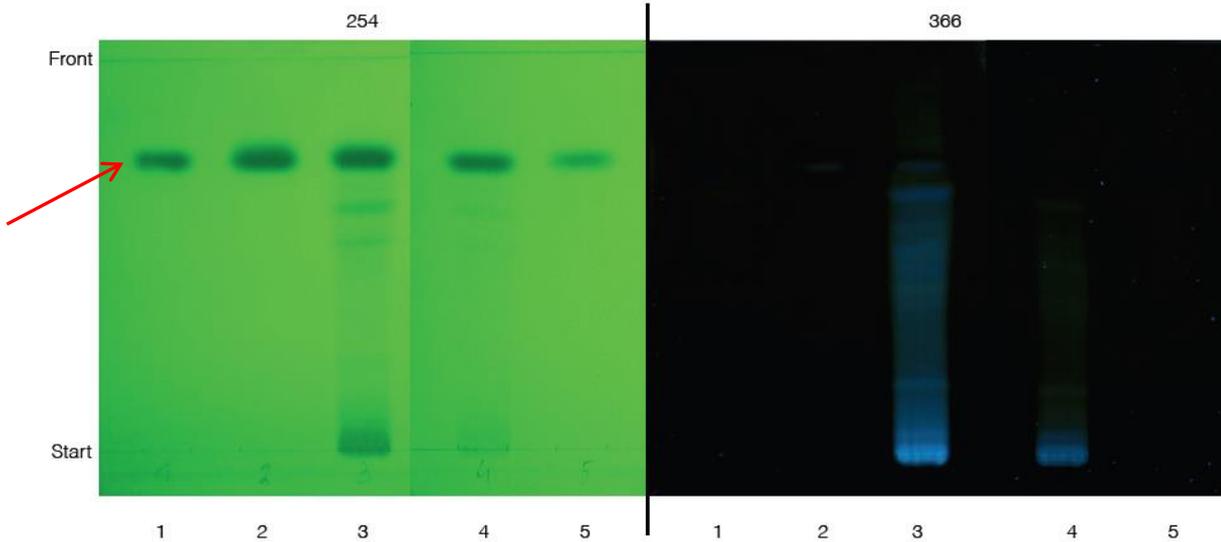


Abbildung 60 zeigt alle fünf zuvor erwähnten Extrakte von *Kaempferia galanga*. Das linke Chromatogramm wurde bei UV 254 nm und das rechte bei UV 366 nm abgebildet. Der Spot der ätherischen Öl-Komponente(n) (rot markiert) kam in allen Extrakten auf gleicher Höhe sehr schön zur Geltung. 1: KaegalRH; 2: KaegalRM_AEO; 3: KaegalDMP; 4: Kaegal_DM; 5: KaegalRM / 0,1% FA; Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufstrecke: 8 cm;

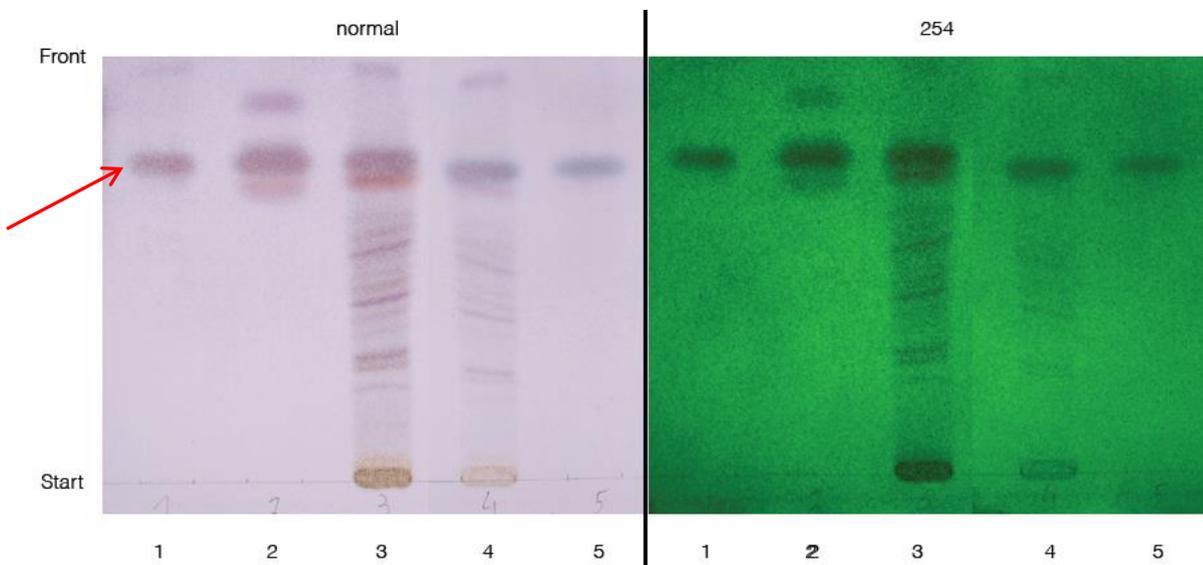


Abbildung 61 zeigt alle fünf zuvor erwähnten Extrakte von *Kaempferia galanga*. Das linke Chromatogramm wurde nach Besprühen mit Vanillin-H₂SO₄-Lösung bei Tageslicht und das rechte bei UV 254 nm abgebildet. Der Spot der ätherischen Öl-Komponente(n) kam in allen Extrakten auf gleicher Höhe sehr schön zur Geltung. Die Ziffern 3 und 4 zeigen sehr schön das gesamte aufgetrennte Inhaltsstoffprofil des Originalextraktes. 1: KaegalRH; 2: KaegalRM_AEO; 3: KaegalDMP; 4: Kaegal_DM; 5: KaegalRM / 0,1% FA; Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufstrecke: 8 cm;

Resultate

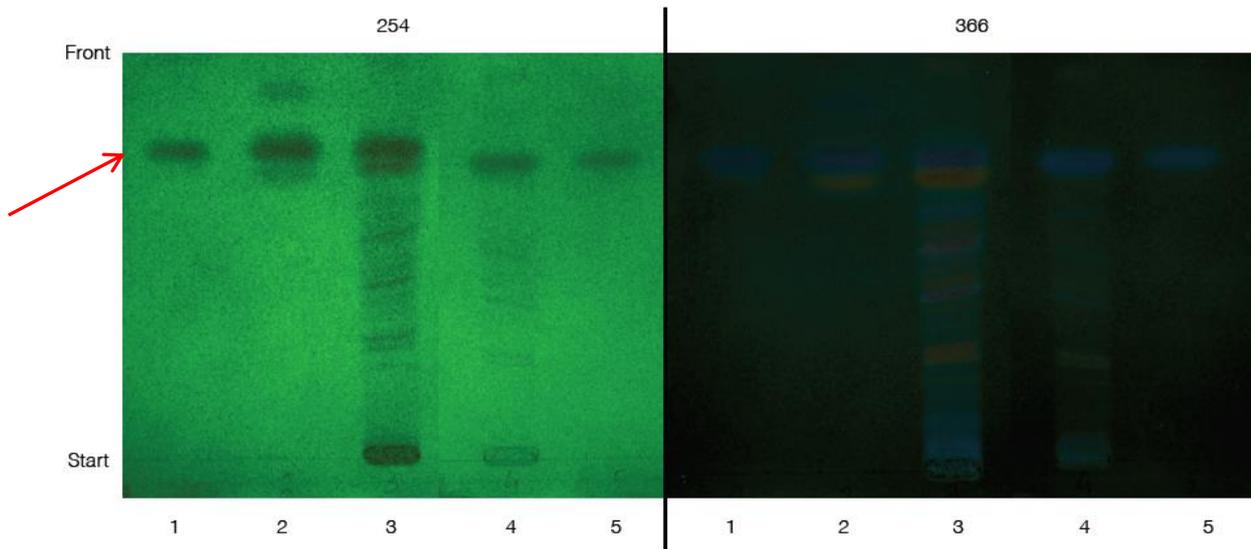


Abbildung 62 zeigt alle fünf zuvor erwähnten Extrakte von *Kaempferia galanga*. Das linke Chromatogramm wurde nach Besprühen mit Vanillin-H₂SO₄-Lösung bei UV 254 nm und das rechte bei UV 366 nm abgebildet. Der Spot der ätherischen Öl-Komponente(n) (rot markiert) kam in allen Extrakten auf gleicher Höhe sehr schön zur Geltung. Die Ziffern 3 und 4 zeigen sehr schön das gesamte aufgetrennte Inhaltsstoffprofil des Originalextraktes. 1: KaegalRH; 2: KaegalRM_AEO; 3: KaegalDMP; 4: Kaegal_DM; 5: KaegalRM / 0,1% FA; Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufstrecke: 8 cm;

3.4.4 Bioaktivitätstests an HEK293-Zellen

Kaempferia galanga war jene Pflanze von den insgesamt drei untersuchten, bei der durch die Dereplikation keine Inhaltsstoffe gefunden werden konnten, die den TGR5-Rezeptor modulierten, obwohl die zuvor durchgeführten Test ja eine Wirkung zeigten (siehe Kapitel 3.1, S.54). Daher erfolgte eine Fraktionierung des Extraktes (siehe Kapitel 3.4.3.1, S.130), um infolge durch Bioaktivitätstests die Anzahl möglicher „Kandidaten“ einzugrenzen. Zusätzlich wurde auch noch das ätherische Öl getestet (siehe Kapitel 3.4.3.1, S.135), weil doch eine beachtliche Menge (circa 2,5 %) in dem Rhizom enthalten ist und ätherische Öl-Komponenten im Extrakt identifiziert wurden. Für die Zelltests wurden die Fraktionen und das ätherische Öl in Eppendorf-Gefäße gegeben und im Anschluss von Frau Dr. Angela Ladurner am Department für Pharmakognosie auf entsprechende Testkonzentrationen verdünnt und an HEK293-Zellen getestet. Zusätzlich erfolgte auch die Testung des Originalextraktes, um einen entsprechenden Vergleich zu haben.

Resultate

Alle Informationen, die in den folgenden Abbildungen enthalten sind, wurden dankenswerterweise zur Verfügung gestellt und für diese Diplomarbeit entsprechend adaptiert.

Die Messungen der Fraktionen und des ätherischen Öls geschahen in zwei verschiedenen Konzentrationsstufen (100 µg/ml, 30 µg/ml), die des Originalextraktes in vier verschiedenen Konzentrationsstufen (100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml, 3 µg/ml). Damit versuchte man die Wirkung bei unterschiedlichen Konzentrationen festzustellen. Das Arbeitsprotokoll der Tests kann im Kapitel 2.2.11, S.50 genau nachgelesen werden. In den Abbildungen stellt die y-Achse die TGR5-Aktivierung und die x-Achse die entsprechende Bezeichnung und Konzentration dar. Alle Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Versuchen (n=3) erhalten und gemittelt. Die abgebildeten Balken zeigen zudem auch die Standardabweichung.

Abbildung 63, S.141 zeigt das Ergebnis, welches bei den Transaktivierungsassays mit den HEK293-Zellen erhalten wurde. Es kann sehr gut erkannt werden, dass auf der linken Seite der Abbildung der Originalextrakt (KaegalEXTR0) bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine eindeutige Wirkung zeigte; auch bei 30 und 10 µg/ml konnte eine Aktivierung erkannt werden. Wenn man dies mit den Fraktionen und dem ätherischen Öl verglich, sah dies ein wenig anders aus. So zeigte zum Beispiel die Fraktion 1 keine Aktivität, die Fraktionen 2 und 6 eine schwache Wirkung im Bereich des Extrakts; jedoch sehr viel geringer als die verwendeten Positivkontrollen LCA und CDCA. Bei den Fraktionen 3, 4 und 5 sowie dem ätherischen Öl sah dies ganz anders aus, da hier die Modulierung bei einer Konzentration von 100 µg/ml auf deutlich höherem Niveau war; im Fall der Fraktion 5 ähnlich wie bei der Positivkontrolle CDCA (10 µM). Die Aktivität aller vier bewegte sich bei einer Konzentration von 100 µg/ml und 30 µg/ml auf ähnlichem Level, was die Stimulierung der HEK293-Zellen betraf. Doch obwohl dieses Ergebnis auf den ersten Blick sehr gut aussah, musste auch die Zellschädigung begutachtet werden; Abbildung 64, S.142 stellt genau dies dar. In dem Diagramm sieht man, dass die Fraktionen 3, 4 und 5 sowie das ätherische Öl bei einer Konzentration von 100 µg/ml zu einer Zellschädigung führten. Dies ist natürlich nicht erwünscht, da idealerweise die Zellen „am Leben“ bleiben sollen. Man möchte eine gezielte Wirkung finden, ohne dass eine Zelltoxizität auftritt. Bei 30 µg/ml lagen die Testergebnisse auf dem Level der unbehandelten Zellen, daher war keine ersichtliche Zellschädigung festzustellen.

Resultate

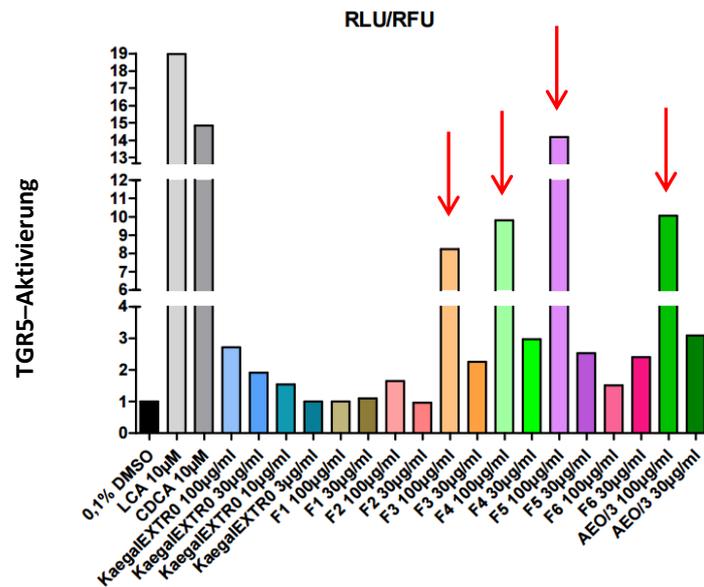


Abbildung 63 zeigt die **TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen**. Dabei wurde der Originalextrakt (KaegalEXTR0), die Fraktionen 1–6 und das ätherische Öl bei den Konzentrationsstufen 100 µg/ml und 30 µg/ml getestet; die Originalprobe zusätzlich noch bei den Konzentrationen 10 µg/ml und 3 µg/ml. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Der schwarze Balken zeigt die unbehandelten Zellen, während die anderen Balken die jeweilige Beschriftung widerspiegeln. Bei RFU handelt es sich um den normierten Fluoreszenz-Wert und bei RLU um den normierten Lumineszenz-Wert. Auf der y-Achse geben daher die Werte RLU/RFU die gemessene Lumineszenz, als Indikator der TGR5-Aktivität, normiert auf den Fluoreszenz-Wert, der uns als Kontrolle der Transfektion und zum Nachweis der Viabilität diente. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Proben. Es kann sehr gut erkannt werden, dass die Fraktionen 3, 4 und 5 sowie das ätherische Öl den TGR5-Rezeptor deutlich stärker aktivierten als der Originalextrakt. Mittelwert +/- Standardabweichung

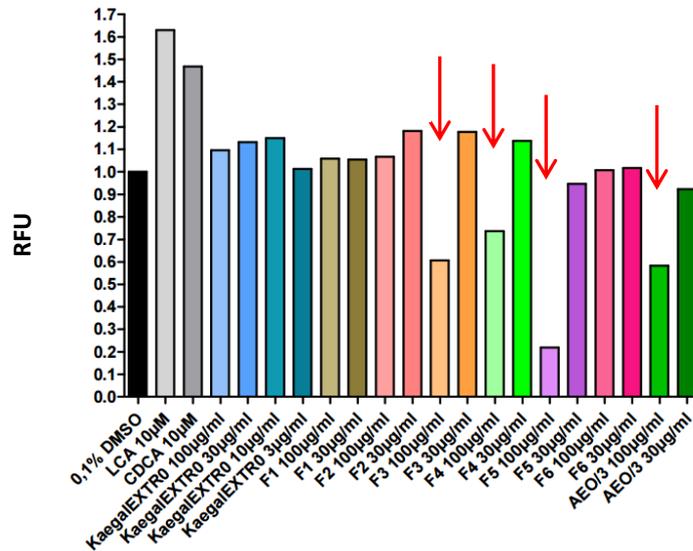


Abbildung 64 zeigt die Zellviabilitätsmessung bei unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei wurde der Originalextrakt (KaegalEXTR0), die Fraktionen 1–6 und das ätherische Öl bei den Konzentrationsstufen 100 µg/ml und 30 µg/ml getestet; die Originalprobe zusätzlich noch bei den Konzentrationen 10 µg/ml und 3 µg/ml. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Die x-Achse zeigt die verschiedenen Bezeichnungen und eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Proben, während die y-Achse den RFU-Wert wiedergibt. Bei RFU handelt es sich um den normierten Fluoreszenz-Wert. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelten Zellen, während die anderen Balken die jeweilige Beschriftung widerspiegeln. Es zeigte sich bei den Fraktionen 3, 4 und 5 sowie dem ätherischen Öl, dass bei einer Extraktkonzentration von 100 µg/ml eine doch vorhandene Zelltoxizität vorlag (mit roten Pfeilen markiert). Mittelwert +/- Standardabweichung;

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wirkung von *Kaempferia galanga* auf den TGR5-Rezeptor vermutlich auf die Fraktionen 3, 4 und 5 sowie das ätherische Öl beschränkt ist. In diesen sollte sich auch jene chemische Stoffgruppe befinden, die in der Lage ist, eine positive Modulation zu bewirken. Daher erfolgte auf der einen Seite sowohl eine massenspektrometrische Analyse des ätherischen Öls, um die Hauptkomponente zu detektieren und auf der anderen Seite, die Dereplikation der Fraktion 5. Diese Diplomarbeit beschränkt sich auf die Analyse der Fraktion 5, da dies sonst den Rahmen sprengen würde. In den nun folgenden Kapiteln, wird hierzu Stellung genommen.

3.4.4.1 GC-Analysen des ätherischen Öls

Der Bioaktivitätstest zeigte, dass das ätherische Öl eine potenzielle Wirkung auf den TGR5-Rezeptor hatte. Immerhin war es, neben der Fraktion 5, die zweit wirksamste Fraktion, die an HEK293-Zellen getestet wurde (siehe Abbildung 63, S.141). Deshalb wurde zuerst eine Massenbestimmung mit der GC-MS durchgeführt, um die Hauptinhaltsstoffe zu identifizieren. Im Anschluss wurde die quantitative Zusammensetzung der Fraktion KaegalDMP_AEO nach der 100%-Methode bestimmt; dies wurde mit einem GC-FID durchgeführt.

3.4.4.1.1 GC-MS

Das ätherische Öl, welches durch den Extraktionsprozess (siehe unter Kapitel 2.2.2, S.25) gewonnen wurde, löste man in CHCl_2 , damit es mit der GC untersucht werden konnte. Zum Einsatz kam das Gerät „GCMS QP2010“ von Shimadzu, wobei die dafür verwendeten Parameter in Kapitel 2.2.10.2, S.49 zusammengefasst sind. Nachdem ein entsprechendes „Tuning“ mit der GC-MS durchgeführt wurde, erfolgte die eigentliche Vermessung der Probe. Dabei entstand ein Chromatogramm, indem die Hauptpeaks eindeutig erkennbar waren. Für jeden Hauptpeak wurden die darunterliegenden EI-Massenspektren aufsummiert und gegen eine Spektren-Datenbank abgeglichen. Auf diesem Weg konnten sehr schnell die wahrscheinlichsten Verbindungen gefunden werden. Auch eine prozentuelle Angabe in Bezug auf die Ergebnissicherheit war vorhanden, wie sicher. Aufgrund dieser Vorgangsweise fand man vier Hauptkomponenten, die im ätherischen Öl enthalten waren. Dabei handelte es sich um die Ethyl-p-Methoxyzimtsäure, Eugenol, Ethyl-Zimtsäure und Eugenylacetat in fallender Konzentration. Teilweise entschlüsselte man diese Verbindungen bereits in Folge der Dereplikation (siehe Tabelle 35, S.122), allerdings konnten sehr flüchtige Verbindungen mit der HPLC-DAD-CAD nicht erfasst werden. Deshalb war der Einsatz der GC-MS für die Analyse des ätherischen Öls notwendig. Auch in der Literatur konnte man einige Übereinstimmungen feststellen. Der Wurzelstock beinhaltet circa 2,5 % ätherisches Öl, von dem wiederum circa 99 % der Inhaltsstoffe vollständig aufgeklärt wurden. Bei den Hauptkomponenten handelt es sich vor allem um Ethyl-p-Methoxyzimtsäure, Zimtsäureethylester und Pentadekan, aber auch andere chemische Verbindungen sind enthalten, wie 1,8-Cineol, Borneol, Camphen, links- und

Resultate

rechtsdrehendes α -Pinen, Δ -3-Caren, Kaempferol, Eucalyptol, β -Caryophyllen, um nur einige wenige zu nennen^{9 (S.13); 40 [6]}.

Abbildung 65 zeigt das Chromatogramm der GC-MS-Analyse des ätherischen Öls. Dabei war die Ethyl-p-Methoxyzimtsäure die Hauptkomponente in dem Öl. Im Zuge dieser Diplomarbeit beschränkte man sich auf die Detektion der Hauptkomponenten. Ein gezielter Bioaktivitätstest mit den Hauptsubstanzen (Ethyl-p-Methoxyzimtsäure, Eugenol, Ethyl-Zimtsäure und Eugenylacetat) an HEK293-Zellen wurde nicht durchgeführt. Deshalb war es auch nicht möglich, zu sagen, welche Verbindungen im ätherischen Öl für die positive Modulation des TGR5-Rezeptors verantwortlich waren.

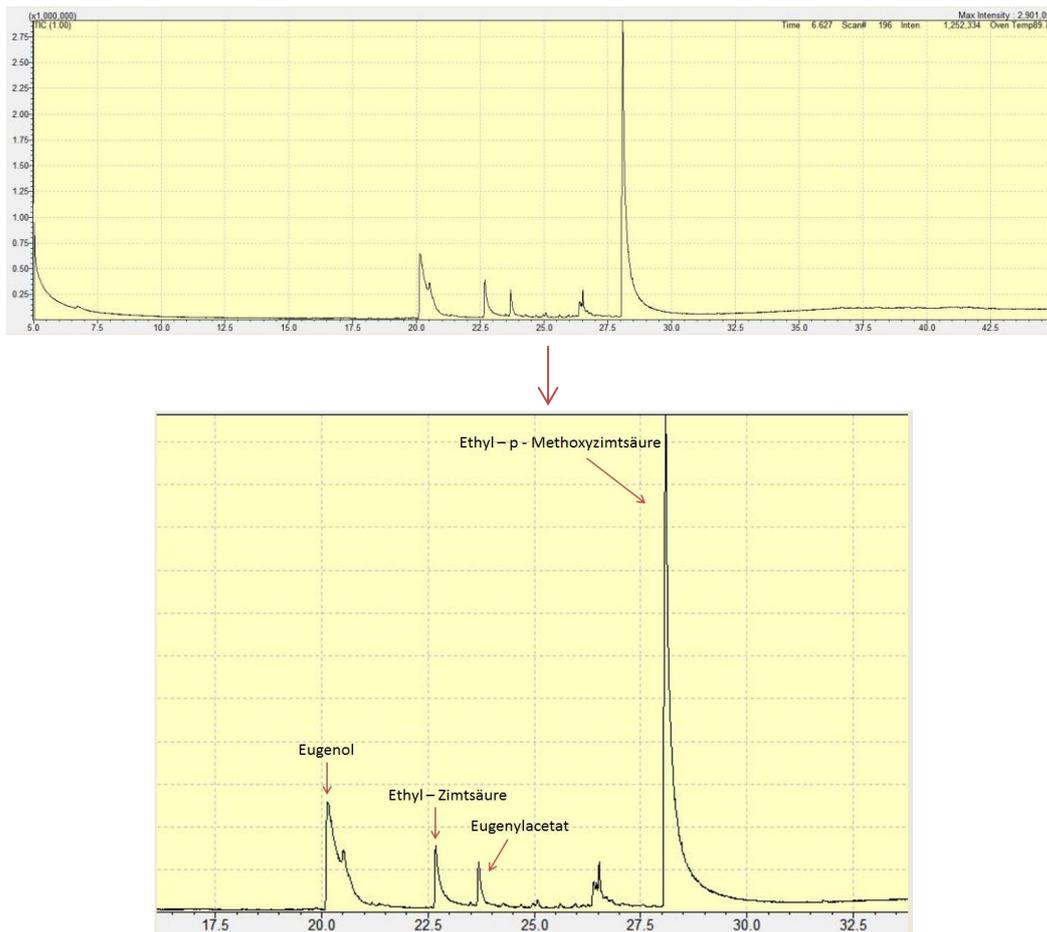


Abbildung 65 zeigt zum einen das **gesamte GC-MS Chromatogramm des ätherischen Öls** und zum anderen eine Teilvergrößerung daraus. Die großen Peaks deuten auf die Hauptkomponenten hin, die mit der GC-MS detektiert und zum Teil identifiziert wurden. Dabei konnte als Hauptkomponente die Ethyl-p-Methoxyzimtsäure gefunden werden; des Weiteren waren auch Eugenol, Eugenylacetat und Ethyl-Zimtsäure in größeren Mengen enthalten. Alle eingestellten Parameter können dem Kapitel 2.2.10.2, S.49 entnommen werden.

⁴⁰ Für Literaturrecherche siehe Kapitel 6.1.1, S.157 unter spice-pages.com / 2

3.4.4.1.2 GC-FID

Nach der erfolgreichen Identifikation der Hauptkomponenten mittels GC-MS, wurde die quantitative Zusammensetzung der Fraktion KaegalDMp_AEO nach der 100%-Methode bestimmt; dies wurde mit einem GC-FID durchgeführt. Die Funktionsweise des GC-FID und die eingestellten Parameter können dem Kapitel 2.2.10.1, S.48 entnommen werden. Das ätherische Öl (1,04 mg) wurde in Dichlormethan gelöst (1:100) und anschließend mit einer GC-Spritze 1 μ l in das Gerät injiziert. Die Analysenzeit betrug 30 min. Da jedoch bei diesem Vorgang der Hauptpeak (Ethyl-p-Methoxyzimtsäure) aufgrund von Detektorsättigung „abgeschnitten“ wurde, verdünnte man auf eine Konzentration von 1:1000 und injizierte davon wieder 1 μ l.

Abbildung 66, S.146 zeigt die detektierten Peaks, wobei die Ethyl-p-Methoxyzimtsäure jener Peak mit größter Konzentration war; alle anderen Peaks sind im Vergleich sehr gering. Tabelle 38, S.146 beinhaltet alle detektierten Peaks mit dazugehörigen Retentionszeiten, Flächen, Konzentrationen und Strukturen. Auch die Literatur zeigt, dass die Ethyl-p-Methoxyzimtsäure zu den Hauptkomponenten zählt, neben weiteren anderen wichtigen Inhaltsstoffen wie der Zimtsäureethylester, Pentadekane, 1,8-Cineol, Borneol, Camphen, links- und rechtsdrehendes α -Pinen, Δ -3-Caren, Kaempferol, Eucalyptol, β -Caryophyllen, um nur einige wenige zu nennen (Fußnote 9, S.13, Fußnote 41, S.146 und [6]).

Resultate

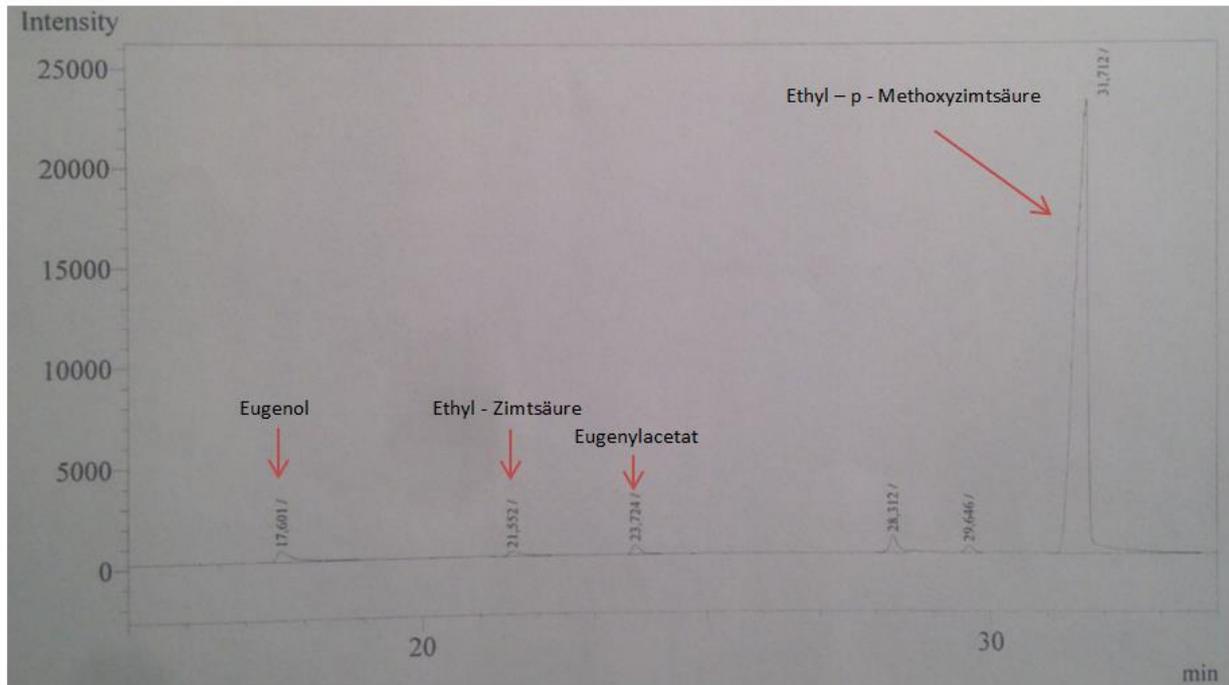


Abbildung 66 zeigt das **Chromatogramm der Fraktion KaegalDMp_AEO**, welches mit dem GC-FID erhalten wurde. Die eindeutige Hauptkomponente (Ethyl-p-Methoxyzimtsäure) trat bei einer Retentionszeit von 31,7 min auf und hatte eine Konzentration von 92,2 % bezogen auf die anderen detektierten Verbindungen.

Tabelle 38 zeigt die **Zusammensetzung des Ätherischen Öls nach der 100%-Methode**. Dabei ist die Ethyl-p-Methoxyzimtsäure jene Verbindung mit der größten Konzentration in der ätherischen Ölfraction (KaegalDMp_AEO). Gerät: GC-FID, Perkin Elmer

Peak-Nummer	Retentionszeit	Fläche	Konzentration	Verbindung
1	17,601	10035	2,527	Eugenol
2	21,552	3528	0,888	Ethyl-Zimtsäure
3	23,724	5064	1,275	Eugenylacetat
4	28,312	8803	2,217	-
5	29,646	3546	0,893	-
6	31,712	366183	92,200	Ethyl-p-Methoxyzimtsäure

3.4.4.2 Dereplikation der Fraktion 5

Die im Kapitel 3.4.4, S.139 näher abgehandelten Bioaktivitätstests zeigten, dass eine positive Modulation des TGR5–Rezeptors durch die Fraktionen 3–5 vorhanden war; alle anderen getesteten Fraktionen besaßen so eine Wirkung nicht. Überdies konnte bei *Kaempferia galanga* keine spezifische Stoffgruppe gefunden werden, die für die TGR5–Aktivierung verantwortlich war. Deshalb erfolgten die in den Kapiteln zuvor besprochene Fraktionierung und der DC–Vergleich mit dem Originalextrakt, um separierte Fraktionen des Extraktes zu erhalten. In der Abbildung 59, S.135 wird eine DC dargestellt, anhand derer die weitere Vorgangsweise abgeleitet wurde. Anhand dieser DC war es möglich zu entscheiden, welche Fraktion näher analysiert werden sollte. Der Hauptinhaltsstoff von Fraktion 3 ist ident mit der des ätherischen Öls und wurde bereits mittels GC-MS identifiziert, wohingegen sich die Zusammensetzung von Fraktion 5 deutlich unterscheidet. Fraktion 4 zeigte Charakteristia sowohl von Fraktion 3 als auch von Fraktion 5 und ist weniger aktiv als letztere. Daher fiel die Entscheidung, nur die Fraktion 5 zu dereplizieren.

Zu Beginn erfolgte eine Methodenoptimierung, um anschließend die Probe KaegalRDMp_F5 mit der hochauflösenden LC–ESI–TOF–Anlage massenspektrometrisch analysieren zu können. Die Auftrennung geschah mit der Methodenoptimierung 5, bei der die gewählte Gradientenelution einen Anstieg des Acetonitril-Gehalts in der mobilen Phase (A: 0,1% wässriger Ameisensäure / B: Acetonitril) von zunächst 65% auf 95% mit einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,3 ml/min und einer Säulenofentemperatur von 35 °C vorsah. Die Trennung der einzelnen Peaks war zum Teil nicht optimal, jedoch reichte dies für die eindeutige Zuordnung einer Masse aus. Der HPLC–Lauf benötigte insgesamt 49,5 min, wobei auch hier eine C₁₈-Umkehrphasenchromatographie zum Einsatz kam. Die korrekt gewählten Geräteeinstellungen sowie genauere Detailinformationen sind dem Kapitel 2.2.5.4, S.33 zu entnehmen.

Um die Dereplikation erfolgreich abzuschließen, erfolgte im Anschluss die Massenbestimmung der im Chromatogramm als Peaks ersichtlichen Verbindungen; dafür kam die hochauflösende LC–ESI–TOF–Anlage zum Einsatz. Das nun folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Massenanalyse; prinzipiell nachzulesen im Kapitel 3.2.1, S.60.

3.4.4.2.1 LC-ESI-TOF-Analyse der Fraktion 5

Auch bei der Fraktion 5 wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt; mit demselben Ziel, herauszufinden, welche Verbindungen in diesem Extrakt enthalten waren. Zur Analyse verwendete man die gleichen Systemeinstellungen, die auch für die Methodenoptimierung zur Anwendung kamen (siehe Kapitel 2.2.5.4, S.33 unter Methodenoptimierung 5). Nach der automatischen Injektion von 2 µl in den Kreislauf, erfolgte die Auftrennung durch das gewählte und voreingestellte System. Informationen darüber können dem Kapitel 2.2.6, S.40 entnommen werden. Um eventuelle Verunreinigungen ausschließen beziehungsweise in der Beurteilung berücksichtigen zu können, injizierte man zunächst obligatorisch Methanol als Leerprobe. Die Probenbezeichnung lautete KaegalDmp_F5 und die Analyse mit der hochauflösenden LC-ESI-TOF-Anlage praktizierte man sowohl im Positiv- als auch im Negativionenmodus. Die Abbildung aller Ergebnisse des negativen Modus mit den Daten des positiven Modus ist in der Tabelle 39, S.150 dargestellt. Diese Tabelle schlüsselt jeden einzelnen Peak nach entsprechenden Retentionszeiten, Masse zu Ladungsverhältnissen im positiven und negativen Modus, Summenformel und Molekulargewicht in Dalton (Da) auf; auch die vorhergesagte Struktur wird angegeben. Da es sich bei den dereplizierten Peaks lediglich um Fettsäuren handelte, wurde auch kein Massenspektrum in diese Diplomarbeit aufgenommen. Die Dereplikation wurde genau wie im Kapitel 3.2.1, S.60 bzw. wie bei *Syzygium aromaticum* und *Pimenta dioica* durchgeführt. Im Falle der Fraktion 5 handelte es sich leider nur um Fettsäuren, die für Aktivierung des TGR5-Rezeptors keine Bedeutung hatten. Es gab bis zu dem Zeitpunkt zumindest keine Publikation, die eine Wirkung auf Grund dieser Fettsäuren beschrieb. Da der Zeitrahmen für diese Diplomarbeit erschöpft war, wurden die Experimente an diesem Punkt trotzdem beendet.

Nichtsdestotrotz sollte über eine weitergehende Analyse der Fraktion 5 nachgedacht werden, da hier eventuell eine neue Struktur verborgen sein könnte, die auf den TGR5-Rezeptor aktivierend wirkt. Eine positive Wirkung lag definitiv vor, wie die Abbildung 63, S.141 zeigte. Die vorhandene Zellschädigung bei einer Konzentration von 100 µg/ml sollte natürlich nicht vernachlässigt und mitberücksichtigt werden (siehe Abbildung 64, S.142).

Die Abbildung 67, S.149 zeigt ein komplettes Übersichtschromatogramm der Probe KaegalDmp_F5 im Negativ- und Positivionenmodus. In diesem sind verschiedene Peaks mit unterschiedlicher Intensität und Retentionszeiten dargestellt.

Resultate

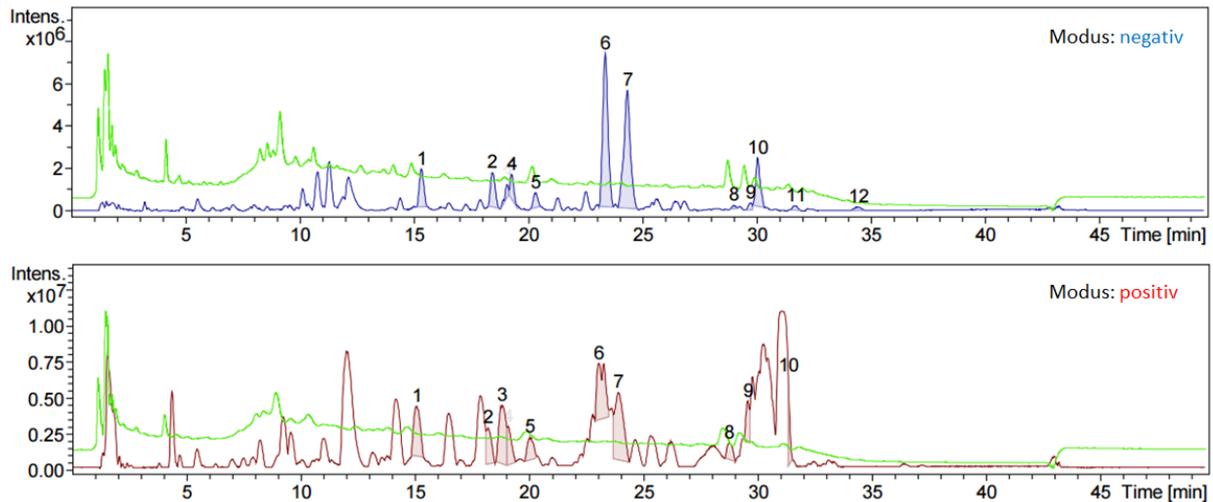


Abbildung 67 zeigt das **gesamte Inhaltsstoffprofil** der Probe **KaegalDMp_F5** sowohl im **Negativ-** als auch **Positivionenmodus**. Die Chromatogramme wurden mit der hochauflösenden LC-ESI-TOF-Anlage mit der Methodenoptimierung 5 aufgenommen. Für alle beschrifteten Peaks erhielt man auch entsprechende Massenspektren, wobei nur die Peaks 5, 7 und 8 als Fettsäuren derepliziert wurden; allen anderen Peaks konnten keine Verbindungen zugeordnet werden. Gradient: 65–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 2 µl; Flussrate: 0,3 ml/min; Ofentemperatur: 25,0 °C;

Resultate

Tabelle 39 Inhaltsstoffprofil der Probe KaegalDMp_F5; Analyse der Massen erfolgte mit der LC–ESI–TOF–Anlage; n. d. = nicht detektiert;

Peak	RT [min]	m/z Pos.	m/z Neg.	Summenformel	MW [Da]	vorhergesagte Struktur	CAS Nr.	TGR5
FR ₁	15,2	355,2841	399,2754	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	354,3	-	-	X
FR ₂	18,3	431,3726	475,3645	C ₂₅ H ₅₀ O ₅	430,4	-	-	X
FR ₃	18,9	331,2839	375,2752	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330,3	-	-	X
FR ₄	19,1	343,2264	n. d.	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	342,2	-	-	X
FR ₅	19,2	n. d.	279,2329	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,2	Linolsäure	463-40-1	X
FR ₆	20,2	357,2998	401,2910	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	356,3	-	-	X
FR ₇	23,0	257,2471	255,2332	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,2	Palmitinsäure	57-10-3	X
FR ₈	24,0	283,2630	281,2488	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,3	Ölsäure	112-80-1	X
FR ₉	28,8	607,4211	605,4061	C ₃₅ H ₅₈ O ₈	606,4	-	-	X
FR ₁₀	29,6	607,4205	605,4066	C ₃₅ H ₅₈ O ₈	606,4	-	-	X
FR ₁₁	30,0	n. d.	283,2649	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,3	Stearinsäure	57-11-4	X
FR ₁₂	31,3	338,3421	n. d.	C ₂₂ H ₄₃ NO	337,3	-	-	X
FR ₁₃	31,7	-	981,5790	C ₇₀ H ₇₈ O ₄	982,6	-	-	X
FR ₁₄	34,4	-	621,4373	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	622,4	-	-	X

Eine weitere wissenschaftliche Aufarbeitung von KaegalDMp_F5 im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht durchgeführt, da ein weiterer Fortschritt bei *Kaempferia galanga* nur dann gelingen könnte, wenn man die Strukturen der unbekanntenen Verbindungen aufklären würde. So könnte die Chance bestehen, entweder eine publizierte Verbindung oder eine neuartige Struktur zu entdecken, die auf den TGR5–Rezeptor wirkt. Bevor man jedoch ein derartiges Projekt startet, sollte zuvor die Sinnhaftigkeit noch einmal gründlich abgeklärt werden, da die Strukturaufklärung aufgrund der sehr gering enthaltenen Mengen der bioaktiven Verbindungen in *Kaempferia galanga* problematisch werden könnte.

4 Zusammenfassung

Der Rahmen für diese Diplomarbeit leitete sich aus einer vorangegangenen Diplomarbeit ab, in der die Einflüsse des gastrointestinalen Traktes auf pflanzliche Inhaltsstoffe untersucht werden sollten. Da die Applikation vieler pflanzlicher Heilmittel oral erfolgt, werden viele nicht sofort resorbierte Inhaltsstoffe dem Darmmilieu ausgesetzt und von der mikrobiellen Flora in unterschiedlicher Art und Weise umgewandelt. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, wie verschiedene Pflanzenextrakte bei der Passage durch das Darmmilieu – hier durch eine Inkubation mit aufgeschlämmtem Mäusekot simuliert - umgewandelt werden. Wie sich an den ausgewählten Beispielen zeigte, hatte die Biotransformation keine Auswirkung auf die eigentliche TGR5-Rezeptor-Aktivierung. Die verwendeten und getesteten pflanzlichen Extrakte wurden nach ihrem Gehalt an Triterpenoiden ausgewählt, da diese den TGR5-Rezeptor besonders gut aktivieren können. Anhand der Testergebnisse kristallisierten sich drei Pflanzen heraus, die in der Lage waren, den TGR5–Rezeptor bei einer Konzentration von 100 µg/ml signifikant zu stimulieren. Dabei handelt es sich um *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (Blütenknospen), *Pimenta dioica* (L.) Merr. (Früchte) und *Kaempferia galanga* L. (Rhizom) [7].

In dieser Diplomarbeit wurden diese drei Pflanzen näher untersucht, um herauszufinden, welche Verbindungen nun tatsächlich für die TGR5–Stimulierung verantwortlich waren. *Syzygium aromaticum* war jene Pflanze, die bei einer Konzentration von 100 µg/ml sogar eine bessere Bioaktivität zeigte als die entsprechenden Positivkontrollen. *Pimenta dioica* hingegen zeigte eine geringere, aber doch deutlich vorhandene Modulierung, die aber niedriger war, als die der Positivkontrollen. *Kaempferia galanga* ergab eine etwas geringere Aktivierung als dies bei *Pimenta dioica* der Fall war. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war die sehr geringe bis fehlende Zelltoxizität der getesteten Pflanzenextrakte.

Die Dereplikation ergab, dass sowohl bei den Extrakten von *Syzygium aromaticum* als auch *Pimenta dioica* die Triterpensäuren für die Aktivierung des TGR5–Rezeptors verantwortlich sind; verschiedene Publikationen wiesen ebenfalls darauf hin. Dabei handelte es sich bei *Syzygium aromaticum* um die Oleanolsäure und die Maslinsäure, bei *Pimenta dioica* zusätzlich noch um die Ursolsäure und die Corosolsäure. Durch die im Anschluss durchgeführte Quantifizierung der Triterpensäuren in den Extrakten und die Austestung der Triterpensäure-Mischungen an HEK293–Zellen in den selben Konzentrationen, in denen sie im Extrakt vorlagen,

Abstract

konnte die Wirkung der Extrakte mehr oder weniger vollständig auf diese Verbindungen zurückgeführt werden.

Kaempferia galanga enthält keine Triterpensäuren in relevanten Mengen, folglich dürfte eine andere Stoffgruppe für die positive TGR5-Modulation verantwortlich sein. Nach einer Fraktionierung des Extraktes (inkl. Gewinnung des ätherischen Öls) und Austestung der dabei erhaltenen Fraktionen an HEK293-Zellen stellte sich heraus, dass die Fraktionen 3–5 und das ätherische Öl eine Wirkung zeigten; zusätzlich aber auch eine Zellschädigung bei einer Konzentration von 100 µg/ml verursachten. Es folgten massenspektrometrische Analysen der Fraktion 5 und des ätherischen Öls. Dabei konnten in der Fraktion 5 Fettsäuren derepliziert werden, beim ätherischen Öl war die Ethyl-p-Methoxyzimtsäure die Hauptkomponente. Deshalb kann nur vermutet werden, dass diese identifizierten Komponenten den TGR5-Rezeptor modulieren können. Welche dies sind, könnte man gegebenenfalls durch weitere Analysen herausfinden.

5 Abstract

The framework for this thesis was obtained from a previous thesis, in which the influence of the gastrointestinal tract on herbal ingredients was examined. Since the application of many herbal remedies is oral, the ingredients are exposed to the intestinal environment to be either rapidly taken up by absorption or metabolized by the microbial flora in different ways. The aim of this diploma thesis was to find out, if and how different plant extracts are converted by the gut environment during the passage – simulated here by incubation with mouse fecal slurry. The herbal extracts used and tested were selected by their content of triterpenes, because they are partly known to stimulate the TGR5-receptor. According to the test results, three plant extracts were able to significantly activate the TGR5-receptor at a concentration of 100 µg/ml.

The three plants *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (flower buds), *Pimenta dioica* (L.) Merr. (fruits) and *Kaempferia galanga* L. (rhizome) were examined [7].

In this thesis their extracts were analyzed in detail to find out which compounds were responsible for the stimulation of the TGR5-receptor. Extracts of *Syzygium aromaticum* was able to modulate the receptor more strongly than the corresponding positive controls at a tested

Abstract

concentration of 100 µg/ml. *Pimenta dioica* however, showed a comparably lower but still highly significant modulation, which was lower than the positive controls but higher than the extracts from *Kaempferia galanga*. Another important outcome was the very low or absent cytotoxicity of the extracts obtained from *Syzygium aromaticum* and *Pimenta dioica*; only some cytotoxicity was observed for the fractions from *Kaempferia galanga* at a tested concentration of 100 µg/ml.

The dereplication revealed that in the extracts of *Syzygium aromaticum* and *Pimenta dioica*, triterpene acids were responsible for the TGR5-activation; various publications pointed that out. In *Syzygium aromaticum*, oleanolic acid as well as maslinic acid and in *Pimenta dioica* additionally ursolic acid and corosolic acid were responsible for the activation. The quantification of the triterpene acids in the extracts followed by bioactivity testing of the reconstituted triterpene acid mixtures on HEK293-cells, allowed the assignment of the TGR5 activity of the plants extracts predominantly to these compounds.

The investigated extract of *Kaempferia galanga* contained no triterpen acids in relevant amounts; consequently, a different class of substances is supposed to contribute to the TGR5-modulation. Fractions and the distilled essential oil were tested on HEK293-cells; These experiments showed an effect of fractions 3–5 and of the essential oil; however, cell damage at a concentration of 100 µg/ml could be seen as well for each fraction. Mass spectrometric analysis revealed mainly fatty acids in fraction 5 and ethyl-p-methoxycinnamate as main compound in the essential oil. Based on these analyses, it is highly likely that these compound classes in the extract of *Kaempferia galanga* contribute to the moderate activation of the TGR5-receptor. For the unambiguous identification further investigations would be necessary.

6 Literaturverzeichnis

1. Max Wichtl, U.B., Günther Hanke, Martin Tegtmeier, *Teedrogen und Phytopharmaka: Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage* 2008. p. 154-154.
2. Cortes-Rojas, D.F., C.R. de Souza, and W.P. Oliveira, *Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2014. **4**(2): p. 90-6.
3. Zhang, L. and B.L. Lokeshwar, *Medicinal properties of the Jamaican pepper plant Pimenta dioica and Allspice*. Current Drug Targets, 2012. **13**(14): p. 1900-6.
4. Kikuzaki, H., et al., *Galloylglucosides from berries of Pimenta dioica*. Journal of natural products, 2000. **63**(6): p. 749-752.
5. Padmakumari, K.P., I. Sasidharan, and M.M. Sreekumar, *Composition and antioxidant activity of essential oil of pimento (Pimenta dioica (L) Merr.) from Jamaica*. Natural product research, 2011. **25**(2): p. 152-160.
6. Umar, M.I., et al., *Phytochemistry and medicinal properties of Kaempferia galanga L. (Zingiberaceae) extracts*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011. **5**(14): p. 1638-1647.
7. Faur, N., *Elaboration and Validation of a Protocol for Gut Microbial Transformed Herbal Preparations*, in *Department for Pharmacognosy* 2016, University of Vienna: Vienna.
8. Pols, T.W., et al., *The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation*. Journal of hepatology, 2011. **54**(6): p. 1263-72.
9. Duboc, H., Y. Tache, and A.F. Hofmann, *The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application*. Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 2014. **46**(4): p. 302-12.
10. Camp, D., et al., *Drug-like properties: guiding principles for the design of natural product libraries*. Journal of natural products, 2012. **75**(1): p. 72-81.
11. Granica, S., et al., *Development and validation of HPLC-DAD-CAD-MS(3) method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in Agrimoniae eupatoriae herba (Ph. Eur)*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2013. **86**: p. 112-22.
12. Vehovec, T. and A. Obreza, *Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector*. Journal of chromatography. A, 2010. **1217**(10): p. 1549-56.
13. Fothergill, W.T., *Gas chromatography. Technique*. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1968. **61**(5): p. 525-8.
14. Nielsen, K.F., et al., *Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS*. Journal of natural products, 2011. **74**(11): p. 2338-48.

Literaturverzeichnis

15. Begum, S.S.T., Saima; Siddiqui, Bina Shaheen; Nizami, Shaikh Sirajuddin; Ghulam, Hina; Ahmad, Aqeel *In vitro antibacterial and antifungal activity of flower buds (clove) of Syzygium aromaticum*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2014. **36**(4): p. 723-727.
16. Kim, J.H., et al., *Simultaneous Determination of Gallic Acid, Ellagic Acid, and Eugenol in Syzygium aromaticum and Verification of Chemical Antagonistic Effect by the Combination with Curcuma aromatica Using Regression Analysis*. Journal of analytical methods in chemistry, 2013. **2013**: p. 375294.
17. Li, D.Q., et al., *A novel sample preparation and on-line HPLC-DAD-MS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts: case study of alpha-glucosidase*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014. **88**: p. 130-5.
18. Dalai, M.K., et al., *Anti-cholinesterase activity of the standardized extract of Syzygium aromaticum L*. Pharmacognosy magazine, 2014. **10**(Suppl 2): p. S276-82.
19. Gupta, M., et al., *GCMS analysis and identifications of chemical constituents of Syzygium aromaticum, Brassica compestris and cow ghee* Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2015. **7**(1): p. 568 - 572.
20. Syamsundar, K.V., S.K. Srivastava, and A.K. Srivastava, *Bud and leaf essential oil composition of Syzygium aromaticum from India and Madagascar*. FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL, 2005. **20**: p. 51 - 53.
21. Genet, C., et al., *Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes*. Journal of medicinal chemistry, 2010. **53**(1): p. 178-90.
22. Zhang, L. and B.L. Lokeshwar, *Medicinal Properties of the Jamaican Pepper Plant Pimenta dioica and Allspice*. Current Drug Targets, 2012. **13**(14): p. 1900-1906.
23. Kikuzaki, H., et al., *Antioxidative phenylpropanoids from berries of Pimenta dioica*. Phytochemistry, 1999. **52**(7): p. 1307-1312.
24. Genet, C., et al., *Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid, A Novel and Selective TGR5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes*. Journal of medicinal chemistry, 2010. **53**(1): p. 178-190.
25. Lopez-Garcia, S., et al., *Macrophage Activation by Ursolic and Oleanolic Acids during Mycobacterial Infection*. Molecules, 2015. **20**(8): p. 14348-14364.
26. Jiang, Z.T., et al., *Composition Comparison of Essential Oils Extracted by Classical Hydro distillation and Microwave-assisted Hydrodistillation from Pimenta dioica*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2013. **16**(1): p. 45-50.
27. Muhammad Nor Omar, N.H.M.H., Helmi Yousif Alfarra, Mohd Ambar Yarmo, Ahmad Muzammil Zuberdi *Antimicrobial Activity and Microbial Transformation of Ethyl p-Methoxycinnamate Extracted from Kaempferia galanga*. Oriental Journal of chemistry, 2014. **30**(3): p. 1037 - 1043.
28. Ko, H.J., et al., *Hypopigmentary effects of ethyl P-methoxycinnamate isolated from Kaempferia galanga*. Phytotherapy research : PTR, 2014. **28**(2): p. 274-9

6.1 URL-Adressen

In diesem Abschnitt können alle URL-Adressen entnommen werden, die für Literaturrecherche herangezogen wurden.

6.1.1 Literaturrecherche

chemgapedia.de aufgerufen am 09.08.2016

http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/detektoren/diodenarray/dad1m75ht0201.vscml.html

chemie.de aufgerufen am 08.08.2016

<http://www.chemie.de/news/44704/charged-aerosol-detector-cad-fuer-die-hplc-technologie.html>

Flammenionisationsdetektor aufgerufen am 15.08.2016

<https://de.wikipedia.org/wiki/Flammenionisationsdetektor>

Gewürzlilie aufgerufen am 14.08.2016

<https://de.wikipedia.org/wiki/Gew%C3%BCrzlilie>

kromidas.de aufgerufen am 26.04.2017

<http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/HPLCfuerNeueinsteiger.pdf>

Literaturverzeichnis

padma.ch aufgerufen am 14.08.2016

<http://www.padma.ch/pflanzen/pflanzenportraits/g-l/kaempferia-galanga-l/>

Pimenta dioica aufgerufen am 13.08.2016

<https://de.wikipedia.org/wiki/Piment>

spice-pages.com / 1 aufgerufen am 13.08.2016

http://gernot-katzers-spice-pages.com/germ/Pime_dio.html

spice-pages.com / 2 aufgerufen am 14.08.2016

http://gernot-katzers-spice-pages.com/germ/Kaem_gal.html

tu-chemnitz.de aufgerufen am 10.08.2016

<https://www.tu-chemnitz.de/chemie/anorg/files/geraete/masse.pdf>

univie.ac.at aufgerufen am 08.08.2016

https://www.univie.ac.at/nutrigenomics/teaching/vo_methoden/LC_MSTeil2.pdf

Waters.com aufgerufen am 20.05.2016

http://www.waters.com/waters/de_AT/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=10048919&locale=de_AT

web.archive.org aufgerufen am 08.08.2016

<https://web.archive.org/web/20070914071719/http://www.uft.uni-bremen.de/chemie/Chromatography/chromhis.htm>

zimmermann.chemie.uni-rostock.de aufgerufen am 30.04.2017

<http://www.zimmermann.chemie.uni-rostock.de/tech-ausstattung/analyseprinzipien/ionenfalle/>

6.1.2 Bildrecherche

Arrellanolimitada.com aufgerufen am 20.05.2016

http://www.arelolanolimitada.com.bo/sites/default/files/productos_thermoscientific/ultimate3000-2.jpg

blogspot.com aufgerufen am 11.08.2016

http://4.bp.blogspot.com/_yak6YgNZso/VNiDjYfRhI/AAAAAAAAp6k/PD5FZmAaZ2E/s1600/berlin-museum_fuer_kommunikation-27053107.jpg

carloth.com aufgerufen am 09.08.2016

https://www.carloth.com/medias/sys_master/product_images_de/product_images_de/hb9/ha9/10536444461086.jpg

dionex.com aufgerufen am 08.08.2016

http://www.dionex.com/en-us/webdocs/88701-Bro-Corona-ultraRS-BR70193_E.pdf

dionexsoftron.de aufgerufen am 02.09.2017

http://dionexsoftron.de/wp-content/uploads/2013/07/CoronaVeo_left-facing_900px.jpg

gfnfoodsales.com aufgerufen am 13.08.2016

<http://gfnfoodsales.com/wp-content/uploads/2016/04/allspice-spices-companies.jpg>

gingersofindia.com aufgerufen am 13.08.2016

http://www.gingersofindia.com/images/phocagallery/Kaempferia/thumbs/phoca_thumb_l_k_aempferia%20galanga.jpg

nih.gov aufgerufen am 10.08.2016

https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/173/2928275/PMC2928275_pone.0012403.g002.png

phyproof.phytolab.de aufgerufen alle am 12.08.2016

Maslinsäure

<https://phyproof.phytolab.de/media/catalog/product/cache/1/image/800x600/17f82f742ffe127f42dca9de82fb58b1/8/3/83209.jpg>

Corosolsäure

<http://phyproof.phytolab.de/media/catalog/product/cache/1/image/265x265/17f82f742ffe127f42dca9de82fb58b1/8/0/80065.jpg>

Ursolsäure

<http://phyproof.phytolab.de/media/catalog/product/cache/2/image/265x265/17f82f742ffe127f42dca9de82fb58b1/8/9/89541.jpg>

researchgate.net aufgerufen am 15.08.2016

https://www.researchgate.net/profile/Alan_Hofmann/publication/259697661/figure/fig2/AS:297091428569093@1447843524687/Fig-2-3D-structure-of-TGR5-The-receptor-comprises-seven-transmembrane-helices.png

wikimedia.org am aufgerufen 14.08.2016

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/Lesser_galangal_Kencur_Luc_Viatour.jpg

zutaten-shop.ch aufgerufen am 11.08.2016

<http://zutaten-shop.ch/WebRoot/Store/Shops/174024/55AA/71C8/EE34/C6C2/9021/0A00/0E18/7A35/Gewuerznelken.jpg>

Ich habe mich bemüht, sämtliche URL-Adresse anzugeben, die ich für die Literatur- und Bildrecherche verwendet habe. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Benachrichtigung.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
[M - H] ⁻	deprotoniertes Molekül im negativen Ionenmodus der Massenspektrometrie
[M + H] ⁺	protoniertes Molekül im positiv Ionenmodus der Massenspektrometrie
ACN	Acetonitril
BPC	Basispeak-Chromatogramm
CAD	Charged Aerosol Detektor
CDCA	Chenodesoxycholsäure
CHCl ₂	Dichlormethan
CoA	Coenzym A
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ECL	extrazelluläre Schleife
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein
EI	Elektronenionisation
ELSD	Lichtstreuendetektor

Anhang

ESI	Elektrospray-Ionisation
FBS	Fetales Kälberserum
FS₀	Steriler Mäusekot
FS₂₄	nicht steriler Mäusekot
FXR-Rezeptor	Farnesoid X Rezeptor
GC-FID	Gaschromatographie Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H₂O	Wasser
HBS	HEPES-buffered saline
HEK293-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen, Zelllinie 293
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICL	intrazelluläre Schleife
IL-1α	Interleukin 1 α
IL-1β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
Kaegal	DCM / MeOH-Extrakt von <i>Kaempferia galanga</i>
Kaegal_DM	gleiches Herstellungsverfahren wie KaegalRDMp
KaegalDMP	Extrakt der aus dem Rhizom von <i>Kaempferia galanga</i> gewonnen wurde
KaegalRDMp	gleiches Herstellungsverfahren wie Kaegal_DM
KaegalRM / 0,1 % FA_1:100	Extrakt, der nach dem Herstellungsverfahren des Originalextrakts von <i>Kaempferia galanga</i> gewonnen wurde
KaegalRM_AEO	Ätherisches Öl gewonnen aus dem Rhizom von <i>Kaempferia galanga</i> gelöst in Methanol
LCA	Lithocholsäure
MeOH	Methanol

Anhang

NF-κB-Weg	Nuklear Faktor-κB-Weg
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Pimdio	DCM / MeOH-Extrakt von <i>Pimenta dioica</i>
Pimdio_EXTR_0h	Extrakt von <i>Pimenta dioica</i> mit sterilem, aufgeschwemmten Mäusekot behandelt
Pimdio_EXTR_24h	Extrakt von <i>Pimenta dioica</i> 24-Stunden mit nicht-sterilem, aufgeschwemmten Mäusekot behandelt
RFU	Relative Fluoreszenz-Intensität
RLU	Relative Lumineszenz Intensität
Rpm	Umdrehungen pro Minute
Syzaro	DCM / MeOH-Extrakt von <i>Syzygium aromaticum</i>
Syzaro(DM)	Synonym: Syzaro_DM
Syzaro_DM	Synonym: Syzaro(DM)
SyzaroEXTR0h	Extrakt von <i>Syzygium aromaticum</i> mit sterilem, aufgeschwemmten Mäusekot behandelt
SyzaroEXTR24h	Extrakt von <i>Syzygium aromaticum</i> 24-Stunden mit nicht-sterilem, aufgeschwemmten Mäusekot behandelt
TGR5-Rezeptor	G-Protein gekoppelter Rezeptor 19
TMH	transmembranäre Helix
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α
UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie

7.2 Massenspektren von *Syzygium aromaticum*

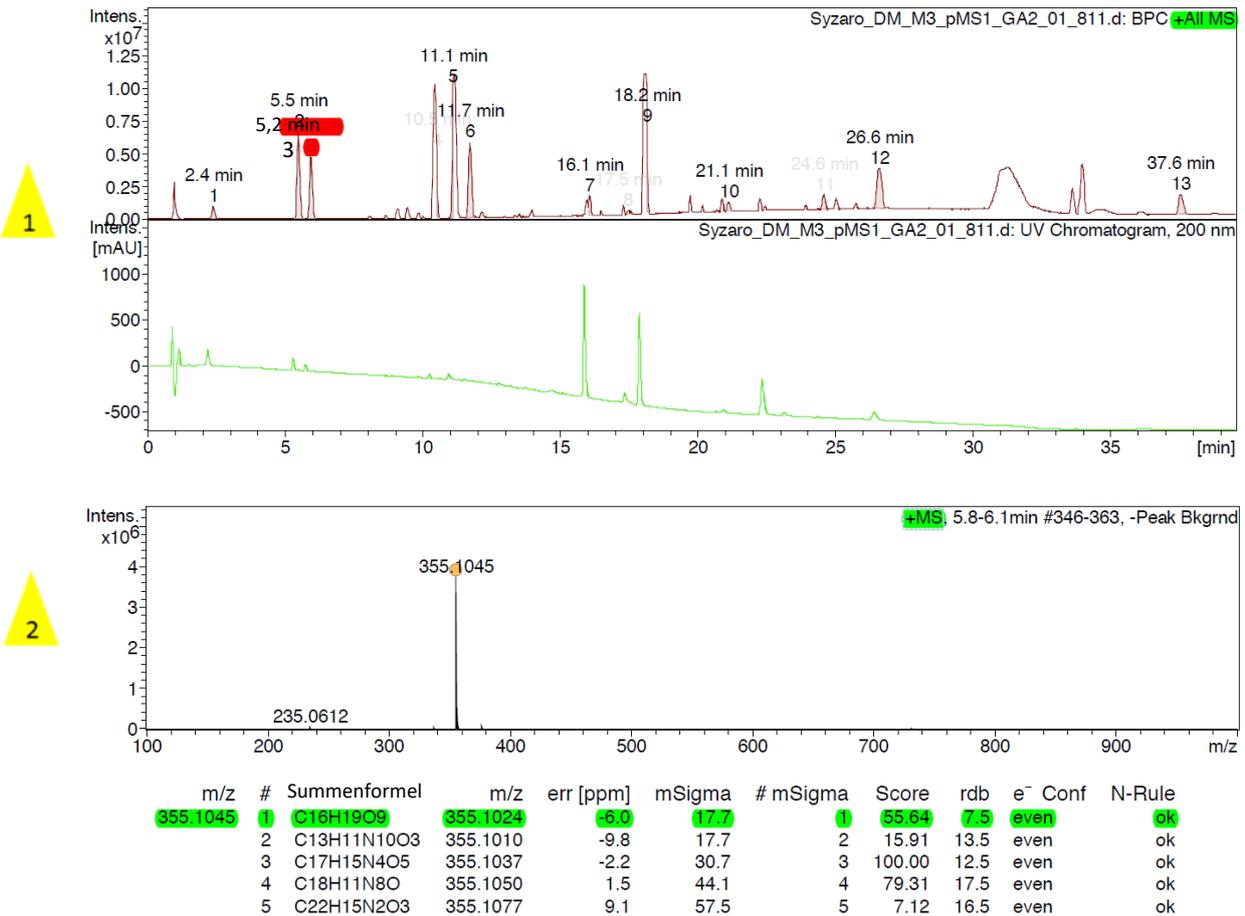


Abbildung 68 zeigt das **Massenspektrum des Biflorins**, das in der Probe Syzaro_DM enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Positivionenmodus mit einem LC-ESI-TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Syzaro_DM, das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) spiegelt das Massenspektrum des Biflorins wider. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 5,8-6,1 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Das Biflorin erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 5,9 min und wurde vor allem als $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 355,1045 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm fünf Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel C₁₆H₁₉O₉ die plausible ist. Um auf die Summenformel des Biflorins zu kommen, muss das bei der Ionisierung zusätzlich vorhandene Proton abgezogen werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt C₁₆H₁₈O₉.

Anhang

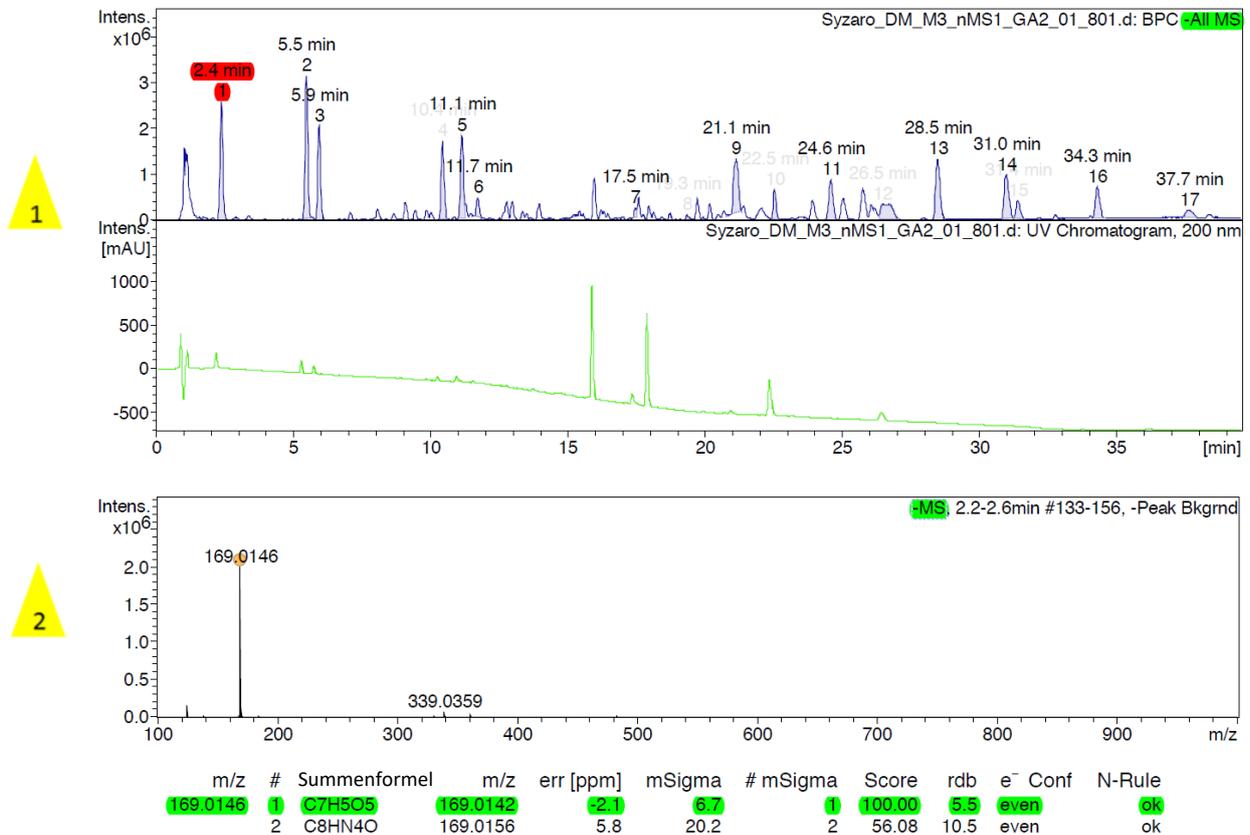


Abbildung 69 zeigt das Massenspektrum der Gallussäure, die in der Probe Syzaro_DM enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit einem LC-ESI-TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Syzaro_DM, das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der Gallussäure wieder. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 2,2-2,6 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die Gallussäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 2,4 min und wurde vor allem als $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 455,3541 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm zwei Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel $C_7H_5O_5$ die plausible ist. Um auf die Summenformel der Gallussäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_7H_6O_5$.

Anhang

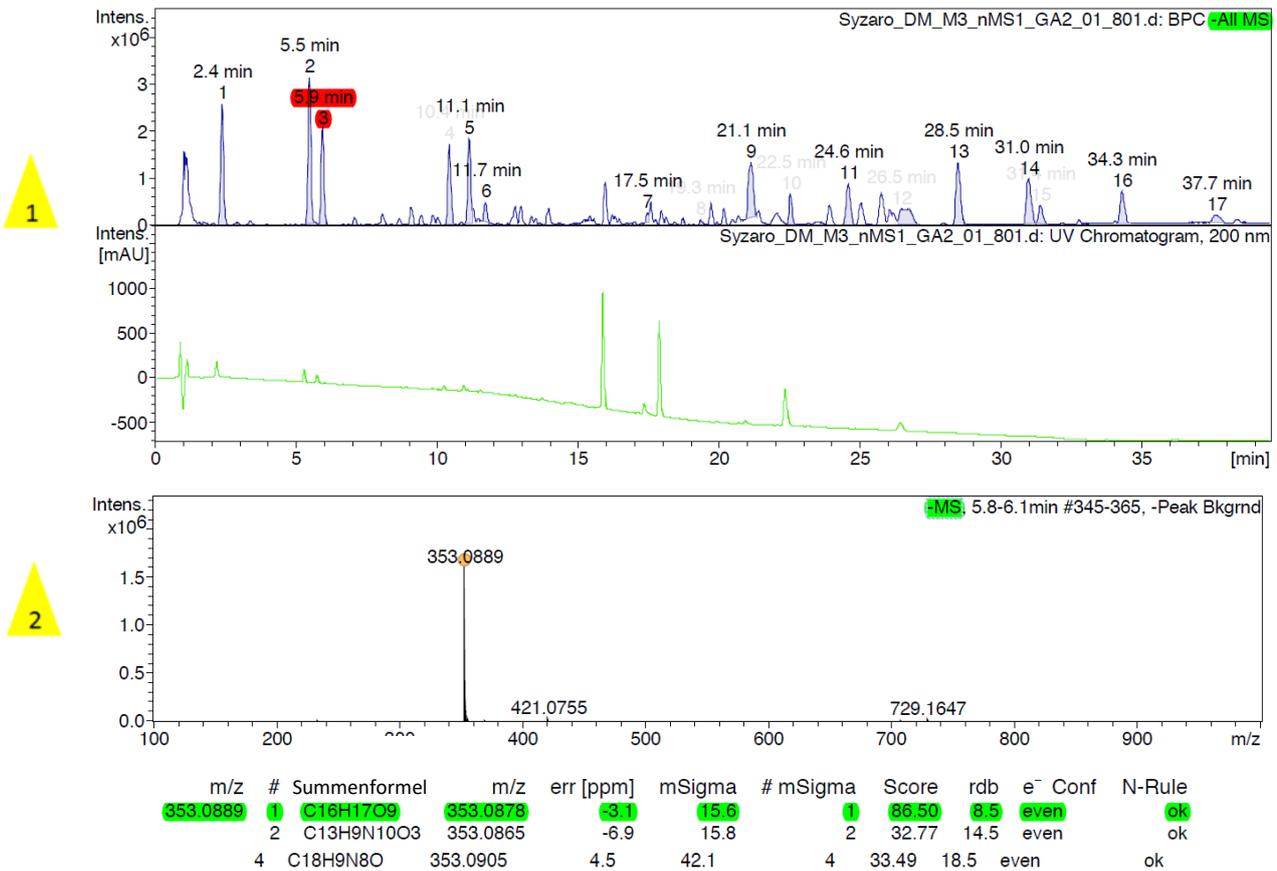


Abbildung 70 zeigt das Massenspektrum des Biflorins, das in der Probe Syzaro_DM enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit einem LC–ESI–TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Syzaro_DM, das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV–Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) spiegelt das Massenspektrum des Biflorins wider. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 5,8–6,1 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Das Biflorin erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 5,9 min und wurde vor allem als [M–H]⁻-Ion bei m/z 353,0889 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm vier Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel C₁₆H₁₇O₉ die plausible ist. Um auf die Summenformel des Biflorins zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt C₁₆H₁₈O₉.

Anhang

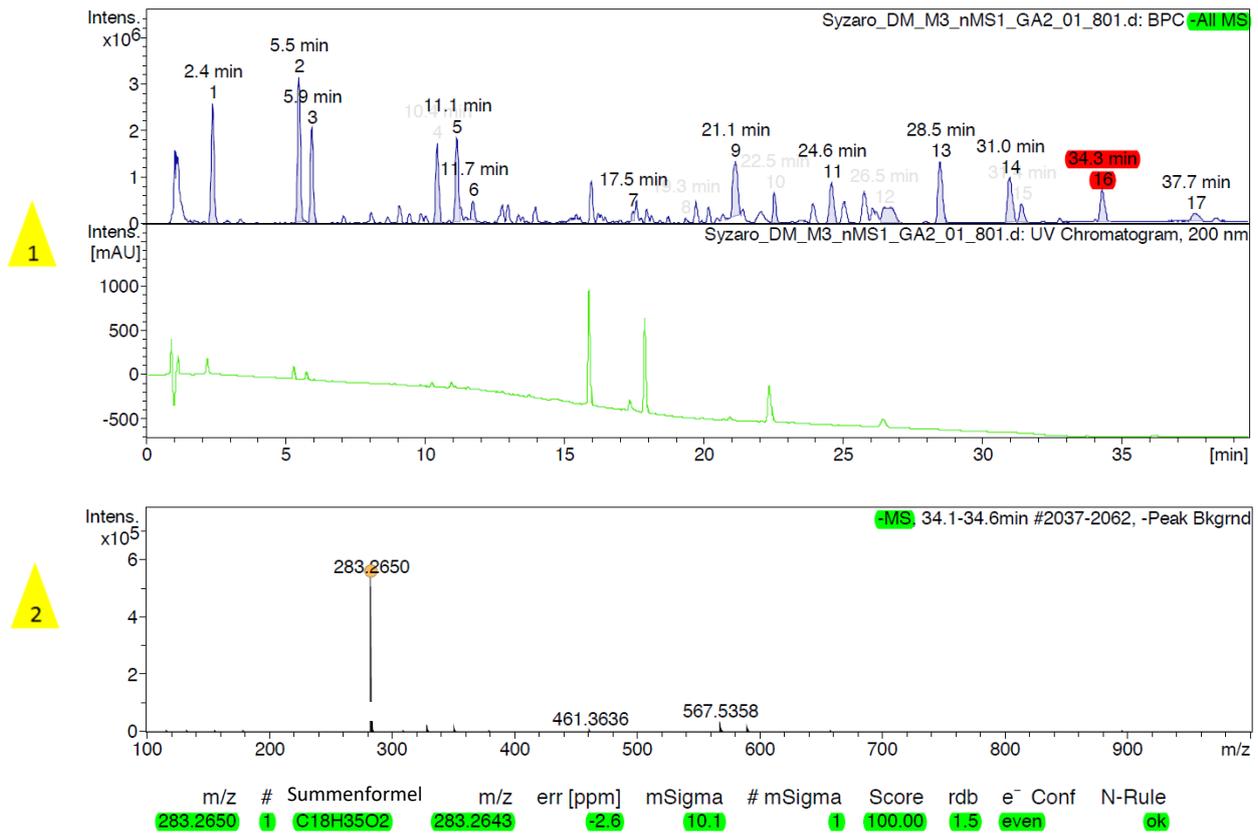


Abbildung 71 zeigt das **Massenspektrum der Ölsäure**, die in der Probe Syzaro_DM enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit einem LC-ESI-TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Syzaro_DM, das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) spiegelt das Massenspektrum der Ölsäure wider. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 34,1-34,6 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die Ölsäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 34,7 min und wurde vor allem als [M-H]⁻-Ion bei m/z 283,2650 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm eine Summenformel vor, wobei die grün hinterlegte Formel C₁₈H₃₅O₂ die plausible ist. Um auf die Summenformel der Ölsäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt C₁₈H₃₆O₂.

Anhang

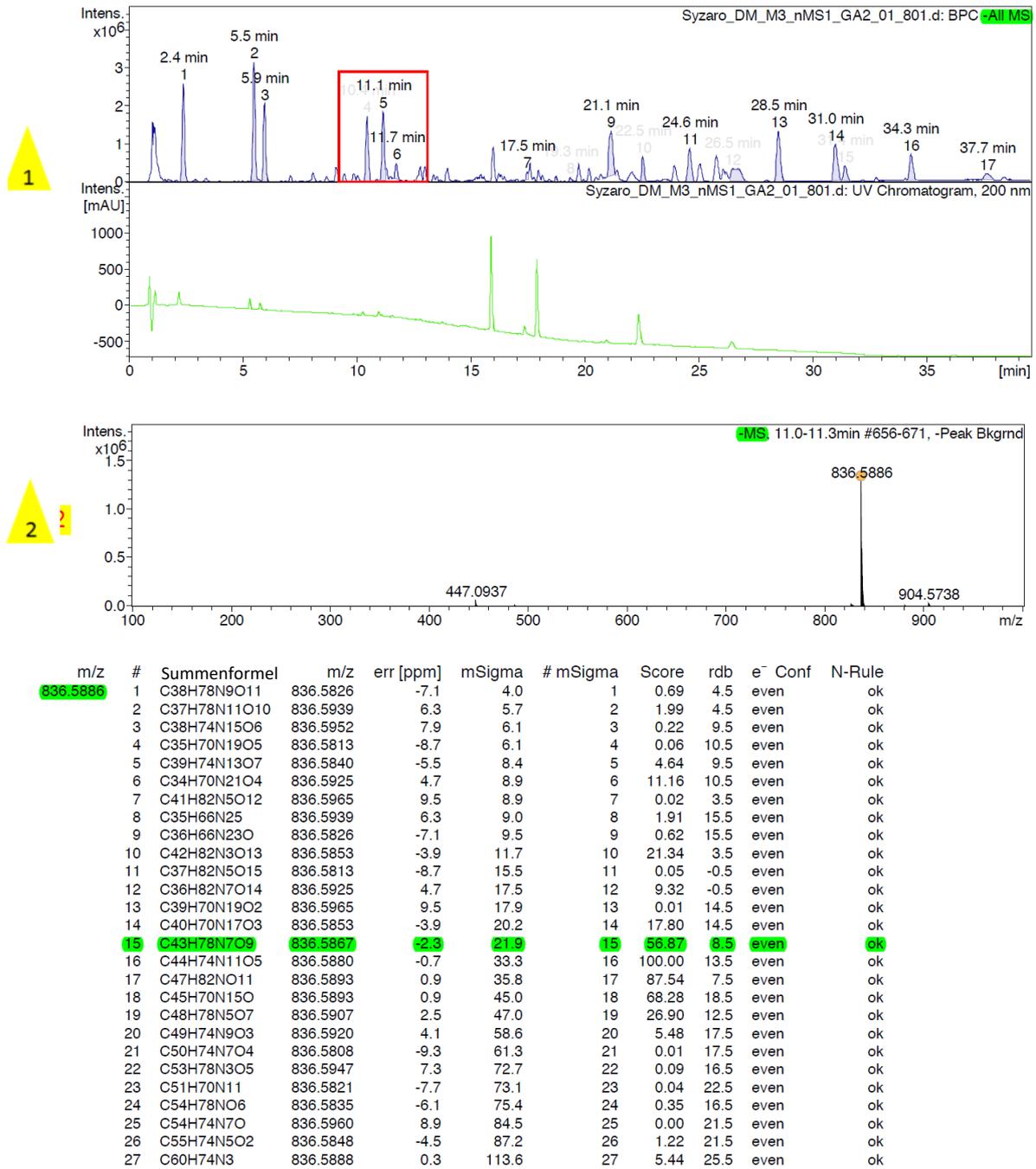


Abbildung 72 zeigt das Massenspektrum eines Polyamids im Negativionenmodus, das in der Probe Syzaro_DM enthalten ist; aufgenommen mit der LC-ESI-TOF-Anlage. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme, das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum eines Polyamids an. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 11,0-11,3 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Das Polyamid erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 11,1 min und wurde vor allem als $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 836,5886 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm 27 Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel $C_{43}H_{78}N_7O_9$ die plausible ist. Bei der tatsächlichen Struktur musste das COO^- -Addukt von dem tatsächlichen Wert abgezogen und ein Wasserstoffproton zugezählt werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_{42}H_{77}N_7O_7$.

7.3 Massenspektren von *Pimenta dioica*

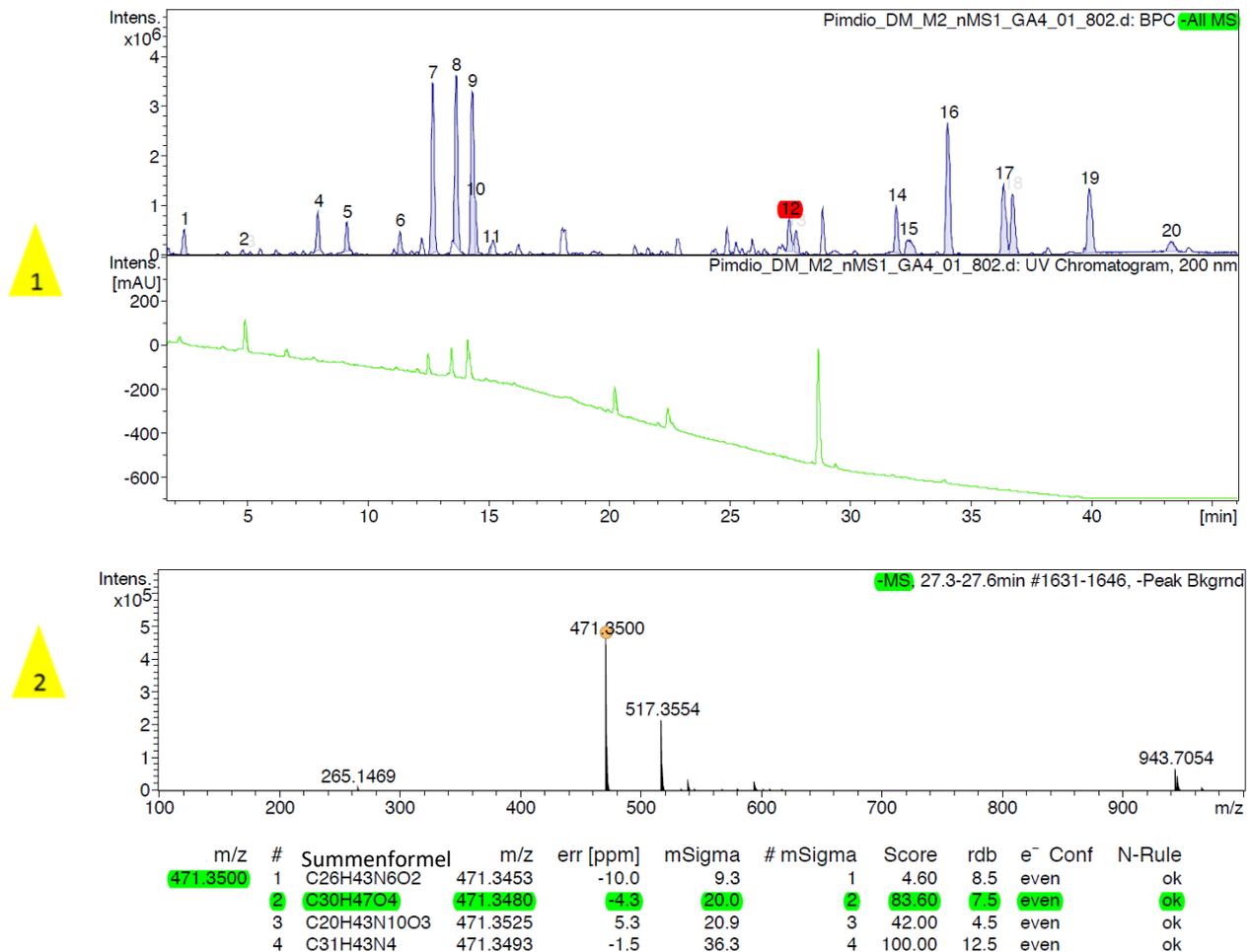


Abbildung 73 zeigt das **Massenspektrum der Maslinsäure**, die in der Probe Pimdio(DM) enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Negativionenmodus mit einem LC-ESI-TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Pimdio(DM), das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum der Maslinsäure an. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 27,3-27,6 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Die Maslinsäure erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 27,5 min und wurde vor allem als $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 471,3480 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm vier Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel $C_{30}H_{47}O_4$ die plausible ist. Um auf die Summenformel der Maslinsäure zu kommen, muss das bei der Ionisierung abgespaltene Proton dazugerechnet werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_{30}H_{48}O_4$.

Anhang

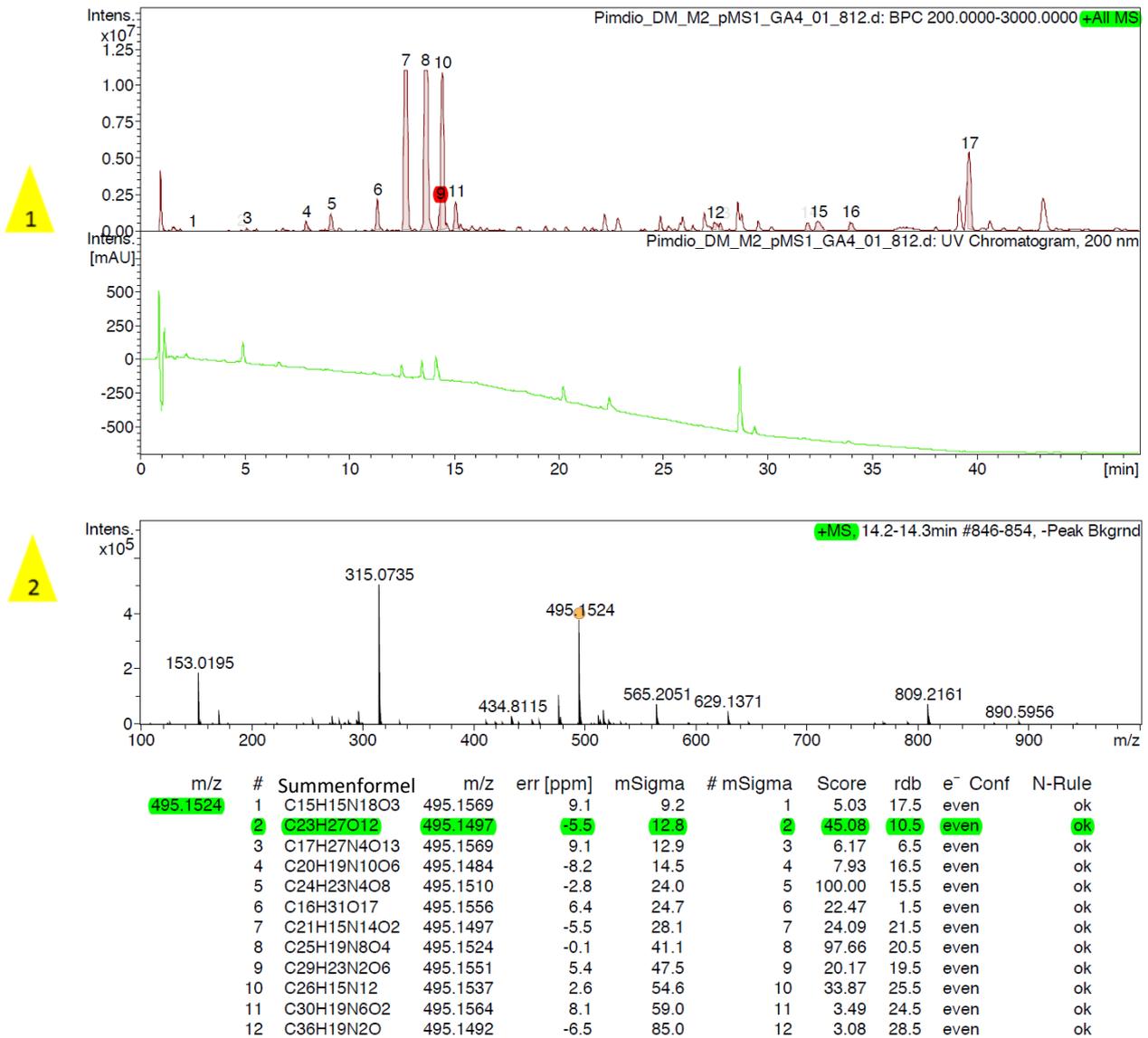


Abbildung 74 zeigt das **Massenspektrum** des **Ericifolins**, das in der Probe Pimdio(DM) enthalten ist: Die gezeigten Resultate wurden im Positivionenmodus mit einem LC-ESI-TOF aufgenommen. Der obere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 1) zeigt zwei Chromatogramme der Probe Pimdio(DM), das obere ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) des Massenspektrometers, während direkt darunter das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm abgebildet ist. Der untere Teil der Abbildung (gelb hinterlegte Ziffer 2) gibt das Massenspektrum des Ericifolins an. Das Spektrum wurde über die Retentionszeiten 14,2-14,3 min summiert und entspricht somit dem rot markierten Peak im BPC. Das Ericifolin erscheint bei einer gemittelten Retentionszeit von 14,3 min und wurde vor allem als $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 495,1497 detektiert. Der SmartFormula Algorithmus schlägt für diesen Wert innerhalb eines Fehlers von 10 ppm 12 Summenformeln vor, wobei die grün hinterlegte Formel $C_{23}H_{27}O_{12}$ die plausiblere ist. Um auf die Summenformel des Ericifolins zu kommen, muss das bei der Ionisierung zusätzlich vorhandene Proton abgezogen werden. Folglich lautet die Strukturformel jetzt $C_{23}H_{26}O_{12}$.

7.4 Quantifizierung der Triterpensäure

Oleanolsäure

Tabelle 40 Ergebnisse der Quantifizierung; Gerät: HPLC–DAD–CAD, Gradient: 80–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,3 ml/min; Ofentemperatur: 10,0 °C; Methodenoptimierung 4

Nr.	Proben- Bezeichnung	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
		Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin
1	2µg/ml	1,7098	0,1298	1,7552	0,1442	1,6911	0,1413	1,6082	0,1336
2	5µg/ml	5,1208	0,3290	5,0913	0,3363	5,1417	0,3352	5,3481	0,3266
3	10µg/ml	11,0152	0,6730	10,6016	0,6535	10,6165	0,6429	10,8367	0,6099
4	20µg/ml	20,3674	1,2190	20,6520	1,2321	21,2138	1,2385	20,5925	1,1135
5	40µg/ml	41,0413	2,4258	41,6561	2,4414	41,5977	2,3842	42,0919	2,2233
6	100µg/ml	97,5011	5,7217	96,9958	5,6274	96,3810	5,4634	96,0703	5,0096
7	PimdioDMp	11,7688	0,7170	11,3379	0,6959	11,8463	0,7120	12,6043	0,7012
8	PimdioDMp_W_01	8,7141	0,5387	8,7881	0,5491	9,0283	0,5536	9,6287	0,5476
9	QC	17,1596	1,0317	16,9794	1,0207	16,4512	0,9709	16,9522	0,9256
10	Syzaro(DM)	20,2002	1,2092	20,3467	1,2145	20,4273	1,1943	21,1040	1,1399
11	SyzaroDMp_W	18,4809	1,1089	17,3976	1,0448	17,9905	1,0574	18,6164	1,0115
Nr.	Proben- Bezeichnung	Summe		Mittelwert		Varianz		Standardabweichung	
		µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin
1	2µg/ml	6,7643	0,5489	1,6911	0,1372	0,0038	0,0000	0,0615	0,0067
2	5µg/ml	20,7019	1,3271	5,1755	0,3318	0,0137	0,0000	0,1169	0,0047
3	10µg/ml	43,0700	2,5793	10,7675	0,6448	0,0388	0,0007	0,1970	0,0264
4	20µg/ml	82,8257	4,8031	20,7064	1,2008	0,1294	0,0035	0,3598	0,0587
5	40µg/ml	166,3870	9,4747	41,5968	2,3687	0,1857	0,0100	0,4310	0,0999
6	100µg/ml	386,9482	21,8221	96,7371	5,4555	0,4074	0,0998	0,6382	0,3159
7	PimdioDMp	47,5573	2,8261	11,8893	0,7065	0,2772	0,0001	0,5265	0,0097
8	PimdioDMp_W_01	36,1592	2,1890	9,0398	0,5473	0,1721	0,0000	0,4149	0,0062
9	QC	67,5424	3,9489	16,8856	0,9872	0,0923	0,0024	0,3039	0,0489
10	Syzaro(DM)	82,0782	4,7579	20,5196	1,1895	0,1607	0,0012	0,4008	0,0341
11	SyzaroDMp_W	72,4854	4,2226	18,1214	1,0557	0,3051	0,0016	0,5524	0,0404

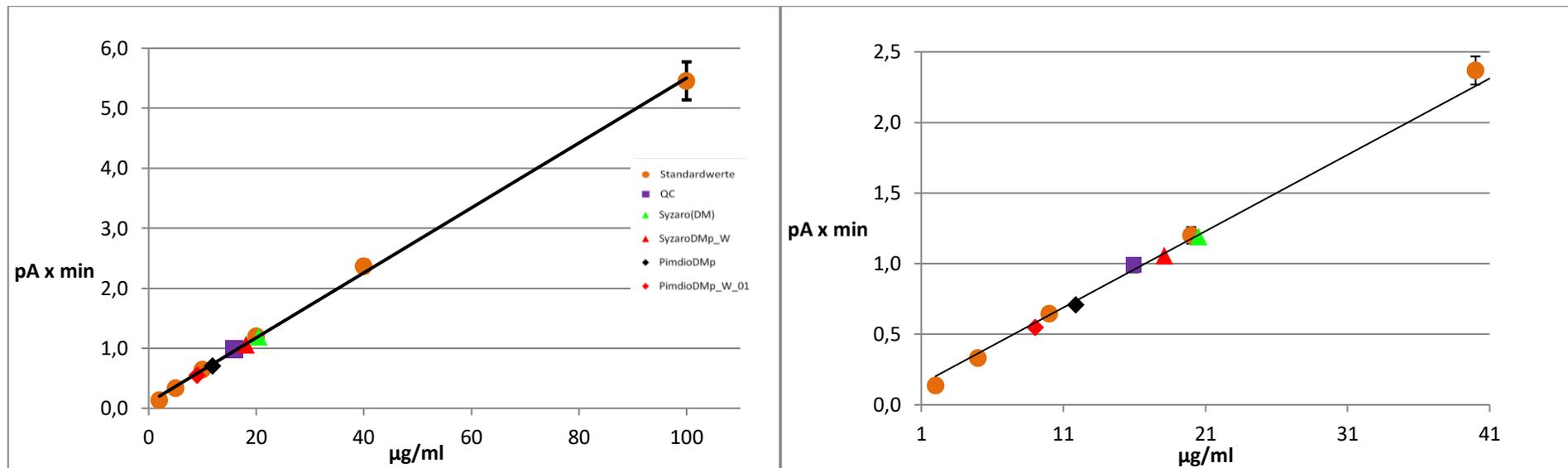


Abbildung 75 Übersichtsdarstellung und Detailvergrößerung der Eichgerade für die Oleanolsäure; die Darstellung der Proben erfolgte bei PimdioDMp⁴¹ als schwarze Raute, bei PimdioDMp_W_01⁴² als rote Raute, bei Syzaro(DM) als grünes Dreieck und bei SyzaroDMp_W als rotes Dreieck; bei den orangen Punkten handelt es sich um die Mittelwerte der gemessenen Standardsubstanzen bei den Konzentrationen 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml und das violette Quadrat zeigt die Qualitätskontrolle die bei einer Konzentration von 16 µg/ml lag; Darstellung: Peakfläche (pAxmin) gegen die Konzentration (µg/ml); Gerät: HPLC–DAD–CAD, Gradient: 80–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,3 ml/min; Ofentemperatur: 10,0 °C; Methodenoptimierung 4

⁴¹ PimdioDMp = neu hergestellter Extrakt

⁴² PimdioDMp_W_01 = von der Diplomarbeit von Mag. Faur übernommener Extrakt

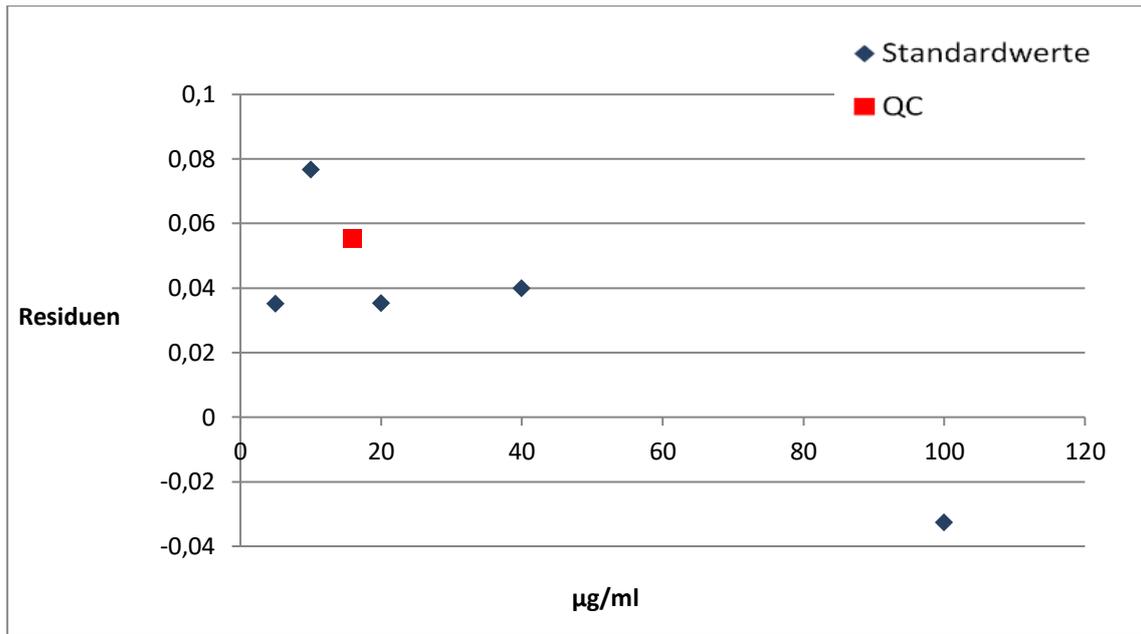


Abbildung 76 zeigt den relativen Residuenplot; Formel: $17,1305 \times \text{Konzentration} - 0,5144$

Maslinsäure

Tabelle 41 Ergebnisse der Quantifizierung; Gerät: HPLC–DAD–CAD, Gradient: 80–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,3 ml/min; Ofentemperatur: 10,0 °C; Methodenoptimierung 4

Nr.	Proben- Bezeichnung	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
		Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin
1	2µg/ml	1,8502	0,0868	1,6691	0,0799	1,7544	0,0908	1,6094	0,0759
2	5µg/ml	4,8759	0,1898	5,3280	0,2017	5,0213	0,1988	5,2672	0,1862
3	10µg/ml	10,7181	0,3888	10,5162	0,3744	10,8740	0,3923	11,0978	0,3620
4	20µg/ml	20,5394	0,7232	20,8865	0,7196	20,6742	0,7163	20,5519	0,6472
5	40µg/ml	40,8060	1,4134	41,3854	1,4020	40,8462	1,3831	41,5929	1,2818
6	100µg/ml	98,0767	3,3637	96,9305	3,2510	97,6263	3,2602	96,4662	2,9369
7	PimdioDMp	19,1366	0,6754	18,8667	0,6524	19,3424	0,6722	21,1536	0,6653
8	PimdioDMp_W_01	17,4253	0,6172	19,7820	0,6829	18,4476	0,6427	20,1560	0,6352
9	QC	16,5305	0,5867	17,0410	0,5916	16,9354	0,5927	16,6320	0,5290
10	Syزارo(DM)	8,6062	0,3168	8,4711	0,3064	8,3040	0,3073	8,4417	0,2819
11	SyزارoDMp_W	7,8999	0,2928	7,9611	0,2894	7,9130	0,2944	8,1593	0,2734
Nr.	Proben- Bezeichnung	Summe		Mittelwert		Varianz		Standardabweichung	
		µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin
1	2µg/ml	6,8831	0,3334	1,7208	0,0834	0,0110	0,0000	0,1048	0,0067
2	5µg/ml	20,4923	0,7765	5,1231	0,1941	0,0447	0,0001	0,2115	0,0073
3	10µg/ml	43,2060	1,5175	10,8015	0,3794	0,0605	0,0002	0,2459	0,0139
4	20µg/ml	82,6520	2,8063	20,6630	0,7016	0,0259	0,0013	0,1609	0,0364
5	40µg/ml	164,6305	5,4803	41,1576	1,3701	0,1540	0,0036	0,3924	0,0602
6	100µg/ml	389,0997	12,8118	97,2749	3,2030	0,5130	0,0341	0,7163	0,1846
7	PimdioDMp	78,4994	2,6653	19,6248	0,6663	1,0767	0,0001	1,0376	0,0102
8	PimdioDMp_W_01	75,8109	2,5780	18,9527	0,6445	1,5746	0,0008	1,2548	0,0277
9	QC	67,1389	2,3000	16,7847	0,5750	0,0588	0,0009	0,2425	0,0308
10	Syزارo(DM)	33,8230	1,2124	8,4558	0,3031	0,0154	0,0002	0,1239	0,0149
11	SyزارoDMp_W	31,9333	1,1500	7,9833	0,2875	0,0145	0,0001	0,1202	0,0096

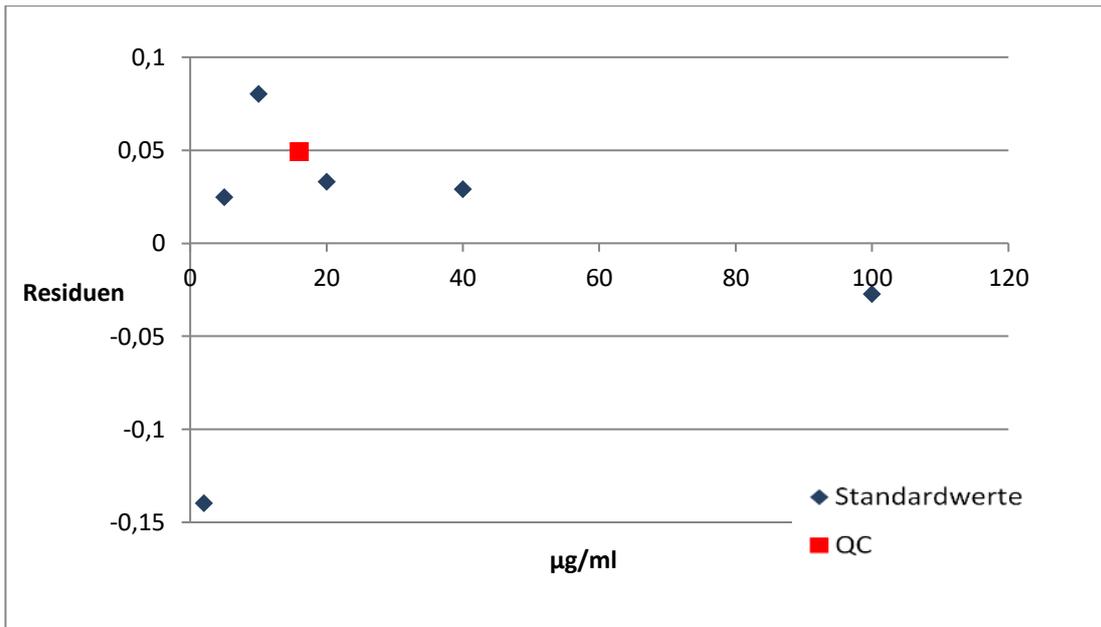


Abbildung 78 zeigt den relativen Residuenplot; Formel: $29,3647 \times \text{Konzentration} - 0,6977$

Corosolsäure

Tabelle 42 Ergebnisse der Quantifizierung; Gerät: HPLC–DAD–CAD, Gradient: 80–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,3 ml/min; Ofentemperatur: 10,0 °C; Methodenoptimierung 4

Nr.	Proben - Bezeichnung	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
		Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin	Menge µg/ml	Fläche pAxmin
1	2µg/ml	1,6638	0,0735	1,6250	0,0793	1,7032	0,0879	1,6028	0,0805
2	5µg/ml	5,1573	0,1849	5,3219	0,1950	5,0680	0,1927	5,3240	0,1863
3	10µg/ml	11,1799	0,3771	10,5739	0,3594	10,9306	0,3754	10,8725	0,3441
4	20µg/ml	20,6180	0,6781	21,2637	0,6940	20,9960	0,6891	20,6101	0,6210
5	40µg/ml	40,4482	1,3106	41,6380	1,3318	40,7748	1,3054	42,3532	1,2394
6	100µg/ml	97,6529	3,1353	96,1590	3,0384	97,2559	3,0654	95,7213	2,7571
7	PimdioDMp	12,3612	0,4147	12,2372	0,4115	12,5438	0,4257	12,9724	0,4038
8	PimdioDMp_W_01	12,0414	0,4045	12,7435	0,4273	12,5394	0,4255	13,5147	0,4192
9	QC	17,0873	0,5655	17,0635	0,5625	16,9078	0,5617	16,1722	0,4948
Nr.	Proben - Bezeichnung	Summe		Mittelwert		Varianz		Standardabweichung	
		µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin
1	2µg/ml	6,5948	0,3212	1,6487	0,0803	0,0020	0,0000	0,0442	0,0059
2	5µg/ml	20,8712	0,7589	5,2178	0,1897	0,0161	0,0000	0,1268	0,0049
3	10µg/ml	43,5569	1,4560	10,8892	0,3640	0,0620	0,0002	0,2489	0,0155
4	20µg/ml	83,4878	2,6822	20,8720	0,6706	0,1006	0,0011	0,3172	0,0337
5	40µg/ml	165,2142	5,1872	41,3036	1,2968	0,7416	0,0016	0,8612	0,0399
6	100µg/ml	386,7891	11,9962	96,6973	2,9991	0,8225	0,0277	0,9069	0,1664
7	PimdioDMp	50,1146	1,6557	12,5287	0,4139	0,1034	0,0001	0,3215	0,0091
8	PimdioDMp_W_01	50,8390	1,6765	12,7098	0,4191	0,3749	0,0001	0,6123	0,0104
9	QC	67,2308	2,1845	16,8077	0,5461	0,1858	0,0012	0,4311	0,0343

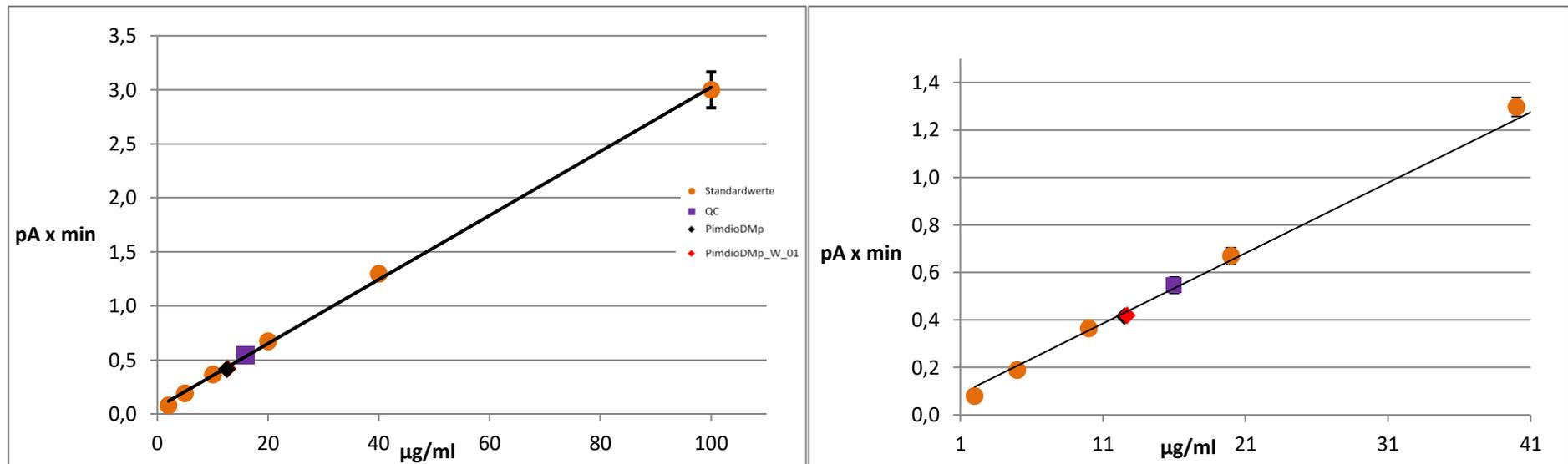


Abbildung 79 Übersichtsdarstellung und Detailvergrößerung der Eichgerade für die Corosolsäure; die Probe PimdioDMp wird als schwarze Raute und PimdioDMp_W_01 als rote Raute dargestellt; bei den orangen Punkten handelt es sich um die Mittelwerte der gemessenen Standardsubstanzen bei den Konzentrationen 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml und das violette Quadrat zeigt die Qualitätskontrolle die bei einer Konzentration von 16 µg/ml; Darstellung: Peakfläche (pA x min) gegen die Konzentration (µg/ml); Gerät: HPLC–DAD–CAD, Gradient: 80–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,3 ml/min; Ofentemperatur: 10,0 °C; Methodenoptimierung 4

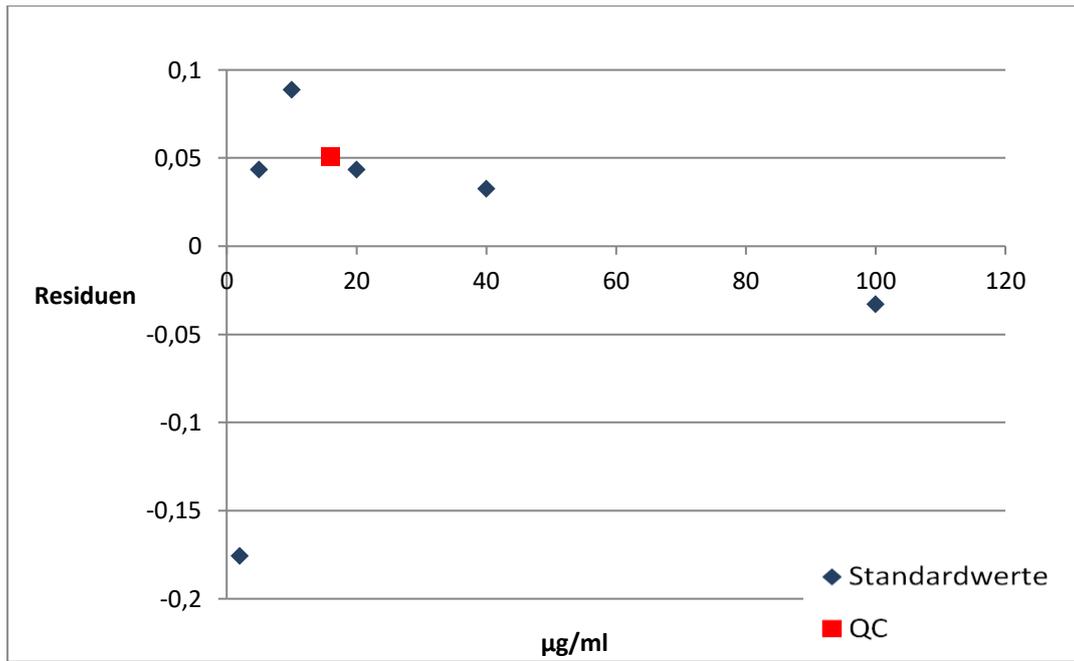


Abbildung 80 zeigt den relativen Residuenplot; Formel: $31,3502 \times \text{Konzentration} - 6407$

Ursolsäure

Tabelle 43 Ergebnisse der Quantifizierung; Gerät: HPLC–DAD–CAD, Gradient: 80–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% HCOOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,3 ml/min; Ofentemperatur: 10,0 °C; Methodenoptimierung 4

Nr.	Proben- Bezeichnung	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
		Menge	Fläche	Menge	Fläche	Menge	Fläche	Menge	Fläche
		µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin
1	2µg/ml	1,6848	0,1150	1,7459	0,1260	1,6415	0,1279	1,5796	0,1184
2	5µg/ml	5,0589	0,2897	4,9700	0,2914	5,1456	0,3024	5,1904	0,2852
3	10µg/ml	11,0314	0,5989	10,6769	0,5842	10,7675	0,5823	11,1661	0,5612
4	20µg/ml	20,8473	1,1070	21,0845	1,1181	21,3654	1,1100	20,7645	1,0046
5	40µg/ml	41,3350	2,1676	41,9819	2,1902	41,9619	2,1355	42,7677	2,0209
6	100µg/ml	96,6963	5,0335	96,1579	4,9696	95,6084	4,8067	94,8100	4,4248
7	PimdioDMp	17,0151	0,9086	17,1252	0,9150	17,0731	0,8963	18,4553	0,8979
8	PimdioDMp_W_01	14,9982	0,8042	14,8984	0,8007	15,4481	0,8154	16,4666	0,8061
9	QC	16,8888	0,9021	17,0466	0,9110	16,7115	0,8783	17,1229	0,8364
Nr.	Proben- Bezeichnung	Summe		Mittelwert		Varianz		Standardabweichung	
		µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin	µg/ml	pAxmin
1	2µg/ml	6,6518	0,4873	1,6630	0,1218	0,0049	0,0000	0,0702	0,0061
2	5µg/ml	20,3649	1,1687	5,0912	0,2922	0,0095	0,0001	0,0975	0,0073
3	10µg/ml	43,6419	2,3266	10,9105	0,5817	0,0517	0,0002	0,2273	0,0155
4	20µg/ml	84,0617	4,3397	21,0154	1,0849	0,0728	0,0029	0,2699	0,0538
5	40µg/ml	168,0465	8,5142	42,0116	2,1286	0,3443	0,0057	0,5868	0,0752
6	100µg/ml	383,2726	19,2346	95,8182	4,8087	0,6490	0,0746	0,8056	0,2731
7	PimdioDMp	69,6687	3,6178	17,4172	0,9045	0,4810	0,0001	0,6935	0,0089
8	PimdioDMp_W_01	61,8113	3,2264	15,4528	0,8066	0,5139	0,0000	0,7169	0,0063
9	QC	67,7698	3,5278	16,9425	0,8820	0,0332	0,0011	0,1822	0,0334

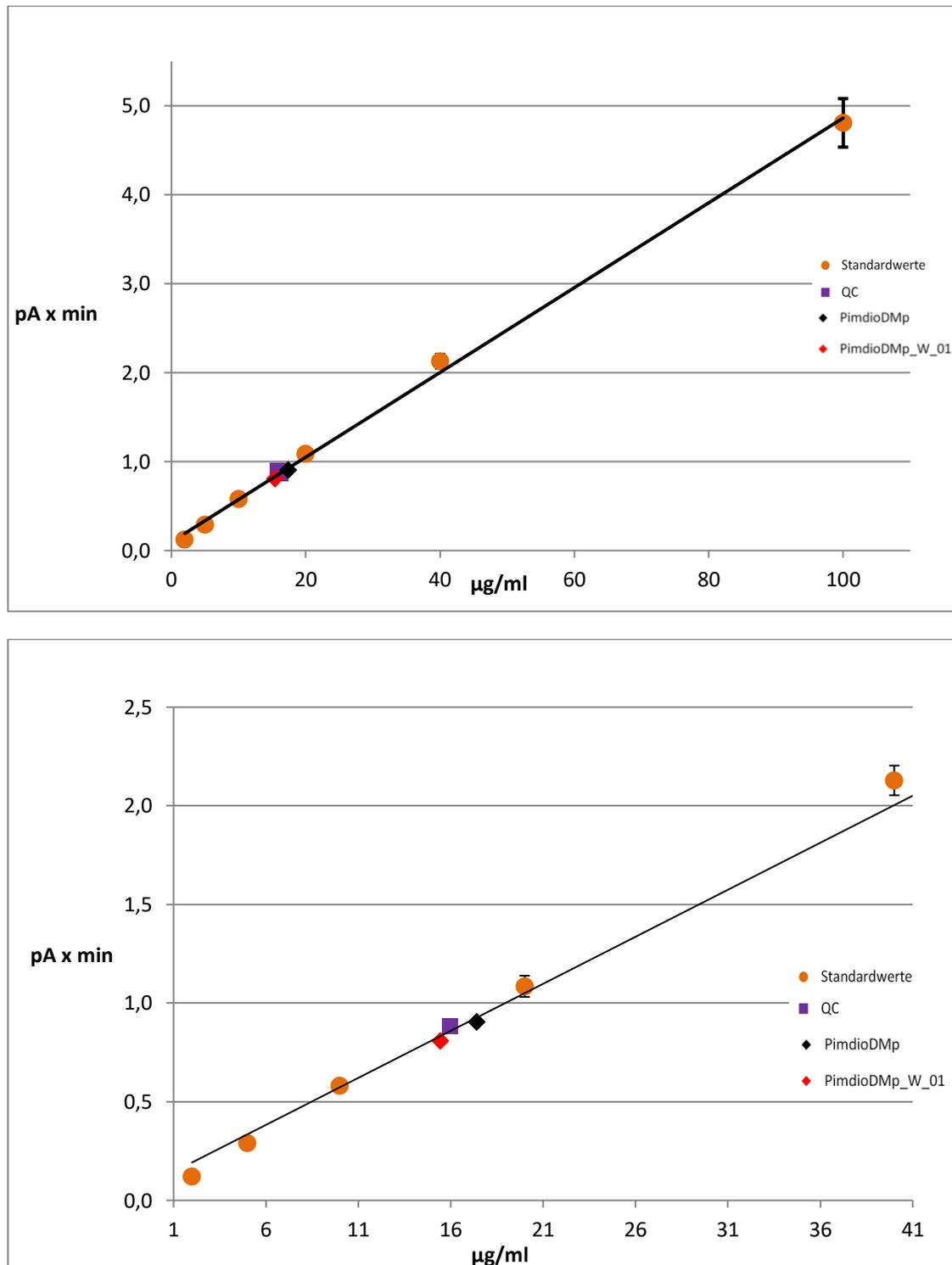


Abbildung 81 Übersichtsdarstellung und Detailvergrößerung der Eichgerade für die Ursolsäure; die Probe PimdioDMP wird als schwarze Raute und PimdioDMP_W_01 als rote Raute dargestellt; bei den orangen Punkten handelt es sich um die Mittelwerte der gemessenen Standardsubstanzen bei den Konzentrationen 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml und das violette Quadrat zeigt die Qualitätskontrolle die bei einer Konzentration von 16 µg/ml lag; Darstellung: Peakfläche (pA x min) gegen die Konzentration (µg/ml); Gerät: HPLC–DAD–CAD, Gradient: 80–95% ACN mit saurem Wasser (0,1% H COOH); Säule: Dionex Acclaim 120, C₁₈, 3 µm, 120 Å, 2,1 x 150 mm; Detektion: CAD; Injektionsvolumen: 3 µl; Flussrate: 0,3 ml/min; Ofentemperatur: 10,0 °C; Methodenoptimierung 4

Anhang

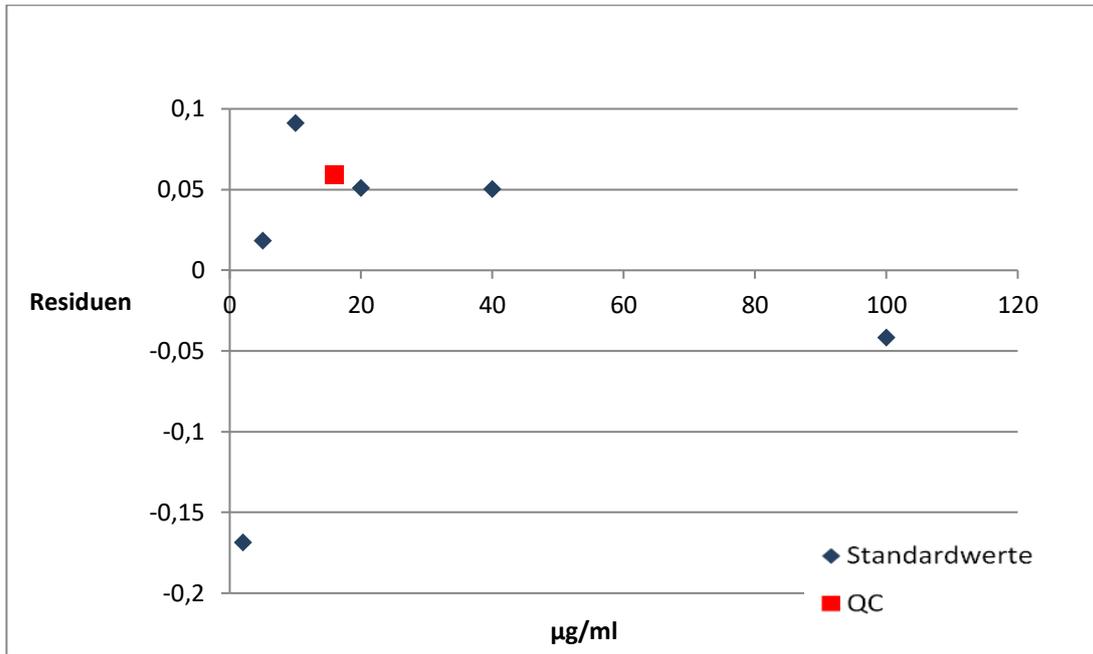


Abbildung 82 zeigt den relativen Residuenplot: Formel: $19,3170 \times \text{Konzentration} - 0,5367$

7.5 Ergebnisse der Transaktivierungsassays

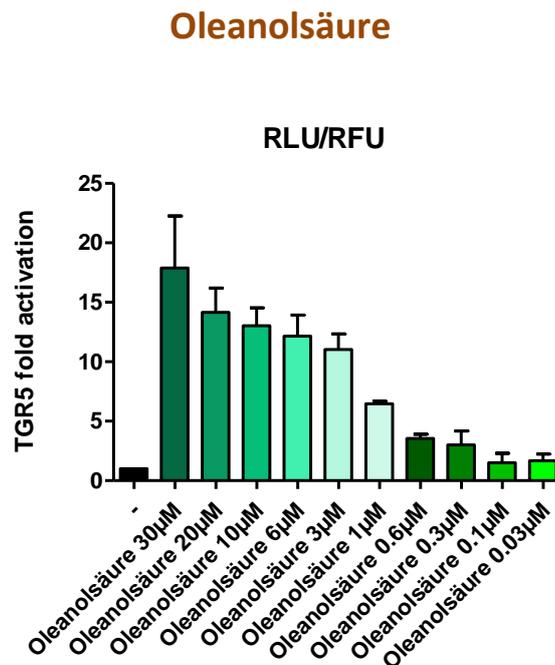


Abbildung 83 zeigt die **TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen der Oleanolsäure**. Die TGR5-Aktivität ist bei der Konzentration 30 µM am größten und nimmt mit fallender Konzentration schön stetig ab. Mittelwert +/- Standardabweichung; n=3

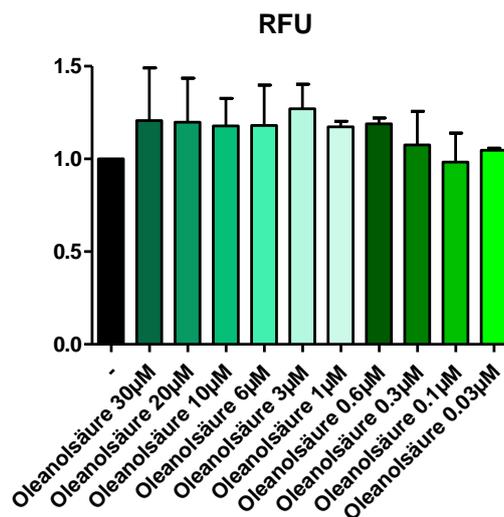


Abbildung 84 zeigt die **Zellschädigung bei unterschiedlichen Konzentrationen der Oleanolsäure**. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Bei RFU⁴³ handelt es sich um den normalisierten Fluoreszenz-Wert. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelten Zellen. Im Balkendiagramm ist erkennbar, dass bei keiner Konzentration eine Zellschädigung vorlag. Mittelwert +/- Standardabweichung

⁴³ RFU = Relative fluorescence unit = normalisierte Fluoreszenz-Intensität

Maslinsäure

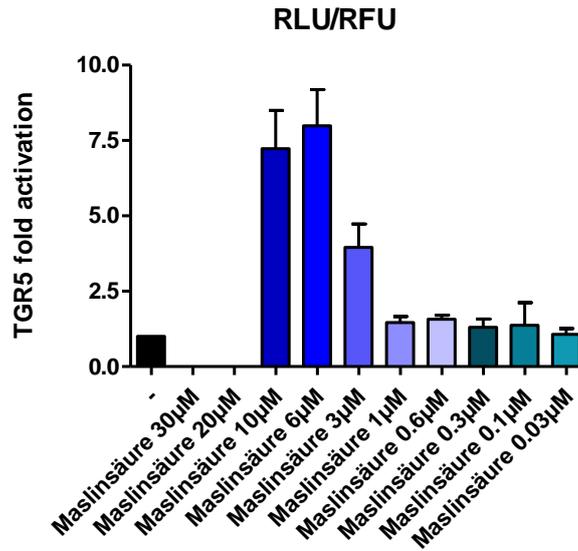


Abbildung 85 zeigt die **TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen der Maslinsäure**. Die TGR5-Aktivität ist bei einer Konzentration von 30 µM und 20 µM aufgrund starker Zellschädigung nicht vorhanden (siehe Abbildung 86). Mittelwert +/- Standardabweichung; n=3; RLU = Relative luminiscence unit (normalisierte Luminiszenz-Intensität)

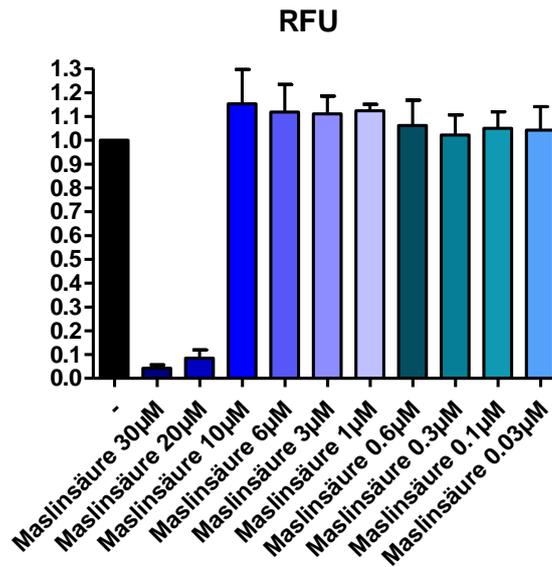


Abbildung 86 zeigt die **Zellschädigung bei unterschiedlichen Konzentrationen der Maslinsäure**. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Bei RFU handelt es sich um den normalisierten Fluoreszenz-Wert. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelten Zellen. Im Balkendiagramm ist erkennbar, dass bei der Konzentration von 30 µM und 20 µM starke Zellschädigung vorlag. Ab 10 µM ist diese schlagartig aufgehoben. Mittelwert +/- Standardabweichung

Ursolsäure

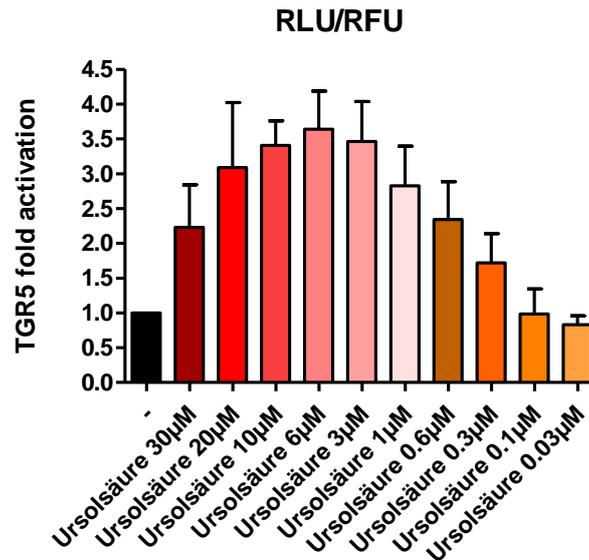


Abbildung 87 zeigt die **TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen der Ursolsäure**. Die TGR5-Aktivität steigt stetig von 30 µM bis 6 µM an und fällt dann wieder kontinuierlich ab. Mittelwert +/- Standardabweichung; n=3; RLU = Relative luminisence unit (normalisierte Luminiszenz-Intensität)

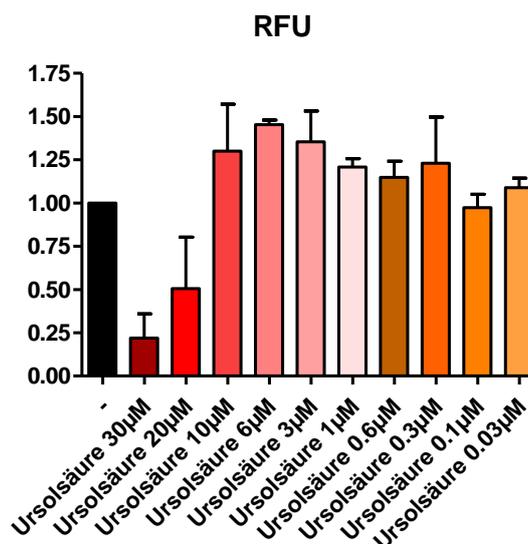


Abbildung 88 zeigt die **Zellschädigung bei unterschiedlichen Konzentrationen der Ursolsäure**. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Bei RFU handelt es sich um den normalisierten Fluoreszenz-Wert. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelten Zellen. Im Balkendiagramm ist erkennbar, dass bei der Konzentration von 30 µM und 20 µM Zellschädigung vorlag. Ab 10 µM ist diese wieder weg. Mittelwert +/- Standardabweichung

Corosolsäure

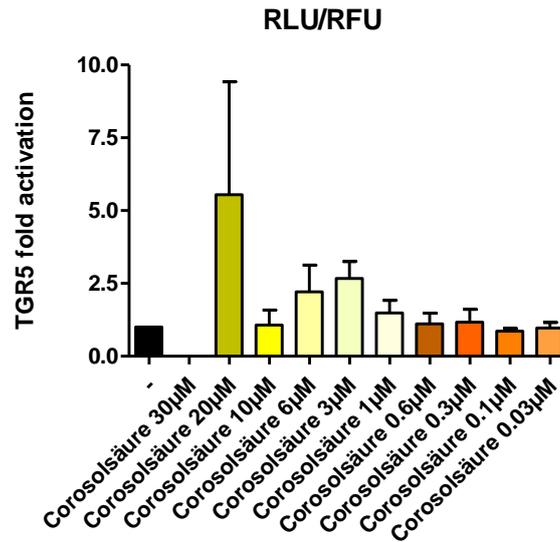


Abbildung 89 zeigt die TGR5-Aktivierung bei unterschiedlichen Konzentrationen der Corosolsäure. Bei einer Konzentration von 30 µM liegt keine TGR5-Aktivierung vor. Bei 20 µM gibt es diese schon, allerdings mit einer entsprechend großen Standardabweichung. Im Allgemeinen sind hier die Ergebnisse nicht besonders schön. Mittelwert +/- Standardabweichung; n=3; RLU = Relative luminiscence unit (normalisierte Luminiszenz-Intensität)

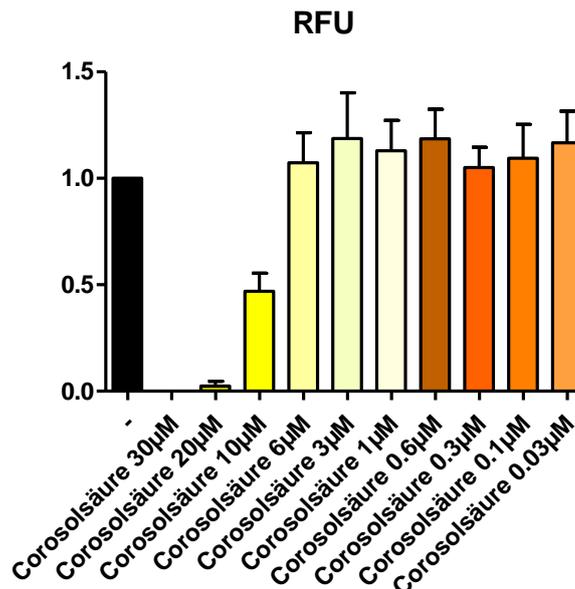


Abbildung 90 zeigt die Zellschädigung bei unterschiedlichen Konzentrationen der Corosolsäure. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (n=3). Bei RFU handelt es sich um den normalisierten Fluoreszenz-Wert. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelten Zellen. Im Balkendiagramm ist erkennbar, dass bei der Konzentration von 30 µM, 20 µM und 10 µM eine starke Zellschädigung vorlag. Ab 6 µM ist diese weg. Mittelwert +/- Standardabweichung

7.5.1 TGR5–Aktivierung: Triterpensäure-Vergleich

Tabelle 44 zeigt den **Triterpensäure–Vergleich** bezogen auf die TGR5–Aktivierung. Die Lithocholsäure ist die eigentliche Positivkontrolle für den TGR5–Rezeptor, während die Chenodesoxycholsäure den FXR–Rezeptor, der im oberen Darmbereich lokalisiert ist, bevorzugt aktiviert.

Substanz	EC ₅₀ [μM]	max. TGR5-Aktivierung	TGR5–Aktivierung bei 10 μM
Oleanolsäure	2,2	16,8	13,04
Maslinsäure	3,1	7,8	7,23
Corosolsäure	0,5	3,6	2,21
Ursolsäure	1,1	3,4	3,41
Chenodesoxycholsäure	33,2	11,6	2,34
Lithocholsäure	13,2	36,4	14,48