

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Isolierung von Xanthonen aus den unterirdischen Teilen  
von *Metaxya rostrata*“

verfasst von / submitted by

Bernadette-Theresia Oláh

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

Wien, 2019 / Vienna, 2019

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:

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn



## Danksagung

Ich möchte mich bei Frau ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu verfassen und für ihre herzliche und hilfsbereite Betreuung während der Arbeit bedanken.

Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand der Departments für Pharmakognosie, möchte ich ebenfalls für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Besonders danken möchte ich Mag. Eva Mittermair, die mir jederzeit bei offenen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand und mich stets herzlich betreut hat.

Weiters möchte ich mich bei Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für Organische Chemie, für die Durchführung und Hilfestellung bei der Strukturaufklärung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden, die mich während meiner gesamten Studienlaufbahn liebevoll unterstützt und gefördert haben.



## **Inhalt**

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>4</b>
3.1	<b>Material</b> .....	<b>4</b>
3.2	<b>Methoden</b> .....	<b>4</b>
3.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC) .....	4
3.2.2	Säulenchromatographie (SC) .....	5
3.2.3	Strukturaufklärung mittels NMR und MS .....	6
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>7</b>
4.1	<b>Überprüfung der vorhandenen Fraktionen mittels DC</b> .....	<b>7</b>
4.2	<b>Auftrennung von Fraktion 1</b> .....	<b>8</b>
4.2.1	Durchführung von SC1 .....	8
4.2.2	Überprüfung der Sammelfractionen .....	9
4.3	<b>Auftrennung von Fraktion 2</b> .....	<b>11</b>
4.3.1	Durchführung von SC 2 .....	12
4.3.2	Überprüfung der Sammelfractionen .....	12
4.3.3	Vergleich der Sammelfraktion 6 mit bekannten Xanthonen und Flavonoiden .....	13
4.3.4	Strukturaufklärung mittels NMR .....	14
4.4	<b>Auftrennung von Fraktion 3</b> .....	<b>15</b>
4.4.1	Durchführung von SC 3 .....	15
4.4.2	Überprüfung der Sammelfractionen .....	15
4.4.3	Vergleich von SF44/SC 3 mit diversen Flavonoiden .....	17
4.5	<b>Auftrennung von SF3 von SC1</b> .....	<b>20</b>
4.5.1	Durchführung von SC4 .....	21
4.5.2	Strukturaufklärung mittels NMR .....	22
4.6	<b>Auftrennung von SF4 von SC1</b> .....	<b>22</b>
4.6.1	Durchführung von SC5 .....	22
4.6.2	Weitere Aufreinigung von Fraktion 3+4/SC5 .....	24
4.6.3	Weitere Aufreinigung von Fraktion 5+6/SC5 .....	26
4.6.4	Vergleich der erhaltenen Fraktionen .....	27
4.6.5	Strukturaufklärung der Substanz BO3 mittels NMR .....	28
4.7	<b>Auftrennung von SF5 von SC1</b> .....	<b>29</b>

4.7.1	Durchführung von SC8 .....	29
<b>4.8</b>	<b>Auftrennung von SF28+29 von SC3 .....</b>	<b>30</b>
4.8.1	Durchführung von SC9 .....	30
<b>4.9</b>	<b>Auftrennung von SF 7+8 von SC9 .....</b>	<b>32</b>
4.9.1	Durchführung von SC10.....	32
<b>4.10</b>	<b>Auftrennung von Fraktion 9 von SC9.....</b>	<b>33</b>
4.10.1	Durchführung von SC11.....	33
<b>5</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>41</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>42</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>44</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

AASS	Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagens
Abb.	Abbildung
conc.	konzentriert
COSY	Correlation Spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
EM4	2-Deprenyl-6-O-methyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
KK4	Mischung aus Cinnamtannin B1 und Aesculitannin B
MeOH	Methanol
OH-XB	2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NS/PEG	Naturstoffreagens A- Polyethylenglycol 400
PA2	Procyanidin A <sub>2</sub>
SC	Säulenchromatographie
SF	Sammelfraktion
SR_1	2-Deprenyl-7-methoxy-rheediaxanthon B
Tab.	Tabelle
XB	2-Deprenyl-rheediaxanthon B

## 2 Einleitung und Zielsetzung

In Österreich sind Krebserkrankungen für etwa ein Viertel der jährlichen Todesfälle verantwortlich, wovon Darmkrebserkrankungen zirka 10% ausmachen. Mit 12% ist ein Kolorektalkarzinom die dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern (nach Prostata- und Lungenkrebs). Bei den Frauen gehören sie mit 10% ebenfalls zu den dritthäufigsten Erkrankungen (nach Brust- und Lungenkrebs).

Etwa ein Viertel der Erkrankungen betrafen den Enddarm, ca. zwei Drittel traten im Dickdarm auf. Der Rest verteilte sich auf den Bereich zwischen Dick- und Enddarm bzw. den Analkanal (Statistik Austria, abgerufen am 25.04.2019).

Diese Zahlen zeigen die Notwendigkeit von Chemotherapeutika, die spezifisch Krebszellen im Darm hemmen und gesunde Zellen möglichst schonen.

*Metaxya rostrata* (Kunth C. Presl) aus der Familie der Metaxyaceae, ist ein immergrüner Baumfarn aus den Flachlandregenwäldern Mittelamerikas und Teilen des nordwestlichen Südamerikas. In Costa Rica wird die Pflanze ethnomedizinisch als Heilmittel bei Geschwüren und Ulcera des Magen-Darm-Traktes verwendet. Hierfür wird eine wässrige Suspension des getrockneten Rhizoms oral verabreicht (Virtbauer et al.; 2008).

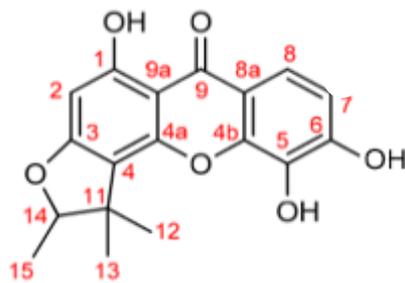


**Abb. 1 *Metaxya rostrata* (Kunth C. Presl)  
(Kainz K., 2011))**

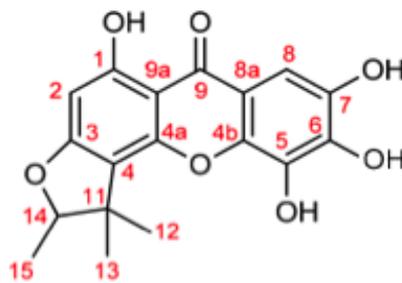
Aufgrund dessen wurde *Metaxya rostrata* in vorangegangenen Dissertationen und Diplomarbeiten auf ihre Inhaltsstoffe und Wirkungsmechanismen an Dickdarmkrebszellen untersucht.

Dabei konnten verschiedene Reinstoffe isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden.

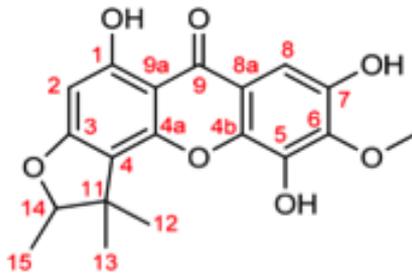
Neben Aesculitannin B, Cinnamtannin B1 und Betulinsäure zeigten vor allem Xanthone in *in vitro* Tests eine zytotoxische Wirkung auf Darmkrebszellen (Mittermair et al.; 2019). Bislang konnten fünf Xanthone isoliert werden (s. Abb. 2).



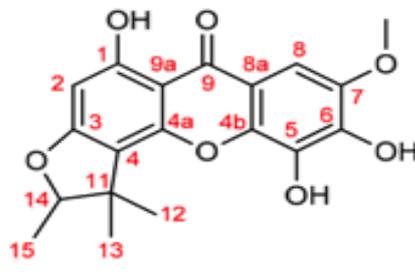
2-Deprenyl-rheediaxanthon B (XB)  
(Kainz et al., 2013)



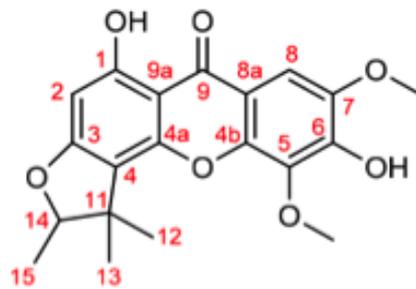
2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (OH-XB)  
(Kainz et al., 2014)



2-Deprenyl-6-O-methyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (EM4)  
(Mittermair E.; in Vorbereitung)



2-Deprenyl-7-methoxy-rheediaxanthon B (SR\_1 in Mischung mit EM4)  
(Rindler S., 2019)



2-Deprenyl-5-O-methyl-7-methoxy-rheediaxanthon B  
(Mittermair E., in Vorbereitung)

**Abb. 2 Strukturen bereits isolierter Xanthone**

Die Wirkung der Xanthone 2-Deprenyl-rheediaxanthon B (XB) und 2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (OH-XB) wurde bereits ausführlich an Dickdarmkrebszellen getestet. Man fand heraus, dass beide Substanzen, trotz ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit, signifikante Unterschiede bei der Beeinflussung des Zellzyklus zeigten. Während Substanz XB mitotische Katastrophe auslöst, wird über Substanz OH-XB klassische Apoptose eingeleitet.

Beide Substanzen scheinen zusätzlich den Transkriptionsfaktor FoxM1 zu blockieren. Dieser Umstand ist für die Krebsforschung von großem Interesse, da eine Hochregulierung von FoxM1 mit der Entwicklung vieler verschiedener Krebsarten verbunden wird (Mittermair et al.; 2019).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen daher, dass ein Struktur-Aktivitätsvergleich strukturell verwandter Xanthone von Bedeutung ist. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Diplomarbeit, weitere dieser Xanthone aus *Metaxya rostrata* zu isolieren und strukturell zu identifizieren.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

Im Rahmen vorangegangener Dissertationen und Diplomarbeiten waren verschiedenste Extrakte mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln (Kainz et al. (2014)) aus den Wurzeln von *Metaxya rostrata* hergestellt worden. Aufgrund ihrer ausreichenden quantitativen Ausbeute und ihrer Zusammensetzung, boten sie sich für weitere Analysen an.

#### **3.2 Methoden**

##### **3.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)**

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung wurden unterschiedliche mobile Phasen und verschiedene Detektionsmethoden verwendet, die an die polaren Eigenschaften der Inhaltsstoffe angepasst wurden. Als stationäre Phase dienten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Fertigplatten (Merck, Darmstadt).

### **3.2.1.1 Mobile Phasen**

**A:** Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure<sub>conc.</sub> (10:4:1)

**B:** Ethylacetat-Methanol-Ameisensäure<sub>conc.</sub>-Wasser (10:8:8:11)

**C:** Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure<sub>conc.</sub>-Methanol (5:4:1:1)

**D:** Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure<sub>conc.</sub> (5:4:1)

### **3.2.1.2 Detektionsmethoden**

- Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AASS):

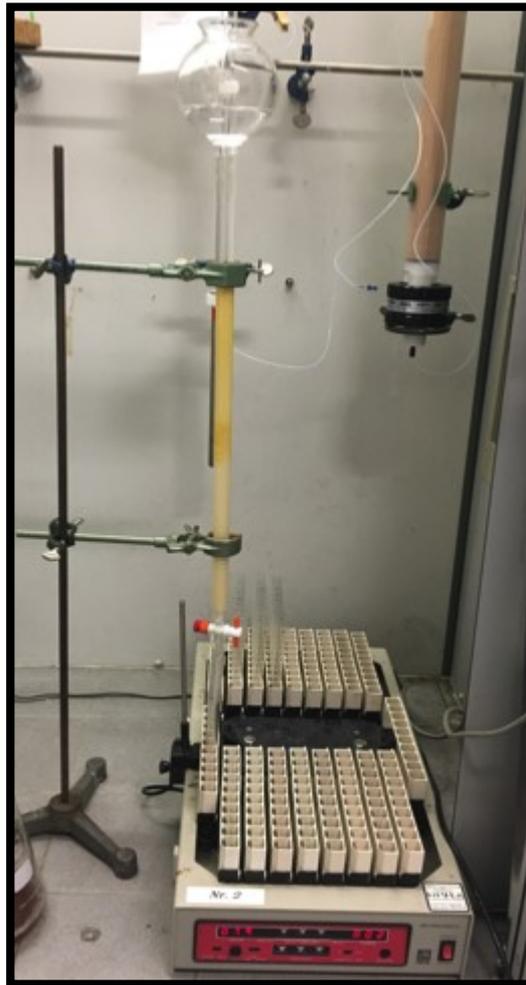
AASS-Reagens besteht aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig, 5 mL Schwefelsäure<sub>conc.</sub> und 0,5 mL Anisaldehyd. Nach dem Besprühen wurden die DC-Platten für ca. 10 min bei 110 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend bei Tageslicht ausgewertet.

- Naturstoffreagens A-Polyethylenglykol 400 (NS/PEG)

Zuerst wurde die DC-Platte mit einer 1%igen methanolischen Naturstoffreagens-Lösung besprüht. Anschließend wurde kurz getrocknet und mit einer 5%igen ethanolischen Polyethylenglykol 400-Lösung nachbesprüht. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm.

### **3.2.2 Säulenchromatographie (SC)**

Bei der säulenchromatographischen Auftrennung wurden als stationäre Phase Sephadex® LH-20 und als mobile Phasen Methanol/Wasser-Mischungen unter Gradientenelution verwendet. Die Säulendimensionen wurden an die Menge des zu trennenden Gemisches angepasst. Die Fraktionen wurden mit Hilfe eines Fraktionensammlers oder händisch aufgefangen. Jede fünfte bzw. zehnte Fraktion ist dünnschichtchromatographisch kontrolliert worden. Übereinstimmende Fraktionen wurden zu Sammelfraktionen vereinigt.



**Abb. 3 SC an Sephadex® LH-20**

### 3.2.3 Strukturaufklärung mittels NMR und MS

Die NMR-Messungen wurden auf einem Bruker Avance DRX 600 NMR-Spektrometer mit einem 5mm QNP Probenkopf ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) mit z-Gradientenspule und automatischer Tuning- und Matching-Einheit durchgeführt.

Messfrequenz	600,13 MHz für $^1\text{H}$ -NMR
	150,92 MHz für $^{13}\text{C}$ -NMR
Messtemperatur	298 K
Lösungsmittel	$\text{MeOH-d}_4$

**Tab. 1 Parameter der NMR-Spektroskopie**

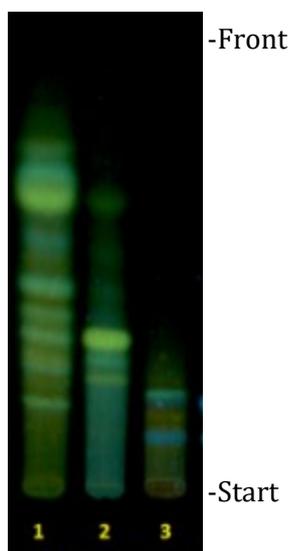
Es wurden 1D- ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) und gradient enhanced 2D-Experimente (COSY, NOESY, HMBC, HSQC) durchgeführt.

Hochauflösende ESI Massenspektren ( $m/z$  50-1900) wurden auf einem maXis UHR ESI-Qq-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) mittels Direkteinlass aufgenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überprüfung der vorhandenen Fraktionen mittels DC

Aus vorangegangenen Dissertationen und Diplomarbeiten war bereits vorfraktioniertes Material vorhanden, welches aus zeitlichen Gründen nicht analysiert worden war. Diese etwa 450 Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Jene Fraktionen, die mit NS/PEG detektiert, gelb-grün fluoreszierende Banden aufwiesen bzw. mit Anisaldehyd im Tageslicht betrachtet, gelbe Banden zeigten, ließen auf das Vorliegen von Xanthonen schließen und wurden daher für weitere Fraktionierungen in Betracht gezogen. Außerdem sollte die Fraktion in ausreichender Menge für weitere Trennschritte vorhanden sein. Anhand dieser Beurteilungskriterien wurden folgende drei Fraktionen ausgewählt:



**Abb. 4 DC von Fraktionen 1,2 und 3 für  
weitere Auftrennungen  
Fließmittel A (s. S. 5);  
Detektionsmethode: NS/PEG**

## 4.2 Auftrennung von Fraktion 1

Von der Fraktion 1 standen 113mg zur Verfügung und es handelte sich um ein Dichlormethan-Extrakt aus dem Rhizom. Wie in Abb. 4 (S. 7) ersichtlich, zeigt die DC der Fraktion 1, dass aufgrund der gelb-grün fluoreszierenden Banden vermutlich auch Xanthone zu den Komponenten gehören. Vor allem die Banden im Rf-Bereich 0,2-0,5 waren von Interesse, da die bereits isolierten Xanthone ebenfalls einen Rf-Wert in diesem Bereich aufwiesen. Mittels säulenchromatographischer Trennung wurde versucht, Komponenten aus diesem Bereich als Reinsubstanzen zu isolieren.

### 4.2.1 Durchführung von SC1

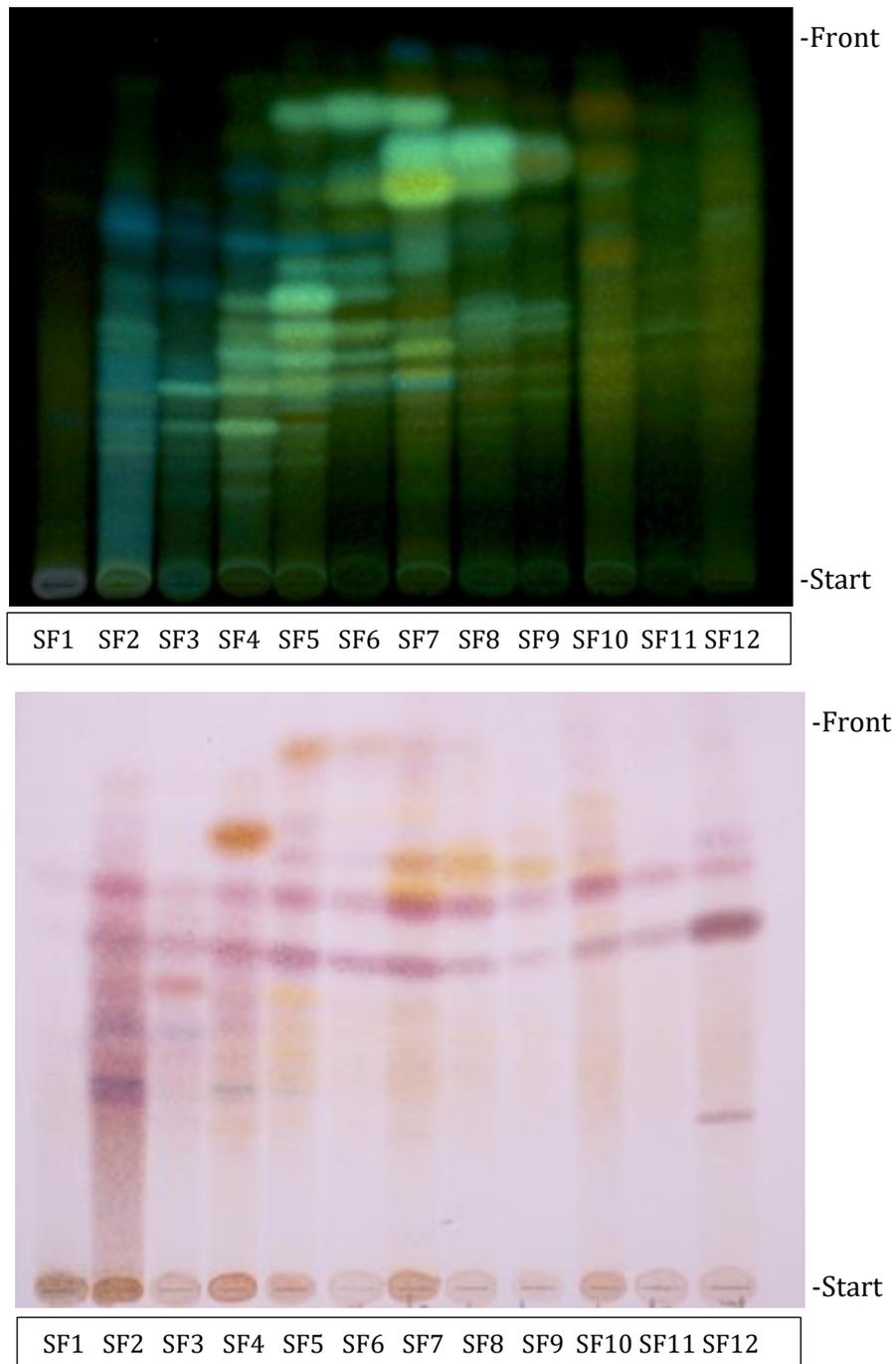
<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Fraktion 1-31: Methanol-Wasser (50:50)
	Fraktion 32-230: Methanol-Wasser (60:40)
	Fraktion 231-245: Methanol-Wasser (70:30)
<b>Dimension</b>	Ø = 2 cm Länge = 50 cm
<b>Flussrate</b>	0,7 mL/min

Tab. 2 Säulenparameter von SC 1

Jede fünfte Fraktion wurde mit Fließmittel A (s. S. 5) dünnschichtchromatographisch untersucht und Fraktionen mit übereinstimmender Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt.

Wie in Abb. 5 (S. 9) ersichtlich, war es in diesem ersten Reinigungsschritt nicht möglich Reinsubstanzen zu gewinnen. Aufgrund der quantitativen Ausbeute (s. Tab. 3, S. 10) und der Zusammensetzung wurden die Sammelfraktionen 3,4 und 5 für weitere säulenchromatographische Trennungen herangezogen.

#### 4.2.2 Überprüfung der Sammelfractionen



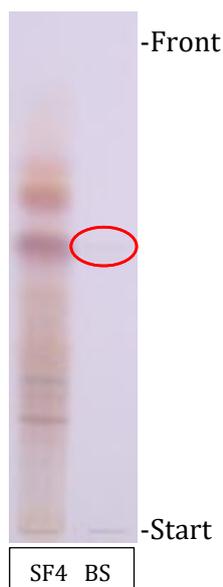
**Abb. 5 DC der Sammelfractionen von SC 1  
Fließmittel A (S. 5)  
Detektion: oben: NS/PEG; unten: Anisaldehyd**

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge [mg]
1	2-8	21,2
2	9-37	19,0
3	38-41	2,3
4	42-76	14,7
5	77-97	9,8
6	98-102	2,0
7	103-145	9,0
8	146-155	2,6
9	156-185	3,3
10	186-215	3,3
11	216-245	1,4
12	Nachlauf	21,2

**Tab. 3 Sammelfraktionen von SC 1**

Obwohl von der Sammelfraktion 3 nur 2,3 mg vorhanden waren, sollte die Hauptkomponente bei Rf ca. 0,4 isoliert werden. Die Sammelfraktionen 4 und 5 wurden ebenfalls für weitere Aufreinigungen verwendet (s. Kapitel 4.5 ff, ab S. 20).

Die DC mit Anisaldehyd zeigte in allen Fraktionen bei einem Rf von ca. 0,6 eine violette Bande, deren Rf-Wert und Färbung nach Detektion mit AASS auf das Vorliegen von Betulinsäure, die bereits in *Metaxya rostrata* nachgewiesen worden war, schließen ließ. Mittels DC mit der authentischen Substanz konnte das Vorliegen von Betulinsäure bestätigt werden (s. Abb. 6, S. 11)



**Abb. 6 DC-Vergleich von SF4 mit  
Betulinsäure (BS)  
Fließmittel A (S. 5);  
Detektion mit AASS**

### **4.3 Auftrennung von Fraktion 2**

Von Fraktion 2 standen 28 mg zur Verfügung und sie stammte ebenfalls aus einem Dichlormethan-Extrakt aus dem Rhizom. In dieser Fraktion war bei  $R_f$  ca. 0,3 eine klare Hauptkomponente sichtbar, die gelblich-grün fluoreszierte, weshalb es sich um ein Xanthon handeln könnte (s. Abb. 4, S. 7). Auch darunter bei einem  $R_f$ -Wert von 0,25 war eine weitere, schwach gelb-grün fluoreszierende Bande sichtbar. Über eine säulenchromatographische Trennung wurde versucht, diese beiden Komponenten möglichst rein zu isolieren.

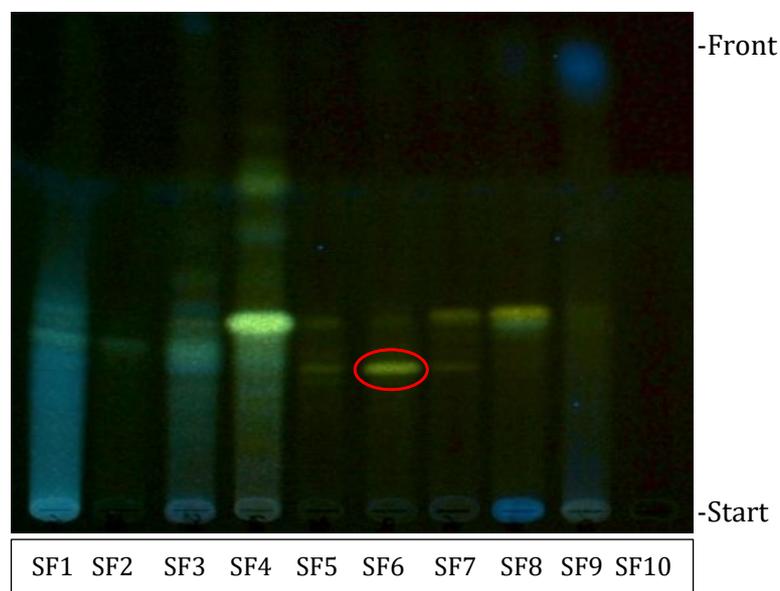
#### 4.3.1 Durchführung von SC 2

<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Fraktion 1-59: Methanol-Wasser (50:50)
	Fraktion 60-147: Methanol-Wasser (70:30)
<b>Dimension</b>	Ø = 1,5 cm Länge = 60 cm
<b>Flussrate</b>	0,5 mL/min

Tab. 4 Säulenparameter von SC 2

Jede fünfte Fraktion wurde mit Fließmittel A (s. S. 5) dünnschichtchromatographisch untersucht und Fraktionen mit gleicher Zusammensetzung zu zehn Sammelfractionen vereinigt.

#### 4.3.2 Überprüfung der Sammelfractionen



**Abb. 7 DC der Sammelfractionen von SC 2  
Fließmittel A (S.5)  
Detektion mit NS/PEG**

Die DC der Sammelfractionen zeigt, dass mit SF6 eine chromatographisch einheitliche Komponente gewonnen werden konnte. Trotz der geringen Ausbeute von 1,2 mg wurde

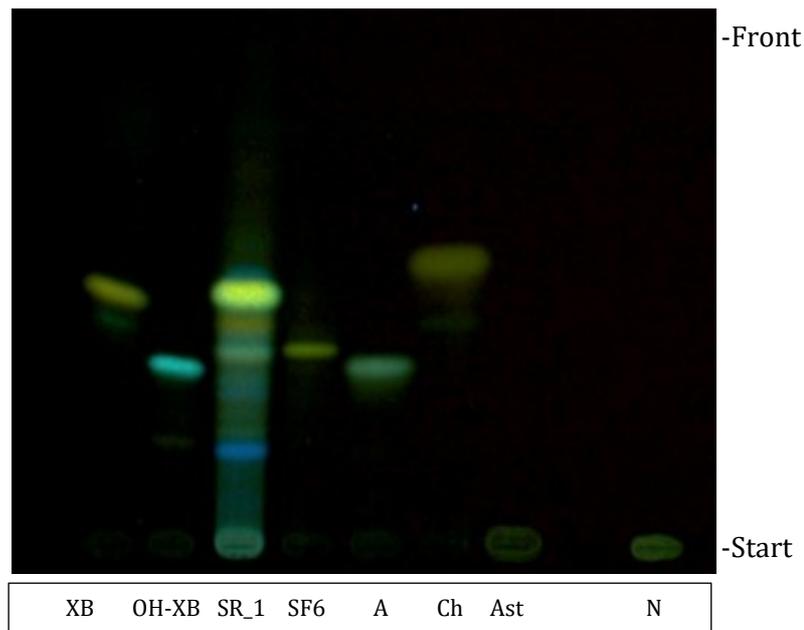
sie zur Strukturaufklärung eingesetzt. In SF4 war eine Hauptkomponente mit gelb-grüner Fluoreszenz sichtbar, bei der es sich ebenfalls um ein Xanthon handeln könnte. Allerdings waren oberhalb und unterhalb weitere gelb-grün fluoreszierende Banden sichtbar. Die geringe Ausbeute von 1,7 mg erlaubte keine weitere Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. In SF8 war bei Rf 0,42 ebenfalls eine Hauptkomponente mit gelb-grüner Fluoreszenz sichtbar. Die Substanz wurde nicht zur Strukturaufklärung herangezogen, da am Start eine bläuliche Fluoreszenz vorhanden war. Das deutete darauf hin, dass die Substanz als Mischung vorlag. Wegen der geringen Ausbeute von 1,3 mg konnte kein weiterer säulenchromatographischer Trennschritt durchgeführt werden.

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge [mg]
1	1-22	9,2
2	23-27	0,6
3	28-67	1,5
4	68-82	1,7
5	83-92	1,1
6	93-103	1,2
7	104-116	0,9
8	117-122	1,3
9	123-147	2,4
10	Nachlauf	6,0

**Tab. 5 Ausbeuten der Sammelfraktionen von SC 2**

#### **4.3.3 Vergleich der Sammelfraktion 6 mit bekannten Xanthonen und Flavonoiden**

Aufgrund des Rf-Wertes und der Farbe der Bande in Sammelfraktion 6 wurde vermutet, dass es sich hierbei um eines der bereits identifizierten Xanthone XB, OH-XB oder SR\_1 handeln könnte (Kainz et al.; 2013;2014; Rindler S. 2019). Aus diesem Grund wurde die Fraktion mit diesen Substanzen und außerdem mit vier möglichen Flavonoiden, und zwar Apigenin (A), Chrysin (Ch), Astragalin (Ast) und Neohesperidin (N), auf einer DC verglichen.



**Abb. 8 DC-Vergleich SF 6 mit Xanthonen/Flavonoiden; Fließmittel A (S. 5); Detektion mit NS/PEG**

Der Vergleich zeigte, dass es sich bei der in Sammelfraktion 6 isolierten Substanz, weder um ein bereits identifiziertes Xanthon noch um eines der aufgetragenen Flavonoide handelte. Die Substanz wurde B04 genannt und zur Strukturaufklärung eingesetzt.

#### **4.3.4 Strukturaufklärung mittels NMR**

Eine eindeutige Strukturaufklärung war aufgrund der geringen Menge von B04 nicht möglich. Die Messungen zeigten, dass es sich bei Substanz B04 um ein komplexes Gemisch handelte und in der Mischung auch Weichmacher enthalten waren.

#### 4.4 Auftrennung von Fraktion 3

Von der Fraktion 3 standen 315 mg zur Verfügung. Hierbei handelte es sich um ein Ethylacetat-Extrakt aus den Nebenwurzeln. Die DC in Abbildung 4 (S. 7) zeigte, dass in dieser Fraktion 2 Hauptkomponenten vorhanden waren. Einerseits eine gelb-grün fluoreszierende Bande bei Rf ca. 0,2 und eine eher bläulich fluoreszierende Bande bei Rf ca. 0,1. Zwischen den beiden Banden waren auch schwache orange Banden sichtbar. Ziel war es die gelb-grün fluoreszierende Bande zu isolieren.

##### 4.4.1 Durchführung von SC 3

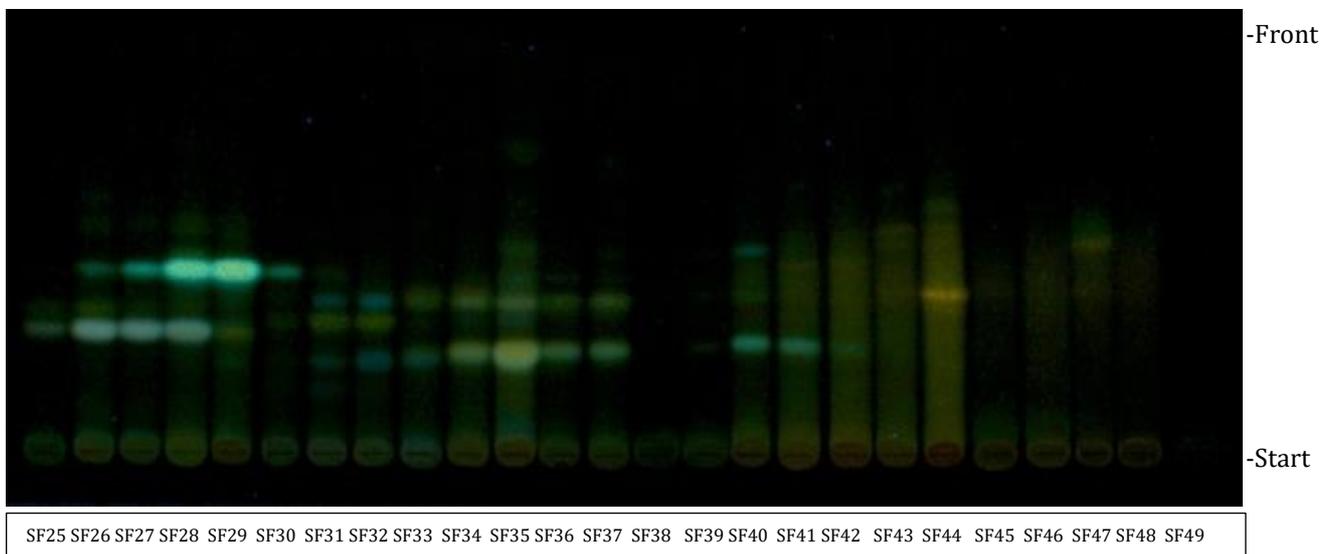
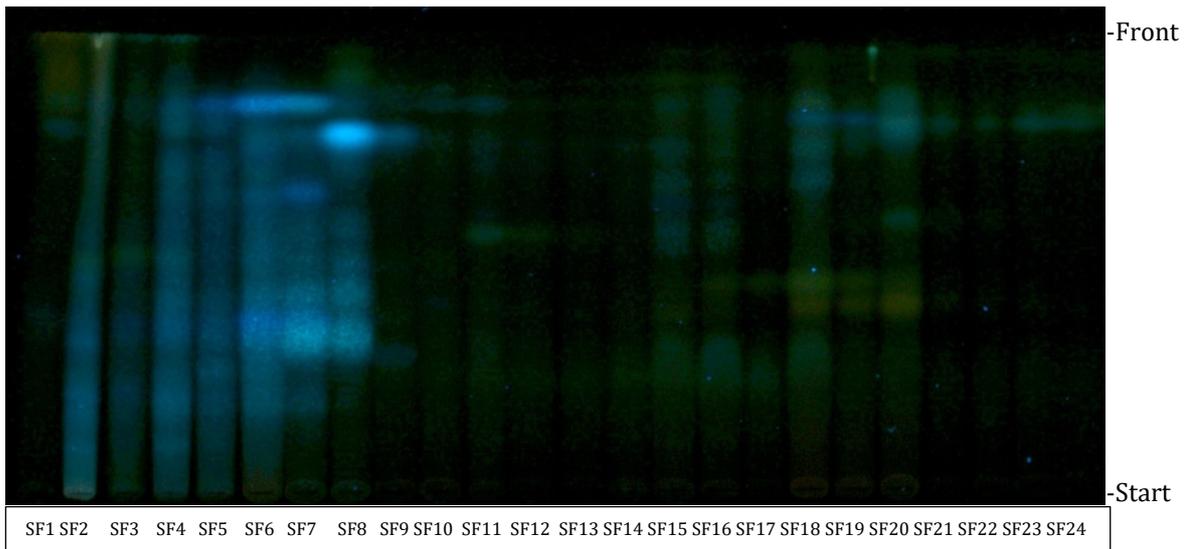
<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Fraktion 1-288: Methanol-Wasser (50:50)
	Fraktion 289-346: Methanol-Wasser (60:40)
	Fraktion 347-446: Methanol-Wasser (80:20)
<b>Dimension</b>	Ø = 2 cm Länge = 50 cm
<b>Flussrate</b>	0,6 mL/min

Tab. 6 Säulenparameter von SC 3

Jede zehnte Fraktion wurde dünnschichtchromatographisch untersucht und Fraktionen mit gleicher Zusammensetzung zu 49 Sammelfraktionen vereinigt.

##### 4.4.2 Überprüfung der Sammelfraktionen

Für die Sammelfraktionen 1-24 wurde wegen ihren polaren Eigenschaften Fließmittel B (S.5) verwendet und für die Sammelfraktionen 25-49 Fließmittel A (S. 5). Die Detektion erfolgte mit NS/PEG bei einer Wellenlänge von 366 nm. Die Sammelfraktionen 1-24 enthielten offensichtlich keine Xanthone, da gelb-grün fluoreszierende Banden fehlten (s. Abb. 9 oben, S. 16).



**Abb. 9 DC der Sammelfractionen von SC 3  
oben Fließmittel B (S. 5), unten Fließmittel A (S. 5)  
Detektion mit NS/PEG**

Wie in Abb. 9 ersichtlich konnten in diesem Trennschritt keine Einzelkomponenten gewonnen werden. SF28 und SF29 zeigten bei  $R_f$  ca. 0,4 eine Hauptkomponente mit deutlicher gelb-grüner Fluoreszenz. Aufgrund ihrer ähnlichen Zusammensetzung wurden die beiden Fractionen vereinigt und konnten wegen der daraus resultierenden Ausbeute (s. Tab. 7, S. 17) für einen weiteren Reinigungsschritt über Säulenchromatographie herangezogen werden. Auch die Sammelfraction 44 zeigte eine Hauptkomponente mit oranger Fluoreszenz. Wegen der Färbung der Bande und dem  $R_f$ -Wert von etwa 0,4 bestand der Verdacht, dass es sich hierbei um Quercetin handeln könnte.

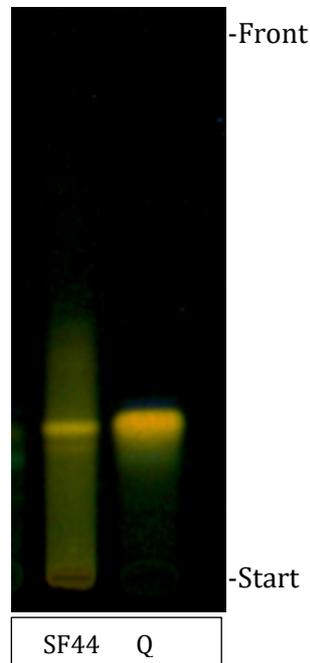
<b>Sammelfraktion</b>	<b>Einzelfractionen</b>	<b>Menge [mg]</b>
1-24	1-188	200,4
25	189+190	1,0
26	191-197	1,4
27	198-202	1,1
28	203-217	3,9
29	218-242	5,4
30	243-247	1,7
31	248-257	2,4
32	258-277	3,8
33	278-297	1,6
34	298-312	5,8
35	313-327	2,6
36	328-330	0,2
37	331-337	2,2
38	338-342	1,2
39	343-345	0,9
40	346-352	1,6
41	353-357	5,7
42	358-362	4,7
43	363-372	5,5
44	373-392	8,5
45	393-407	6,8
46	408-417	11,1
47	418-427	6,9
48	428-446	5,2
49	Nachlauf	21,2

**Tab. 7 Ausbeuten der Sammelfractionen von SC 3**

#### **4.4.3 Vergleich von SF44/SC 3 mit diversen Flavonoiden**

Aufgrund der orangen Fluoreszenz und dem R<sub>f</sub>-Wert von etwa 0,4 konnte es sich bei der Hauptkomponente in SF44 um ein Flavonoid, wie zum Beispiel Quercetin, handeln.

Aus diesem Grund wurde ein dünnschichtchromatographischer Vergleich der Sammelfraktion 44 mit Quercetin als Referenz in zwei verschiedenen DC-Systemen durchgeführt.



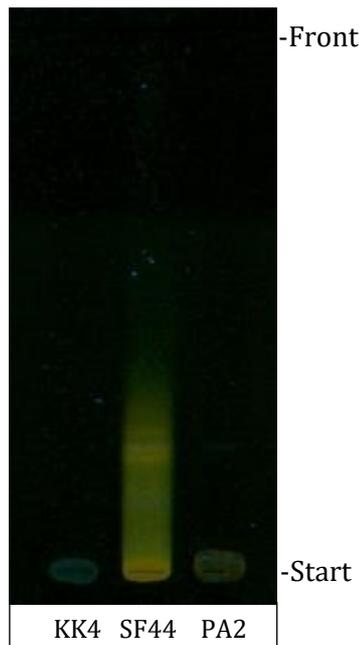
**Abb. 10 DC-Vergleich von SF44 mit Quercetin  
Fließmittel A (S. 5)  
Detektion mit NS/PEG**



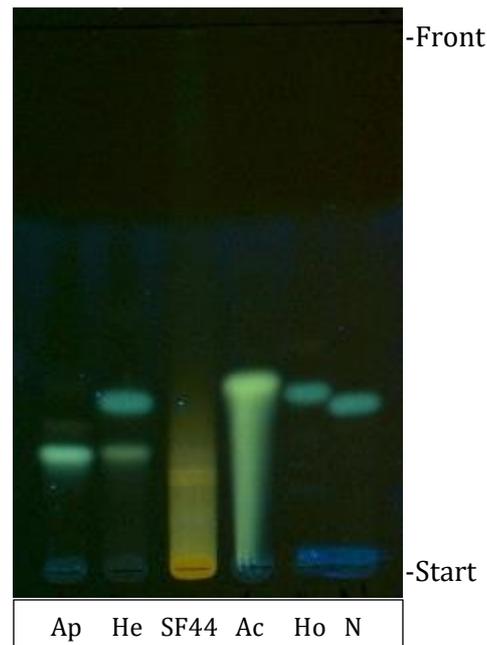
**Abb. 11 DC-Vergleich von SF44 mit Quercetin  
Fließmittel C (S. 5)  
Detektion mit NS/PEG**

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, könnte man vermuten, dass es sich in SF44 um Quercetin handelt, da beide Banden denselben Rf-Wert aufweisen. In einem Vergleich mit einem anderen Fließmittel wurde allerdings deutlich, dass diese Substanz nicht mit Quercetin übereinstimmt.

Es wurden weitere Versuche mit anderen Flavonoiden ähnlicher Polarität und Fluoreszenz nach der Detektion durchgeführt (Apigenin, Hesperidin, Acacetin, Homoeriodictyol und Neohesperidin), die ebenfalls keine Übereinstimmungen zeigten. Auch im Vergleich mit Tanninen Procyanidin A2, Cinnamtannin B1 und Aesculitannin B (Kainz K, 2011) konnte die Hauptkomponente von SF44 nicht identifiziert werden (s. Abb. 12 und 13).



**Abb. 12 DC-Vergleich von SF44 mit KK4 und Procyanidin A2  
Fließmittel A (S. 5)  
Detektion mit NS/PEG**



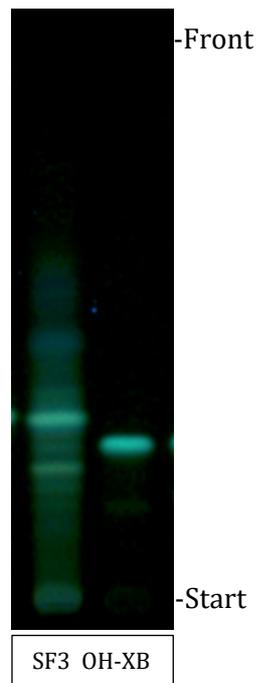
**Abb. 13 DC-Vergleich von SF44 mit Flavonoiden  
Fließmittel A (S.5)  
Detektion mit NS/PEG**

<b>Ac</b>	Acacetin
<b>Ap</b>	Apigenin
<b>He</b>	Hesperidin
<b>Ho</b>	Homoeriodictyol
<b>N</b>	Neohesperidin

**Tab. 8 für Vergleichs-DC verwendete Flavanoide**

#### 4.5 Auftrennung von SF3 von SC1

Wie die Abbildung 5 (S. 9) zeigt, war in Sammelfraktion 3 von SC1 bei Rf ca. 0,4 eine klare Hauptbande mit gelb-grüner Fluoreszenz sichtbar. Der DC-Vergleich mit Substanz OH-XB zeigte, dass es sich nicht um dieselbe Substanz handelte, da die Banden nicht denselben Rf-Wert aufwiesen.



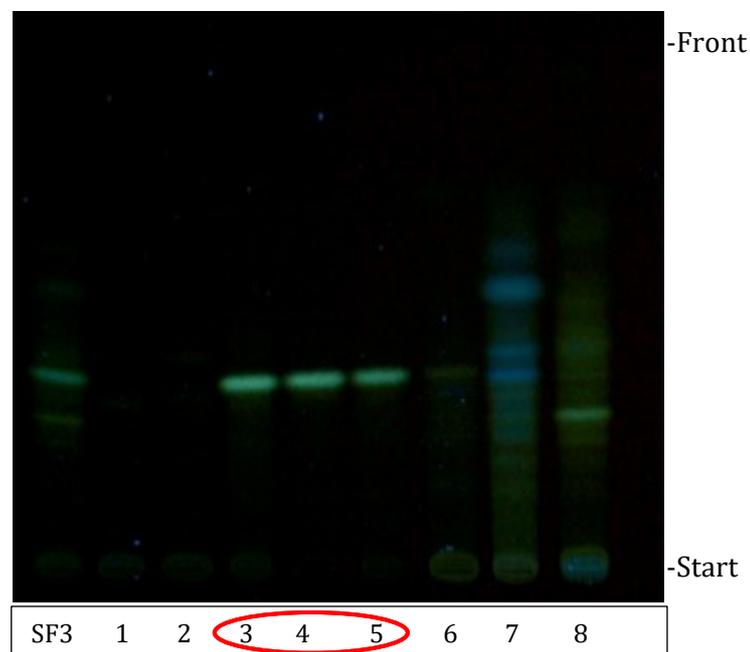
**Abb. 14 DC- Vergleich  
von SF3 mit OH-XB  
Fließmittel A (S.5)  
Detektion mit NS/PEG**

Da sonst nur wenige Begleitstoffe in geringer Menge sichtbar waren, wurde trotz der geringen Ausbeute von 2,2 mg ein weiterer Trennschritt mittels Säulenchromatographie durchgeführt, um die Hauptbande als Reinsubstanz zu isolieren. In diesem Aufreinigungsschritt wurden die Fraktionen händisch gesammelt und jede Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht.

## 4.5.1 Durchführung von SC4

<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Fraktion 1-3: Methanol-Wasser (50:50)
	Fraktion 4-6: Methanol-Wasser (70:30)
	Fraktion 7-8: 100% Methanol
<b>Dimension</b>	∅ = 1,5 cm Länge = 30 cm

Tab. 9 Säulenparameter von SC 4

Abb. 15 DC der Sammelfractionen von SC 4  
Fließmitte A (S.5); Detektion mit NS/PEG

Fraktion	Menge [mg]
1	-
2	-
3	0,5
4	0,1
5	0,1
6	0,3
7	0,6
8	0,6

Tab. 10 Ausbeuten der Fraktionen von SC4

Die Fraktionen 3-5 enthielten die Hauptkomponente von SF3 und wurden vereinigt. Die Substanz wurde B01 genannt. Insgesamt konnte eine Menge von 0,7mg für die Strukturaufklärung mittels NMR isoliert werden.

#### 4.5.2 Strukturaufklärung mittels NMR

Bei der Substanz B01 war die eindeutige Strukturaufklärung aufgrund der geringen Menge ebenfalls nicht möglich. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es sich um ein Gemisch handelt, in dem ebenso Weichmacher enthalten sind, wie in Substanz B04.

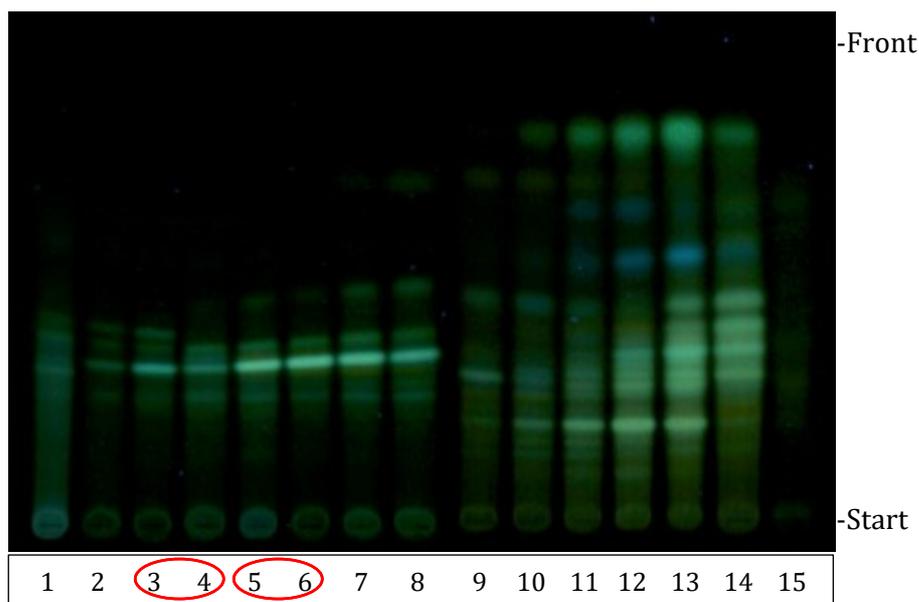
#### 4.6 Auftrennung von SF4 von SC1

In der Sammelfraktion 4 von SC1 waren in Rf-Bereich von 0,3 bis 0,5 einige gelb-grün fluoreszierende Banden sichtbar, die alle eine ähnliche Intensität aufwiesen (s. Abb. 5, S.9). Wegen der quantitativen Ausbeute von 14,7 mg wurde SF4 von SC1 einem weiteren Trennschritt mittels Säulenchromatographie unterzogen. Die Fraktionen wurden händisch gesammelt und jede Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht.

##### 4.6.1 Durchführung von SC5

<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Fraktion 1-5: Methanol-Wasser (50:50)
	Fraktion 6-11: Methanol-Wasser (60:40)
	Fraktion 12-13: Methanol-Wasser (80:20)
	Fraktion 14-15: 100% Methanol
<b>Dimension</b>	$\varnothing = 1,5 \text{ cm}$ Länge = 30 cm

Tab. 11 Säulenparameter von SC 5



**Abb. 16 DC der Sammelfractionen von SC5  
Fließmittel A (S-5)  
Detektion mit NS/PEG**

<b>Fraktion</b>	<b>Menge [mg]</b>
1	0,8
2	0,7
3	0,9
4	1,3
5+6	3,6
7+8	0,5
9	0,8
10	1,5
11	1,2
12	1,1
13	0,9
14	1,0
15	0,4

**Tab. 12 Ausbeuten der Fraktionen von SC5**

Wie in Abb. 16 zu sehen, war es mit SC5 nicht möglich Reinsubstanzen zu gewinnen. Allerdings wurden die Fraktionen 3 und 4 wegen ihrer übereinstimmenden Zusammensetzung vereinigt. Trotz der niedrigen Ausbeute von 2,2 mg wurde ein

weiterer Trennschritt mittels Säulenchromatographie durchgeführt, da abgesehen von der Hauptkomponente bei Rf ca. 0,3 kaum Nebenkomponten sichtbar waren. Die Fraktionen 5 und 6 zeigten ebenfalls eine übereinstimmende Zusammensetzung und wurden auch vereinigt. Die daraus resultierende Ausbeute von 3,6 mg und die Hauptbande bei Rf 0,3 erlaubte ebenfalls eine weitere säulenchromatographische Trennung. Die Fraktionen 7 und 8 zeigten, wie auch die Fraktionen 5 und 6, eine Hauptkomponente bei einem Rf von 0,3. Allerdings betrug die Ausbeute nach Vereinigung der beiden Fraktionen nur 0,5 mg.

#### 4.6.2 Weitere Aufreinigung von Fraktion 3+4/SC5

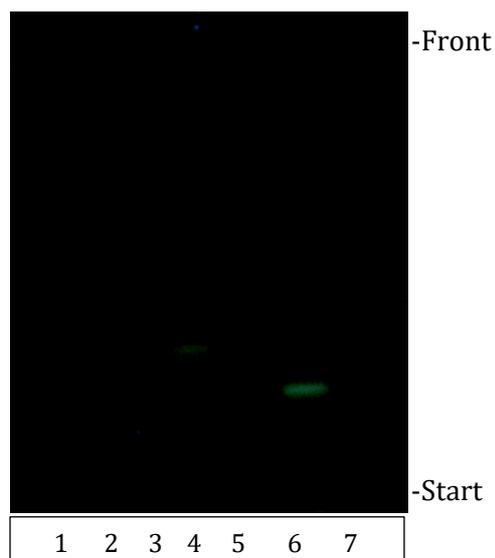
Da die Hauptkomponente in Fraktion 3+4 nicht chromatographisch einheitlich war, wurden sie nochmals über eine Säulenchromatographie aufgereinigt.

Dabei wurden folgende Säulenparameter verwendet:

##### 4.6.2.1 Durchführung von SC6

<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Fraktion 1-4: Methanol-Wasser (50:50)
	Fraktion 5: Methanol-Wasser (70:30)
	Fraktion 6: 100% Methanol
<b>Dimension</b>	$\varnothing = 1,5 \text{ cm}$ Länge = 15 cm

**Tab. 13 Säulenparameter von SC6**



**Abb. 17 DC der Sammelfractionen von SC6  
Fließmittel A (S.5)  
Detektion mit NS/PEG**

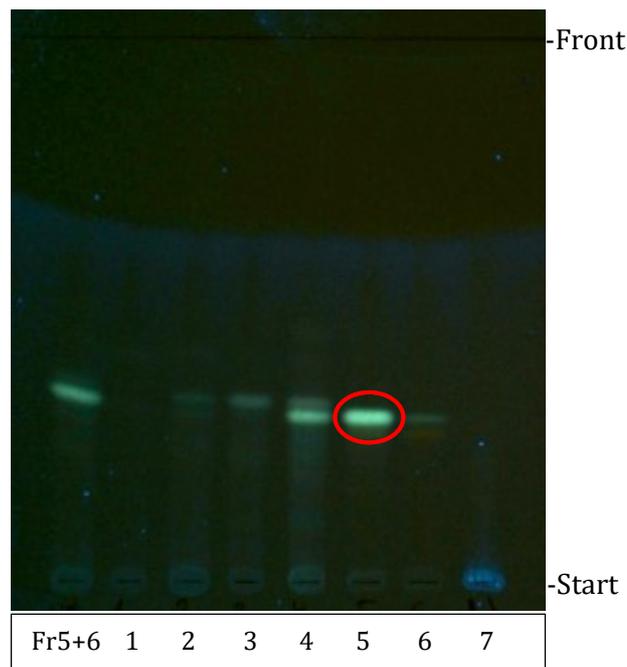
In Fraktion 6 war es möglich, Substanz BO2 zu isolieren. Die Ausbeute betrug 0,4 mg. Die geringe Menge reichte für die Strukturaufklärung mittels NMR nicht aus.

Orientierende Messungen ergaben, dass es sich bei der Substanz BO2 um eine Mischung handelte, in der ebenfalls Weichmacher enthalten waren.

### 4.6.3 Weitere Aufreinigung von Fraktion 5+6/SC5

#### 4.6.3.1 Durchführung von SC7

Die Ausbeute von Fraktion 5+6 betrug 3,6 mg. Die Hauptbande wurde in gleicher Weise wie in Kapitel 4.6.2.1 aufgereinigt (s. S. 24).



**Abb. 18 DC der Sammelfractionen von SC7  
Fließmittel A (S. 5)  
Detektion mit NS/PEG**

<b>Fraktion</b>	<b>Menge [mg]</b>
1	0,1
2	0,1
3	0,2
4	0,4
5	0,7
6	0,3
7	1,8

**Tab. 14 Ausbeuten der Fraktionen von SC7**

Es konnten sieben Fraktionen gesammelt werden. Davon zeigte Fraktion 5 (0,7 mg) eine chromatographisch einheitliche Bande (Substanz BO3) mit gelb-grüner Fluoreszenz.

#### 4.6.4 Vergleich der erhaltenen Fraktionen

Da die Substanzen B01 und B03, die mittels Säulenchromatographie gewonnen worden waren, ähnliche Rf-Werte aufwiesen, wurde ein dünnschichtchromatographischer Vergleich durchgeführt, um abzusichern, dass es sich hierbei nicht um dieselben Substanzen handelt. Hierfür wurde die Sammelfraktion 3 und die Fraktion 5+6, die aus der Sammelfraktion 4 gewonnen wurde, mittels Dünnschichtchromatographie untersucht.

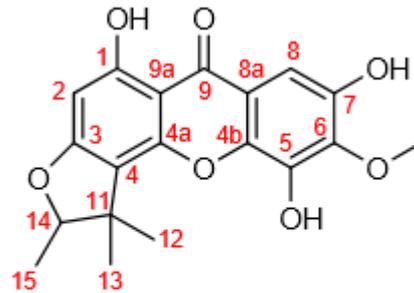


**Abb. 19 DC-Vergleich Fraktion  
5+6 von SF 4 mit SF 3  
Fließmittel A (S.5)  
Detektion mit NS/PEG**

Der Vergleich zeigte, dass sich die beiden Banden im Rf-Wert minimal unterschieden. Auch die Farbe der Banden war unterschiedlich. Das war ein Hinweis darauf, dass es sich um strukturell verwandte, aber nicht identische Verbindungen handelt.

#### 4.6.5 Strukturaufklärung der Substanz BO3 mittels NMR

Die Strukturaufklärung ergab, dass es sich bei Substanz BO3 um eine Mischung handelte. Das Gemisch enthielt zwei verschiedene Xanthone. Bei einer Komponente handelte es sich um das bereits identifizierte 2-Deprenyl-6-O-methyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (EM4, Mittermair E., in Vorbereitung), was durch des HSQC overlay bewiesen werden konnte (s. Anhang S. 48).



Chemical Formula:  $C_{19}H_{18}O_7$   
Molecular Weight: 358,34

**Abb. 20 2-Deprenyl-6-O-methyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (EM4; Mittermair E., in Vorbereitung)**

Das zweite Xanthon enthält eine benachbarte Methoxy-Gruppe, was der Crosspeak im NOESY zu einem Aromatensignal zeigt (s. Anhang ab S. 49). Die Detailauswertung war leider wegen der geringen Menge nicht möglich.

#### 4.7 Auftrennung von SF5 von SC1

Die Sammelfraktion 5 von SC1 zeigte im Rf-Bereich 0,3 bis 0,5 einige gelb-grün fluoreszierende Banden mit ähnlicher Intensität, wobei die Bande bei Rf ca. 0,5 eine etwas stärkere Intensität zeigte (s. Abb. 5, S. 9). Die Ausbeute betrug 9,8 mg und SF5 wurde einem weiteren Trennschritt mittels Säulenchromatographie unterzogen. Die Fraktionen wurden händisch gesammelt und jede Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht.

##### 4.7.1 Durchführung von SC8

<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Methanol-Wasser (70:30)
<b>Dimension</b>	Ø = 1,5 cm Länge = 30 cm

Tab. 15 Säulenparameter von SC8

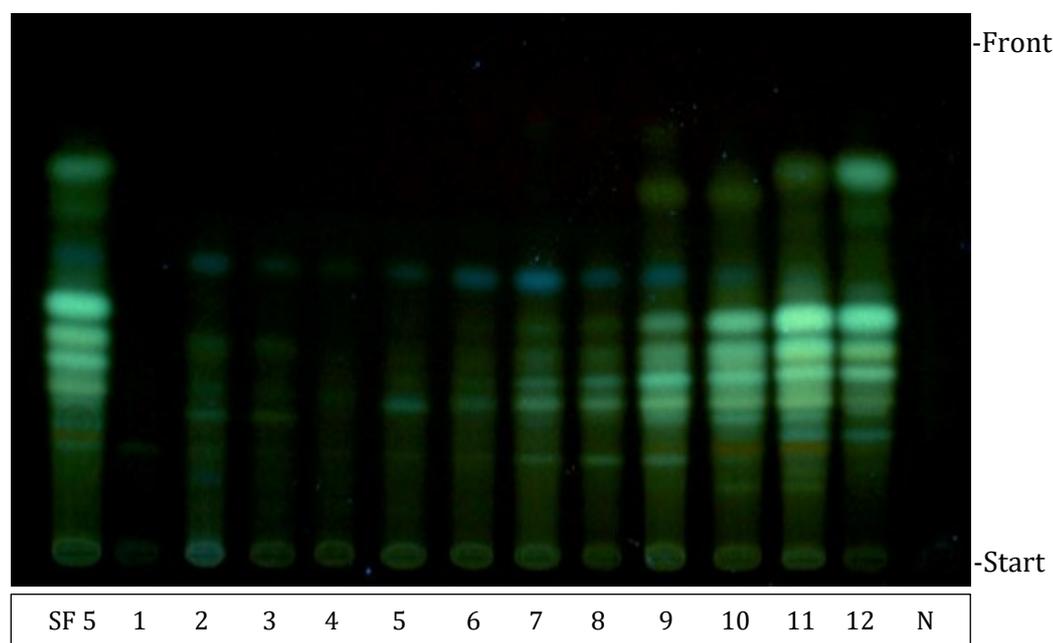


Abb. 21 DC der Sammelfractionen von SC8  
Fließmittel A (S.5)  
Detektion mit NS/PEG

Wie in Abb. 21 ersichtlich, war es nicht möglich eine einzelne Bande zu isolieren. Auch die Wiederholung des Reinigungsschrittes war nicht möglich, da die quantitativen Ausbeuten der einzelnen Fraktionen nicht ausreichend waren (s. Tab. 16, S. 30).

<b>Fraktion</b>	<b>Menge [mg]</b>
1	0,1
2	0,4
3	0,2
4	0,2
5	0,2
6	0,6
7	0,6
8	0,7
9	1,5
10	1,0
11	2,2
12	2,0
13	0,1

**Tab. 16 Ausbeute der Fraktionen von SF5/SC6**

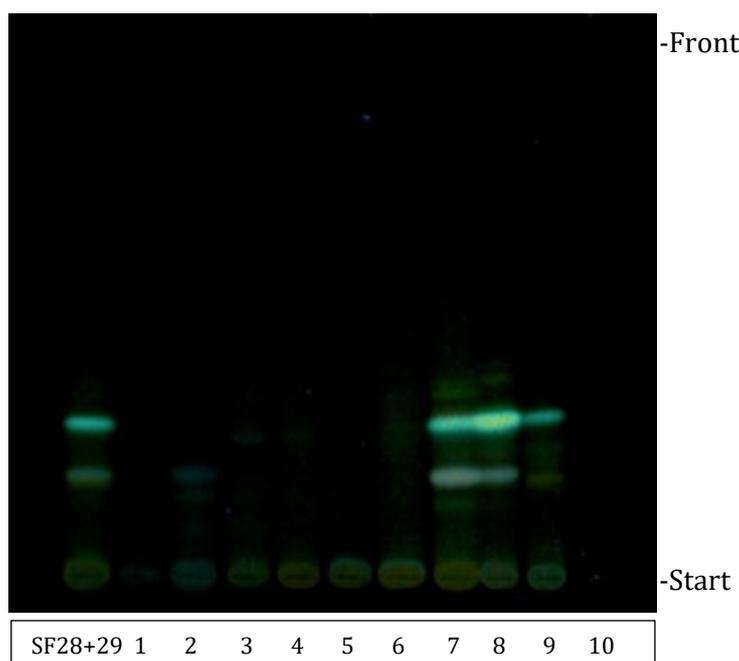
#### **4.8 Auftrennung von SF28+29 von SC3**

Wie in Abb. 9 (S. 16) zu sehen, enthielten die Sammelfraktionen 28 und 29 zwei Banden. Bei einem Rf von etwa 0,4 war eine Hauptbande mit gelb-grüner Fluoreszenz sichtbar, die nun in einem weiteren säulenchromatographischen Trennschritt zu isolieren galt. Jede gewonnene Fraktion wurde dünn-schichtchromatographisch untersucht.

##### **4.8.1 Durchführung von SC9**

<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Fraktion 1-2: Methanol-Wasser (50:50)
	Fraktion: 3-5: Methanol-Wasser (70:30)
	Fraktion 6-10: 100% Methanol
<b>Dimension</b>	$\varnothing = 1,5 \text{ cm}$ Länge = 30 cm

**Tab. 17 Säulenparameter von SC 9**



**Abb. 22 DC der Sammelfraktionen von SC9  
Fließmittel A (S. 5)  
Detektion mit NS/PEG**

<b>Fraktion</b>	<b>Menge [mg]</b>
1	0,5
2	0,7
3	0,2
4	0,4
5	0,8
6	0,8
7	1,3
8	0,8
9	2,2
10	1,6

**Tab. 18 Ausbeute der Fraktionen von SC9**

Wie Abb. 22 zeigt, führte dieser Aufreinigungsschritt zu keiner Reinsubstanz, weil die zwei Banden nicht voneinander getrennt werden konnten. Wegen der niedrigen Ausbeute wurden die Fraktionen 7+8 vereinigt und einem weiteren Aufreinigungsschritt unterzogen, ebenso wie Fraktion 9.

#### 4.9 Auftrennung von SF 7+8 von SC9

Die im letzten Reinigungsschritt mit SC9 gewonnenen und vereinigten Fraktionen 7 und 8 (mit einer Ausbeute von 2,1 mg) zeigten zwei Banden, eine gelb-grün fluoreszierende Bande bei einem Rf-Wert von 0,3 und eine Bande unterschiedlicher Fluoreszenz bei einem Rf von 0,2. Ziel war es die gelb-grün fluoreszierende Komponente zu isolieren, daher wurde jede Fraktion dünn-schichtchromatographisch untersucht.

##### 4.9.1 Durchführung von SC10

<b>Stationäre Phase</b>	Sephadex® LH-20
<b>Mobile Phase</b>	Methanol - Wasser (70:30)
<b>Dimension</b>	Ø = 1,5 cm Länge = 15 cm

Tab. 19 Säulenparameter von SC 10

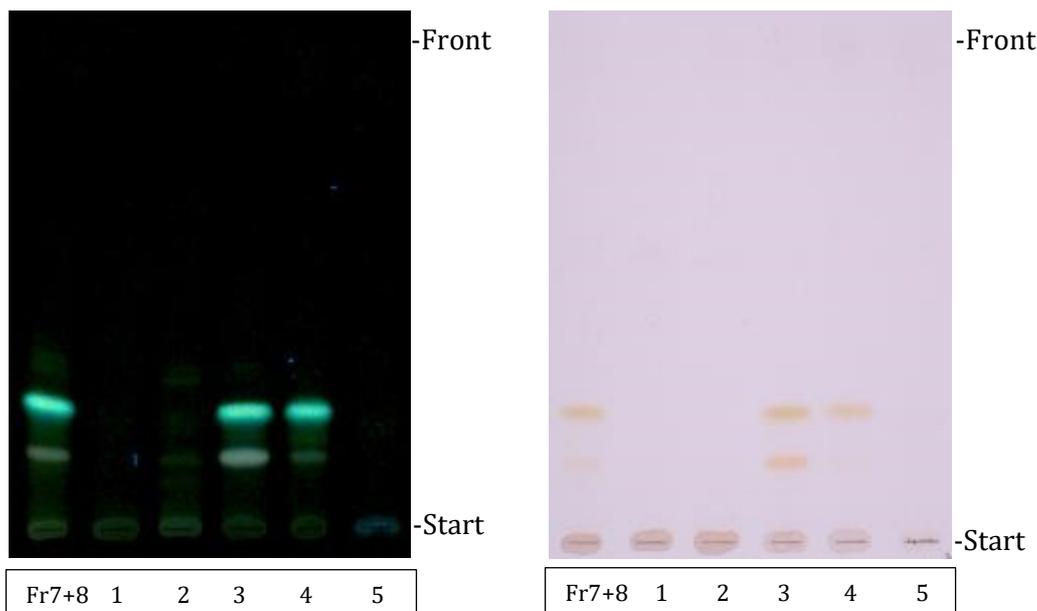


Abb. 23 DC der Sammelfractionen von SC10  
Fließmittel A (S. 5)  
Detektionsmethode: links mit NS/PEG, rechts mit AASS

Fraktion	Menge [mg]
1	0,1
2	0,1
3	0,3
4	0,3
5	1,3

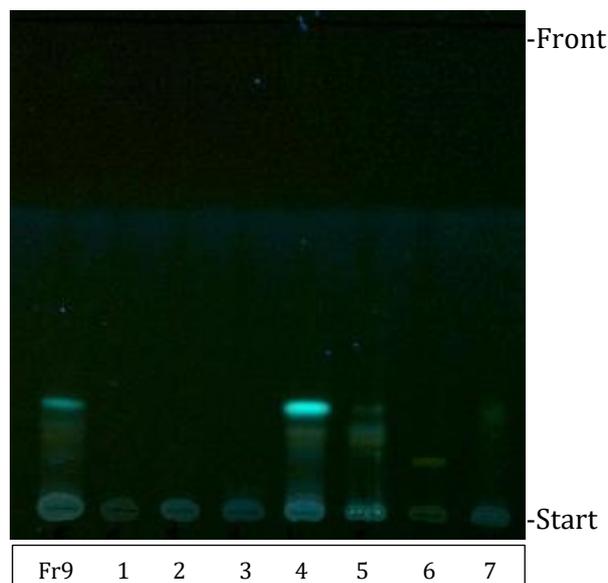
Tab. 20 Ausbeuten der Fraktionen von SC10

Mit diesem säulenchromatographischen Trennschritt war es nicht möglich eine chromatographisch einheitliche Bande zu gewinnen. Auch die geringen Ausbeuten (s. Tab. 20, S. 32) machten einen weiteren Reinigungsschritt mittels Säulenchromatographie nicht möglich.

#### 4.10 Auftrennung von Fraktion 9 von SC9

##### 4.10.1 Durchführung von SC11

In der Fraktion 9 von SC9 war bei einem Rf-Wert von 0,3 eine Hauptkomponente mit gelbgrüner Fluoreszenz sichtbar. Darunter bei etwa Rf 0,2 war eine Bande mit schwacher Fluoreszenz sichtbar. Da nur eine Hauptkomponente sichtbar war, wurde die Fraktion 9 trotz der eher geringen Ausbeute von 2,2 mg einem weiteren Trennschritt mittels Säulenchromatographie unterzogen. Die Säulenparameter wurden von SC10 übernommen (s. Tab. 19, S. 32) und jede Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht.



**Abb. 24 DC der Sammelfractionen SC11  
Fließmittel A (S. 5)  
Detektion mit NS/PEG**

<b>Fraktion</b>	<b>Menge [mg]</b>
1	-
2	0,1
3	0,2
4	0,5
5	1,1
6	0,2
7	0,1

**Tab. 21 Ausbeuten der Fraktionen von SC11**

In Fraktion 4 war bei einem Rf von 0,2 eine gelb-grün fluoreszierende Hauptbande sichtbar. Allerdings ist am Startpunkt ebenfalls eine Fluoreszenz sichtbar, weshalb die in Fraktion 4 isolierte Bande nicht chromatographisch einheitlich war. Wegen der geringen Ausbeute von 0,5 mg war ein weiterer säulenchromatographischer Trennschritt nicht möglich.

## 5 Diskussion der Ergebnisse

Heutzutage sind Krebserkrankungen für etwa ein Viertel der jährlichen Todesfälle verantwortlich. Dabei gehört das Kolorektalkarzinom bei Männern als auch bei Frauen zu den dritthäufigsten Krebserkrankungen. *Metaxya rostrata* (Kunth C. Presl), ein immergrüner Baumfarn aus den Flachlandregenwäldern Mittelamerikas, wird in Costa Rica ethnomedizinisch bei Geschwüren und Ulcera des Magen-Darm-Traktes verwendet. In vorangegangenen Dissertationen konnten bereits einige Reinsubstanzen isoliert und ihre Aktivität auf Dickdarmkrebszellen untersucht werden. Dabei spielten vor allem die enthaltenen Xanthone eine wichtige Rolle. Zwei Xanthone 2-Deprenyl-rheediaxanthon B (XB) und 2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (OH-XB) wurden bezüglich ihrer Aktivität näher untersucht und zeigten trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit große Unterschiede in ihrer Wirkungsweise. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der Vergleich weiterer verwandter Xanthone zusätzliche Aufschlüsse über Wirkungsmechanismen ergeben könnte. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Fraktionen, die durch vorherige Arbeiten gewonnen worden waren, bezüglich ihrer Inhaltsstoffe analysiert. Ziel war es, Reinsubstanzen zu isolieren, die strukturelle Ähnlichkeiten mit bereits identifizierten Xanthonen aus *Metaxya rostrata* aufwiesen.

Von etwa 450 vorhandenen Fraktionen wurden drei ausgewählt, die mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 weiter aufgetrennt wurden.

Fraktion 1 enthielt ein Gemisch an Komponenten, die bei der Detektion mit NS/PEG und einer Wellenlänge von 366 nm, eine gelb-grüne Fluoreszenz zeigten. In einem ersten Aufreinigungsschritt war es nicht möglich, Reinsubstanzen zu isolieren, allerdings wurden die Sammelfraktionen 3, 4 und 5 für weitere Reinigungsschritte herangezogen (s. Abb. 5, S. 9 und Tab. 3, S. 10). Wie in Kapitel 4.5 (s. S. 22) beschrieben konnte Substanz B01 gewonnen werden (s. Abb. 15, S. 21). Aufgrund des R<sub>f</sub>-Wertes und der Fluoreszenz bestand der Verdacht, dass es sich hierbei um das bereits isolierte Xanthon OH-XB handeln könnte. Der Vergleich der beiden Substanzen zeigte, dass sie sich sowohl im R<sub>f</sub>-Wert als auch in der Fluoreszenz unterscheiden (Abb. 14, S. 20). Aus der Sammelfraktion 4 konnte durch zwei Aufreinigungsschritte zwei Substanzen isoliert werden. Substanz B02 zeigte in der Dünnschichtchromatographie eine chromatographisch einheitliche gelb-grün fluoreszierende Bande (s. Kapitel 4.6.2, Abb. 17, S. 25). Die Strukturaufklärung

mittels NMR war aufgrund der geringen Masse nicht möglich, zeigte allerdings, dass es sich bei B02 um ein Gemisch handelte, in dem auch Weichmacher enthalten waren. Bei Substanz B03 (s. Kapitel 4.6.3., Abb. 18, S. 26) zeigten die Untersuchungen eine Mischung zwei verschiedener Xanthone. Einerseits bestand das Gemisch aus dem bereits charakterisierten 2-Deprenyl-6-O-methoxy-7-hydroxy-rheediaxanthon B (EM4, Mittermair E. in Vorbereitung) und einem strukturell verwandten Xanthon, das eine benachbarte Methoxy-Gruppe in Position 5 oder 7 aufwies. Die eindeutige Zuordnung der Verknüpfung der Methylgruppe war wegen der geringen Menge nicht möglich.

Fraktion 2 enthielt eine Hauptkomponente und wenige Nebenkomponten. Aus dieser Fraktion wurde Substanz B04 isoliert (s. Kapitel 4.3., Abb.7, S. 12). Der Vergleich mit den bereits identifizierten Xanthonen zeigte, dass es sich bei B04 um keine dieser Substanzen handelte. Auch der Vergleich mit ausgewählten Flavonoiden zeigte keine Übereinstimmungen (s. Kapitel 4.3.3 Abb.8, S. 14). Die Strukturaufklärung ergab auch hier, dass es sich um ein komplexes Gemisch handelte, in dem Weichmacher enthalten waren.

Fraktion 3 enthielt zwei Banden. Diese zwei Substanzen müssen ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweisen, denn es war nicht möglich diese über Säulenchromatographie zu trennen. Diese Fraktion enthielt auch ein Flavonoid, dessen Identität allerdings nicht geklärt werden konnte. Wegen der orangen Fluoreszenz bei 366nm wird es sich vermutlich um ein Flavonoid vom Quercetin-Typ handeln.

## 6 Zusammenfassung

Das getrocknete und pulverisierte Rhizom von *Metaxya rostrata* wird in Costa Rica als wässrige Suspension ethnomedizinisch bei Geschwüren des Magen-Darm-Traktes eingesetzt.

Aus diesem Grund wurde der Baumfarn im Rahmen mehrjähriger Arbeiten auf seine Inhaltsstoffe untersucht. Dabei konnten einige Substanzen isoliert werden, die auf Dickdarmkrebszellen eine zytotoxische Wirkung zeigten. Die Xanthone 2-Deprenyl-rheediaxanthon B (XB) und 2-Deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (OH-XB) beeinflussen den Zellzyklus trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit auf unterschiedliche Art und Weise.

Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit weitere strukturell ähnliche Xanthone zu identifizieren und für die Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen zu isolieren.

Hierfür wurden etwa 450 Fraktionen verschiedener Extrakte des Rhizoms und der Nebenwurzeln, welche in vorangegangenen Diplomarbeiten mittels Säulenchromatographie gewonnen worden waren, herangezogen und dünnschichtchromatographisch untersucht. Drei Fraktionen, die in den Voruntersuchungen auf das Vorliegen von Xanthonen schließen ließen, wurden mittels Säulenchromatographie weiter aufgereinigt. Es konnten die Substanzen B01, B02, B03 und B04 isoliert werden.

Bei den Substanzen B01, B02 und B04 war eine Strukturaufklärung mittels NMR nicht möglich, da zu wenig Substanz vorhanden war. Die Messungen ergaben, dass es sich um Mischungen handelte, in denen auch Weichmacher enthalten waren.

Bei Substanz B03 handelte es sich ebenfalls um eine Mischung aus 2-Deprenyl-6-O-methoxy-7-hydroxy-rheediaxanthon und einem nahe verwandten Xanthon mit einer benachbarten Methoxy-Gruppe in Position 5 oder 7. Aufgrund der geringen Ausbeute war die zweifelsfreie Identifizierung nicht möglich.

## 7 Summary

The dried and powdered rhizome of *Metaxya rostrata* is used ethnomedicinally in Costa Rica as an aqueous suspension against ulcers of the gastrointestinal tract.

Thus, the tree fern has been examined phytochemically during recent years. Several substances have been isolated which showed a cytotoxic effect on colon cancer cells. The xanthenes 2-deprenyl-rheediaxanthone B (XB) and 2-deprenyl-7-hydroxy-rheediaxanthone B (OH-XB), despite their structural similarity, affect the cell cycle in different ways.

For this reason, the aim of this diploma thesis was to identify and isolate further structurally related xanthenes for the determination of structure-activity-relationships.

For this purpose, about 450 fractions from various extracts of the rhizome and the secondary roots, which had been obtained in previous diploma theses by column chromatography, were used and examined by thin layer chromatography. Three fractions, in which bands in the preliminary screening pointed to the occurrence of xanthenes, were further purified by column chromatography. The substances B01, B02, B03 and B04 were isolated.

Substances B01, B02 and B04 were not elucidated by NMR experiments due to the small amounts isolated. Further measurements showed that the compounds were complex mixtures and also contained plasticizers.

Substance B03 was a mixture consisting of 2-deprenyl-6-O-methoxy-7-hydroxy-rheediaxanthone B and a closely related xanthone with an adjacent methoxy group in position 5 or 7. Due to the low yield, the unambiguous identification was not possible.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 <i>Metaxya rostrata</i> (Kunth C. Presl) (Kainz K., 2011)) .....	2
Abb. 2 Strukturen bereits isolierter Xanthone.....	3
Abb. 3 SC an Sephadex® LH-20 .....	6
Abb. 4 DC von Fraktionen 1,2 und 3 für weitere Auftrennungen Fließmittel A (s. S. 5); Detektionsmethode: NS/PEG.....	7
Abb. 5 DC der Sammelfractionen von SC 1 Fließmittel A (S. 5) Detektion: oben: NS/PEG; unten: Anisaldehyd.....	9
Abb. 6 DC-Vergleich von SF4 mit Betulinsäure (BS) Fließmittel A (S. 5); Detektion mit AASS.....	11
Abb. 7 DC der Sammelfractionen von SC 2 Fließmittel A (S.5) Detektion mit NS/PEG ....	12
Abb. 8 DC-Vergleich SF 6 mit Xanthonen/Flavonoiden; Fließmittel A (S. 5); Detektion mit NS/PEG.....	14
Abb. 9 DC der Sammelfractionen von SC 3 oben Fließmittel B (S. 5), unten Fließmittel A (S. 5) Detektion mit NS/PEG .....	16
Abb. 10 DC-Vergleich von SF44 mit Quercetin Fließmittel A (S. 5) Detektion mit NS/PEG .....	18
Abb. 11 DC-Vergleich von SF44 mit Quercetin Fließmittel C (S. 5) Detektion mit NS/PEG .....	18
Abb. 12 DC-Vergleich von SF44 mit KK4 und Procyanidin A2 Fließmittel A (S. 5) Detektion mit NS/PEG .....	19
Abb. 13 DC-Vergleich von SF44 mit Flavonoiden Fließmittel A (S.5) Detektion mit NS/PEG.....	19
Abb. 14 DC- Vergleich von SF3 mit OH-XB Fließmittel A (S.5) Detektion mit NS/PEG.....	20
Abb. 15 DC der Sammelfractionen von SC 4 Fließmittel A (S.5); Detektion mit NS/PEG..	21
Abb. 16 DC der Sammelfractionen von SC5 Fließmittel A (S-5) Detektion mit NS/PEG..	23
Abb. 17 DC der Sammelfractionen von SC6 Fließmittel A (S.5) Detektion mit NS/PEG...	25
Abb. 18 DC der Sammelfractionen von SC7 Fließmittel A (S. 5) Detektion mit NS/PEG .	26
Abb. 19 DC-Vergleich Fraktion 5+6 von SF 4 mit SF 3 Fließmittel A (S.5) Detektion mit NS/PEG .....	27
Abb. 20 2-Deprenyl-6-O-methyl-7-hydroxy-rheediaxanthon B (EM4; Mittermair E., in Vorbereitung) .....	28

Abb. 21 DC der Sammelfractionen von SC8 Fließmittel A (S.5) Detektion mit NS/PEG... 29

Abb. 22 DC der Sammelfractionen von SC9 Fließmittel A (S. 5) Detektion mit NS/PEG .31

Abb. 23 DC der Sammelfractionen von SC10 Fließmittel A (S. 5) Detektionsmethode:  
links mit NS/PEG, rechts mit AASS..... 32

Abb. 24 DC der Sammelfractionen SC11 Fließmittel A (S. 5) Detektion mit NS/PEG ..... 33

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Parameter der NMR-Spektroskopie .....	6
Tab. 2 Säulenparameter von SC 1 .....	8
Tab. 3 Sammelfractionen von SC 1 .....	10
Tab. 4 Säulenparameter von SC 2 .....	12
Tab. 5 Ausbeuten der Sammelfractionen von SC 2 .....	13
Tab. 6 Säulenparameter von SC 3 .....	15
Tab. 7 Ausbeuten der Sammelfractionen von SC 3 .....	17
Tab. 8 für Vergleichs-DC verwendete Flavanoide.....	19
Tab. 9 Säulenparameter von SC 4 .....	21
Tab. 10 Ausbeuten der Fraktionen von SC4.....	21
Tab. 11 Säulenparameter von SC 5.....	22
Tab. 12 Ausbeuten der Fraktionen von SC5.....	23
Tab. 13 Säulenparameter von SC6.....	24
Tab. 14 Ausbeuten der Fraktionen von SC7.....	26
Tab. 15 Säulenparameter von SC8.....	29
Tab. 16 Ausbeute der Fraktionen von SF5/SC6 .....	30
Tab. 17 Säulenparameter von SC 9.....	30
Tab. 18 Ausbeute der Fraktionen von SC9 .....	31
Tab. 19 Säulenparameter von SC 10 .....	32
Tab. 20 Ausbeuten der Fraktionen von SC10 .....	32
Tab. 21 Ausbeuten der Fraktionen von SC11 .....	34

## 10 Literaturverzeichnis

**Kainz K. P., Krenn L., Erdem Z., Kaehlig H., Zehl M., Bursch W., Berger W., Marian B.** (2013) 2-Deprenyl-rheediaxanthone B isolated from *Metaxy rostrata* induces active cell death in colorectal tumor cells. PLoS One 8 (6), e65745

**Kainz K., Zehl M., Bleier J., Merkingner B., Pemmer T., Schmidt N., Winkler J., Kählig H., Krenn L.** (2014) New Compounds from the tree fern *Metaxy rostrata* C. Presl. Rec. Nat. Prod. 8:4, 348-353

**Kainz K.** (2011) Phytochemical investigation and bioactivity-guided isolation of cytotoxic compounds from *Metaxya rostrata*, Dissertation, Univ. Wien.

**Mittermair E.** Xanthonen from *Metaxya rostrata* as promising new lead compounds for cancer therapy, Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung.

**Mittermair E., Krenn L., Marian B.** (2019) Prenylated xanthonen from *Metaxy rostrata* suppress FoxM1 and induce active cell death by distinct mechanisms. Phytomedicine, in press

**Rindler S.** Isolierung neuer Xanthonen aus *Metaxya rostrata*, Diplomarbeit, Univ. Wien, 2019

**Statistik Austria** (2019) a)

[https://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/menschen\\_und\\_gesellschaft/gesundheit/krebserkrankungen/krebs\\_im\\_ueberblick/index.html](https://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/krebserkrankungen/krebs_im_ueberblick/index.html) (abgerufen am: 26.04.2019)

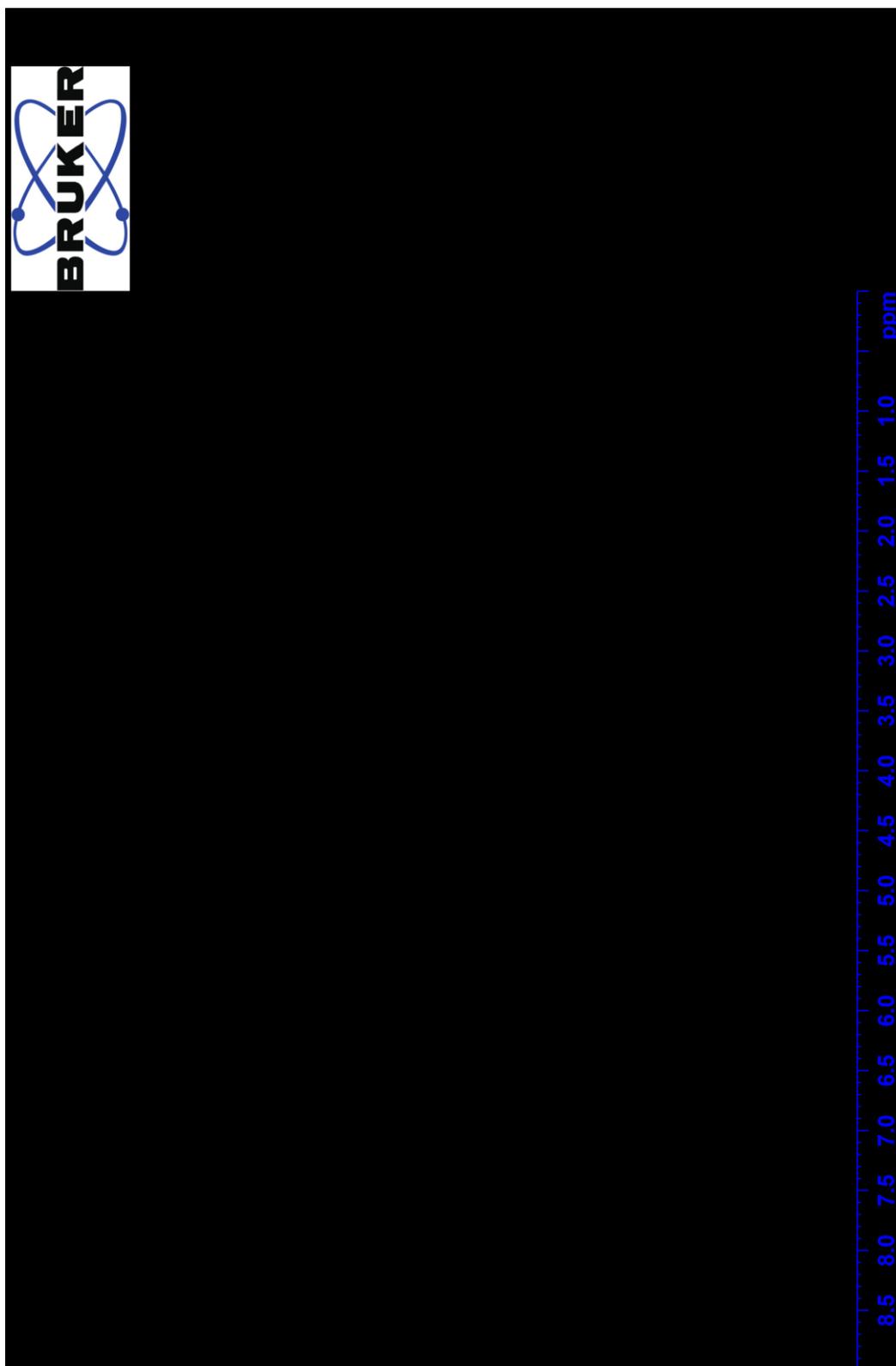
**Statistik Austria** (2019)

[http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/menschen\\_und\\_gesellschaft/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm\\_enddarm/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enddarm/index.html) (abgerufen am: 26.04.2019)

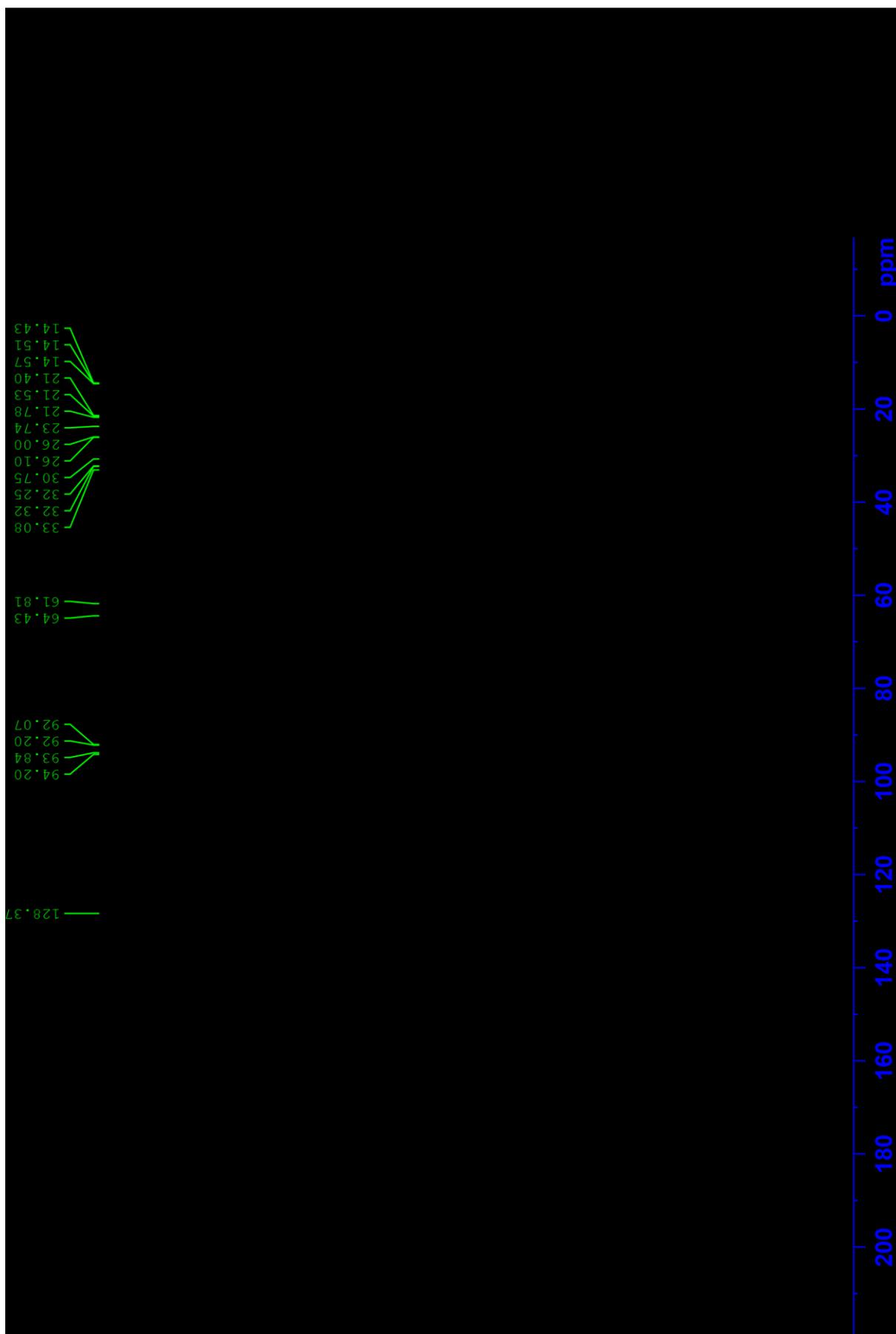
**Virtbauer J.** (2007) Bioassay-guided chemische Untersuchungen von tropischen Arzneipflanzen, Dissertation, Univ. Wien.

**Virtbauer J. Krenn L., Kählig H., Hufner A., Donath O., Marian B. (2008)** Chemical and pharmacological investigations of *Metaxya rostrata*. Z. Naturforsch. 63c, 469-475.

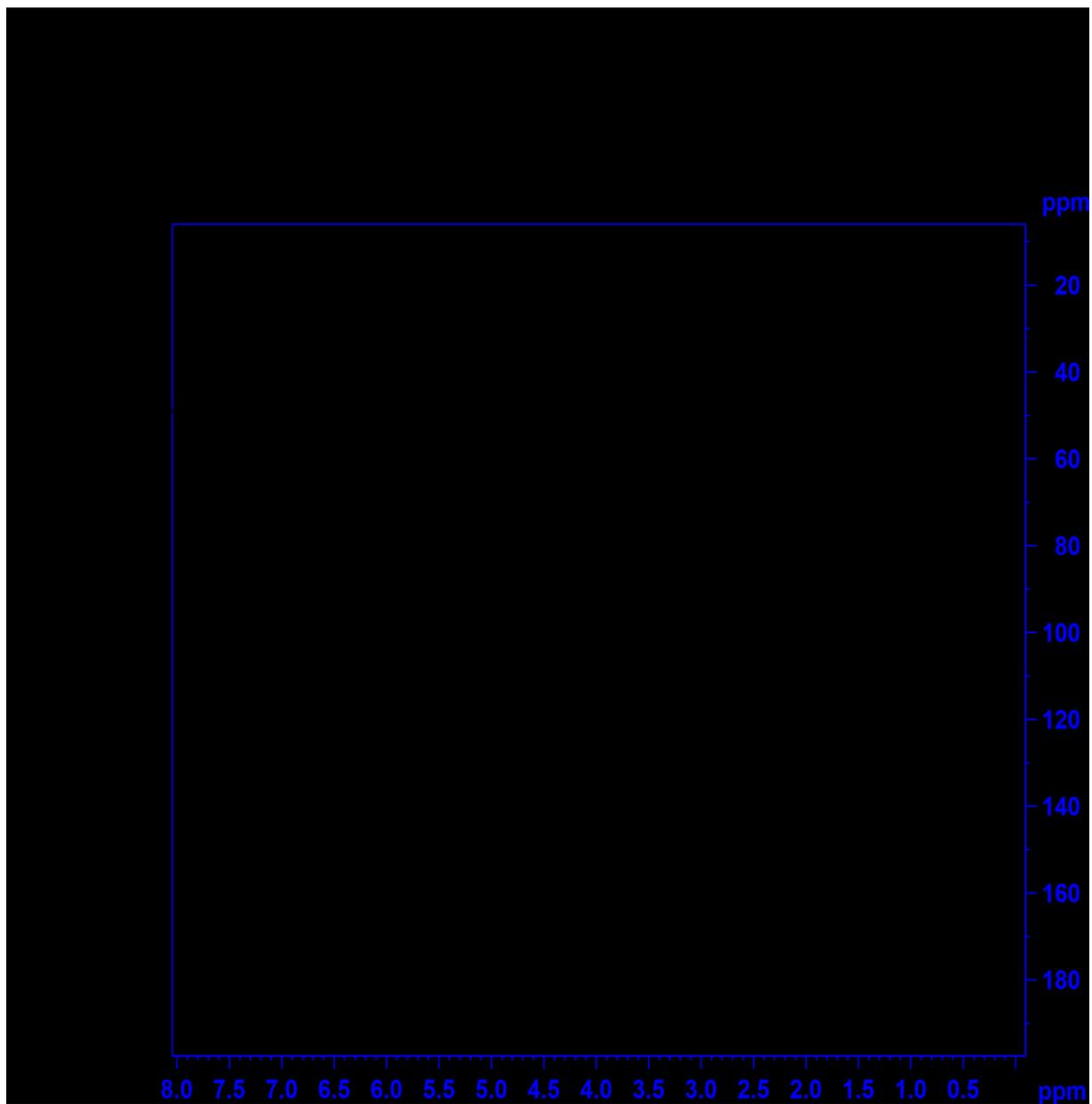
## 11 Anhang



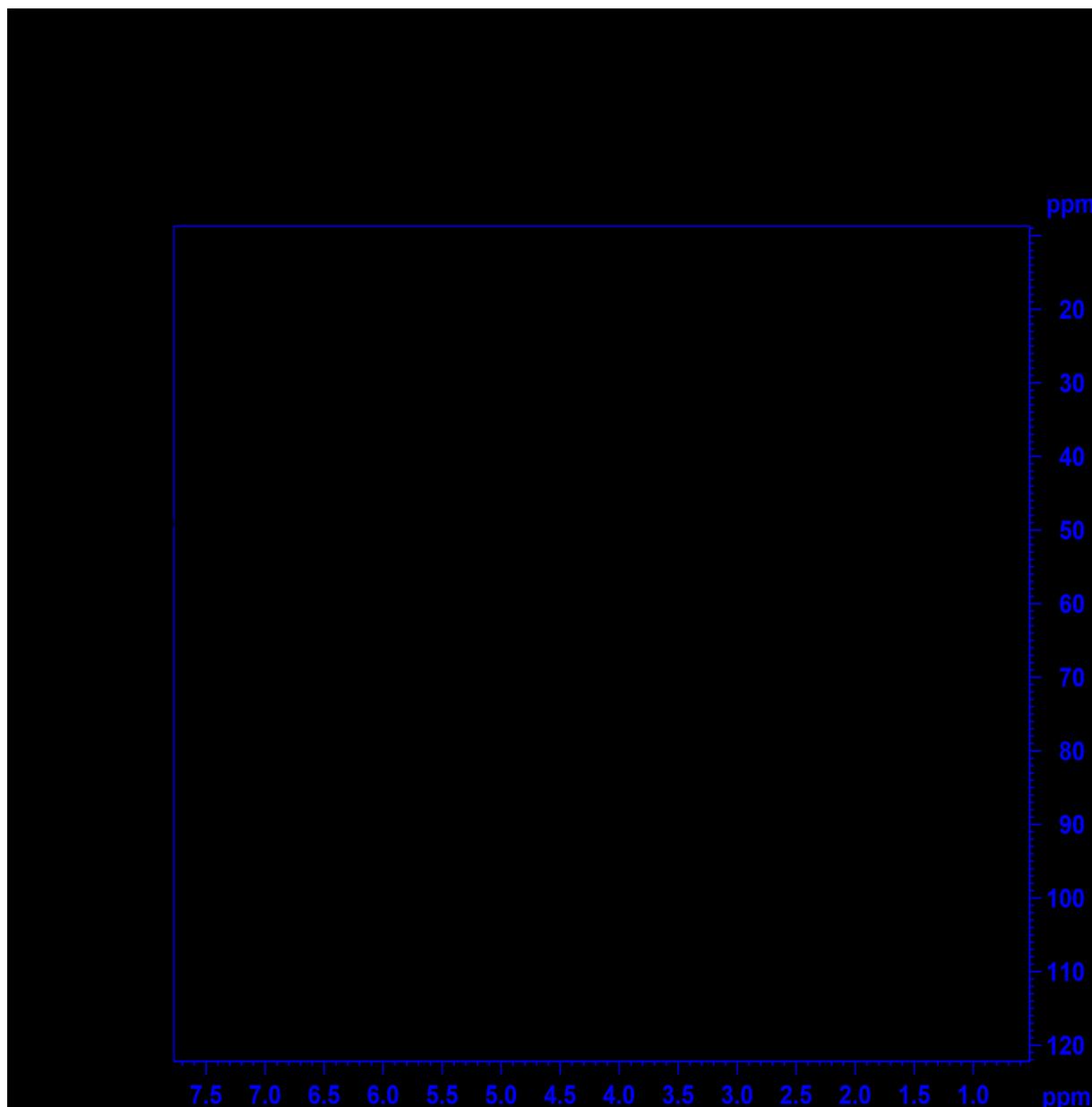
**Anhang 1:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Substanz B03 in  $\text{MeOH-d}_4$



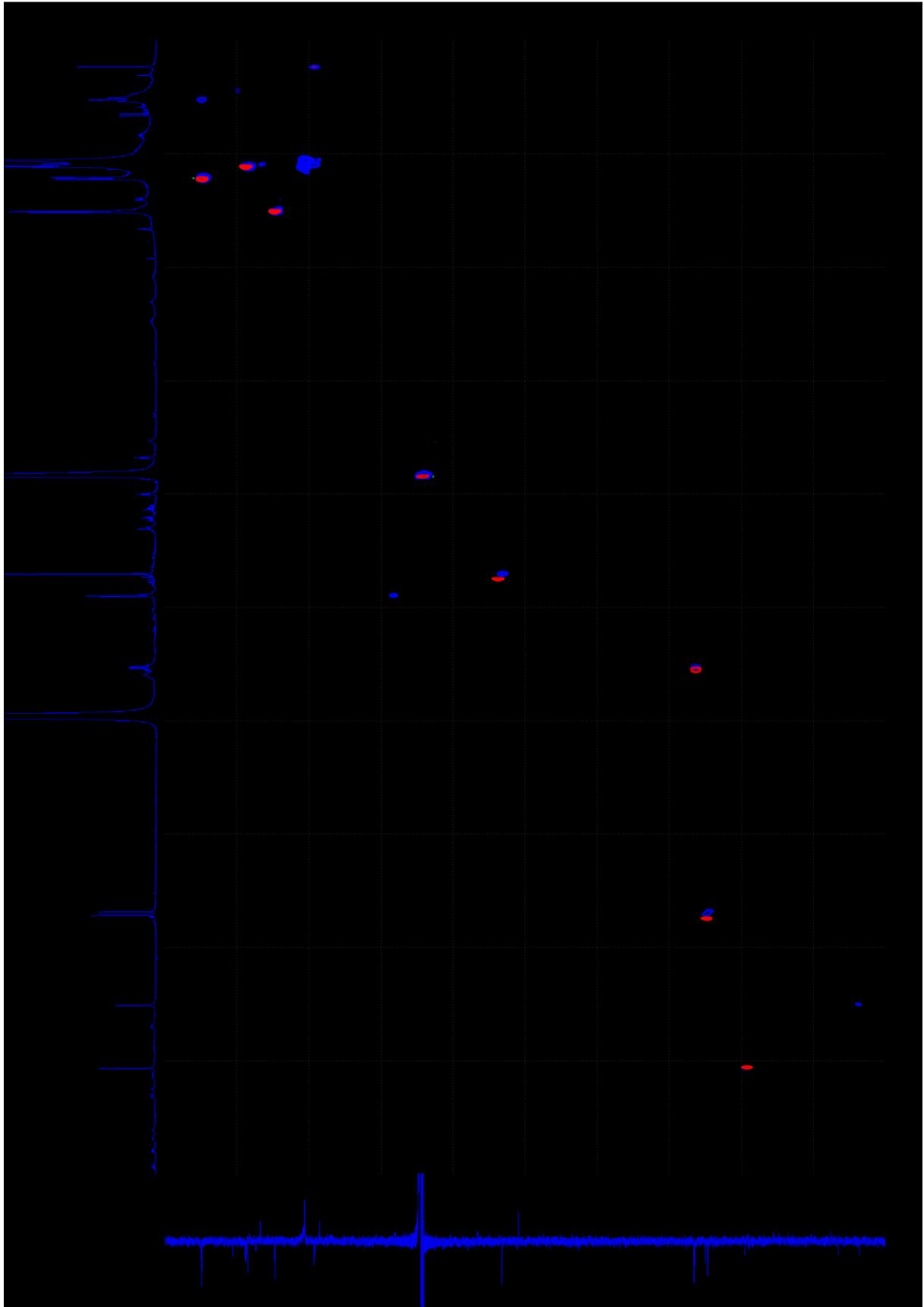
Anhang 2:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Substanz BO3 in  $\text{MeOH-d}_4$



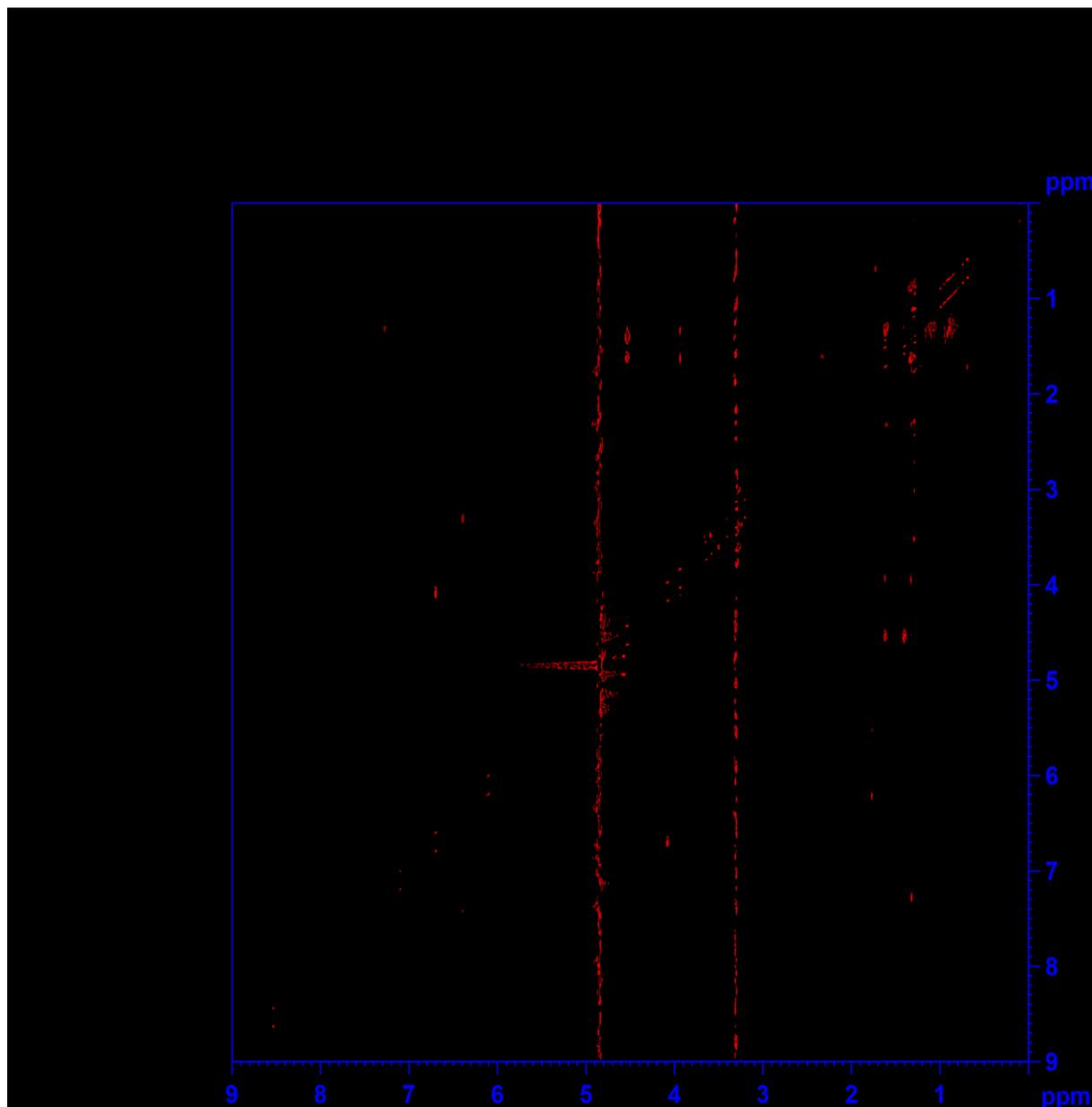
**Anhang 3:** HMBC-Spektrum von Substanz BO3



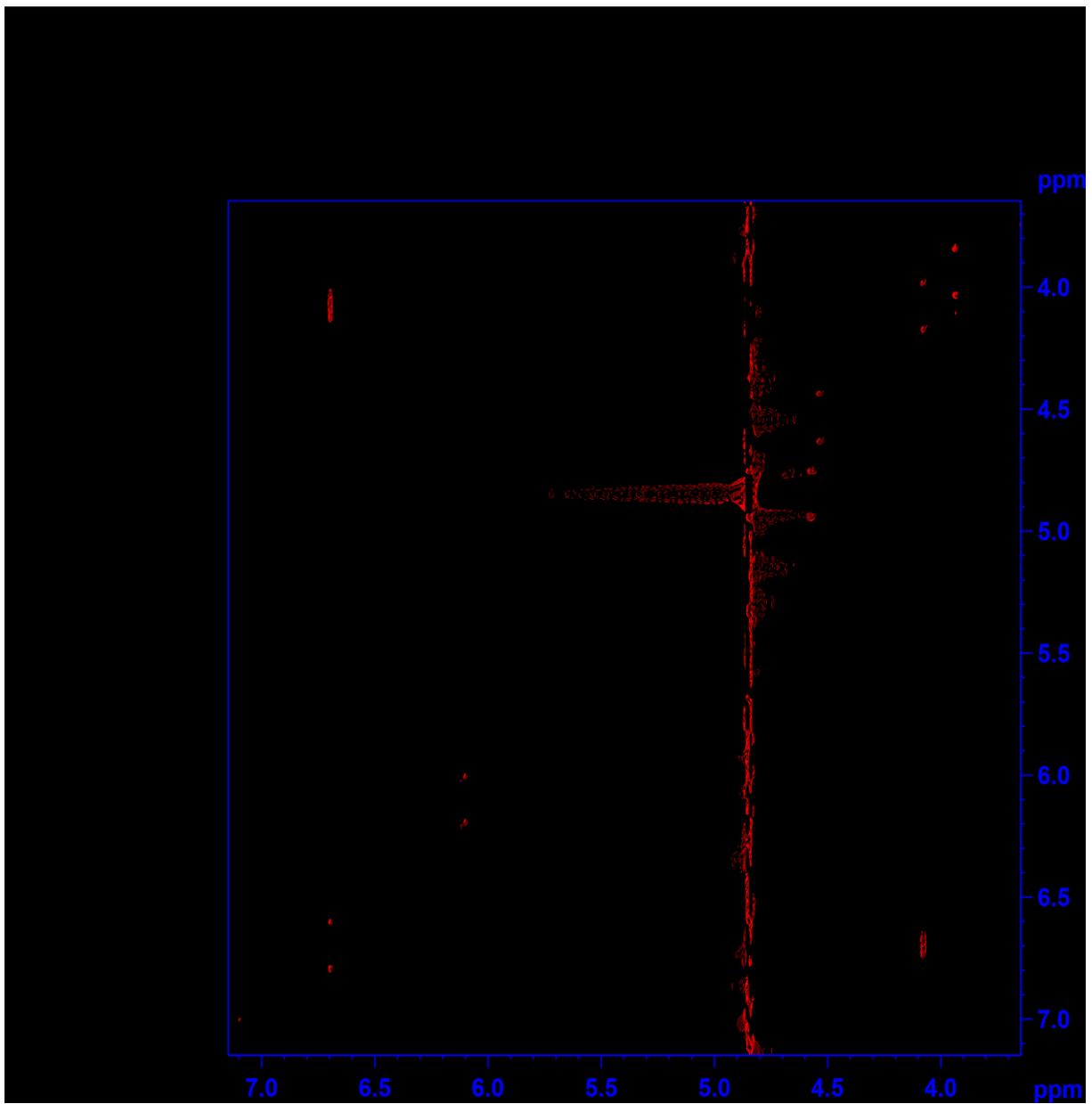
**Anhang 4:** HSQC-Spektrum von Substanz B03



**Anhang 5:** HSQC-Overlay mit EM4 von Substanz B03



**Anhang 6:** NOESY-Spektrum von Substanz B03



**Anhang 7:** NOESY-Spektrum von Substanz B03