



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Untersuchungen zu GABA_A-Modulatoren aus
Juncus effusus L.**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Nussbaumer Susanne
Matrikel-Nummer:	0307189
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Dr.Dr. h.c. Brigitte Kopp

Wien, im März 2010

Vorwort

Diese Diplomarbeit entstand am Departement für Pharmakognosie an der Universität Wien.

Ich möchte hiermit Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp meine Dankbarkeit für die Möglichkeit der Arbeit an meiner Diplomarbeit aussprechen. Vielen Dank für das interessante Thema, die freundliche Betreuung und Ihre Unterstützung.

Ein großes Dankeschön an Mag. Judith Singhuber für die gute Zusammenarbeit, die freundliche Unterstützung und kompetente Beratung während meiner Arbeit und für die gute Arbeitsatmosphäre.

Herzlichen Dank auch an all meine Kolleginnen und Kollegen am Departement für Pharmakognosie, die mir mit ihren Ratschlägen zur Seite standen.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden danken für ihren Beistand und ihre Begleitung während dieser Arbeit.

Abkürzungs Index

Abb	Abbildung
ASR	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
DC	Dünnschichtchromatographie
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FM	Fließmittelsystem
GABA _A	γ-Aminobuttersäure Typ A
HAc	Essigsäure
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	High pressure liquid chromatography
HSCCC	High speed countercurrent chromatography
I _{GABA}	Durch GABA ausgelöster Cl ⁻ -Strom
MeOH	Methanol
n-Hex	n-Hexan
NST/PEG	Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagens
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
Tol	Toluol

UNTERSUCHUNGEN ZU GABA_A-MODULATOREN AUS *JUNCUS EFFUSUS* L.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung und Problemstellung	3
2	Material und Methoden	9
	2.1 Pflanzenmaterial	9
	2.2 Chemikalien und Substanzen	9
	2.3 Vorversuche zur Extraktion	11
	2.4 Extraktion	11
	2.5 Chromatographie	12
	2.5.1 Dünnschichtchromatographie (DC)	12
	2.5.2 Säulenchromatographie an Kieselgel	15
	2.5.3 Säulenchromatographie an Sephadex	16
	2.5.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	17
	2.5.5 High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)	26
	2.6 Pharmakologische Testung	28
3	Ergebnisse	30
	3.1 Vorversuche zur Extraktion	30
	3.2 Entwicklung eines DC Systems	33
	3.3 Charakterisierung des EtOAc-Extraktes mittels DC	40
	3.4 Bioaktivitätsgeleitete Auftrennung	44
	3.4.1 Säulenchromatographie an Kieselgel	44
	3.4.2 Säulenchromatographie an Sephadex LH-20	51
	3.4.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	57
	3.4.4 High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)	62

4	Diskussion	67
5	Zusammenfassung	74
6	Summary	75
7	Literaturverzeichnis	76
	Curriculum vitae	

1 EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In der pharmakognostischen Forschung gibt es 2 Ansätze, um die Wirkung von Arzneipflanzen zu erklären:

Einerseits kann man davon ausgehen, dass durch das synergistische Zusammenwirken mehrerer Inhaltsstoffe und Stoffgruppen der Gesamtextrakt einer Arzneipflanze die pharmakologische Wirkung erzielt und dieser somit den „Wirkstoff“ darstellt. Andererseits ist es möglich, einzelne Naturstoffe zu isolieren, welchen eine definierte Bioaktivität zugeordnet werden kann.

In der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) werden Gesamtextrakte, oft in Form von Dekokten, an die Patienten verabreicht. Die pflanzlichen Bestandteile werden allein oder in Kombination angewandt. Die Drogen werden häufig durch verschiedene, teilweise sehr komplexe, Verfahren vorbehandelt. Als Ziele der zum Teil aufwändigen Prozeduren gelten einerseits die dadurch mögliche Aufkonzentrierung der wirksamen Inhaltsstoffe, andererseits die Verringerung toxischer Bestandteile, sowie die Vereinfachung der Handhabung für die Patienten. Die be- und verarbeiteten Drogen können je nach Verarbeitungsform verschiedene Wirkungen erzielen und unterscheiden sich demnach in ihren Anwendungsbereichen (Huaquiang, 2009).

Die Anwendung von *Juncus effusus* L. (Abb. 1, S. 4) bezieht sich hauptsächlich auf den Gesamtextrakt des getrockneten Stängelmarks. Zwar kann laut Bensky et al. (2004) das Mark dem Prozess der Verkohlung unterworfen werden, aufgrund der leichten Entflammbarkeit handelt es sich aber um ein schwieriges Aufarbeitungsverfahren, das nur bei einzelnen Indikationsstellungen durchgeführt wird.

Die pharmakologischen Wirkungen der einzelnen Inhaltsstoffe sind kaum erforscht. Besonders die sedierende Wirkung wurde zwar durch Anwendungsbeobachtung festgestellt, welche Naturstoffe und Mechanismen dahinterstehen, wurde bis jetzt noch nicht untersucht.

Die Gattung *Juncus* umfasst etwa 225 Arten grasähnlicher Pflanzen, die an feuchten bis sumpfigen Standorten auf der ganzen Erde vorkommen (Burnie et al., 2003). Der Lebensraum von *Juncus effusus*, der Flatterbinse, erstreckt sich von Europa bis Nordamerika. Es handelt sich um einen Kosmopoliten, welcher auf der ganzen Erde, auf nassen Wiesen, an Flussufern und feuchten Waldstellen vorkommt (Pahlow, 2006). Die immergrüne Pflanze erreicht eine Höhe von bis zu einem Meter (Burnie et al., 2003).

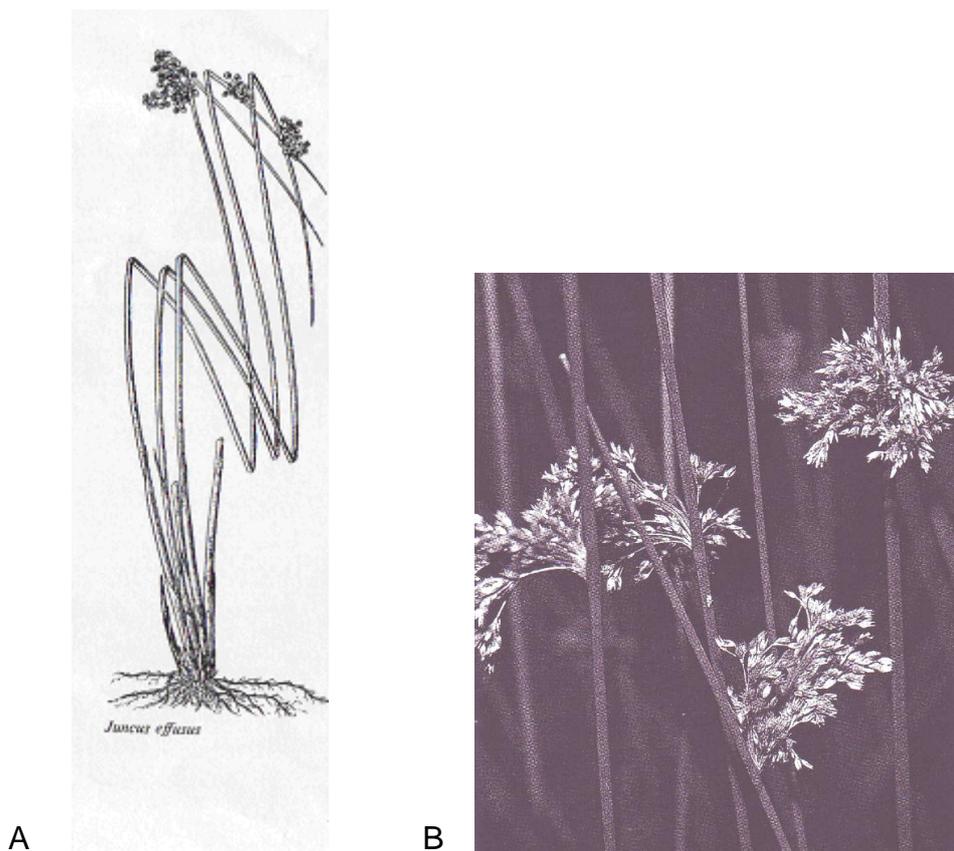


Abbildung 1 A-B.

A: Habitus von *Juncus effusus* (Keys, 1993).

B: *Juncus effusus*, Blüten und Stängel (Pahlow, 2006).

Verwendete Pflanzenteile

Als eine in Europa beheimatete Pflanze wird die Flatterbinsenwurzel (*Junci Radix*) in diesem Kulturkreis als Entwässerungsmittel für Blutreinigungskuren verwendet (Pahlow, 2006). Der Wurzelstock mit anhängenden Wurzeln wird in der Homöopathie bei Nierensteinleiden eingesetzt (Hiller, 2006).

In der Traditionellen Chinesischen Medizin wird dagegen das getrocknete Stängelmark von *Juncus effusus* (Dēng Xīn Cǎo) verwendet. Im Sommer oder Herbst werden die Stängel geschnitten, das Mark mit einer Stange herausgelöst und an der Sonne getrocknet. Dēng Xīn Cǎo wird meistens als getrocknete Droge verwendet. Die Dosierung beträgt 1,5 – 4,5 g (Bensky et al., 2004). In seltenen Fällen kann *Juncus* auch mit Cinnabarit (HgS) verarbeitet werden. Diese Form ist wegen des hohen Gehaltes an Quecksilber in Europa nicht zugelassen (Körfers und Sun, 2008).

Anwendung und Wirkung

Die Wirkungen sind vielfältig. Das Mark von *Juncus effusus* zeichnet sich laut Körfers und Sun (2008) durch antipyretische, schwach diuretische und sedierende Wirkungen aus.

Juncus effusus wird hauptsächlich in der Traditionellen Chinesischen Medizin verwendet. Die Droge wird laut Körfers und Sun (2008) einzeln als Dekokt oder in Kombination verwendet.

Die Droge, in Kombination mit *Plantaginis Herba* und *Lophatheri Herba*, fördert das Wasserlassen und wird gegen schmerzhaftes Tröpfeln eingesetzt (Bensky et al., 2004). Bei Miktionsstörungen mit erschwertem und vermindertem Wasserlassen sowie brennendem Gefühl wird die Droge mit *Clematidis arandii caulis*, Talkum, *Gardeniae fructus* und *Glycyrrhizae radix et rhizoma* kombiniert (Körfers und Sun, 2008).

Bei Ödemen infolge einer Nephritis wird die Droge mit *Plantaginis Herba* und *Imperatae Rhizoma* verwendet.

Das Mark von *Juncus effusus* wird aufgrund seiner sedierenden Eigenschaften auch zur Behebung von Schlafstörungen und

Erregungsstörungen bei Kindern und Erwachsenen eingesetzt. Hierfür wird die Droge mit *Ziziphi spinosae semen*, *Poria* und *Cinnabarit* kombiniert (Bensky et al., 2004).

Zerkleinert kann *Junci medulla* auch als Kissenfüllung für besseren Schlaf verwendet werden. Bei Harninkontinenz ist die Gabe von *J. effusus* kontraindiziert (Körfers und Sun, 2008).

Inhaltsstoffe

Der in der europäischen Volksmedizin angewandte Wurzelstock zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Kieselsäure und Gerbstoffen aus (Pahlow, 2006), wohingegen sich eine Vielzahl anderer, potentiell wirksamer Verbindungen im Stängelmark befinden (Bensky et al., 2004).

Phenanthrenderivate stellen einen großen Teil der Inhaltsstoffe im Mark von *Juncus effusus* dar. Sie werden zwar für einige pharmakologische Wirkungen verantwortlich gemacht, ihr Potential wird in der pharmazeutischen Industrie bisher noch nicht genutzt.

Es wurde eine Vielzahl von Phenanthrenen in höheren Pflanzen, hauptsächlich in der Familie der Orchideen, entdeckt. Ebenfalls phenanthrenhaltig sind Lebermoose (*Hepaticae*), Yamswurzelgewächse (*Dioscoreaceae*) und einige Vertreter in den Familien der Flügelsamengewächse (*Combretaceae*) und Birkengewächse (*Betulaceae*) (Kovács et al., 2008).

In einigen Traditionellen Medizinsystemen werden Pflanzen mit Phenanthrenen als Inhaltsstoffen eingesetzt, hauptsächlich finden solche Arzneipflanzen aber in China Verwendung (Kovács et al., 2008). Zu den Phenanthrenderivaten, welche aus dem Mark von *Juncus effusus* isoliert wurden, gehören insbesondere Effusol, Dehydroeffusol, Dehydroeffusal, Juncusol, Juncunon, Dihydrojuncunon (Bensky et al., 2004) und 9,10-Dihydrophenantrenoglucoside (Effuside I-V) (Della Greca et al., 1995), wie in den Abbildungen 2 (S. 6) und 3 (S. 6) ersichtlich.

Als weitere Komponenten konnten ätherisches Öl, Luteolin und sein 7-O-Glucosid, organische Säuren, Aminosäuren sowie

mono-p-Coumaroylglyceride, β -Sitosterol und α -Tocopherol isoliert werden. Bei den bisher isolierten Komponenten des ätherischen Öls handelt es sich v.a. um aromatische Verbindungen wie z.B. α - und β -Ionon, β -Phenylethylalkohol, Eugenol, p-Cresol und Vanillin (Bensky et al., 2004). Aus *Juncus effusus* konnten auch einige Aminosäuren isoliert werden. Bisher bekannt sind Phenylalanin, β -Alanin, Valin, Norvalin, Methionin, Tryptophan und Glutaminsäure (Bensky et al., 2004).

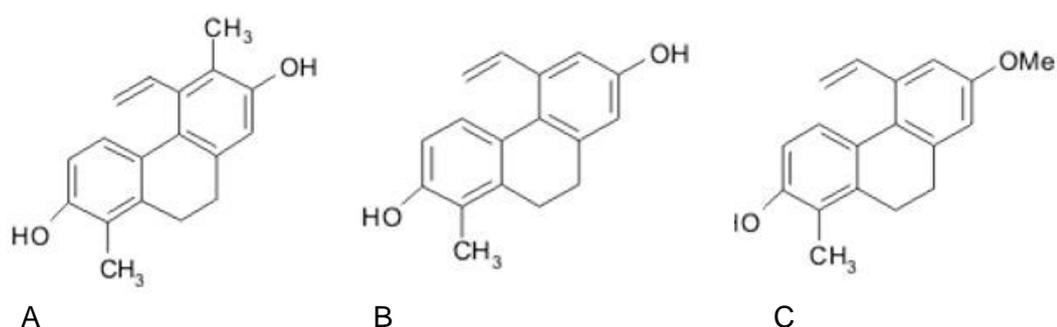


Abbildung 2. Phenanthrenederivate aus *Juncus effusus*, A: Juncusol, B: Juncunol C: Effusol.

	R1	R2	R3
Effusid I	Me	Glc	H
Effusid II	H	Glc	H
Effusid III	Glc	H	H
Effusid IV	H	H	Glc
Effusid V	Me	Glc	Glc

Abbildung 3. 9,10-Dihydrophenantrenglycoside: Effuside I-V.

Es wurde eine, von der Lichteinstrahlung abhängige (photosensible) antimikrobielle Aktivität der EtOAc-Fraktion des methanolischen

Gesamtextrakt aus dem Mark der unterirdisch wachsenden Teile aus *Juncus effusus* gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Candida albicans* festgestellt. Die Testung der Reinsubstanzen ergab, dass Dehydroeffusol eine höhere antimikrobielle Aktivität nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht erzielte als Juncusol (Hanawa et al., 2002). Weiters hat sich gezeigt, dass über 30 9,10-Dihydrophenanthrene aus *Juncus effusus* starke antialgale und algizide Wirkung besitzen (Della Greca et al., 1996).

Juncusol zeigt in Untersuchungen durch Chapatwala et al. (1981) überdies antimikrobielle Eigenschaften. Durch Lam et al. (1977) wurde auch eine cytotoxische Wirkung von Juncusol festgestellt.

J. effusus wird in der TCM als Schlafmittel für Kinder und Erwachsene eingesetzt, da durch Anwendungsbeobachtung sedierende Eigenschaften dieser Pflanze festgestellt werden konnten. Aus Vorversuchen war bereits bekannt, dass der EtOAc-Extrakt aus *J. effusus* an GABA_A-Rezeptoren modulatorische Wirkung erzielt (Singhuber, in Vorbereitung). Das Hauptbestreben der vorliegenden Arbeit lag darin, für die Sedierung verantwortliche Inhaltsstoffe aus dem getrockneten Stängelmark von *J. effusus* zu gewinnen, um diese am GABA_A-Rezeptor auf ihre modulatorische Wirkung zu testen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial

Es wurden die getrockneten Markstangen von *Juncus effusus*, Junci medulla, als Ausgangsmaterial verwendet (PLANTASIA, 5110 Oberndorf, Österreich Charge Nr. 660558).

2.2 Chemikalien und Substanzen

Lösungsmittel

Die genannten Lösungsmittel wurden für die Extraktion des Pflanzenmaterials sowie zur Herstellung von mobiler Phase für die DC und HPLC verwendet.

Acetonitril: HPLC grade, J.T. Baker, Deventer, Holland

n-Butanol dest.

Chloroform dest.

Dichlormethan dest.

Ethylacetat dest.

n-Hexan dest.

Ethanol 96 %

Methanol dest.

Methanol: HPLC grade, J.T. Baker, Deventer, Holland

Wasser dest.

Reinsubstanzen:

Die verwendeten Reinsubstanzen dienten als Vergleichssubstanzen für die DC.

Cumarin 1 mg/ml MeOH: Österreichische Heilmittelstelle G.A., Wien, Österreich

Emodin 1 mg/ml CH₂Cl₂ oder MeOH: Heyl und Co, Berlin, Deutschland

Glucose 1mg/ ml MeOH: Merck, Darmstadt, Deutschland

Phenanthren 1 mg/ml CH₂Cl₂: Retort, New York, USA

Quercetin 1 mg/ml MeOH: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Rutin 1 mg/ml MeOH: Merck, Darmstadt, Deutschland

β-Sitosterin 1 mg/ml MeOH: Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

Reagenzien und Chemikalien

Die angeführten Reagenzien wurden für die Herstellung von mobilen Phasen für die DC und von Sprühreagenzien zur Detektion der Dünnschichtchromatogramme verwendet.

Ameisensäure: Gatt-Koller, Absam, Österreich

Anisaldehyd: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Antimon-III-chlorid: Merck, Darmstadt, Deutschland

Emodin: Heyl und Co, Berlin, Deutschland

Essigsäure (konz.): Gatt-Koller, Absam, Österreich

Kaliumhydroxid: Merck, Darmstadt, Deutschland

Phenanthren: Retort, New York, USA

Polyethylenglycol: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Schwefelsäure (konz.): Gatt-Koller, Absam, Österreich

Thymol: Hestag, Wien, Österreich

Toluol dest.

Vanillin: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.3 Vorversuche zur Extraktion

Je 1 g der geriebenen Droge (Sieb 710) wurde mit 30 ml Dichlormethan (CH_2Cl_2) oder 30 ml Ethylacetat (EtOAc) versetzt und am Wasserbad unter Rückfluss 15 min lang extrahiert. Anschließend wurde jeweils abfiltriert und der Drogenrückstand noch 2mal mit je 30 ml Lösungsmittel, wie oben beschrieben, extrahiert. Die einzelnen Filtrate wurden am Rotovapor bei 40 °C zur Trockene gebracht und anschließend dünnenschichtchromatographisch analysiert.

Es wurde 1 g Droge mit 30 ml Petrolether versetzt und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Drogenrückstand abfiltriert und das Filtrat am Rotovapor bei 40 °C zur Trockene gebracht. Der erhaltene Trockenextrakt wurde im Verhältnis 1 : 30 mit EtOAc versetzt und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Rückstand abfiltriert und das Filtrat am Rotovapor zur Trockene gebracht (Extrakt II).

2.4 Extraktion

Es wurden ca. 190 g Drogenpulver mit 5,7 l EtOAc versetzt und am Wasserbad unter Rückfluss 15 min lang extrahiert. Anschließend wurde der Drogenrückstand abfiltriert und noch weitere zwei Mal auf dieselbe Weise behandelt. Die drei erhaltenen Filtrate wurden vereint und am Rotovapor bei 40 °C zur Trockene gebracht (EtOAc-Extrakt).

2.5 Chromatographie

2.5.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Probenlösungen und Referenzsubstanzen wurden, wenn nicht gesondert angegeben, in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet.

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Aluminiumplatten (Merck, Darmstadt, Deutschland), 20*20 cm, Schichtdicke 0,25 mm. Die Laufstrecke betrug jeweils 8 cm.

Mobile Phase:

Fließmittelsystem 1:	CH ₂ Cl ₂
Fließmittelsystem 2:	CHCl ₃
Fließmittelsystem 3:	CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O = 95:1,5:0,1
Fließmittelsystem 4:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 100:17:13
Fließmittelsystem 5:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 100:13,5:10
Fließmittelsystem 6:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 110:17:13
Fließmittelsystem 7:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 130:17:13
Fließmittelsystem 8:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 110:13:5,1
Fließmittelsystem 9:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 130:13,5:10
Fließmittelsystem 10:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 150:17:13
Fließmittelsystem 11:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 180:17:13
Fließmittelsystem 12:	EtOAc : MeOH : H ₂ O = 150:10:1
Fließmittelsystem 13:	n-Hex : CH ₂ Cl ₂ = 1:1
Fließmittelsystem 14:	n-Hex : EtOAc : MeOH : H ₂ O = 0,8:10:1,7:1,3
Fließmittelsystem 15:	n-Hex : EtOAc : MeOH : H ₂ O = 0,2:15:1:0,1
Fließmittelsystem 16:	EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 15:1:0,5:0,1
Fließmittelsystem 17:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 1:15:1:0,5:0,1
Fließmittelsystem 18:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 2:15:1:0,5:0,1
Fließmittelsystem 19:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 4:15:1:0,5:0,1
Fließmittelsystem 20:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 8:15:1:0,5:0,1
Fließmittelsystem 21:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 15:15:1:0,5:0,1
Fließmittelsystem 22:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 12:15:1:1:0,1
Fließmittelsystem 23:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 15:15:1:1:0,1
Fließmittelsystem 24:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 20:15:1:1:0,1

Fließmittelsystem 25:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 20:8:1:0,5:0,1
Fließmittelsystem 26:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc : H ₂ O = 15:15:1:0,7:0,1
Fließmittelsystem 27:	n-Hex : CH ₂ Cl ₂ : HAc : H ₂ O = 15:14:1:1
Fließmittelsystem 28:	Tol : EtOAc = 7:2
Fließmittelsystem 29:	Tol : EtOAc : HAc = 7:2:0,5
Fließmittelsystem 30:	Tol : EtOAc : HCOOH = 7:2:0,5
Fließmittelsystem 31:	Tol : EtOAc : HAc = 9:2:0,5
Fließmittelsystem 32:	Tol : EtOAc : HAc = 7:3:1
Fließmittelsystem 33:	Tol : EtOAc : MeOH : HAc = 7:2:0,2:0,5
Fließmittelsystem 34:	Tol : EtOAc : HAc = 9:3:1
Fließmittelsystem 35:	CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O = 35:30:6
Fließmittelsystem 36:	n-Hex : EtOAc : MeOH : HAc = 15:15:1:2

Detektionsmittel für die Dünnschichtchromatografie

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (ASR)

0,5 ml Anisaldehyd wurden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure in angegebener Reihenfolge gemischt. Die DC-Platte wurde besprüht und 5-10 min bei 100 °C im Trockenschrank erhitzt (Wagner et al., 1983).

Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagens (NST/PEG)

Auf die DC-Platte wurden nacheinander eine 1 %ige methanolische Lösung von Naturstoff-Reagens A und eine 5 %ige ethanolische Polyethylenglykol-Lösung aufgesprüht (Wagner et al., 1983).

Antimon(III)chlorid-Eisessig

20 g Antimon(III)chlorid wurden in einem Gemisch aus 20 ml Eisessig und 60 ml Chloroform gelöst und anschließend 5 min auf 100 °C erwärmt (Merck, 1970).

Methanolische Kalilauge

Kaliumhydroxidlösung (5 % in Methanol) (Merck, 1970).

Vanillin-Schwefelsäure-Reagens

1 g Vanillin wurde in 100 ml konz. Schwefelsäure gelöst und die Platte nach dem Besprühen auf 120 °C bis zur optimalen Farbintensität der Zonen erwärmt (Merck, 1970).

Thymol-Schwefelsäure

0,5 g Thymol wurden in 95 ml Ethanol gelöst und vorsichtig 5 ml konz. Schwefelsäure zugegeben. Die Platte wird besprüht und anschließend 15 min auf 120 °C erhitzt (Merck, 1970).

2.5.2 Säulenchromatographie an Kieselgel

Es wurde Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt, Deutschland, Ch. Nr. 107TA958134, Korngröße 0,063-0,200 mm) für die Säulenchromatographie verwendet. Vor dem Befüllen der Säule mit 300 g Kieselgel wurde dieses zuvor 2 h in n-Hex suspendiert.

306 mg des getrockneten EtOAc-Extraktes aus *Juncus effusus* wurden in 20 ml EtOAc gelöst und zusammen mit 300 mg Kieselgel am Rotovapor zur Trockene gebracht. Die trockene Mischung wurde auf den Säulenkopf aufgebracht. Danach wurde mit der Elution begonnen. Die Trennstrecke hatte eine Länge von 97 cm und einen Durchmesser von 1,5 cm. Es wurde eine Gradientenelution mit einer Flussrate von 5 ml/30 min durchgeführt. Das mobile Phase wurde nach je ~ 24 h entsprechend der untenstehenden Tabelle 1 verändert.

Mobile Phase	Relation
n-Hex + EtOAc	10+1
n-Hex + EtOAc	10+2
n-Hex + EtOAc	10+3
n-Hex + EtOAc	10+4
n-Hex + EtOAc	10+5
n-Hex + EtOAc	1+1
n-Hex + EtOAc	1+2
n-Hex + EtOAc	2+10
EtOAc	
EtOAc + MeOH	10+1
EtOAc + MeOH	10+2
EtOAc + MeOH	1+1
EtOAc + MeOH	5+10
MeOH	

Tabelle 1. Zusammensetzung der mobilen Phase der Gradientenelution während der Säulenchromatographie auf Kieselgel.

2.5.3 Säulenchromatographie an Sephadex

Es wurde Sephadex LH-20 (Amersham Bioscience, 100-500G, Ch. Nr. 016K0727) für die Säulenchromatographie verwendet.

200 g Sephadex LH-20 wurden 2 h in n-Hex : EtOAc (95:5) suspendiert, bevor die Säule mit diesem Material befüllt wurde. Die Säule aus Sephadex LH-20 hatte eine Länge von 60 cm und einen Durchmesser von 1,5 cm.

30 mg der getrockneten aktiven Fraktionen aus der Kieselgelsäule wurden in 5 ml EtOAc gelöst und zusammen mit 30 mg Sephadex LH-20 am Rotovapor zur Trockene gebracht. Die trockene Mischung wurde auf die bereits befüllte Säule aufgebracht. Es wurde eine Gradientenelution mit einer anfänglichen Flussrate von 5 ml/min durchgeführt. Die mobile Phase wurde laufend, entsprechend der untenstehenden Tabelle 2, verändert.

Mobile Phase	Relation
n-Hex + EtOAc	95+5
n-Hex + EtOAc	90+10
n-Hex + EtOAc	85+15
n-Hex + EtOAc	80+20
n-Hex + EtOAc	70+30
n-Hex + EtOAc	60+40
n-Hex + EtOAc	50+50
n-Hex + EtOAc	40+60
n-Hex + EtOAc	30+70
n-Hex + EtOAc	20+80
n-Hex + EtOAc	10+90
EtOAc	

Tabelle 2. Zusammensetzung der mobilen Phase der Gradientenelution während der Säulenchromatographie auf Sephadex.

2.5.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Instrument 1: Shimadzu LC – 10 AD VP Liquid chromatograph
SCL – 10A VP System Controller
SPD – M10 A VP Diode array detector
SIL – 10 AD VP Autoinjector
FCV – 10 AL VP
DGU – 14A Degasser
Software: LCsolutions

Instrument 2: Shimadzu Prominence LC-20AD Liquid chromatograph
Prominence SPD-M20A Diode Array Detector
Prominence CTO-20AC Column oven
Prominence SIL-20ACHT Auto sampler
Prominence DGU-20A5 Degasser
Prominence CBM-20A Communications bus module
Software: LCsolutions

Vorsäule: Agilent Technologies
Hypersil ODS
4*4 mm, 5 µm
Part No 7992618-504

Säule: Agilent Technologies
Hypersil BDS-C18
4*250 mm, 5 µm
PN 799260B-584
SN USIN002700

Mobile Phase A: Aqua dest
 Mobile Phase B: MeOH p.a.
 Durchflussrate: 1,00 ml/min
 Injektionsvolumen: 10 µl
 Detektion: 260, 280 und 290 nm

Zur Analyse des EtOAc-Extraktes aus *Juncus effusus* (1 mg/ml MeOH) wurden folgende Methoden verwendet:

Methode 1

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 15	72 → 30	28 → 70
15 → 20	30 → 30	70 → 70
20 → 22	30 → 00	70 → 100
22 → 27	00 → 00	100 → 100

Methode 2

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 15	67 → 25	33 → 75
15 → 20	25 → 25	75 → 75
20 → 22	25 → 00	75 → 100
22 → 27	00 → 00	100 → 100

Methode 3

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 15	62 → 20	38 → 80
15 → 20	20 → 20	80 → 80
20 → 22	20 → 00	80 → 100
22 → 27	00 → 00	100 → 100

Methode 4

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 05	62 → 35	38 → 65
05 → 20	35 → 35	65 → 65
20 → 30	35 → 20	65 → 80
30 → 31	20 → 00	80 → 100
31 → 36	00 → 00	100 → 100

Methode 5

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 05	62 → 45	38 → 55
05 → 20	45 → 45	55 → 55
20 → 30	45 → 20	55 → 80
30 → 31	20 → 00	80 → 100
31 → 36	00 → 00	100 → 100

Methode 6

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 25	40 → 40	60 → 60
25 → 30	40 → 20	60 → 80
30 → 31	20 → 00	80 → 100
31 → 36	00 → 00	100 → 100

Methode 7

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 25	40 → 40	60 → 60
25 → 30	40 → 20	60 → 80
30 → 31	20 → 00	80 → 100
31 → 36	00 → 00	100 → 100

Methode 8

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 25	40 → 40	60 → 60
25 → 28	40 → 10	60 → 90
28 → 30	10 → 10	90 → 90
30 → 31	10 → 05	90 → 95
31 → 32	05 → 02	95 → 98
32 → 33	02 → 00	98 → 100
33 → 36	00 → 00	100 → 100

Methode 9

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 18	40 → 40	60 → 60
18 → 21	40 → 10	60 → 90
21 → 23	10 → 10	90 → 90
23 → 28	10 → 07	90 → 93
28 → 29	07 → 07	93 → 93
29 → 32	07 → 05	93 → 95
32 → 35	05 → 05	95 → 95
35 → 37	05 → 02	95 → 98
37 → 38	02 → 00	98 → 100
38 → 39	00 → 00	100 → 100

Methode 10

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 15	40 → 40	60 → 60
15 → 16	40 → 20	60 → 80
16 → 27	20 → 00	80 → 100
27 → 30	00 → 00	100 → 100

Methode 11

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 14	40 → 40	60 → 60
14 → 15	40 → 10	60 → 90
15 → 25	10 → 10	90 → 90
25 → 29	10 → 00	90 → 100
29 → 30	00 → 00	100 → 100

Methode 12

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 14	40 → 40	60 → 60
14 → 15	40 → 05	60 → 95
15 → 25	05 → 10	95 → 90
25 → 29	10 → 00	90 → 100
29 → 30	00 → 00	100 → 100

Methode 13

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 14	40 → 40	60 → 60
14 → 15	40 → 00	60 → 100
15 → 17	00 → 00	100 → 100
17 → 18	00 → 50	100 → 50
18 → 28	50 → 50	50 → 50
28 → 29	50 → 00	50 → 100
29 → 34	00 → 00	100 → 100

Methode 14

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 03	62 → 40	38 → 60
03 → 14	40 → 40	60 → 60
14 → 15	40 → 01	60 → 99
15 → 20	01 → 01	99 → 99

Präperative HPLC

Instrument: Shimadzu LC-8A Liquid chromatograph
Prominence SPD-M20A Diode Array
Detector
SIL-10AP Auto sampler
FRC-10A Fraction collector
Prominence CBM-20A Communications
bus module
FCV AL Reservoir
Software: LCsolutions

Säule: Macherey-Nagel
Nucleosil 100-7 C18
21*250 mm, 5 µm
Ser. No.: 0086425

Bei der Durchführung der präoperativen HPLC wurde die nachfolgende Methode verwendet:

Mobile Phase A: Aqua dest
Mobile Phase B: MeOH p.a.
Durchflussrate: 24,00 ml/min
Injektionsvolumen: 1,00 ml
Detektion: 260, 280 und 290 nm

Die Konzentrationen des Extraktes betragen bei dieser Methode 25 mg/ml MeOH und 50 mg/ml MeOH.

Zeit (min)	Mobile Phase A (Prozent V/V)	Mobile Phase B (Prozent V/V)
00 → 05	62 → 40	38 → 60
05 → 16	40 → 40	60 → 60
16 → 17	40 → 01	60 → 99
17 → 22	01 → 00	99 → 100

2.5.5 High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)

Um eine Trennung durch die HSCCC zu erreichen, wurde die Verteilung des Extraktes aus *Juncus effusus* zwischen verschiedenen Lösungsmitteln zuerst im Scheidetrichter überprüft und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Dazu wurden verschiedene Systeme (Vorversuch 1-4) getestet.

Vorversuch 1

10 mg *Juncus*-Extrakt wurden in 5 ml EtOAc gelöst und mit 5 ml einer Mischung aus EtOH und H₂O (1:2) im Scheidetrichter geschüttelt.

Vorversuch 2

10 mg *Juncus*-Extrakt wurden in 5 ml EtOAc gelöst und mit 5 ml einer Mischung aus MeOH und H₂O (1:2) im Scheidetrichter geschüttelt.

Vorversuch 3

10 mg *Juncus*-Extrakt wurden in 5 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 5 ml einer Mischung aus MeOH und H₂O (2:1) im Scheidetrichter geschüttelt.

Vorversuch 4

10 mg *Juncus*-Extrakt wurden 5 ml einer Mischung aus MeOH und Wasser (1:1) angelöst und mit 5 ml einer Mischung aus n-Hex und EtOAc (1:1) im Scheidetrichter geschüttelt.

Instrument: Model CCC-1000
Pharma-Tech Research CORP.
(Baltimore, Maryland, USA)
Pharma-Tech Research 59164
Series III Pump
Pharma-Tech Research Electronic controller

Bei der Durchführung der HSCCC wurden 2 Methoden getestet.
Es wurden 2 ml der vorbereiteten Lösungen in einer Konzentration von
50 mg/ml eingespritzt.

Methode 1

Mobile Phase : MeOH : H₂O = 2:1
Stationäre Phase : CH₂Cl₂
Durchflussrate: 3 ml/min
Injektionsvolumen: 2 ml

Methode 2

Mobile Phase : MeOH : H₂O = 1:1
Stationäre Phase : Hex : EtOAc = 1:1
Durchflussrate: 1 ml/min
Injektionsvolumen: 2 ml

2.6 Pharmakologische Testung

γ -Aminobuttersäure Typ A (GABA_A)-Rezeptoren sind die wichtigsten Mediatoren der synaptischen Inhibition im Zentralnervensystem von Säugetieren. Sie bestehen aus 5 Untereinheiten, die einen ligandengesteuerten Chloridionenkanal bilden. Die am häufigsten vorkommenden Rezeptoren setzen sich aus $2\alpha_1$, $2\beta_2$ und $1\gamma_2$ Untereinheiten zusammen.

GABA_A Ionenkanäle werden von zahlreichen Substanzen, auch wichtigen Arzneistoffen wie Benzodiazepinen, Barbituraten und verschiedenen Anästhetika moduliert (Bernard et al., 1998).

Eine Vielzahl von GABA_A -Rezeptor-Liganden kommen in Pflanzenextrakten vor und von vielen strukturell verschiedenen natürlichen Verbindungen ist bekannt, dass sie mit GABA_A -Rezeptoren interagieren (Medina, 1989).

Zu den Antagonisten des GABA_A -Rezeptors gehören z.B. Bicucullin und Picrotoxin (Stephenson, 1995). Von Amentoflavon, einem Biflavon (Nielsen, 1988), Tetrahydroberberin und 6-Methylflavon (Ai et al., 1997) ist bekannt, dass diese Verbindungen ebenfalls mit GABA_A Rezeptoren interagieren. Auch Valerensäure moduliert laut Khom et al. (2007) den Rezeptor und trägt somit zur schlaffördernden Wirkung der Baldrianwurzel bei.

Eine mögliche positive Modulation des GABA_A -Rezeptors durch einzelne Fraktionen des aufgereinigten EtOAc-Extraktes aus *J. effusus* wurde an isolierten *Xenopus laevis* Oozyten getestet.

Die Eizellen des afrikanischen Krallenfrosches werden standardmäßig für die Expression und Untersuchung von Ionenkanälen und Membranrezeptoren eingesetzt. Um nun die Modulation von (Natur-) Stoffen an Ionenkanälen wie dem GABA_A -Rezeptor zu messen, kann die Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik verwendet werden. Diese ermöglicht die Messung transmembranärer Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential. Dadurch können

Veränderungen im Ionenstrom gemessen und mit einer Wirkung der Substanz auf den Rezeptor in Verbindung gebracht werden.

Für dieses Experiment wurden weibliche Krallenfrösche anästhesiert und die Ovariallappen mitsamt Oozyten chirurgisch entnommen. Follikelmembranen und anhängiges Gewebe wurden mit Kollagenase (2 mg/ml) enzymatisch zersetzt. Nach der enzymatischen Verdauung des Gewebes wurde den isolierten Oozyten eine Mischung aus humaner rekombinanter α_1 , β_2 and γ_{2S} cRNA (1+1+10) injiziert. Die Oozyten wurden über Nacht zur Expressierung der Kanäle bei 18 °C in ND96 Lösung gelagert (Methfessel et al., 1986) und in den darauffolgenden Tagen zur Testung verwendet.

Zur Messung des Chloridionenstroms wurde die Zwei-Mikroelektroden Patch-Clamp Technik verwendet (Baburin et al., 2006).

Dazu wurde von jeder Fraktion eine Stammlösung in *DMSO* hergestellt und anschließend mit einer dem EC_{1-10} entsprechenden micromolaren Lösung von GABA in ND96 auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Die Testlösungen enthielten max. 1 % *DMSO*. Dieser Wert durfte nicht überstiegen werden, da dies das Messergebnis beeinflusst hätte.

Die Messungen wurden in einer modifizierten Mikroperfusionsskammer mit raschem Perfusionssystem durchgeführt (Hering, 1998).

In jedem Experiment wurde zuerst GABA in einer Konzentration zwischen 1 und 10 % der maximal ausgelösten Modulation appliziert (EC_{1-10}), danach wurde eine Verstärkung des durch GABA ausgelösten Cl^- -Stroms (I_{GABA}) durch die Fraktionen gemessen (Khom et al., 2007).

Die Messungen an isolierten *Xenopus laevis* Oozyten wurden in Kooperation mit dem Departement für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien von Mag. Judith Singhuber (Dept. Für Pharmakognosie) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Extraktion

Wie in Kapitel 2.3 (S. 11) beschrieben, wurde 1 g gepulverte Ausgangsdroge jeweils entweder mit CH_2Cl_2 oder mit EtOAc dreimal extrahiert.

Um zu ermitteln, welches der beiden Extraktionsmittel sich am besten eignete, wurde das Gewicht der erhaltenen Trockenextrakte ermittelt (Tabelle 3 und 4).

Material	Extraktionsmittel	Ausbeute
1 g Rohdroge	30 ml CH_2Cl_2	6,1 mg
Rückstand I	30 ml CH_2Cl_2	2,5 mg
Rückstand II	30 ml CH_2Cl_2	2,3 mg

Tabelle 3. Dreimalige Extraktion der gepulverten Ausgangsdroge mit CH_2Cl_2 und die dadurch jeweils erzielte Ausbeute.

Material	Extraktionsmittel	Ausbeute
1 g Rohdroge	30 ml EtOAc	12,5 mg
Rückstand I	30 ml EtOAc	4,6 mg
Rückstand II	30 ml EtOAc	3,2 mg

Tabelle 4. Dreimalige Extraktion der gepulverten Ausgangsdroge mit EtOAc und die dadurch jeweils erzielte Ausbeute.

1 g gepulverte Ausgangsdroge wurde dreimal mit je 30 ml CH_2Cl_2 extrahiert und lieferte 10,9 mg Extrakt. Die gleiche Menge an Ausgangsmaterial lieferte unter denselben Extraktionsbedingungen, aber dem Einsatz von EtOAc anstatt von CH_2Cl_2 20,3 mg Extrakt.

Die Extrakte wurden darauf in ihrem jeweiligen Extraktionsmittel (1 mg/ml) gelöst und mittels Dünnschichtchromatographie verglichen. Es wurden drei verschiedene Fließmittelsysteme (FM) verwendet: CH_2Cl_2 (FM-1), CHCl_3 (FM-2) und $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (95:1,5:0,1) (FM-3).

Als Referenzsubstanz diente Phenanthren (1 mg/ml in CH_2Cl_2). Jeweils 20 μl der Lösungen wurden bandenförmig auf eine DC-Platte aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Extrakte sowohl vor, als auch nach Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (ASR) im sichtbarem Licht, unter UV_{254} und UV_{366} ähnliche Banden aufwiesen (Abb. 4, S. 32).

Somit ist EtOAc besser als Extraktionsmittel für die gepulverten Markstangen aus *Juncus effusus* geeignet, da einerseits die damit erzielte Ausbeute an Extrakt in etwa doppelt so hoch im Vergleich zur Extraktion mit CH_2Cl_2 war, und andererseits durch die DC-Analyse davon auszugehen ist, dass die gleichen Inhaltsstoffe extrahiert wurden. Da die Fließmittelsysteme 1-3 (S. 12) zu keiner optimalen Auftrennung der Banden führten, war es nötig, ein DC-System zu entwickeln, um möglichst das gesamte Spektrum der Inhaltsstoffe des EtOAc-Extraktes aus *J. effusus* detektieren zu können.

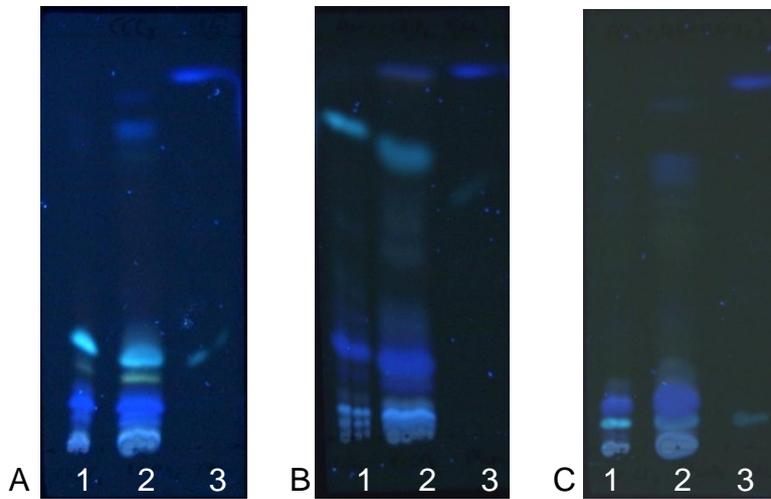


Abbildung 4 A-C. Dünnschichtchromatogramm des EtOAc- und CH_2Cl_2 -Extraktes, Phenanthren als Referenz; Konzentration 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 μl , unbesprüht unter UV_{366} .

- A:** FM-2 (S. 12): 1: CH_2Cl_2 -Extrakt, 2: EtOAc-Extrakt, 3: Phenanthren
B: FM-1 (S. 12): 1: CH_2Cl_2 -Extrakt, 2: EtOAc-Extrakt, 3: Phenanthren
C: FM-3 (S. 12): 1: CH_2Cl_2 -Extrakt, 2: EtOAc-Extrakt, 3: Phenanthren.

3.2 Entwicklung eines DC-Systems

Die Dünnschichtchromatographie sollte vor allem zur Kontrolle der Fraktionen während der Fraktionierung dienen.

Darum wurde ein DC-System benötigt, das eine möglichst vollständige Bandenaufftrennung des EtOAc-Extraktes ermöglicht. Wie in Kapitel 2.5.1 (S. 12-13) beschrieben, wurden 37 verschiedene Fließmittelsysteme entwickelt und getestet.

Grundsätzlich wurden der *Juncus*-EtOAc-Extrakt und die verwendeten Referenzsubstanzen in einer Konzentration von 1 mg/ml eines passenden Lösungsmittels verwendet. Das Applikationsvolumen betrug jeweils 20 µl. Als Detektionmittel diente ASR. Die DCs wurden sowohl unbesprüht als auch nach dem Besprühen im sichtbaren Licht und unter UV₂₅₄ und UV₃₆₆ ausgewertet.

Nach der Extraktion der Rohdroge mit EtOAc sollte ein passendes Fließmittelsystem für die Bandenaufftrennung gefunden werden. Trotz gründlicher Literatursuche konnte kein DC-System ausfindig gemacht werden. Der erste Versuch wurde mit CH₂Cl₂ als mobiler Phase durchgeführt (FM-1, S. 12). Dieses erwies sich als zu apolar, da der Großteil der Banden nur im unteren Drittel der Platte zu detektieren war. Trotz erhöhter Polarität erzielten auch FM-2 (S. 12) und FM-3 (S. 12) ähnliche Ergebnisse, wie in Abb. 4 (S. 32) deutlich zu erkennen ist.

Aufgrund der Kenntnis, dass *Juncus effusus* Phenanthrenderivate enthält (Bensky et al., 2004, Della Greca et al., 1995) und diese ähnliche Polarität wie Anthracenderivaten aufweisen, verwendete man im nächsten Versuch ein etabliertes Trennsystem für Anthracen-Drogen (FM-4 S. 12) (Wagner et al., 1983).

Durch FM-4 wurden zwar einige Inhaltsstoffe aufgetrennt, wie in Abb. 5 (S. 34) ersichtlich, war die Polarität aber noch zu hoch. Die Inhaltsstoffe wurden erst im oberen Drittel der DC-Platte aufgetrennt bzw. die Banden überlagerten sich an der Fließmittelfront. In weiteren Versuchen wurden die verwendeten Fließmittelbestandteile - EtOAc, MeOH und H₂O -

variiert, bis mit FM-12 (S. 12) erstmals eine bessere Auftrennung erreicht werden konnte. FM-12 führte zu einer Auftrennung über die gesamte Laufstrecke, welche allerdings mit einer Unschärfe der einzelnen Banden verbunden war (Abb. 6, S.35).

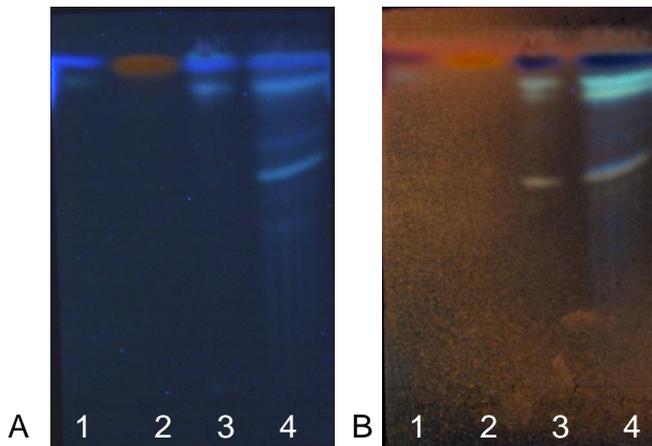


Abbildung 5. Dünnschichtchromatogramm des EtOAc- und CH₂Cl₂-Extraktes, Phenanthren und Emodin als Referenz, FM-4 (S. 12), Konzentration 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 µl, Sprühreagens ASR, **A:** unbesprüht UV₃₆₆, **B:** besprüht UV₃₆₆.

1: Phenanthren, 2: Emodin, 3: CH₂Cl₂-Extrakt, 4: EtOAc-Extrakt.

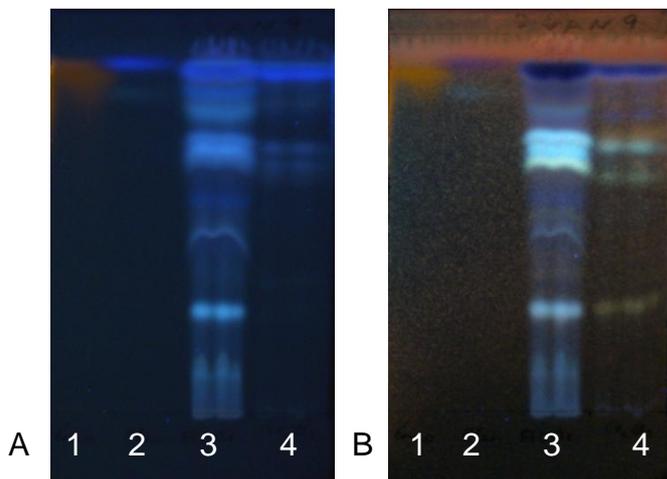


Abbildung 6. Dünnschichtchromatogramm des EtOAc- und CH₂Cl₂-Extraktes, Phenanthren und Emodin als Referenz, FM-12 (S. 12), Konzentration 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 µl, Sprühreagens ASR,

A: unbesprüht UV₃₆₆, **B:** besprüht UV₃₆₆.

1: Emodin, 2: Phenanthren, 3: EtOAc-Extrakt., 4: CH₂Cl₂-Extrakt

Als weitere Modifikation wurde durch Zugabe von n-Hexan (n-Hex) die Polarität vermindert. Durch Zusatz von Essigsäure (HAc) gelang es schließlich die Bandenschärfe zu erhöhen. Der Anteil von n-Hex als apolare Komponente des Fließmittels wurde schrittweise erhöht, bis eine gleichförmige Auftrennung des EtOAc-Extraktes über die gesamte Laufstrecke erzielt werden konnte. Das gelang mit FM-21 (S.12), wie in untenstehender Abbildung (Abb.7) ersichtlich. Allerdings erfuhren die intensiv blau fluoreszierenden Banden eine noch nicht optimale Separation, sodass dieses System noch weiterentwickelt werden musste. Dazu wurde das Verhältnis der einzelnen Komponenten von FM-21 verändert, wobei v.a. die apolaren Komponenten, n-Hex und EtOAc, sowie die polare HAc, bei gleich bleibenden Anteilen von MeOH und H₂O, variiert wurden (FM-22 bis FM-26, S. 12-13).

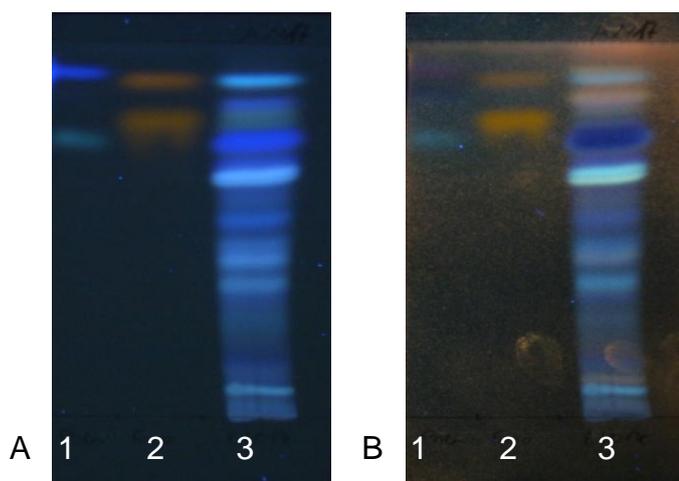


Abbildung 7. Dünnschichtchromatogramm des EtOAc- Extraktes, Phenanthren und Emodin als Referenz, FM-21 (S. 12), Konzentration 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 µl, Sprühreagens ASR, **A:** unbesprüht UV₃₆₆, **B:** besprüht UV₃₆₆.

1: Phenanthren, 2: Emodin, 3: EtOAc-Extrakt.

Als keine Optimierung der Auftrennung mittels FM-21 mehr erkennbar war, wurde ein weiteres etabliertes DC-System erprobt. Dieses System aus Toluol (Tol) und EtOAc im Verhältnis 1:1 wurde ursprünglich für den

Nachweis von Opiumalkaloiden entwickelt, die bekannterweise ein Phenanthren-Grundgerüst besitzen (Wagner et al., 1983).

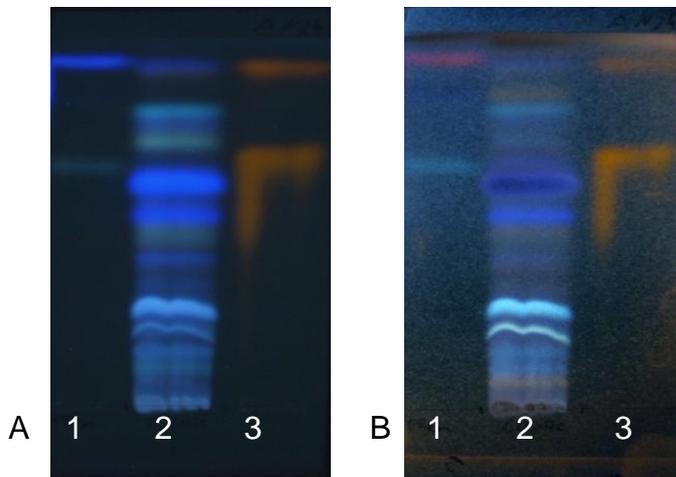


Abbildung 8. Dünnschichtchromatogramm des EtOAc- Extraktes, Phenanthren und Emodin als Referenz, FM-28 (S. 13), Konzentration 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 μ l, Sprühreagens ASR, **A:** unbesprüht UV₃₆₆, **B:** besprüht UV₃₆₆.
1: Phenanthren, 2: EtOAc-Extrakt, 3: Emodin.

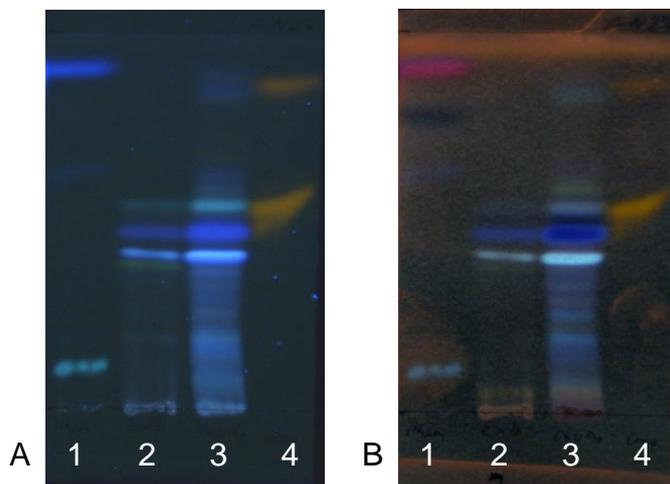


Abbildung 9. Dünnschichtchromatogramm des EtOAc- Gesamtextraktes und Extrakt II, Phenanthren und Emodin als Referenz, FM-31 (S. 13), Konzentration 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 μ l, Sprühreagens ASR, **A:** unbesprüht UV₃₆₆, **B:** besprüht UV₃₆₆.
1: Phenanthren, 2: Extrakt II, 3: EtOAc-Extrakt, 4: Emodin.

Wegen der apolareren Natur der *Juncus*-Inhaltsstoffe im Vergleich zu den Alkaloiden, wurde das Verhältnis Tol : EtOAc gleich zu Beginn von 1:1 auf 7:2 abgeändert (FM-28, S. 13). Das System ließ eine deutliche Auftrennung erkennen (Abb. 8, S. 37), die aber durch Unschärfe der einzelnen Banden charakterisiert war. Infolgedessen wurde dieses System weiter verändert, um eine Optimierung zu erzielen. FM-28 wurde modifiziert, indem HAc bzw. HCOOH zur Erhöhung der Bandenschärfe zugefügt wurde (FM-29 bis FM-32) (exemplarisch abgebildet: FM-31, Abb. 9, S. 37).

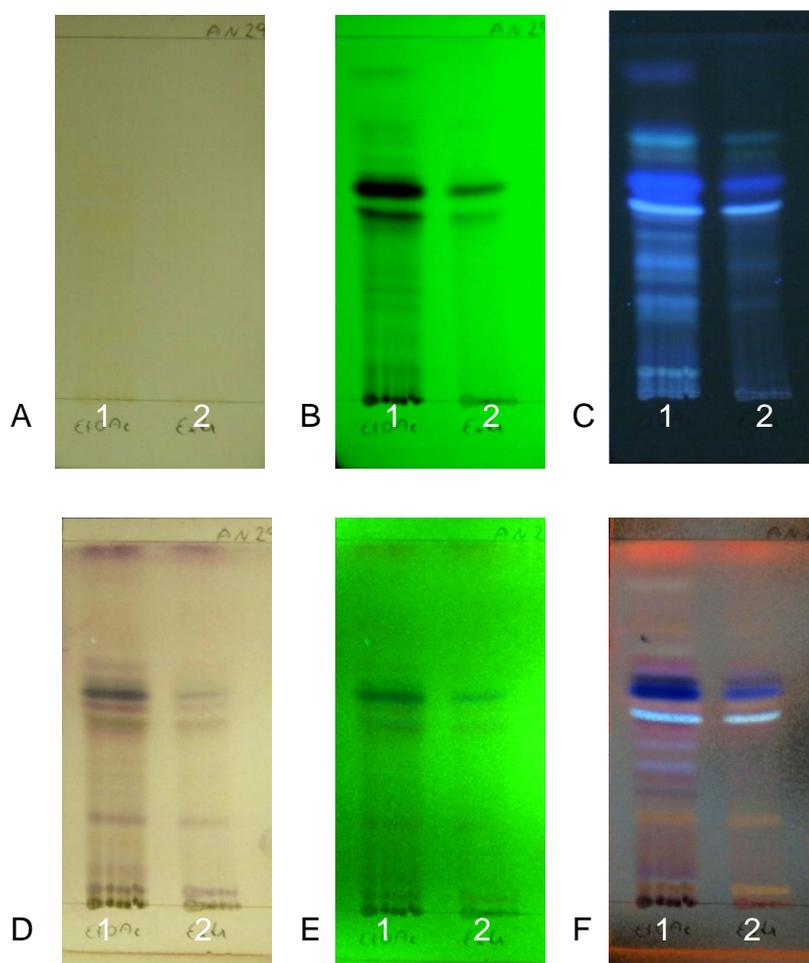


Abbildung 10 A-F. Dünnschichtchromatogramm des EtOAc-Extraktes und Extrakt II, FM-33 (S. 13), Konzentration 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 μ l, Sprühreagens ASR, **A:** unbesprüht UV_{vis}, **B:** unbesprüht UV₂₅₄, **C:** unbesprüht UV₃₆₆. **D:** besprüht UV_{vis}, **E:** besprüht UV₂₅₄, **F:** besprüht UV₃₆₆.
1: EtOAc-Extrakt, 2: Extrakt II,

Um schließlich die Polarität und die Bandenschärfe noch zu steigern, wurde MeOH zugefügt. Durch den Zusatz von MeOH ließ sich schließlich das Trennsystem (FM-33: Tol : EtOAc : MeOH : HAc = 7:2:0,2:0,5) entwickeln welches die Banden in einem zufriedenstellenden Maße separierte (Abb. 10, S. 38).

Für die Trennung der polaren Fraktionen diente ein von FM-21 abgeleitetes System. Hierbei konnte durch das Weglassen der H₂O-Komponente und der Erhöhung des Anteils an HAc, bei gleich bleibenden Anteilen von n-Hex, EtOAc und MeOH, Fließmittelsystem 36 (Kapitel 2.5.1, S. 13) entwickelt werden.

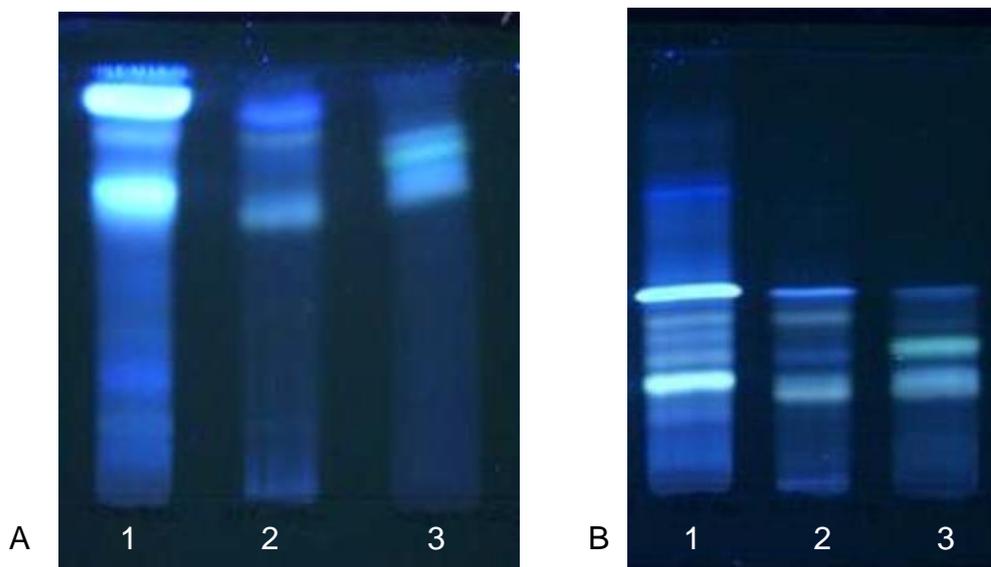


Abbildung 11 A-B. Dünnschichtchromatogramm der polaren Fraktionen der Kieselgelsäule. Applikation von jeweils 20 μ l .

A: FM-36 (S. 13), unbesprüht, UV_{366nm} 1: J 16, 2: J 17, 3: J 18.

B: FM-33 (S. 13), unbesprüht, UV_{366nm}.1: J 16, 2: J 17, 3: J 18.

Wie in obiger Abbildung (Abb. 11) erkennbar ist, ließen sich die polaren Substanzen über die gesamte Laufstrecke separieren. Darunter litt aber die Bandenschärfe, die auch nach weiterer Zugabe von Säure nicht verbessert werden konnte.

Wie in Abb. 10 (S. 38) ersichtlich, wurde das beste Ergebnis mit Fließmittelsystem 33 (Kapitel 2.5.1, S. 13) erzielt. Die Banden wurden über die gesamte Laufstrecke gleichmäßig und scharf aufgetrennt. Selbst die intensiv blau fluoreszierenden Banden ließen sich gut separieren.

3.3 Charakterisierung des EtOAc-Extraktes mittels DC

Nach der Ausarbeitung eines optimalen DC-Systems, um den EtOAc-Extrakt aufzutrennen, wurde versucht anhand dünnschichtchromatographischer Analyse einzelne Inhaltsstoffgruppen nachzuweisen bzw. zumindest die Polarität der *Juncus*-Inhaltsstoffe mit verfügbaren Referenzen zu vergleichen.

Wie in Kapitel 2.5.1 (S. 13) beschrieben, wurden verschiedene Sprühreagentien verwendet, um charakteristische Stoffgruppen des Gesamtextraktes nachzuweisen.

Das Universalsprühreagens ASR eignete sich besonders gut als Detektionsreagens zur Charakterisierung des EtOAc-Extraktes aus *Juncus effusus*. Die Auswertung erfolgte nach dem Besprühen unter UV₃₆₆.

Zum Nachweis von Flavonoiden und anderen fluoreszierenden Inhaltsstoffen diente Naturstoffreagenz A-Polyethylenglykol-Reagens (NST/PEG). Die Auswertung durch intensive Fluoreszenzfärbung erfolgte unter UV₃₆₆. Als Referenzsubstanzen dienten das Flavonolaglykon Quercetin und das Flavonoidglykosid Rutin in einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml MeOH (Abb. 12 A, S. 41). Für die DC wurde FM-36 (S. 13), welches für polare Fraktionen erarbeitet wurde, verwendet.

Flavonoide sind bekannte Inhaltsstoffe von *Juncus effusus*. Wie in Abb. 12 A (S. 41) zu sehen ist, befanden sich die untersten Banden des Extraktes auf gleicher Höhe wie das Aglykon. Durch Unschärfe der Banden und Dominanz der blauen Zonen ließen sich Flavonoidaglyka vermuten, konnten aber nicht eindeutig detektiert werden.

Cumarine wurden durch Besprühen mit methanolischer Kalilauge, welche auch eine Fluoreszenzverstärkung herbeiführte, nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte unter UV₃₆₆. Als Referenzsubstanzen dienten Cumarin und das Anthrachinonderivat Emodin in einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml MeOH. Für die DC wurde FM-33 (S. 13) verwendet. Cumarin erschien blau, Emodin gelb (Abb. 12 B). Die Bande von Cumarin zeigte einen höheren Rf-Wert als die intensiv blau fluoreszierenden Banden des EtOAc-Extraktes und besaß ebenfalls unter UV₃₆₆ und UV₂₅₄ eine blaue Färbung. Das Anthrachinonderivat Emodin wurde aufgrund der ähnlichen Polarität zu Phenanthrenen als weitere Referenz verwendet und erschien unter UV₃₆₆ und UV₂₅₄ als gelbe Bande noch leicht überhalb der Bande von Cumarin.

Auch unbesprüht zeigten Cumarin und Emodin eine charakteristische Fluoreszenz (Abb. 12 C).

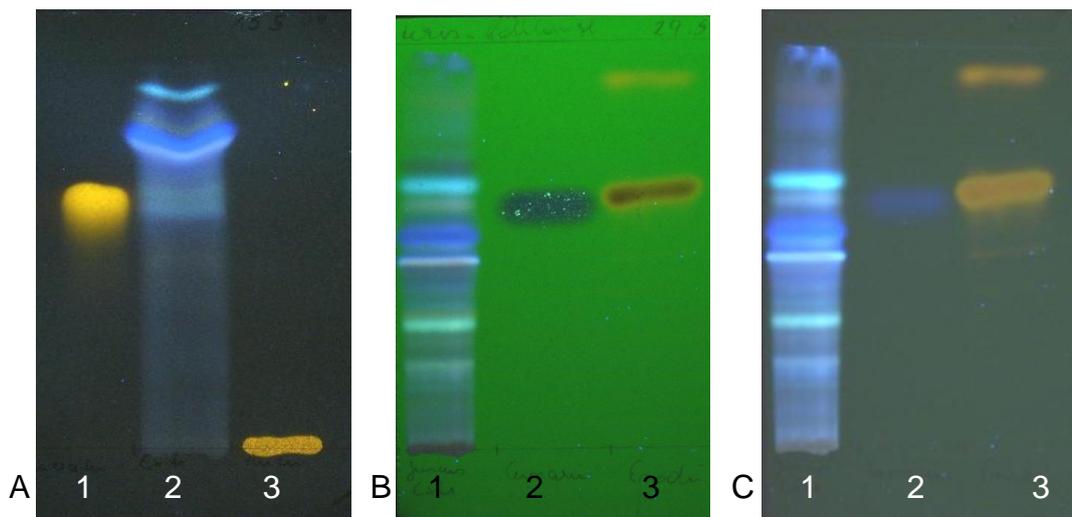


Abbildung 12 A-C. Dünnschichtchromatogramme zur Überprüfung verschiedener Inhaltstoffgruppen. Konzentration jeweils 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 µl.

A: Dünnschichtchromatogramm von Quercetin, EtOAc -Extrakt und Rutin, FM-36 (S. 13), besprüht mit NST/PEG, UV₃₆₆. 1: Quercetin, 2: EtOAc -Extrakt, 3: Rutin

B: Dünnschichtchromatogramm von EtOAc-Extrakt, Cumarin und Emodin, FM-33 (S. 13), besprüht mit methanolischer Kalilauge, UV₃₆₆ und UV₂₅₄. 1: J EtOAc -Extrakt, 2: Cumarin, 3: Emodin.

C: Dünnschichtchromatogramm von EtOAc -Extrakt, Cumarin und Emodin, FM-33 (S. 13), unbesprüht, UV₃₆₆. 1: EtOAc -Extrakt, 2: Cumarin, 3: Emodin.

Als Universalreagens zum Nachweis von höheren Alkoholen, Phenolen und Steroiden wurde Vanillin-Schwefelsäure-Reagens verwendet. Die Auswertung erfolgte im sichtbaren Licht. Als Referenzsubstanz diente β -Sitosterin in einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml MeOH. β -Sitosterin erschien als rosa gefärbte Bande mit ähnlichem Rf-Wert wie die blauen Banden (Abb. 13 A).

Aufgrund der Polarität des EtOAc-Extraktes waren Zucker nicht zu erwarten, wurden aber dennoch überprüft. Zucker konnten mit Thymol-Schwefelsäure-Reagens angefärbt werden. Die Auswertung erfolgte im sichtbaren Licht. Zucker sollten als schwache rosagefärbte Flecken erscheinen. Unter UV_{vis} wurden nach dem Besprühen keine Banden sichtbar. Nur unter UV_{366} konnte eine rote Färbung an der Startzone der Glucose festgestellt werden (Abb. 13 B). Im Extrakt konnten keine Banden zugeordnet werden.

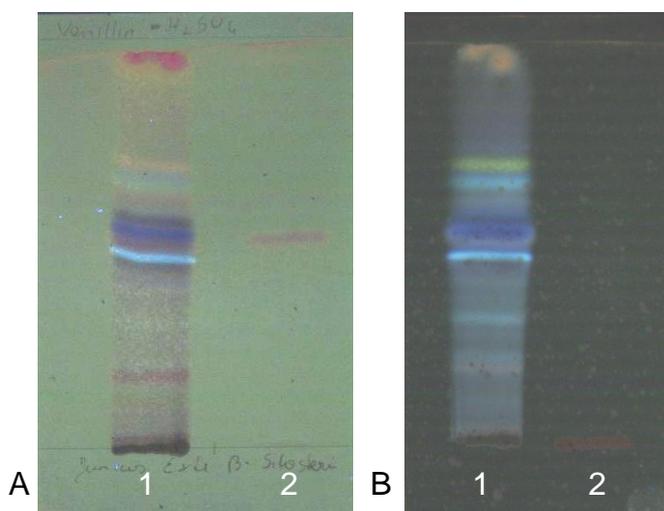


Abbildung 13 A-C.

Dünnschichtchromatogramme zur Überprüfung verschiedener Inhaltstoffgruppen. Konzentration 1 mg/ml, Applikation von jeweils 20 μ l.

A: Dünnschichtchromatogramm von EtOAc -Extrakt und β -Sitosterin, FM-33 (S. 13), besprüht mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagens, UV_{vis} . 1: EtOAc -Extrakt, 2: β -Sitosterin

B: Dünnschichtchromatogramm von EtOAc -Extrakt und Glucose, FM-33 (S. 13), besprüht mit Thymol-Schwefelsäure-Reagens, UV_{366nm} . 1: EtOAc -Extrakt, 2: Glucose.

Als Resultat der Charakterisierung der Extraktinhaltsstoffe mittels DC kann festgehalten werden, dass die meisten der eingesetzten Referenzsubstanzen, außer Glucose und Rutin, im Polaritätsbereich der dominanten, intensiv blau fluoreszierenden Banden des EtOAc-Extraktes liegen, wobei das Flavonoidaglycon Quercetin zu den polarsten Verbindungen dieses Rf-Bereichs gehört.

3.4 Bioaktivitätsgeleitete Auftrennung

3.4.1 Säulenchromatographie an Kieselgel

Aus dem entwickelten Fließmittelsystem 33 (S.13) wurde eine für die Säulenchromatographie auf Kieselgel geeignete mobile Phase abgeleitet. Für eine bessere Auftrennung wurde die Polarität der mobilen Phase im Vergleich zu FM-33 etwas gesenkt, indem auf die Zugabe von MeOH verzichtet wurde. Weiteres war es nötig, aufgrund einer möglichen Zersetzung der Inhaltsstoffe, auf die Verwendung der in FM-33 (S. 13) vorgesehenen Säure zu verzichten. Damit wurde natürlich eine weniger gute Auftrennung riskiert. Um dem entgegenzuwirken wurde mit einem Lösungsmittelgradienten gearbeitet.

Das Ziel dieser Methode war eine polaritätsabhängige Fraktionierung oder Auftrennung der möglich wirksamen Inhaltsstoffe. Wie in Kapitel 2.5.2 (S. 15) beschrieben, wurden 306 mg *Juncus*-EtOAc-Extrakt auf eine Kieselgelsäule (97 cm x 1,5 cm) aufgebracht und eine Gradientenelution gestartet, wie der Tabelle 1 (S. 15) zu entnehmen ist. Die Flussrate betrug 5 ml/30 min.

Die Elution wurde mit n-Hex gestartet und die Polarität mit EtOAc schrittweise erhöht. In weiterer Folge wurde die Polarität noch mit MeOH gesteigert. MeOH wurde nur mehr zum Spülen der Säule verwendet. Aus früheren I_{GABA} -Messungen war bereits bekannt, dass die polaren Fraktionen nicht mehr wirksam sind (Singhuber, in Vorbereitung).

Deshalb wurde die MeOH-Fraktion zwar gesammelt, nicht aber für die pharmakologische Testung verwendet. Insgesamt wurden 1205 Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Davon wurde jede zehnte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie (FM-33) analysiert. Als Detektionsmittel wurde ASR eingesetzt. Wegen der geringen Konzentrationen an Inhaltsstoffen musste jede zum DC-Screening verwendete Fraktion (5 ml) auf 1 ml eingengt werden, bevor davon

jeweils 20 µl als Testlösung für die Dünnschichtchromatographie verwendet werden konnten. Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung wurden, wie in Abbildung 14-17 (S. 46-47) dokumentiert ist, vereint. Insgesamt resultierten aus dieser Fraktionierung 19 Sammelfraktionen (J 1-J 19), deren Ausbeuten der untenstehenden Tabelle 5 zu entnehmen sind.

Kieselgelfraktion	vereinte Fraktion	Ausbeute (mg)
1-29	J 1	15,1
30-35	J 2	4,9
36-52	J 3	5,1
53-65	J 4	16,1
66-109	J 5	10,7
110-153	J 6	4,8
184-203	J 7	4,7
204-225	J 8	8,9
226-259	J 9	20,4
260-273	J 10	2,9
274-353	J 11	9,5
354-446	J 12	24,5
447-480	J 13	4,1
481-563	J 14	4,9
564-708	J 15	28,9
709-950	J 16	40
951-1030	J 17	29,9
1031-1040	J 18	15,2
1041-1205	J 19	30

Tabelle 5. Fraktionen der Kieselgelsäule, vereinte Sammelfraktionen und erzielte Ausbeuten. Weitere Bedingungen laut Kapitel 2.5.2 (S. 15).

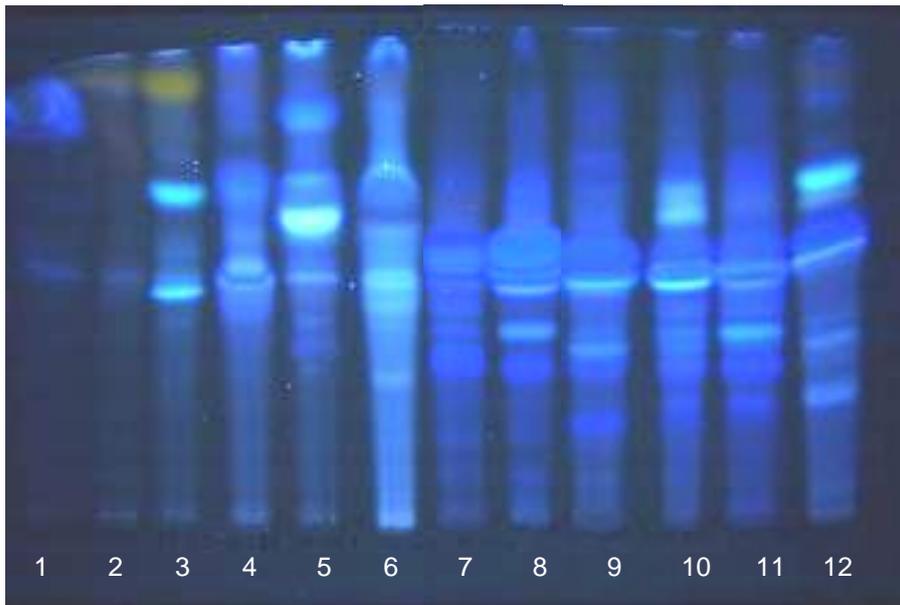


Abbildung 14. Dünnschichtchromatogramm der Sammelfractionen J 1-J 11 aus der Trennung an Kieselgel, FM-33 (S. 13), Applikation von jeweils 20 μ l, unbesprüht unter UV₃₆₆. 1: J 1, 2: J 2, 3: J 3, 4: J 4, 5: J 5, 6: J 6, 7: J 7, 8: J 8, 9: J 9, 10: J 10, 11: J 11 (S. 45), 12: EtOAc-Extrakt.

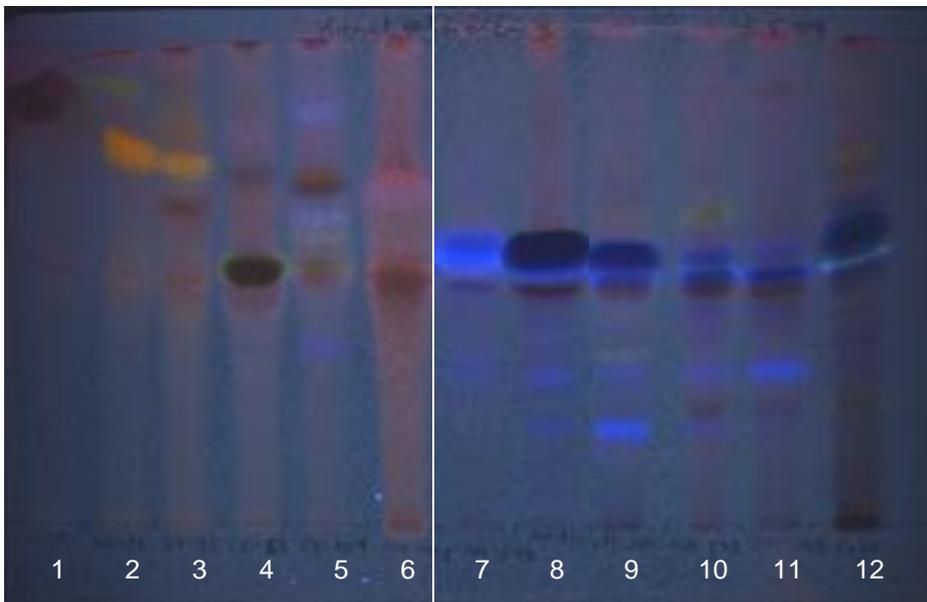


Abbildung 15. Dünnschichtchromatogramm der Sammelfractionen J 1-J 11 aus der Trennung an Kieselgel, FM-33 (S. 13), Applikation von jeweils 20 μ l, besprüht mit ASR unter UV₃₆₆. 1: J 1, 2: J 2, 3: J 3, 4: J 4, 5: J 5, 6: J 6, 7: J 7, 8: J 8, 9: J 9, 10: J 10, 11: J 11 (S. 45), 12: EtOAc-Extrakt.

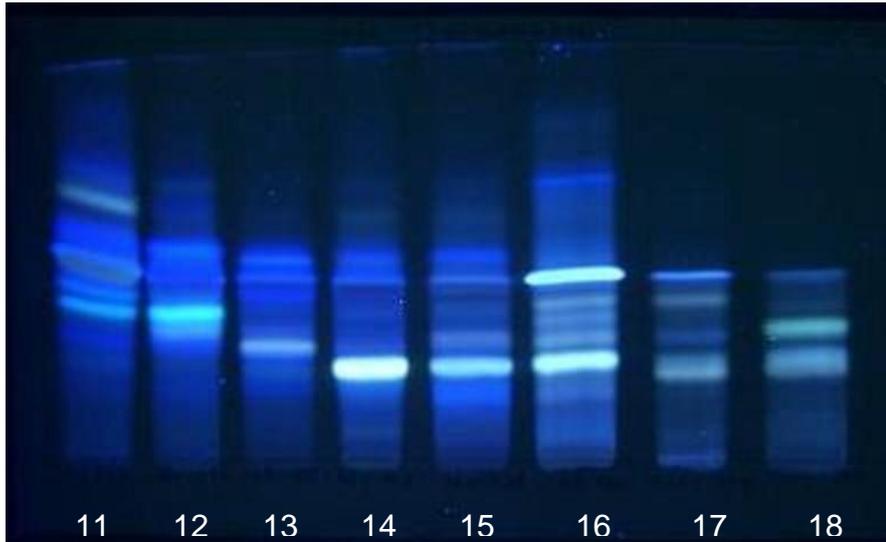


Abbildung 16. Dünnschichtchromatogramm der Sammelfractionen J 11-J 18 aus der Trennung an Kieselgel, FM-33 (S. 13), Applikation von jeweils 20 µl, unbesprüht unter UV₃₆₆. 11: J 11, 12: J 12, 13: J 13, 14: J 14, 15: J 15, 16: J 16, 17: J 17, 18: J 18 (S.45).

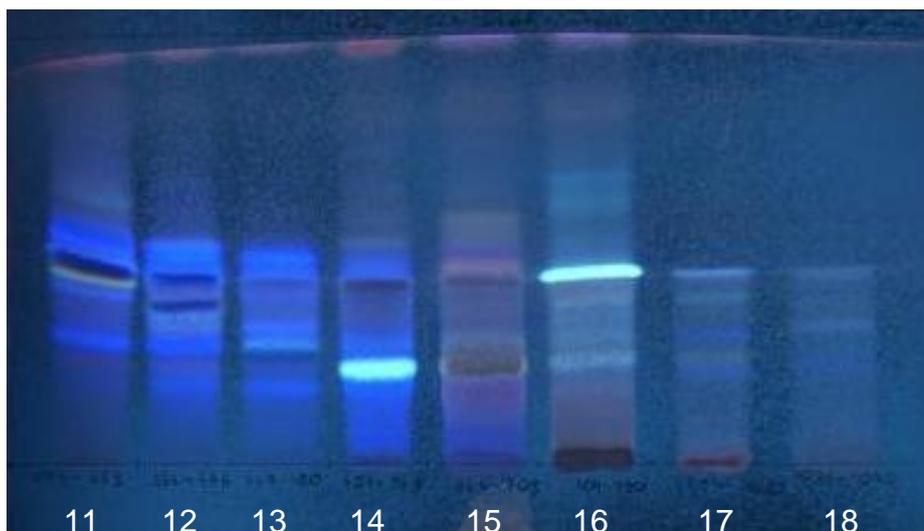


Abbildung 17. Dünnschichtchromatogramm der Sammelfractionen J 11-J 18 aus der Trennung an Kieselgel, FM-33 (S. 13), Applikation von jeweils 20 µl, besprüht mit ASR unter UV₃₆₆. 11: J 11, 12: J 12, 13: J 13, 14: J 14, 15: J 15, 16: J 16, 17: J 17, 18: J 18 (S. 45).

Ein Wirkmechanismus, welcher möglicherweise für die sedierende und schlaffördernde Wirkung von *Juncus effusus* verantwortlich ist, könnte sich durch die Modulation des GABA_A-Rezeptors erklären. Wie in Kapitel 2.6 (S. 28) beschrieben ist, konnte die GABA_A-Modulation mit der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Technik gemessen werden.

Dazu wurden humane GABA_A-Ionenkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert.

Es sollte getestet werden, ob die 19 Sammelfractionen (S. 45) Wirkung bzw. Unterschiede in der Modulation der GABA_A-Rezeptoren zeigten.

Die Fraktionen (J 1-J 19) wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml getestet. In jedem Experiment wurde zuerst GABA in einer Konzentration zwischen 1 und 10 % der maximal ausgelösten Modulation appliziert (EC₁₋₁₀), um danach die Potenzierung des Cl⁻-Stroms (I_{GABA}) zu messen, welcher durch GABA ausgelöst wurde. EC₁₋₁₀ wurde als Grundwert herangezogen und die Potenzierung nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Potenzierung} = [(I_{\text{Fraktion} + \text{GABA}} - I_{\text{GABA}}) / I_{\text{GABA}}] \times 100$$

Aus diesen Versuchen ergab sich, dass von 19 Sammelfractionen J 3, J 8, J 9 und J 10 die stärkste positive Modulation des I_{GABA}-bewirkten-(siehe auch Abb. 18, S. 50) J 8 erzielte eine I_{GABA}-Verstärkung von 186,5 %, gefolgt von J 3 (65,8 %), J 9 (172,1 %) und J 10 mit einer 154,2 %igen Stimulation (Singhuber, in Vorbereitung).

Sammelfractionen	Durchschnittliche Potenzierung von I_{GABA} (%)
J 1	22,6
J 2	41,2
J 3	65,8
J 4	22,6
J 5	27,1
J 6	1,5
J 7	-5,8
J 8	186,5
J 9	172,1
J 10	154,2
J 11	40,8
J 12	14,0
J 13	44,4
J 14	42,7
J 15	20,6
J 16	-3,8
J 17	-16,5
J 18	-59,2
J 19	-3,8

Tabelle 6. Sammelfractionen (S. 45) der Kieselgelsäule und deren durchschnittliche Potenzierung von I_{GABA} in Prozent als Mittelwerte aus 3 Messungen. (Singhuber, in Vorbereitung).

Wie der obenstehenden Tabelle 6 zu entnehmen ist, bewirkten 4 der 19 Sammelfractionen eine relevante Potenzierung der Modulation am $GABA_A$ -Rezeptor.

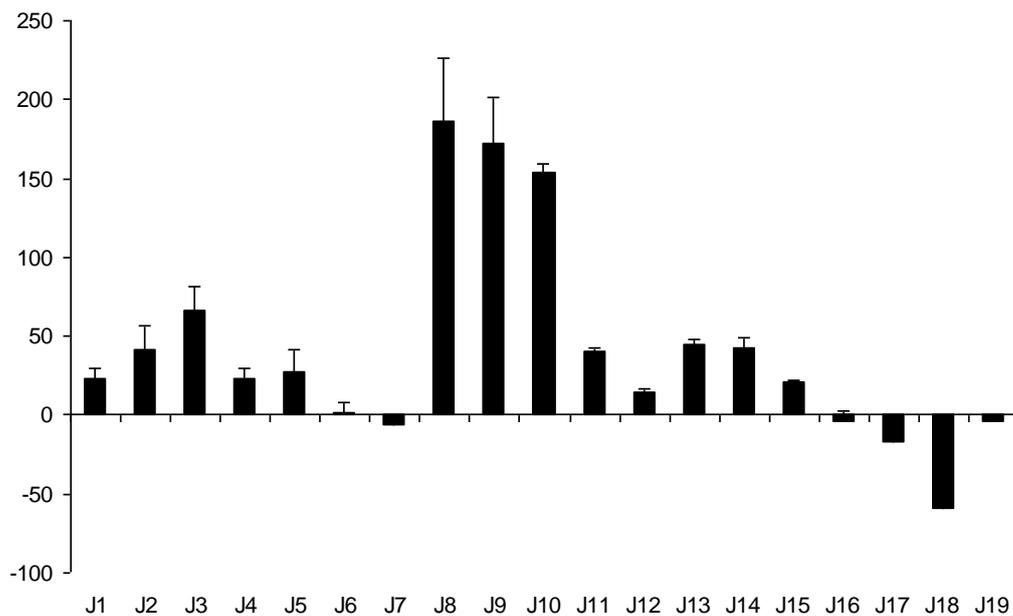


Abbildung 18 :Graphische Darstellung der Modulation von I_{GABA} (%) durch Sammelfractionen J 1-19 (S. 49) an $GABA_A$ -Ionenkanälen. Durchschnittliche Potenzierung als Mittelwerte von 3 Messungen. Testkonzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$ gemeinsam mit $GABA EC_{1-10}$.

Aus den vier am stärksten modulierenden Fraktionen J 3 (65,8 %), J 8 (186,5 %), J 9 (172,1 %), J 10 (154,2 %) wurden drei Fraktionen (J 8, J 9, J 10), die sich in ihrer Zusammensetzung wenig unterschieden, zur Fraktion 9.2 wiedervereint. Dieser Schritt war nötig, da sich die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen als zu gering erwiesen, um einzeln weiter aufgetrennt werden zu können. Durch die Vereinigung mehrerer aktiver Fraktionen, die sich kaum in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe unterschieden, war es möglich, an mehr aktives Ausgangsmaterial zu gelangen, welches für eine weitere Auftrennung verwendet werden konnte.

3.4.2 Säulenchromatographie an Sephadex LH-20

Die Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 sollte der Auftrennung der Subfraktion J 9.2 dienen, die sich aus den Fraktionen J 8, J 9 und J 10 zusammensetzt. Nach der polaritätsorientierten Vorfraktionierung erfolgte nun eine Gelchromatographie am hydroxypropylierten Dextrangel. Hierbei handelte es sich um eine Trennung des Substanzgemisches nach abnehmender Molekülgröße und nach Anzahl und Anordnung phenolischer Gruppen (Adam und Becker, 2000).

Wie in Kapitel 3.4.1 (S. 44) beschrieben, wurden drei der vier aktiven Fraktionen (J 8, J 9, J 10) zu Subfraktion J 9.2 wiedervereint. Davon wurden ca. 30 mg auf Sephadex aufgezogen und dann auf den Säulenkopf aufgebracht.

Es wurde eine Gradientenelution mit veränderlichen Anteilen von n-Hex und EtOAc, gemäß der in Kapitel 2.5.3 (S. 16) angegebenen Tabelle 2 gestartet.

Die Flussrate betrug anfänglich 5 ml/ 30 min, nahm während der Elution aber stark ab (0,5 ml/ 30 min).

Jede zehnte Fraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie analysiert und Fraktionen mit übereinstimmendem Fingerprint wurden vereint.

Zur dünnschichtchromatographischen Überprüfung diente FM-33. Als Detektionsmittel wurde ASR eingesetzt. Aufgrund der geringen Konzentrationen musste jede zehnte Fraktion (5 ml) auf 1 ml eingengt werden, bevor davon jeweils 20 µl als Testlösung für die Dünnschichtchromatographie verwendet werden konnten. Wie in Abb. 19 und 20 (S. 53) ersichtlich, ergab die Auftrennung der Fraktion J 9.2 Subfraktionen mit teils sehr unterschiedlicher Zusammensetzung. Insbesondere nach dem Besprühen mit ASR und der Detektion unter UV366 wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Subfraktionen deutlich.

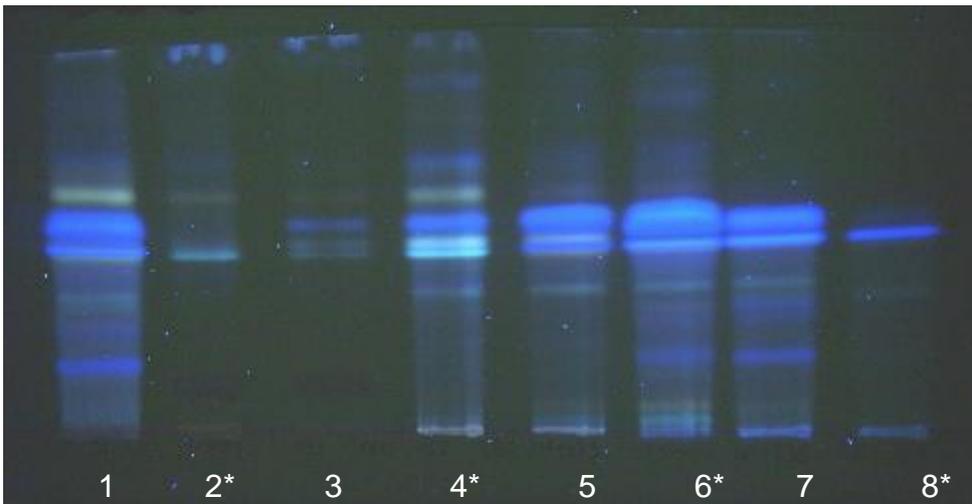


Abbildung 19. Dünnschichtchromatogramm einiger Sammelfractionen aus der Trennung an Sephadex LH-20, FM-33 (S. 13), Applikation von jeweils 20 μ l unter UV₃₆₆.
 1: J 8-J 10 (J 9.2), 2: J 9.2.1, 3: J 9.2.2, 4: J 9.2.3, 5: J 9.2.4, 6: J 9.2.5, 7: J 9.2.6, 8: J 9.2.8 (S. 52).

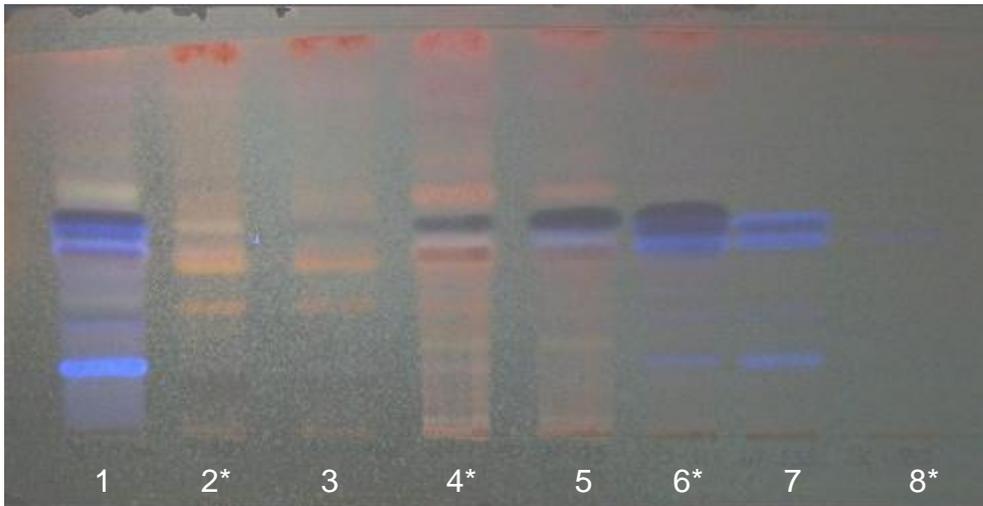


Abbildung 20. Dünnschichtchromatogramm einiger Sammelfractionen aus der Trennung an Sephadex LH-20, FM-33 (S. 13), Applikation von jeweils 20 μ l, besprüht mit ASR unter UV₃₆₆.
 1: J 8-J 10 (J 9.2), 2: J 9.2.1, 3: J 9.2.2, 4: J 9.2.3, 5: J 9.2.4, 6: J 9.2.5, 7: J 9.2.6, 8: J 9.2.8 (S. 52).

Die mit * markierten Fraktionen wurden pharmakologisch getestet, da sich deren Fingerprints am stärksten voneinander unterschieden. J 9.2.10 fehlt in der Abbildung, zeigt aber kaum Banden.

Obwohl insgesamt 11 Sammelfractionen (siehe untenstehende Tabelle 7) erhalten wurden (J 9.2.1-J 9.2.11), wurden nur die 5 Subfractionen pharmakologisch getestet (Kapitel 2.6, S. 28), deren Fingerprints sich am stärksten voneinander unterschieden (J 9.2.1, J 9.2.3, J 9.2.5, J 9.2.8, J 9.2.10) (Singhuber, in Vorbereitung).

Sephadexfraktion	vereinte Subfraktion	Ausbeute (mg)
1-122	J 9.2.1	4,38
131-160	J 9.2.2	3,66
161-330	J 9.2.3	4,86
331-392	J 9.2.4	3,5
393-464	J 9.2.5	6,02
465-535	J 9.2.6	5,74
536-580	J 9.2.7	2,21
581-680	J 9.2.8	2,46
681-690	J 9.2.9	0,5
691-869	J 9.2.10	1,24
purge EtOAc	J.9.2.11	2,82

Tabelle 7. Fraktionen der Sephadexsäule, vereinte Subfractionen und erzielte Ausbeuten. Weitere Bedingungen laut Kapitel 2.5.3 (S. 16).

Es stellte sich heraus, dass die Subfraction J 9.2.5 mit einer durchschnittlichen Potenzierung von 205,1 % den GABA_A-Rezeptor am stärksten modulierte, gefolgt von J 9.2.1 (124,9 %) und J 9.2.3 (51,9 %) (Tabelle 8, und Abb. 21, S.55 und Abb. 21, S. 56).

Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus drei Messungen dar.

Der Vergleich der beiden aktivsten Subfractionen J 9.2.5 und J 9.2.1 mit der jeweiligen Potenzierung von I_{GABA} zeigt, dass beide Fraktionen zwar den Rezeptor modulieren, aber ein völlig unterschiedliches Inhaltsstoffspektrum aufweisen (Abb. 19 und 20, S. 53).

Subfraktionen	Durchschnittliche Potenzierung von I_{GABA} (%)
J 9.2.1	124,9
J 9.2.3	51,9
J 9.2.5	205,1
J 9.2.8	-24,6
J 9.2.10	-11,4

Tabelle 8. Subfraktionen (S. 52) und deren durchschnittliche Potenzierung von I_{GABA} in Prozent als Mittelwerte von 3 Messungen, Testkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$. (Singhuber, in Vorbereitung).

Die stärkste Modulation des $GABA_A$ -Rezeptors wurde durch Subfraktion J 9.2.5 erzielt. Die Analyse dieser Subfraktion mittels DC zeigte nach Detektion mit ASR unter UV_{366} deutlich das Auftreten mehrerer blauer Zonierungen, die Subfraktion J 2.2.1 nicht aufwies, da hier bräunlich gefärbte Banden dominierten.

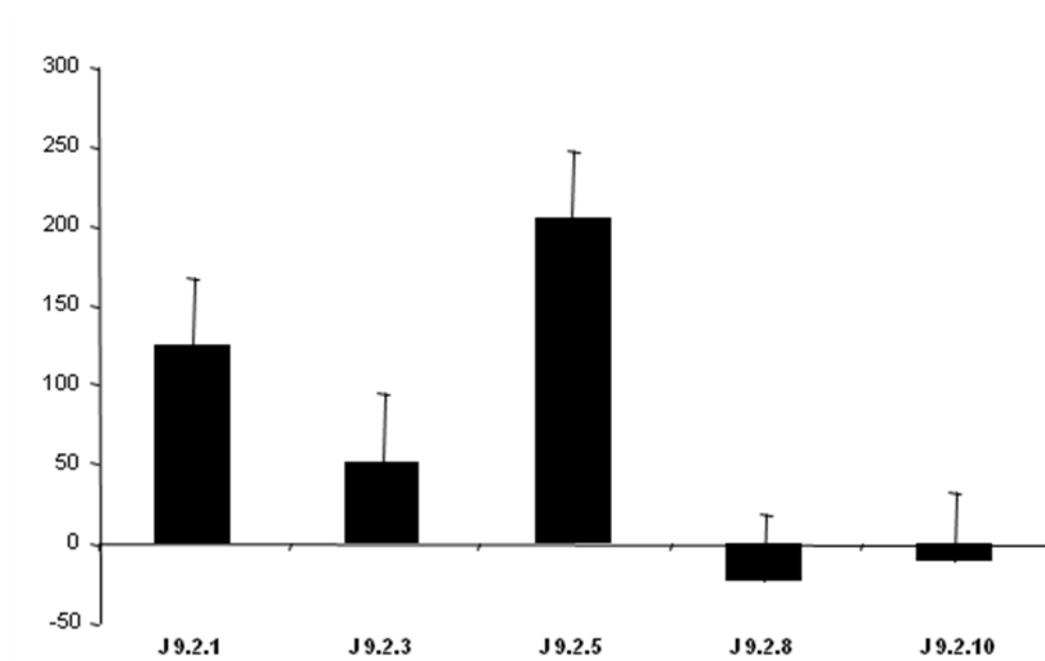


Abbildung 21. Graphische Darstellung der-Modulation von I_{GABA} (%) durch Subfraktionen J 9.2.1, J 9.2.3, J 9.2.5, J 9.2.8 und J 9.2.10 an $GABA_A$ -Ionenkanälen, I_{GABA} in Prozent als Mittelwerte von 3 Messungen. Testkonzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$ gemeinsam mit $GABA_{EC_{1-10}}$

Die in Subfraktion J 9.2.8 erhaltene, scheinbar einzelne Substanz, bewirkte keine Potenzierung von I_{GABA} . Ebenfalls als inaktiv stellte sich Subfraktion J 9.2.10 heraus.

Da die beiden aktivsten Fraktionen keine Übereinstimmung ihres Inhaltsstoffspektrums aufwiesen, ist anzunehmen, dass mehr als nur eine Substanz für die pharmakologische Wirkung verantwortlich ist.

Durch die Auftrennung des EtOAc-Extraktes an Kieselgel und der daraus erhaltenen aktiven Fraktionen an Sephadex wurden Stoffgemische erhalten, die teilweise eine den $GABA_A$ -Rezeptor modulierende Aktivität besitzen.

Es ist jedoch weiter unklar, welche Substanzen dafür verantwortlich sind, da eine Auftrennung in Einzelkomponenten nicht erzielt werden konnte.

Durch Anwendung weiterer Methoden wurde schließlich der Versuch unternommen, eine mögliche Isolierung wirksamer Inhaltsstoffe zu erreichen.

3.4.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Neben der Auftrennung über Kieselgel- und Sephadexsäulen wurde versucht, eine Methode zu entwickeln, die eine Trennung des komplexen Stoffgemisches des EtOAc-Gesamtextraktes aus *Juncus effusus* mittels HPLC ermöglichte. Dadurch würde eine schnelle Analyse aber auch eine Auftrennung und somit Aufreinigung einzelner Wirkstoffe ermöglicht werden.

Ausgehend von einem Verfahren zum Nachweis von Phenanthrenen aus *Dendrobium*-Arten (Yang et al., 2006) wurden 14 Methoden entwickelt, die sich hinsichtlich ihrer Fließmittelgradienten und Analysezeiten unterschieden (Kapitel 2.5.4, S. 17).

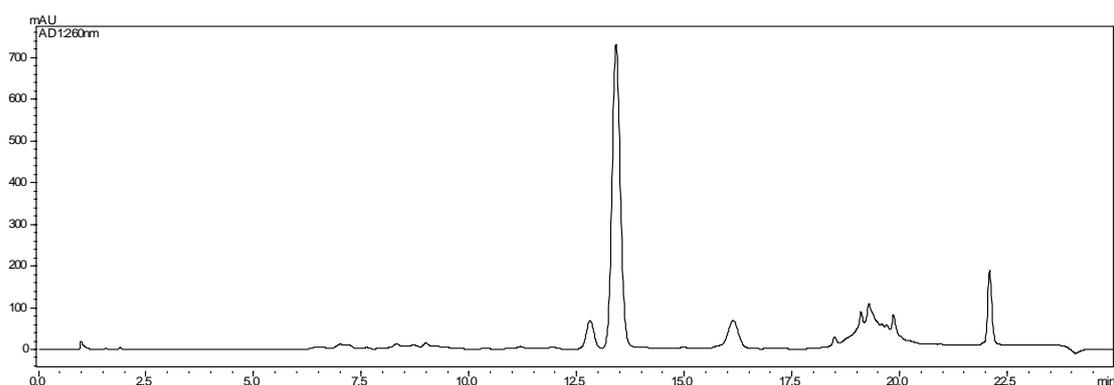


Abbildung 22. HPLC Chromatogramm, EtOAc-Extrakt (1 mg/ml MeOH), HPLC Instrument 1, HPLC Methode 14, $\lambda = 260$ nm. Weitere Bedingungen laut Kapitel 2.5.4 (S. 17).

Letztendlich wurde mit Methode 14 (S. 23) ein Analysenverfahren ausgearbeitet, bei dem mittels Diodenarraydetektor einzelne basisliniengetrennte Peaks sichtbar gemacht werden konnten, wie in Abb. 22 ersichtlich. Das Verfahren wurde für die präperative HPLC angepasst. Die Veränderungen bezogen sich auf die Analysezeiten, welche um jeweils 2 min verlängert wurden. Weiters wurde die mobile Phase B im letzten Analyseabschnitt von 99 % auf 100 % hinaufgesetzt.

Somit wurde eine Methode erarbeitet, die an der präoperativen HPLC getestet werden konnte (Kapitel 2.5.4, S. 24).

Im ersten Versuch wurde eine Konzentration von 25 mg/ml MeOH verwendet, welche sich als zu gering erwies, da die gewonnenen Fraktionen nicht für die DC-Kontrolle verwendet werden konnten. In einem zweiten Versuch, anschaulich in Abbildung 23, verwendete man eine Konzentration von 50 mg/ml. Es wurden insgesamt 48 Einzelfraktionen erhalten.

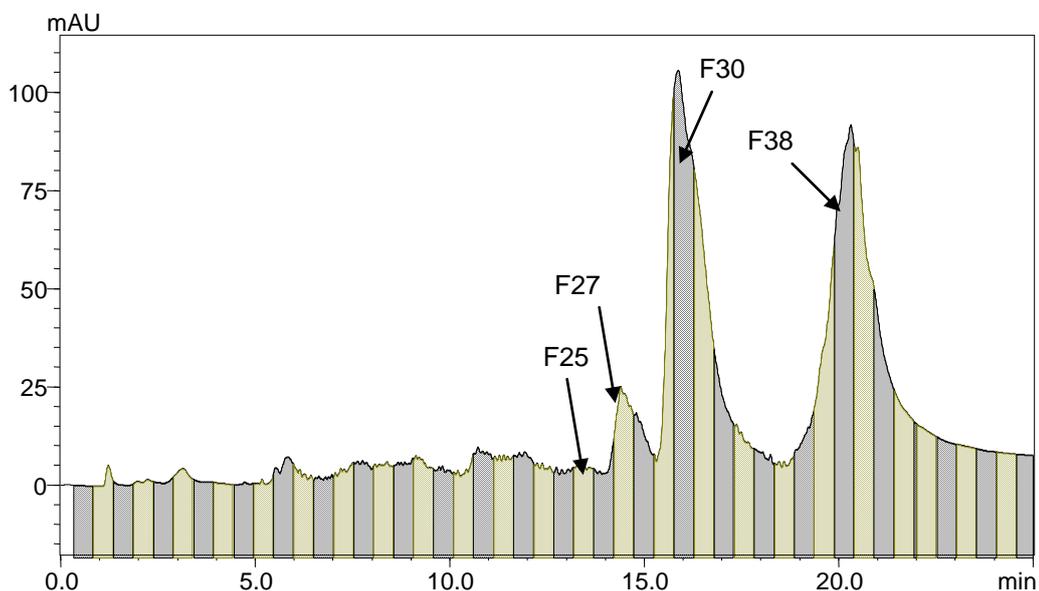


Abbildung 23. Chromatogramm der präoperativen HPLC Methode 1, EtOAc-Extrakt, 50 mg/ml, $\lambda = 280$ nm, Weitere Bedingungen laut Kapitel 2.5.4 (S. 24).

Jede Fraktion wurde auf ihre Zusammensetzung mittels analytischer HPLC (Methode 14, S. 23) getestet und entsprechend ihrem Peakmuster mit anderen Fraktionen vereint. Als Beispiel dieser Vorgehensweise werden 4 Chromatogramme angeführt (Abb. 24 A-D, S. 59).

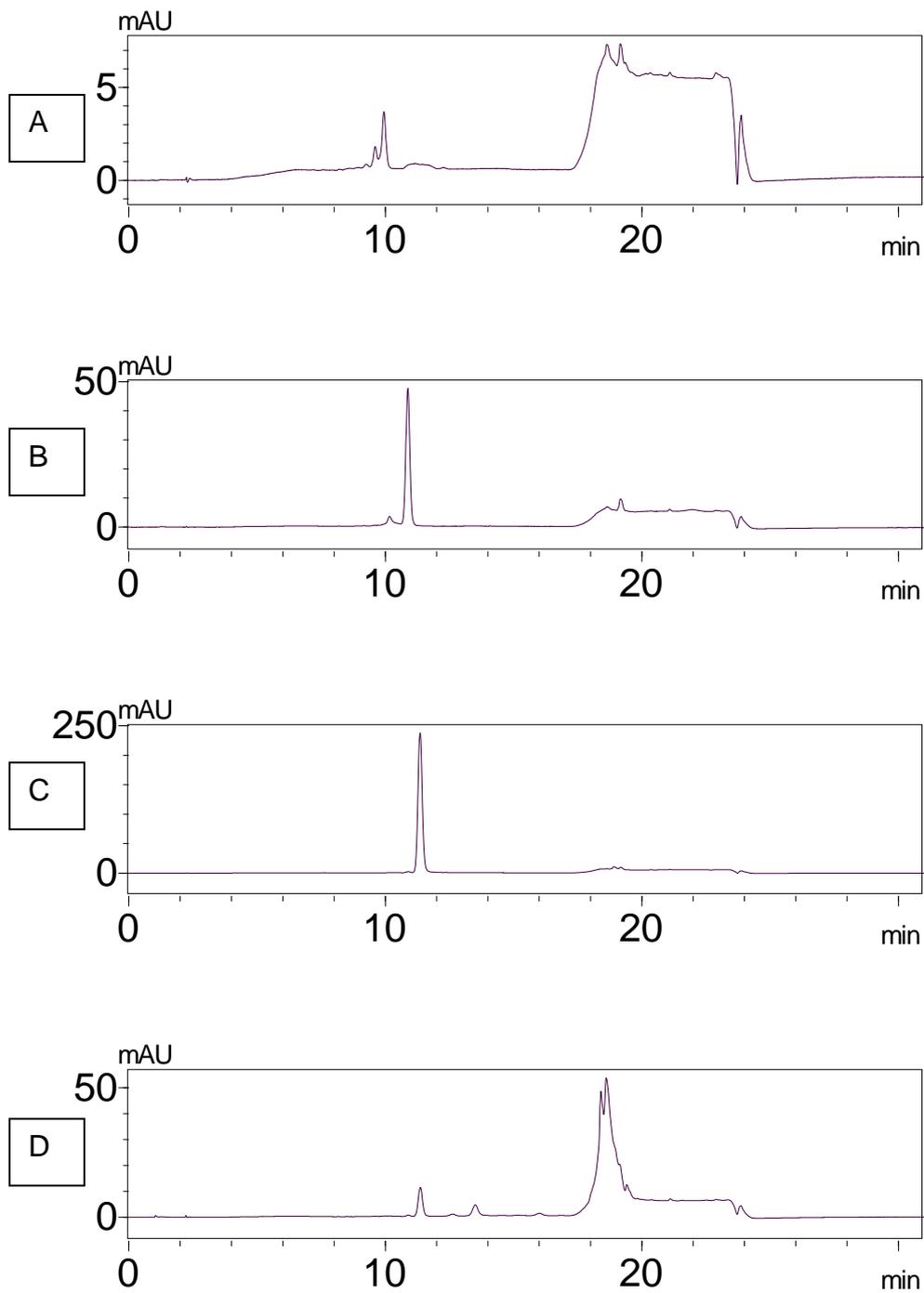


Abbildung 24 A-D. HPLC-Chromatogramme einzelner Fraktionen aus der präp. HPLC. 1 mg/ml MeOH, HPLC Instrument 2, HPLC Methode 14. Weitere Bedingungen laut Kapitel 2.5.4 (S. 17)

A: F 25, $\lambda = 280 \text{ nm}$; **B:** F 27, $\lambda = 280 \text{ nm}$; **C:** F 30, $\lambda = 280 \text{ nm}$; **D:** F 38, $\lambda = 280 \text{ nm}$.

Mittels präp. HPLC konnten 48 Fraktionen erhalten werden (Abb. 23, S. 58). Die Zusammensetzung jeder einzelnen Fraktion wurde mittels analytischer HPLC untersucht (Methode 14, S. 23). Fraktionen mit ähnlichem Peakmuster wurden vereint. Durch die Analyse der Fraktionen mittels analytischer HPLC wurden einzelne Peaks erhalten, die auf eine erfolgreiche Isolierung einer scheinbar einzelnen Substanz hindeuteten (Abb. 24 C, S. 59). Von diesen Fraktionen wurden zur Überprüfung der Isolierung zusätzlich DC-Chromatogramme angefertigt (FM-33, S. 13, Detektion mit ASR) (Abb. 25). Durch die Auswertung der DC wurde deutlich, dass alle Fraktionen mehrere Inhaltsstoffe enthielten.

Folglich konnten die Inhaltsstoffe und Stoffgruppen nicht ausreichend durch die präperative HPLC getrennt werden. Wie durch Vergleich der Peaks von Abb. 24 A-D (S. 59) mit dem Bandenmuster der Kontroll-DC in Abb. 25 festgestellt werden kann, setzen sich scheinbar einzelne HPLC-Peaks aus mehreren Substanzen zusammen.

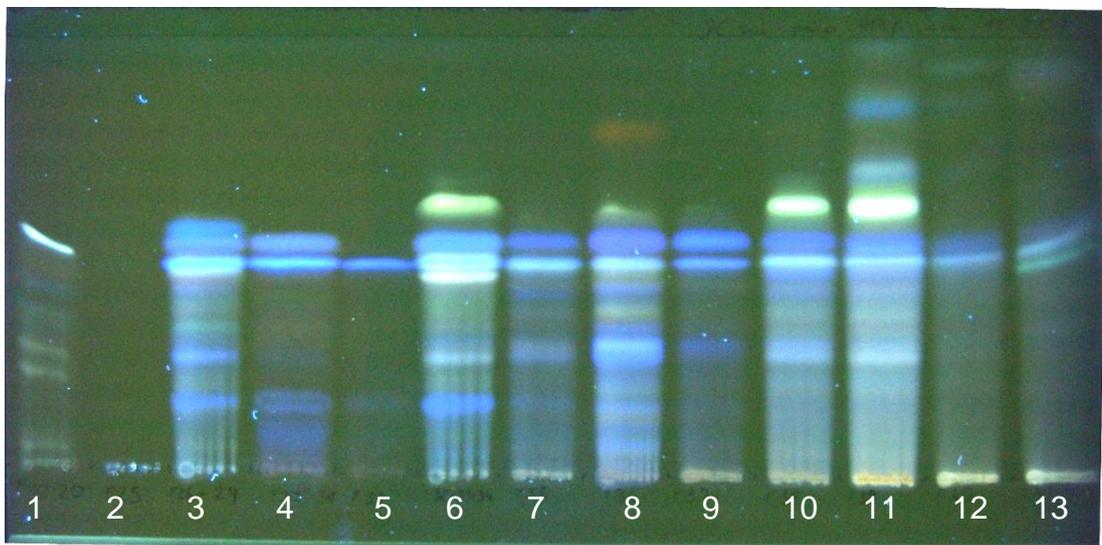


Abbildung 25. Dünnschichtchromatogramm ausgewählter Fraktionen der präp. HPLC, Methode (50 mg/ml) (S. 25), Applikation von 20 µl, Fließmittelsystem 33 (S. 13), UV₃₆₆.
1: F10-20, 2: F25, 3: F26-29, 4: F30-31, 5: F32, 6: F33-34, 7: F35, 8: F36, 9: F37, 10: F38, 11: F39, 12: F40, 13: F41-45

Dies wird deutlich, wenn man Abb. 24 C (S. 59) mit der 4. Bande in Abb. 25 (S.60) vergleicht. Hier werden aus einem Peak im HPLC-Chromatogramm mehrere Zonen auf der DC sichtbar.

Als Resultat der Auftrennung mittels HPLC kann festgehalten werden, dass sich das durchgeführte Verfahren als ungeeignet für die Separation der Inhaltstoffe aus *J. effusus* erwies. Die Methode müsste noch weiter verbessert werden, was im Rahmen dieser Diplomarbeit leider nicht möglich war. Für die analytische Methode würde der Einsatz von Säure, oder auch der Einsatz von Acetonitril, anstelle von Methanol, eventuell eine Verbesserung darstellen.

Für die präperative HPLC sollten diese Maßnahmen vermieden werden, da die Aufarbeitung mit Säure zu einer Zersetzung von empfindlichen Substanzen führen kann. Außerdem stellt die Verwendung einer hohen Menge an Acetonitril, wie es für die präp. HPLC nötig wäre, ein Umweltproblem dar.

Prinzipiell kann diese Arbeit als ein erster Ansatzpunkt gesehen werden, von welchem aus eine Weiterentwicklung möglich ist.

3.4.4 High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)

Durch die HSCCC wurde eine weitere Möglichkeit zur Auftrennung des EtOAc-Extraktes getestet. Die Gegenstromverteilungschromatographie basiert auf der kontinuierlichen Verteilung der Substanzen zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen, wobei eine der beiden Phasen als stationäre Phase in der Apparatur verbleibt, während die andere Phase durchgepumpt wird. Es handelt sich um eine präperative Technik, welche oft für Trennungs- und Reinigungsschritte natürlicher Stoffgemische eingesetzt wird. Die HSCCC bietet gegenüber traditionellen Trennmethoden einige Vorteile. So ist die Zahl möglicher Phasensysteme nahezu unbegrenzt. Weiters tritt keine irreversible Adsorption der Probe an der stationären Phase auf und das gesamte verwendete Probenmaterial kann nach dem Durchlauf quantitativ rückgewonnen werden. Allgemein handelt es sich um eine ökonomisch arbeitende Technik mit geringem Lösungsmittelverbrauch (Sticher, 2008, Adam und Becker, 2000).

Zu Beginn der Durchläufe wurde die Verteilung der Inhaltsstoffe des Extraktes zwischen verschiedenen Phasen im Scheidetrichter getestet (Vorversuch 1-4, S. 26). Aus den beiden nicht mischbaren Phasen wurden jeweils 20 µl entnommen und wie in Abbildung 26 (S. 63) ersichtlich, für die Dünnschichtchromatographie verwendet. Als Fließmittel diente FM-33 (S. 13), ASR wurde als Sprühreagens eingesetzt.

Die Analyse mittels DC ergab, dass sich alle Inhaltsstoffe im Verteilungssystem EtOAc und EtOH : H₂O (1:2) in der apolareren Ethylacetat-Phase befanden (Abb. 26 A, S. 63). Dasselbe Ergebnis wurde mit Vorversuch 2 erzielt (Abb. 26 B, S. 63).

Die erfolgreiche Verteilung der *Juncus*-Komponenten in Vorversuch 3 zwischen gleichen Teilen von CH₂Cl₂ und MeOH : H₂O (2:1) konnte mittels DC nachgewiesen werden (Abb. 26 C, S. 63). Ebenso erzielten EtOAc : n-Hex (1:1) als apolare Phase und MeOH : H₂O (1:1) als polare Phase eine

gleichförmige Verteilung der Inhaltsstoffe (Abb. 26 D). Beide Lösungsmittelsysteme wurden für eine Trennung mittels HSCCC getestet.

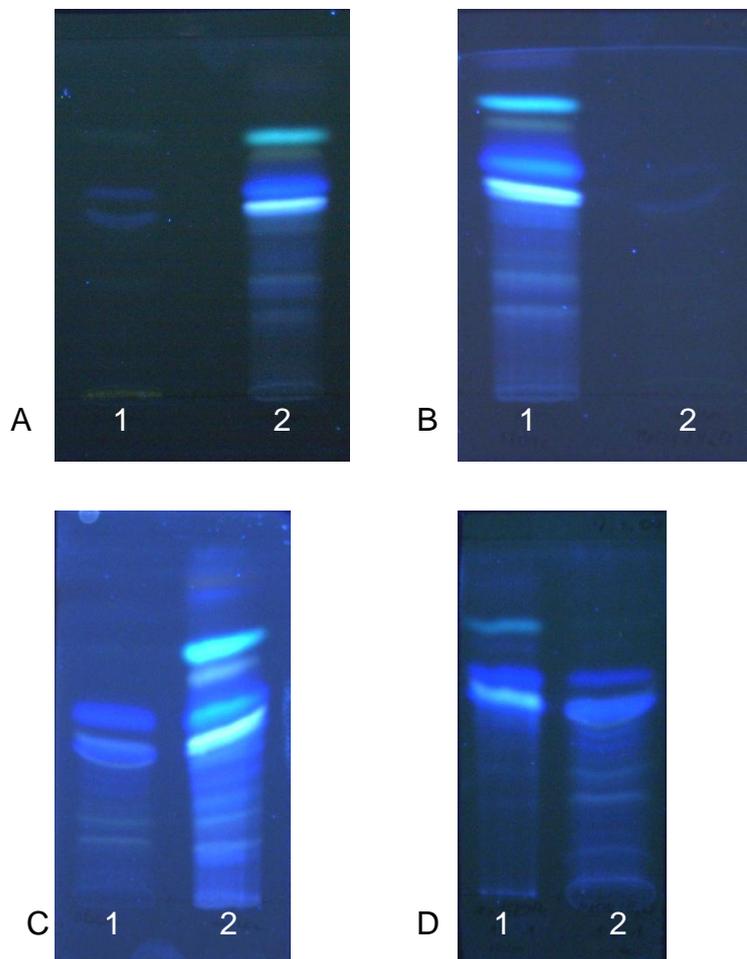


Abbildung 26 A-D. Dünnschichtchromatogramm der 2 Phasen nach Verteilung des EtOAc-Extraktes. FM-33 (S. 13), Applikation von 20 μ l, UV₃₆₆.

A: Vorversuch 1, 1: EtOAc-Phase, 2: EtOH : H₂O (1:2)-Phase

B: Vorversuch 2, 1: EtOAc-Phase, 2: MeOH : H₂O (1:2)-Phase

C: Vorversuch 3, 1: CH₂Cl₂-Phase, 2: MeOH : H₂O (1:1)-Phase

D: Vorversuch 4, 1: MeOH : H₂O (1:1)-Phase, 2: n-Hex : EtOAc (1:1)-Phase

Für die HSCCC wurde jeweils eine Konzentration von 50 mg/ml verwendet. Wie in Kapitel 2.5.5 (S. 26) beschrieben, wurden 2 Methoden getestet. Es wurden 2 ml der vorbereiteten Lösungen in die HSCCC eingebracht.

Methode 1 lieferte 200 Fraktionen. Jede zehnte Fraktion wurde eingeeengt und mittels DC überprüft. Die Auswertung zeigte, dass die Auftrennung unvollständiger war als der Vorversuch erwarten ließ (Abb. 27).

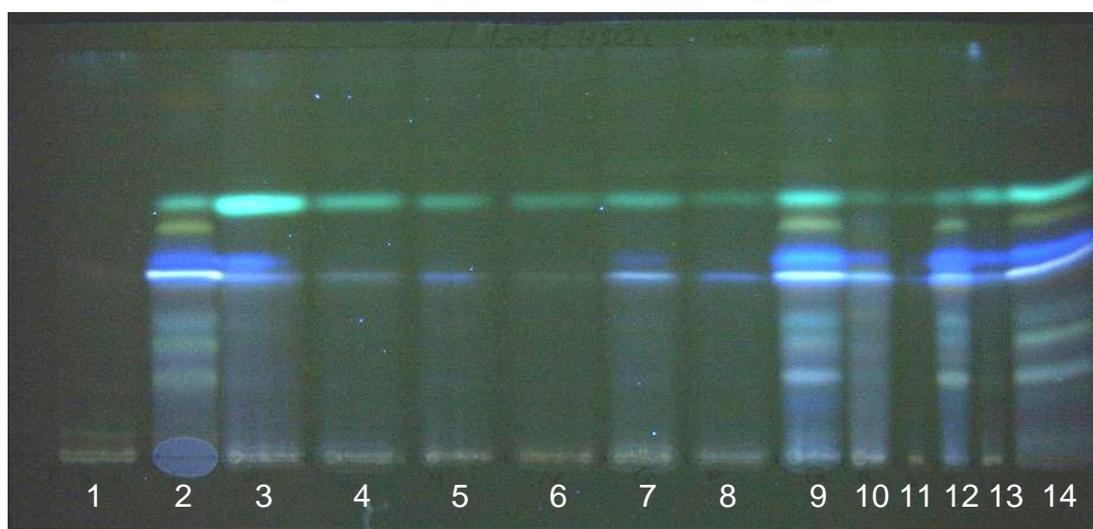


Abbildung 27. Dünnschichtchromatogramm ausgewählter Fraktionen der HSCCC, Methode 1 (50 mg/ml), Applikation von 20 μ l, FM-33 (S. 13), UV_{366} . Weitere Bedingungen laut Kapitel 2.5.5 (S. 26).

1: F41-71, 2: F81, 3: F91, 4: F111, 5: F121, 6: F131, 7: F141, 8: F151, 9: F161, 10: F171, 11: F181, 12: F191, 13: F192-200, 14: EtOAc-Extrakt.

Methode 2 lieferte bessere Ergebnisse. Diese Methode führte zu einer erkennbaren Auftrennung, die anhand der DC-Kontrolle laufend überwacht wurde (Abb. 28 und 29, S. 65). Die erzielte Auftrennung war allerdings weniger gut als die Fraktionierung durch die Säulenchromatographie auf Silikagel.

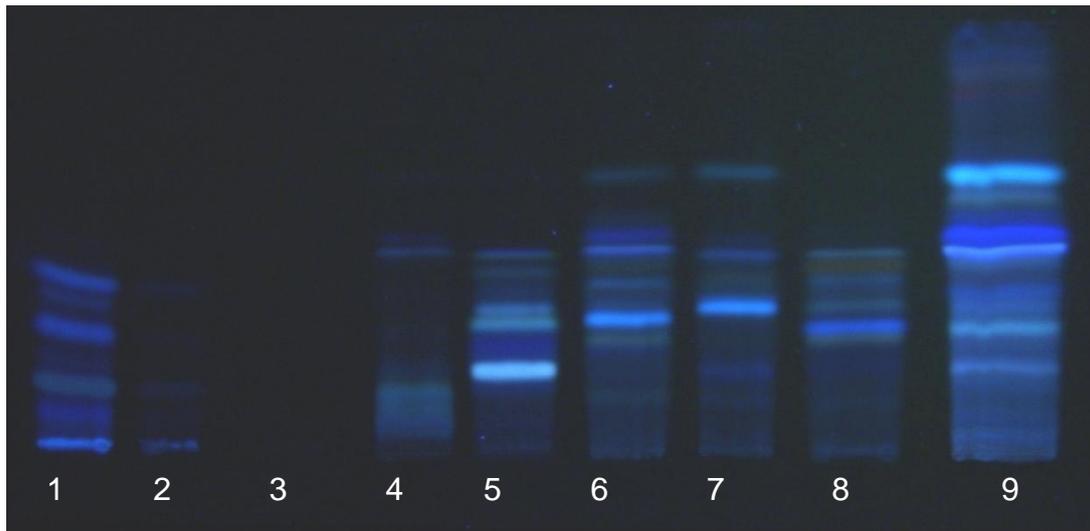


Abbildung 28. Dünnschichtchromatogramm jeder 10. Fraktion der HSCCC, Methode 2 (50 mg/ml), Applikation von 20 μ l, FM-33 (S. 13), UV_{366} . Weitere Bedingungen laut Kapitel 2.5.5 (S. 26).

1: F 5, 2: F 11, 3: F 21, 4: F 31, 5: F 41, 6: F 51, 7: F 61, 8: F 71, 9: EtOAc-Extrakt.

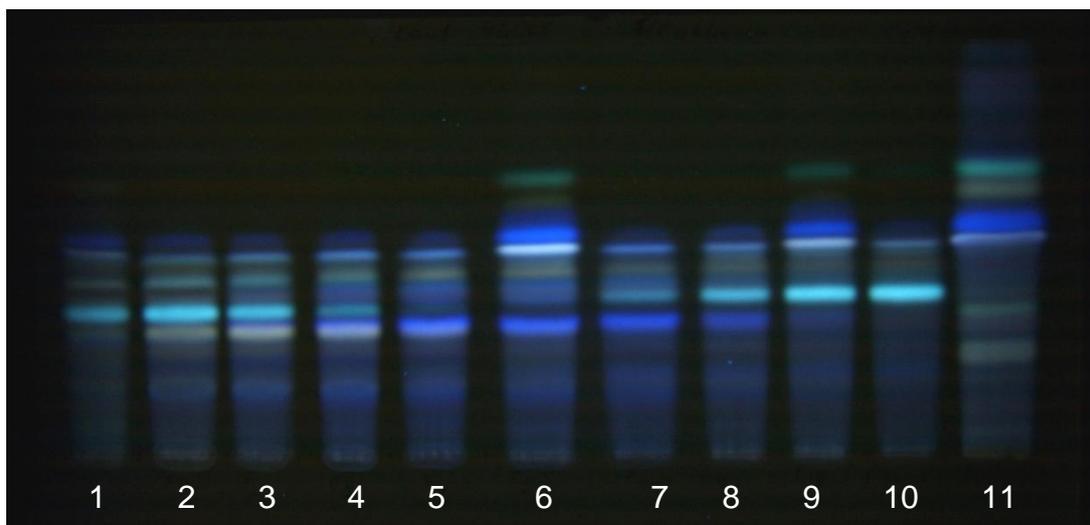


Abbildung 29. Dünnschichtchromatogramm, ausgewählter Fraktionen aus der HSCCC, Methode 2 (50 mg/ml), Applikation von 20 μ l, FM-33 (S.13), UV_{366nm} . Weitere Bedingungen laut Kapitel 2.5.5 (S. 26).

1: F 51, 2: F 52, 3: F 53, 4: F 54, 5: F 55, 6: F 56, 7: F 57, 8: F 58, 9: F 59, 10: F 60, 11: EtOAc-Extrakt.

Für die Reinigung und Isolierung von Naturstoffen werden viele chromatographische Techniken herangezogen, meist mit einer festen stationären Phase. Trotz ihrer Leistungsfähigkeit können diese Techniken

Nachteile aufweisen, die in der chemischen Natur des zu trennenden Stoffgemisches liegen. Die Gegenstromverteilungschromatographie, die auf der Verteilung der Substanzen zwischen zwei flüssigen Phasen beruht, ist eine gute Alternative bei problematischen Trennungen (Adam und Becker, 2000).

In dieser Arbeit konnte erstmals ein System getestet werden, welches zu einer anschaulichen Auftrennung der Inhaltsstoffe des EtOAc-Extraktes führte. Durch ein paar Abänderungen des Systems wäre es eventuell möglich, in kurzer Zeit große Mengen wirksamer Substanzen ohne Verluste zu isolieren.

Allerdings konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit aus zeitlichen Gründen keine Optimierung dieses Verfahren erzielt werden.

4 Diskussion

Das getrocknete Stängelmark aus *Juncus effusus* L. wird in der TCM aufgrund seiner sedierenden Eigenschaften als pflanzliches Schlafmittel verwendet (Bensky et al., 2004, Köfers und Sun 2008). Die Wirkmechanismen, die zu dieser Indikationsstellung führen, sind bisher unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der bereits am GABA_A-Rezeptor positiv getestete EtOAc-Extrakt der Droge (Singhuber, in Vorbereitung) bioaktivitätsgeleitet aufgetrennt, um eine mögliche Interaktion der Inhaltsstoffe mit GABA_A-Rezeptoren zu belegen.

Da die Ausbeute des Ethylacetat (EtOAc)-Extraktes sehr gering war, wurde im Vorfeld versucht, mit dem ähnlich polaren Lösungsmittel Dichlormethan (CH₂Cl₂) eine größere Menge an Inhaltsstoffen zu extrahieren. Nach Überprüfung mittels DC stellte sich heraus, dass sich die Zusammensetzung der beiden Extrakte kaum unterschied, die Ausbeute des CH₂Cl₂-Extraktes allerdings um ca. 50% geringer war als die des EtOAc-Extraktes. Somit konnte das ursprüngliche Problem, die geringe Ausbeute, mit CH₂Cl₂ nicht gelöst werden. Folglich wurde EtOAc als Lösungsmittel für die Extraktion beibehalten. Durch den Einsatz dieses apolaren Extraktionsmittels wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den extrahierten Komponenten vermutlich u.a. um Phenanthrene handelt, da einerseits EtOAc die für Phenanthrene passende Polarität besitzt, andererseits gelang Hanawa et al. (2002) nach vorangegangener Extraktion mit MeOH und anschließendem flüssig-flüssig Verteilungsverfahren die Isolierung der Phenanthrenderivate Juncusol und Dehydroeffusol aus der EtOAc-Phase.

Nach durchgeführter Extraktion galt es, ein geeignetes DC-Fließmittelsystem für die Inhaltsstoffe des EtOAc-Extraktes von *J. effusus* zu finden, um die Fraktionierung des Extraktes laufend nachvollziehen zu können

In der für diese Arbeit verwendeten Literatur (Rizk, 1986, Rethy et al., 2006, Della Greca et al., 1995, Hanawa et al., 2002) fand sich kein DC-Verfahren für die Auftrennung der apolaren Inhaltsstoffe aus *Juncus*. Da das Vorkommen von Phenanthrenderivaten in *J. effusus* aus der Literatur bekannt war (Bensky et al., 2004), und diese ähnliche Polarität zu Anthraceenderivaten aufweisen, wurde ein etabliertes Trennsystem für Anthraceendrogen erprobt (Wagner et al., 1983). Dieses stellte sich als zu polar heraus, weswegen die Polarität schrittweise durch anteilmäßige Erhöhung von EtOAc erniedrigt werden musste. Später wurde versucht, durch die Herabsetzung des H₂O-Anteils eine bessere Auftrennung der Komponenten zu erzielen. Da diese Abänderungen noch nicht das gewünschte Ergebnis lieferten, wurde durch Zusatz von n-Hexan (n-Hex) und Essigsäure (HAc) eine Optimierung des Fließmittels angestrebt. Durch n-Hex sollte eine weitere Trennung der Zonen erfolgen, während die Säure zur Steigerung der Bandenschärfe zugegeben wurde. Dies führte zu einem Fließmittel, mit welchem das erste Mal eine Verteilung der Banden über die gesamte Trennstrecke gelang. Allerdings wurden die dominanten hell- und dunkelblau fluoreszierenden Banden noch nicht optimal voneinander getrennt. Zur Verbesserung wurde das System noch modifiziert. Dennoch stellte sich keine weitere Optimierung der Auftrennung mehr ein. Dies führte zur Erprobung eines weiteren etablierten DC-Systems. Dieses System wurde ursprünglich für den Nachweis von Opiumalkaloiden entwickelt, die bekannterweise ein Phenanthren-Grundgerüst besitzen (Wagner et al., 1983). Da die im EtOAc-Extrakt enthaltenen Inhaltsstoffe von apolarer Natur sind, wurde von Anfang an nicht das vorgesehene Verhältnis Tol : EtOAc (1:1) verwendet, sondern die Polarität gleich zu Beginn durch das Verhältnis Tol: EtOAc (7:2) vermindert. Das System führte zu einer sehr guten Auftrennung der Banden. Dennoch konnte es mit Zugabe von HAc und geringen Mengen an MeOH weiter optimiert werden. Letztendlich wurde mit einem Fließmittelsystem folgender Zusammensetzung: Tol: EtOAc : MeOH : HAc (7:2:0,2:0,5) (FM-33), eine gute Trennung erzielt. Dieses

System trennte die Banden über die gesamte Laufstrecke gleichmäßig und scharf auf. Somit fand es im weiteren Verlauf der Arbeit immer als Fließmittel zur Kontrolle der Fraktionierung Verwendung. Zusätzlich wurde noch versucht, die Polarität der im Extrakt enthaltenen Komponenten unter Verwendung verschiedenster Referenzsubstanzen und Detektionsmittel zu bestimmen. Hierbei zeigte sich deutlich, dass sich das entwickelte Fließmittelsystem für beinahe alle verwendeten Referenzen als geeignet erwies. Die Banden des sowohl eingesetzten Cumarin, als auch die des Anthrachinonderivats Emodin und des Flavonolaglykons Quercetin besaßen ähnliche Rf-Werte wie die dominant blau fluoreszierenden Zonen des Extraktes. Im Gegensatz dazu wurde das Flavonoidglykosid Rutin nicht von der Startzone bewegt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den zwei dominanten blau-fluoreszierenden Zonen ebenfalls nicht um Glykoside (ev. Phenanthrenglykoside) sondern um (Phenanthren-) Aglyka handelt.

Fließmittelsystem 33 wurde nicht nur für die Kontrolle der erhaltenen Fraktionen verwendet, sondern diente auch als Grundlage der mobilen Phase für die Säulenchromatographie. Um eine mögliche Artefaktbildung der Substanzen auf der Säule zu verhindern, wurde das System abgeändert und der mobilen Phase keine Säure zugesetzt. Säure wurde dem ursprünglichen Fließmittel 33 aber zugesetzt, um die Bandenschärfe zu erhöhen. Damit einer Verminderung der Bandenschärfe und einer damit verbundenen schwächeren Trennleistung entgegengewirkt werden konnte, wurde mit einem Lösungsmittelgradienten gearbeitet. Daher wurde, wie bei Hanawa et al. (2002), das zu Beginn verwendete n-Hex schrittweise mit steigenden Anteilen an EtOAc versetzt. In weiterer Folge konnte die Polarität noch mit MeOH gesteigert werden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden je nach der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe zu Sammelfraktionen vereinigt, welche auf ihre GABA_A-Rezeptor-modulatorische Wirkung getestet wurden. Da die aktiven Einzelfraktionen nicht genügend Ausgangsmaterial für eine weitere

Auftrennung lieferten, wurden nach der pharmakologischen Testung jene 3 der 4 aktivsten Fraktionen vereint, welche eine ähnliche Zonierung und Aktivität aufwiesen. Die nachfolgende Auftrennung an Sephadex LH-20 wurde ebenfalls mit einem Lösungsmittelgradienten durchgeführt. Die zunehmende Erhöhung der Polarität führte zu einer Volumensvergrößerung des Sorbens und somit zu einer Verlangsamung des Durchflusses der mobilen Phase. Die wenigen in der Literatur angegebenen Verfahren zur Isolierung wirksamer Inhaltsstoffe aus *J. effusus* bedienen sich sehr ähnlicher Methoden (Hanawa et al., 2002; Della Greca et al., 1995). Della Greca et al. (1995) trennten Fraktionen ebenfalls an Sephadex LH-20 auf, wobei die Trennung isokratisch mit MeOH und H₂O durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu trennten Hanawa et al. (2002) ihre Fraktionen nochmal an Kieselgel auf. In der vorliegenden Arbeit bediente man sich aber Sephadex LH-20, da dieses Sorbens neben der polaritätsorientierten Auftrennung auch eine Auftrennung nach Molekülgröße und nach Anzahl und Anordnung phenolischer Gruppen ermöglichte. Somit sollte eine noch bessere Auftrennung des Substanzgemisches ermöglicht werden. Bei den erhaltenen Fraktionen handelte es sich immer noch um Mehrkomponentengemische. Die vereinten Sammelfraktionen wurden ebenfalls pharmakologisch getestet, für eine weitere Auftrennung war aber nicht mehr genügend Ausgangsmaterial vorhanden. Obwohl eine Isolierung der wirksamen Substanzen im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht möglich war, konnte mit der Auftrennung an Kieselgel und Sephadex dennoch ein Weg aufgezeigt werden, um den Extrakt bioaktivitätsgeleitet zu fraktionieren.

Hanawa et al. (2002) setzten auch die HPLC zur Aufreinigung der erhaltenen Fraktionen ein. Der Vorteil einer Auftrennung mittels HPLC gegenüber der klassischen Säulenchromatographie liegt im geringeren Zeitaufwand der Fraktionierung bzw. Isolierung und einem damit verbundenen geringerem Risiko für die Entstehung von Derivaten oder Zersetzungsprodukten. In der für diese Arbeit verwendeten Literatur wurde kein Verfahren zur Auftrennung des Gesamtextraktes aus *J. effusus*

mittels HPLC beschrieben. Rethy et al. (2006) und Della Greca et al. (1995) verwendeten die HPLC ebenfalls erst für die Aufreinigung der Fraktionen nach der Trennung an Sephadex oder Kieselgel. In dieser Literatur fehlen aber genaue Angaben über die HPLC-Bedingungen.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde bereits mit der Ausarbeitung eines HPLC-Systems für die Analyse und Fraktionierung des Extraktes begonnen. Dabei wurde als Ansatz ein System von Yang et al. (2006) gewählt. Mit diesem Verfahren können Phenanthrene und andere phenolische Inhaltsstoffe aus *Dendrobium* sp. zusammen analysiert werden. Es wurde versucht, diese Methode auf die Analyse von *Juncus* abzustimmen. Erste Ergebnisse mittels analytischer HPLC waren durchaus vielversprechend. Bei nachheriger Analyse der durch die präparative HPLC erhaltenen Fraktionen mittels DC wurde jedoch ersichtlich, dass die Hauptkomponenten als ein Peak co-eluiert wurden.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit war es aus Zeitgründen nicht möglich, die Methode weiterzuentwickeln, um eine Auftrennung der Substanzen mittels HPLC zu erzielen. Für die Verbesserung der analytischen Methode würde sich der Einsatz von Säure oder auch der Einsatz von Acetonitril anstelle des verwendeten Methanols eignen.

In nachfolgenden Arbeiten sollte es gelingen, eine Analysenmethode zur Qualitätskontrolle der Droge zu entwickeln, da das Fingerprint-Chromatogramm einer Droge sehr charakteristisch ist und nur geringe Variabilität aufweist. Ein solches Verfahren für die qualitative Prüfung fehlt derzeit auch in der chinesischen Pharmakopöe (2005).

Wegen der sehr geringen Extraktausbeuten aus *Juncus* wurde parallel zur HPLC-Analyse auch die HSCCC als Verfahren zur schonenden Auftrennung des Extraktes in Betracht gezogen. Durch die HSCCC tritt keine irreversible Adsorption der Probe an der stationären Phase auf und das gesamte verwendete Probenmaterial kann nach dem Durchlauf quantitativ zurückgewonnen werden. Im Gegensatz dazu muss man bei Säulenchromatographie und auch bei HPLC immer mit Verlusten durch

irreversible Adsorption rechnen. Allgemein handelt es sich um eine ökonomisch arbeitende Technik mit geringem Lösungsmittelverbrauch (Sticher, 2008, Adam und Becker, 2000). Nach Durchsicht der Literatur stellte sich schnell heraus, dass es weder für *Juncus* noch für Phenanthrene erprobte Verfahren gibt. Um geeignete Fließmittelsysteme zu ermitteln, wurden Vorversuche im Scheidetrichter durchgeführt. Die 2 Systeme, die eine Verteilung des EtOAc-Extraktes zwischen den 2 Phasen zeigten, wurden dann an der HSCCC getestet. Eines der getesteten Systeme erzielte eine schwache Auftrennung. Die Weiterentwicklung dieses Systems war aber im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht mehr möglich.

Die HSCCC wird oft für die Reinigung und Isolierung von Naturstoffgemischen eingesetzt und ermöglicht eine sehr schnelle Fraktionierung. Allerdings stellt die Ermittlung eines geeigneten Phasensystems den aufwändigsten Teil der Arbeit dar. Dabei gilt es, für einen gegebenen Extrakt ein System zu ermitteln, das die entsprechenden Polaritäten besitzt und bei dem die Probe in beiden Phasen gut löslich ist. Das Zweiphasensystem muss auch physikochemische Kriterien erfüllen, damit einerseits ein guter Massentransport zwischen den Phasen stattfindet, aber andererseits die stationäre Phase in der Säule zurückgehalten wird (Sutherland und Fisher, 2008; Adam und Becker 2000). Da eines der getesteten Systeme eine Auftrennung erzielte, wäre es in nachfolgenden Arbeiten möglich, dieses System weiter zu entwickeln. Andererseits könnte man auch bestehende Systeme von ähnlich polaren Verbindungen heranziehen und modifizieren.

Durch die DC-Charakterisierung ist bekannt, dass die Polarität der analysierten Stoffgruppen ungefähr jener von Anthraceenaglyka und Cumarinen entspricht. Für diese Stoffgruppen werden in der Literatur einige Verfahren angeführt. Eine Zusammenfassung von HSCCC-Verfahren in Zusammenhang mit Naturstoffen wurde von Sutherland und Fisher (2008) verfasst.

In der vorliegenden Arbeit wurde der EtOAc-Extrakt aus *Juncus effusus* erfolgreich mittels Säulenchromatographie an Kieselgel und Sephadex zu Fraktionen mit nur mehr wenigen Einzelkomponenten aufgetrennt. Einige der dabei erhaltenen Fraktionen erzielen eine eindeutig positiv-modulatorische Wirkung am GABA_A-Rezeptor. Um welche Wirkstoffe es sich handelt, ist nachwievor unbekannt, denn dazu wäre eine weitere Isolierung und Strukturaufklärung nötig. Dadurch und durch die Testung dieser Reinsubstanzen an GABA_A-Rezeptoren könnte geklärt werden, welche Struktur für die I_{GABA}-Verstärkung verantwortlich ist. Auch bei *Juncus* sollte man, wie bei vielen Pflanzen, auch in Betracht ziehen, dass die Wirkung möglicherweise durch das Zusammenwirken mehrerer Inhaltsstoffe und nicht einer einzelnen Komponente zustande kommt.

5 Zusammenfassung

Das getrocknete Stängelmark von *Juncus effusus* L. wird seit langem in der Traditionellen Chinesischen Medizin verwendet. Vor allem bei Urogenitalbeschwerden und Schlafstörungen wird es häufig eingesetzt. Die schlaffördernde Wirkung wurde durch Anwendungsbeobachtungen beschrieben, bis jetzt liegen aber noch keine Studien vor, die den Wirkmechanismus dieser Pflanze aufklären und die für diesen Effekt verantwortlichen Komponenten bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der am GABA_A-Rezeptor wirksame EtOAc-Extrakt bioaktivitätsgeleitet aufgetrennt. Um den Inhaltsstoffkomplex zu trennen, wurde zuerst ein DC-Verfahren entwickelt, welches zur Kontrolle der Fraktionierung eingesetzt werden konnte. Die anschließende Auftrennung des EtOAc-Extraktes mittels Säulenchromatographie an Kieselgel und aktiver Fraktionen später an Sephadex LH-20 führte zu Mehrkomponentengemischen mit positiv modulatorischer Aktivität am GABA_A-Rezeptor. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass Junci Medulla Inhaltsstoffe enthält, die GABA_A-Rezeptoren modulieren. Diese könnten für den ethnopharmakologischen Gebrauch von *Juncus effusus* als Sedativum verantwortlich sein.

6 Summary

The dried pith from *Juncus effusus* has long been used in Traditional Chinese Medicine. Above all, it is often applied against urogenital and sleep disorders. Observational studies describe sedative effects, nonetheless no scientific investigations, elucidating the mechanism of the sedative action of this plant and determining the compounds responsible for this effect, are published yet.

Within the scope of this work the GABA_A-receptor-modulating ethyl acetate-extract was fractionated in a bioassay-guided approach.

Before the compounds were separated, a TLC system was developed, which enabled the characterization of the extract and furthermore could be used for the TLC screening of the fractionation.

The fractionation of the ethyl acetate-extract on silica gel and the active fractions later on Sephadex LH-20 resulted in giving a few mixtures of compounds with positive GABA_A-receptor modulating activity.

Hence it was demonstrated that Junci medulla contains substances that modulate GABA_A-receptors. Those could be responsible for the ethnopharmacological use of *Juncus effusus* as a sedative.

7 Literaturverzeichnis

Adam P., Becker H., 2000. Analytik biogener Arzneistoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. S. 100-198.

Ai J., Dekermendjian K., Wang X., Nielsen M., Witt M.R., 1997. 6-Methylflavone, a benzodiazepine receptor ligand with antagonistic properties on rat brain and human recombinant GABA_A receptors *in vitro*. Drug Develop. Res. 41, S. 99-106.

Barburin I., Beyl S., Hering S., 2006. Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. Pflugers Archiv 453, S. 117-123.

Bensky D., Clavey S., Stöger E., 2004. Chinese Herbal Medicine: Materia Medica, Third Edition, Eastland Press, Seattle. S. 287-289.

Bernard E.A., Skolnick P., Olsen R.W., Mohler H., Sieghart W., Biggio G., 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Pharmacol Rev. 50, S. 291-313.

Burnie G., Forrester S., Greig D., Gueswt S., Harmony M., Hobley S., Jackson G., Lavarack P., Legett M., McDonald R., Macoboy S., Molyneux B., Moodie D., Moore J., Newman D., North T., Pienaar K., Purdy G., Silk J., Ryan S., Schien G., 2003. Botanica, Könemann in der Tandem Verlag GmbH, München. S. 491.

Chapatwala, K.D., de la Cruz A.A., 1981. Antimicrobial activity of juncusol, a novel 9-10-dihydrophenanthrene from the marsh plant *Juncus roemerianus*. Life Sci. 29, S. 1997-2001.

Della Greca M., Fiorentino A., Monaco P., Previtera L., Zarrelli A., 1995. Effusides I-V: 9,10-dihydrophenanthrene glucosides from *Juncus effusus*. *Phytochem.* 40, S. 533-535.

Della Greca M., Fiorentino A., 1996. Action of antialgal compounds from *Juncus effusus* L. on *Selenastrum capricornutum*. *J. Chem. Ecol.* 22, S. 587-603.

Hanawa F., Okamoto M., Towers G.H., 2002. Antimicrobial DNA-binding photosensitizers from the common rush, *Juncus effusus*. *Photochem Photobiol.* 76, S. 51-56.

Hering S., 1998. Small volume and rapid extracellular solution exchange around *Xenopus* oocytes during voltage clamp recordings. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 436, S. 303-307.

Hiller K., Melzig M.F., 2006. *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen*, Area Verlag, Erfstadt. S. 442.

Huaqiang Z., 2009. The elementary knowledge of Chinese Medical Herbs. Skriptum, Beijing, University of Chinese Medicine. S. 13-14.

Keys D. J., 1993. *Chinese Herbs, Their botany, chemistry, and pharmacodynamics*, Tuttle Publishing, Rutland. S. 52-53.

Khom S., Baburin I., Timin E.N., Hohaus A., Sieghart W., Hering S., 2006. Pharmacological properties of GABA_A receptors containing γ_1 subunits *Mol Pharmacol.* 69, S. 640-649.

Khom S., Baburin I., Timin E.N., Hohaus A., Trauner G., Kopp B., Hering S., 2007. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors:

molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology*. 53, S. 178-87.

Kovács A., Vasas A., 2008. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochem.* 69, S. 1084-1110.

Körfers A., Sun N., Sun Y., Willich, 2008. Traditionelle Chinesische Medizin: Arzneidrogen und Therapie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. S. 317-318.

Lam C.T., Corfield P.W.R., Lippard S.J., 1977. The structure of juncusol. A novel cytotoxic dihydrophenanthrene from the estuarine marsh plant *Juncus roemerianus*. *J. Am. Chem. Soc.* 99, S. 618–620.

Medina J.H., Pena C., Levi de Stein M., Wolfman C, Paladini A.C., 1989. Benzodiazepine-like molecules, as well as other ligands for the brain benzodiazepine receptors, are relatively common constituents of plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, S. 547-53.

Methfessel C., Witzemann V., Takahashi T., Mishina M., Numa S., Sakmann B., 1986. Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers Arch.: Eur. J. Physiol.* 407, S. 577-588.

Merck E., 1970. Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Merck, Darmstadt. S. 8-107.

Nielsen M., Frokjaer S., Braestrup C., 1988. High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavone, to brain benzodiazepine receptors *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 37, S. 3285-7.

Pahlow M., 2006. Das große Buch der Heilpflanzen, Gräfe und Unzer Verlag GmbH, München. S. 441.

Rethy B., Kovacs A., Zupko I., Forgo P., Vasas A., Falkay G., Hohmann J., 2006. Cytotoxic Phenanthrenes from the Rhizomes of *Tamus communis*. *Planta Med.* 72, S. 767-770.

Rizk A.M., 1986. The phytochemistry of the flora of Qatar, Scientific and Applied Research Centre, Univ. of Qatar, Doha. S. 206-208.

Singhuber J., Dissertation, Univ. Wien, in Vorbereitung.

Stephenson F.A., 1995. The GABA_A receptors. *Biochem J.* 310, S. 1-9.

Sticher O., 2008. Natural product isolation. *Nat. Prod. Rep.* 25, S. 517-554.

Sutherland I.A., Fisher D., 2008. Role of counter-current chromatography in the modernization of Chinese herbal medicines. *J. Chromatogr. A.* 1216, S. 740-753.

Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M., 1983. Drogenanalyse, Dünnschicht-chromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer-Verlag, Berlin. S. 79-305.

Yang L., Wang Z., Xua L., 2006. Simultaneous determination of phenols (bibenzyl, phenanthrene, and fluorenone) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatogr. A.* 1104, S. 230–237.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Susanne Nussbaumer
Geburtsdatum und Geburtsort: 04.09.1985 in Gmunden
Nationalität: Österreich

Schulbildung

09/1991-06/1995 Volksschule Pinsdorf
09/1995-06/1997 Hauptschule Gmunden
09/1997-06/2003 Bundesgymnasium Gmunden

Universitäre Ausbildung

10/2003-03/2010 Studium der Pharmazie an der
Universität Wien
Diplomarbeit am Institut für
Pharmakognosie