



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Isolierung von Inhaltsstoffen mittlerer Polarität
aus *Metaxya rostrata*“

Verfasserin

Johanna Bleier

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Besonders danke ich Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die herzliche und umfassende Betreuung während der gesamten Diplomarbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Mag. Dr. Kerstin Kainz und Herrn Pharm. D. Hamid-Reza Adhami für ihre Geduld und Hilfestellung beim praktischen Arbeiten.

Weiters danke ich Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für Organische Chemie, und Herrn Dr. Martin Zehl für die Durchführung und Hilfestellung bei der Strukturaufklärung.

Ich bedanke mich auch bei Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zur Durchführung der praktischen Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während des Studiums in jeder Hinsicht immer bestmöglich und sehr liebevoll unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Material.....	6
2.1.1.	Fraktionen aus dem Wasserextrakt und Methanolextrakt des Rhizoms	6
2.1.2.	Fraktion aus dem Ethylacetatextrakt der Seitenwurzeln.....	7
2.2.	Methoden	7
2.2.1.	Dünnschichtchromatographie.....	7
2.2.2.	Säulenchromatographie	9
2.2.3.	Solid Phase Extraction	10
2.2.4.	NMR-Spektroskopie	11
2.2.5.	Massen-Spektrometrie	11
3.	Ergebnisse	13
3.1.	DC-Überprüfung der Ausgangsfraktionen	13
3.1.1.	Fraktionen aus dem Wasserextrakt und Methanolextrakt des Rhizoms	13
3.1.2.	Fraktion aus dem Ethylacetatextrakt der Seitenwurzeln.....	14
3.2.	Aufarbeitung der Fraktion 8-13.....	15
3.2.1.	Säulenchromatographie 1	16
3.2.2.	Säulenchromatographie 2	18
3.2.3.	Säulenchromatographie 3	22
3.2.4.	Säulenchromatographie 4	24
3.3.	Aufarbeitung der Fraktion 5-7	27
3.4.	Aufarbeitung der Fraktionen 31-36 und 35-50.....	30
3.5.	Aufarbeitung der Fraktionen 15-20 und 21-40.....	33
3.5.1.	Säulenchromatographie 7	33
3.5.2.	Säulenchromatographie 8	35
3.6.	Aufarbeitung der Fraktion 541-670.....	38
3.7.	Enzymatische Hydrolyse von KK1.....	40
3.7.1.	Vorversuche zur Hydrolyse	40

3.7.2.	Hydrolyse von KK1 in größerem Ansatz	42
3.7.3.	Säulenchromatographie 9	43
3.7.4.	Strukturaufklärung der Substanz K1	46
3.7.5.	Wiederholung der Hydrolyse	48
3.7.6.	Strukturaufklärung von Hydrolysat C	48
3.7.7.	Testung von Hydrolysat C an SW480 Zellen	49
3.8.	Strukturaufklärung der isolierten Substanzen	51
3.8.1.	Strukturaufklärung der Substanz JB-1	51
3.8.2.	Strukturaufklärung der Substanz JB-3	52
4	Diskussion der Ergebnisse	54
5	Zusammenfassung	56
6	Summary	57
7	Abkürzungsverzeichnis	58
8	Abbildungsverzeichnis	59
9	Tabellenverzeichnis	61
10	Literaturverzeichnis	62
11	Curriculum vitae	63
12	Anhang	65

1. Einleitung und Problemstellung

Metaxya rostrata (C. Presl) aus der Familie der Metaxyaceae ist ein rund zwei Meter hoher Baumfarn, welcher in den Flachlandregenwäldern Mittelamerikas und den nordwestlichen Teilen Südamerikas beheimatet ist.

In Costa Rica wird die wässrige Suspension des getrockneten Rhizoms ethnomedizinisch zur Behandlung von Ulcera und Tumoren des Gastrointestinaltraktes eingesetzt ^[1].

Abbildung 1: *Metaxya rostrata* (C. Presl) ^[2]



Da die Häufigkeit von kolorektalen Karzinomen in den westlichen Industrieländern kontinuierlich ansteigt und diese Tumore durch eine hohe Therapieresistenz charakterisiert sind, ist die Entwicklung neuer Kolonkarzinomtherapeutika von großer Wichtigkeit. Die Isolation zytotoxischer Komponenten aus Arzneipflanzen spielt dabei eine bedeutende Rolle.

Aufgrund der ethnomedizinischen Verwendung von *Metaxya rostrata*, wurde der Baumfarn im Rahmen vorangegangener Dissertationen ^[2,3] einer aktivitätsgeleiteten Untersuchung zur Isolierung von Komponenten mit zytotoxischem Potential gegenüber Kolonkrebszelllinien unterzogen.

Bisher konnten folgende Inhaltsstoffe in den unterirdischen Anteilen (Rhizom und Seitenwurzeln) von *Metaxya rostrata* nachgewiesen werden:

- Proanthocyanidine
 - Cinnamtannin B1 ^[1]
 - Aesculitannin B ^[1]
 - Procyanidin A2 ^[4]
- Xanthone
 - 2-Deprenylrheediaxanthon B ^[2]
 - Tetra-OH-Deprenylrheediaxanthon ^[5]
- Sterole ^[1]
 - Sitosterol
 - Stigmasterol
 - Campesterol
- Säuren
 - Chlorogensäure ^[1]
 - Kaffeesäure ^[1]
 - Betulinsäure ^[2]
- Glykoside phenolischer Säuren ^[2]
 - 4-O-β-D-glucopyranosyl-Kaffeesäure
 - 4-O-β-D-glucopyranosyl-p-trans-Cumarinsäure
- Saccharide
 - Saccharose ^[1]
 - Fructose ^[1]
 - Methyl-α-fructofuranosid ^[2]
- Methylencyclopropanglykoside ^[2]
 - (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropyl-β-glucopyranosid (= KK1)
 - (6E)-6[2-(β-glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]hexansäure (= KK5)

Die beiden trimeren Procyanidine Cinnamtannin B1 und Aesculitannin B, das 2-Deprenylrheediaxanthon B und Betulinsäure zeigten zytotoxisches Potential gegenüber Kolonkrebszelllinien ^[1,2].

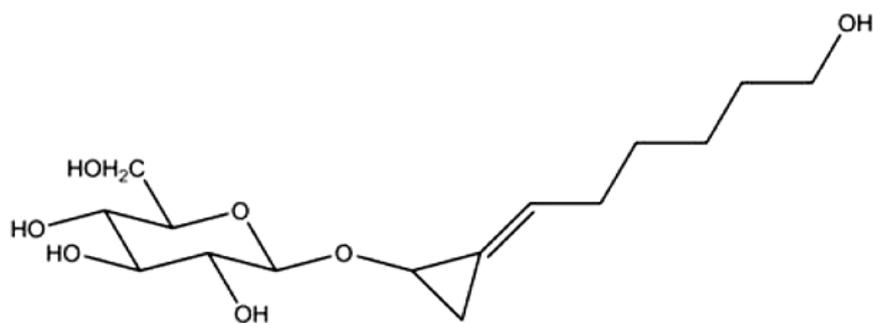
Abbildung 2: Pflanzenmaterial von *Metaxya rostrata* [2]

links: Rhizom, rechts: Seitenwurzeln



Die zwei Methylencyclopropanglykoside stellen Hauptkomponenten des Rhizoms dar. Diese neuen Naturstoffe wiesen Strukturen auf, die bisher auch noch nie auf synthetischem Weg hergestellt worden waren.

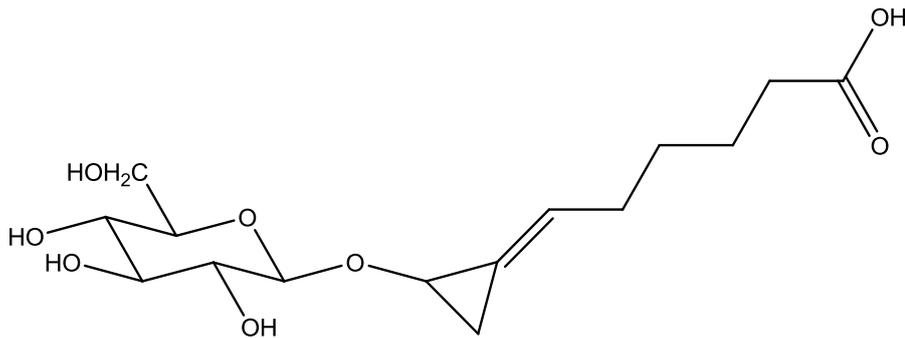
Abbildung 3: Strukturformel von KK1



(2E)-2-(hydroxyhexylidene)cyclopropyl- β -glucopyranosid

(6E)-6[2-(β -glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]hexansäure stellt das Oxidationsprodukt von KK1 dar, und lag in etwas geringerer Konzentration im Rhizom vor. Diese Verbindung war relativ leicht zersetzlich.

Abbildung 4: Strukturformel von KK5



(6E)-6[2-(β -glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]hexansäure

Aufgrund der sehr ausgefallenen Methylencyclopropanstruktur (*siehe Abb. 3, S. 3*) und der hohen Konzentration im Rhizom wurde KK1 verschiedenen Aktivitätstests unterzogen. Die isolierten Mengen von KK5 waren bisher zu gering gewesen, um damit ebenfalls Wirkungsnachweise durchzuführen.

KK1 wurde auf folgende biologische Wirkungen getestet ^[2]:

- Testung auf Antitumorwirkung
 - KK1 zeigte in Konzentrationen bis zu 200 $\mu\text{g/ml}$ keine zytotoxische Wirkung auf SW480 Kolonkarzinomzellen
 - bei Konzentrationen bis zu 250 μM kam es zu keiner Hemmung von Histondeacetylasen in einem in vitro Testsystem
- Testung der antiinflammatorischen Wirkung
 - 10 μM KK1 führte zu keiner TNF- α induzierten Hemmung von NF- κB

- Testung auf antidiabetische Wirkung
 - 10 μM KK1 führte zu keiner PTP1B Hemmung
 - KK1 zeigte keine PPAR α und PPAR γ Aktivität
- Testung auf antibakterielle/antifungale/insektizide Aktivität
 - 10 μM KK1 wirkte nicht bakteriostatisch bzw. bakterizid gegen sechs *Staphylococcus aureus*-Stämme
 - bei einer Konzentration von 128 $\mu\text{g/ml}$ kam es zu keiner antifungalen Wirkung gegen *Cladosporium spec.*
 - KK1 zeigte auch keine insektizide Wirkung gegen *Spodoptera littoralis*-Larven

Aufgrund der negativen Testergebnisse stellte sich die Frage, ob KK1 erst nach Abspaltung der Glucose durch pflanzeigene Enzyme, zum Beispiel bedingt durch Stresssituationen (Fraßfeinde etc.), eine Wirksamkeit zeigt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus Fraktionen methanolischer Extrakte des Rhizoms weiteres KK1 zu isolieren, dieses enzymatisch zu hydrolysieren und die Struktur des entstandenen Spaltproduktes mittels NMR-Spektroskopie zu identifizieren, um in weiterer Folge Aktivitätstests mit dieser Substanz zu wiederholen.

Ein zusätzliches Ziel war die Isolierung weiterer Reinsubstanzen, deren Strukturen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Fraktionen aus dem Wasserextrakt und Methanol-extrakt des Rhizoms

Es standen neun methanolische Fraktionen von Extrakten des Rhizoms zur Verfügung.

Sechs dieser Fraktionen (Fraktionen 31-36, 1-19, 35-50, 15-20, 21-40 und 41-60) stammen von einem Wasserextrakt des pulverisierten Rhizoms, das mit Ethylacetat, Butanol und Methanol extrahiert und anschließend mittels Vacuum Liquid Chromatography (VLC) ^[1] und Säulenchromatographie (SC) ^[2] fraktioniert worden war (siehe Abb. 5).

Drei der Fraktionen (Fraktionen 5-7, 8-13 und 14-21) stammen von einem Methanolextrakt des Rhizoms, welches mittels Säulenchromatographie an Sephadex aufgetrennt worden war ^[2] (siehe Abb. 6, S. 7).

Abbildung 5: Übersicht der Fraktionen des Wasserextraktes

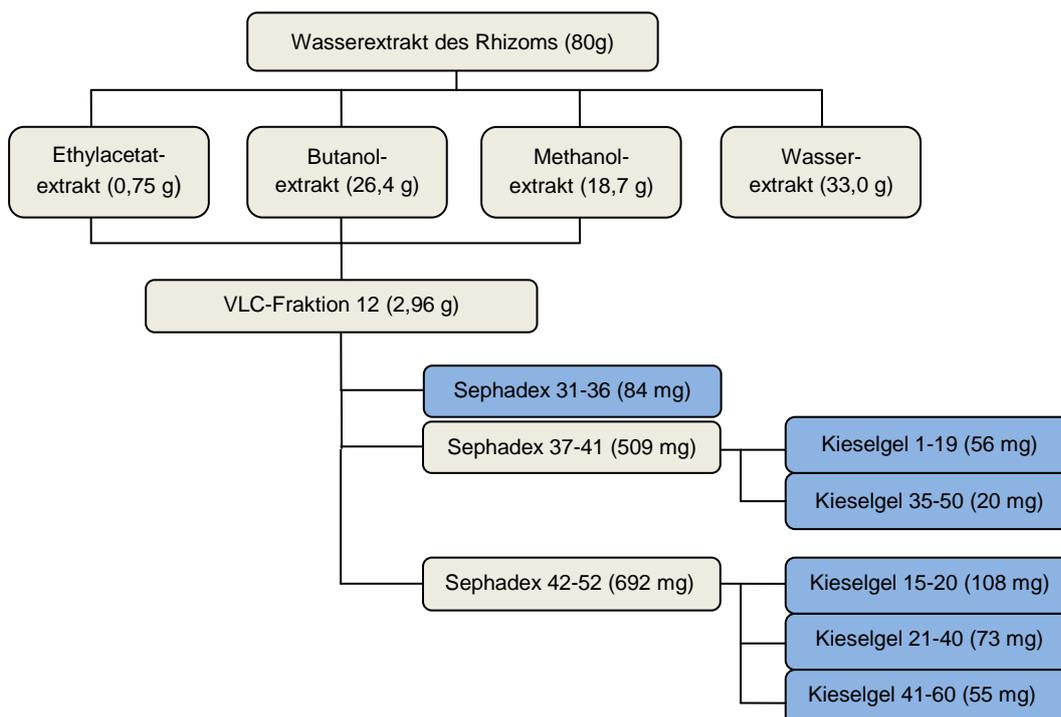
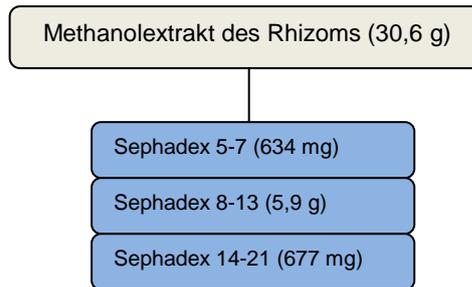


Abbildung 6: Übersicht der Fraktionen des Methanolextraktes



2.1.2. Fraktion aus dem Ethylacetatextrakt der Seitenwurzeln

Es stand eine weitere Fraktion (Fraktion 541-670, 650 mg) eines Ethylacetatextraktes der Seitenwurzeln zur Verfügung. Diese wurde über Fraktionierung mittels Säulenchromatographie an Sephadex erhalten ^[4].

2.2. Methoden

2.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Stationäre Phase

Kieselgel 60 F₂₅₄ Glasplatten, Schichtdicke 0,25 mm (Firma Merck), in den Größen 20 x 20 cm, 20 x 10 cm, 10 x 10 cm, 5 x 20 cm und 5 x 10 cm

Mobile Phasen

System A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)

System B: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 4 : 4)

System C: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (60 : 8 : 8 : 11)

System D: Chloroform – Methanol – Aqua dest. (75 : 15 : 1,5)

System E: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)

System F: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure – Methanol (10 : 4 : 1 : 1)

System G: Chloroform – Methanol – Aqua dest. (85 : 8 : 0,4)

Die verwendeten stationären und mobilen Phasen sind in den entsprechenden Kapiteln angeführt.

Entwicklung

Die Platten wurden in herkömmlichen DC-Trögen oder in einer Sandwichkammer entwickelt, die sich aufgrund des besonders kleinen Volumens der Gasphase, bedingt durch einen nur wenige Millimeter breiten Abstand zwischen den Glaswänden, durch eine scharfe Zonierung und einen geringeren Fließmittelverbrauch auszeichnet (*siehe Abb. 7*).

Abbildung 7: Sandwichkammer (Firma Desaga)



Detektionsmethoden:

➤ Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AASS)

Methanol, konzentrierte Essigsäure und konzentrierte Schwefelsäure wurden im Verhältnis 85 : 10 : 5 vorsichtig gemischt. Nach dem Abkühlen der Mischung wurden 0,5 Teile Anisaldehyd zugesetzt.

Die DC-Platten wurden mit dem AASS-Reagens besprüht und für 5-10 Minuten im Trockenschrank bei 100 °C erhitzt. Die Auswertung erfolgte bei Tageslicht ^[6].

➤ **Naturstoffreagenz A und PEG 400 (NR/PEG)**

Es wurden eine 1 %ige methanolische Naturstoffreagens-A-Lösung (=Diphenylboryloxyethylamin) und eine 5 %ige ethanolische Polyethylenglykol-400-Lösung hergestellt.

Die DC-Platten wurden zuerst mit der Naturstoffreagens-A-Lösung und anschließend mit der Polyethylenglykol-Lösung besprüht. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm ^[6].

2.2.2. Säulenchromatographie (SC)

Stationäre Phasen

- Kieselgel 60, Korngröße 0,063-0,200 mm, Firma Merck
- Sephadex[®] LH-20, Firma Sigma-Aldrich

Mobile Phasen

- FM 1: Ethylacetat (H₂O-gesättigt) – Methanol (90 : 10)
- FM 2: Ethylacetat (H₂O-gesättigt) – Methanol (80 : 20)
- FM 3: Methanol – Aqua dest. (1 : 1)
- FM 4: Chloroform – Methanol – Aqua dest. (95 : 1,5 : 0,1)
- FM 5: Chloroform – Methanol – Aqua dest. (90 : 3,5 : 0,2)
- FM 6: Chloroform – Methanol – Aqua dest. (85 : 8 : 0,5)

Die verwendeten stationären und mobilen Phasen sind in den entsprechenden Kapiteln angeführt.

2.2.3. Solid Phase Extraction (SPE)

Stationäre Phase

Kieselgel RP-18 (12 ml Varian Mega Bond Elut™ C18 Kartuschen)

Mobile Phasen

Methanol – Aqua dest. Gemische unterschiedlicher Konzentration

Durchführung

Nach der Konditionierung und Trocknung mittels Luftstrom wurde das gelöste Extrakt auf das Sorbens aufgetragen und mit steigender Methanolkonzentration eluiert.

Von jeder Konzentrationsstufe wurden je drei Fraktionen zu je 10 ml gesammelt und anschließend dünnschichtchromatographisch überprüft.

Abbildung 8: SPE Kammer mit Kartuschen



2.2.4. NMR-Spektroskopie

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

Messfrequenz: 600,13 MHz für ^1H -NMR bzw. 150,92 MHz für ^{13}C -NMR
Messtemperatur: 298 K
Lösungsmittel: MeOH- d_4

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

2.2.5. Massen-Spektrometrie

Die LC/MS Analysen wurden auf einem UltiMate 3000 RSLC-Series System (Firma Dionex), gekoppelt an ein, mit einer orthogonalen ESI-Quelle (HCT, Bruker Daltonics) ausgestattetem 3D-Quadrupol-Ionenfallen Massenspektrometer, durchgeführt.

Angaben zur HPLC

Gerät: Dionex UltiMate 3000 RSLC-Series System
stationäre Phase: Acclaim[®] 120 C₁₈, 2,1 mm x 150 mm x 3 μm (Firma Dionex, Germering, Deutschland)
mobile Phase: Eluent A: 1 %ige wässrige Ameisensäure
Eluent B: Acetonitril
Gradient: 10 % B (0 min), 10 % B (2 min) und 23 % B (15 min)
Temperatur: 25 °C
Flussrate: 0,5 ml/min
UV-Detektion: 190-400 nm

Angaben zum Massenspektrometer

Gerät:	Bruker Daltonics ESI-IT-MS
Ionisation:	Elektrospray
Kapillarenspannung:	$\pm 3-7$ kV
Vernebler:	26 psi (N ₂)
Trocknungsgasfluss:	9 l/min (N ₂)
Trocknungstemperatur:	340 °C
Kollisionsgas:	Helium
Modus:	DDA-Modus
Messbereich MS:	m/z 80-1000
Messbereich MS ^(n= 2,3,4) :	m/z 40-1000
Anzahl Spektren/Scan:	durchschnittlich 3 Spektren

3. Ergebnisse

3.1. DC-Überprüfung der Ausgangsfractionen

3.1.1. Fractionen aus dem Wasserextrakt und Methanol-extrakt des Rhizoms

Von den neun Fractionen (*siehe Kap. 2.1.1, S. 6 f.*) wurde ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt, um deren Zusammensetzung zu untersuchen (*siehe Abb. 9, S. 14*).

Bei der Detektion mit AASS zeigte sich, dass in diesen neun Fractionen hauptsächlich Komponenten mittlerer Polarität enthalten waren.

Fractionen 5-7, 8-13, 31-36 und 35-50 wiesen die nach dem Besprühen mit AASS blau gefärbte Substanz KK1 mit einem Rf-Wert von ca. 0,55 auf. Diese Fractionen wurden für die Isolierung von KK1 weiterverwendet.

In Fractionen 8-13, 1-19 und 31-36 war eine weitere, bei der Detektion mit AASS blau gefärbte Zone mit einem Rf-Wert von ca. 0,68 sichtbar.

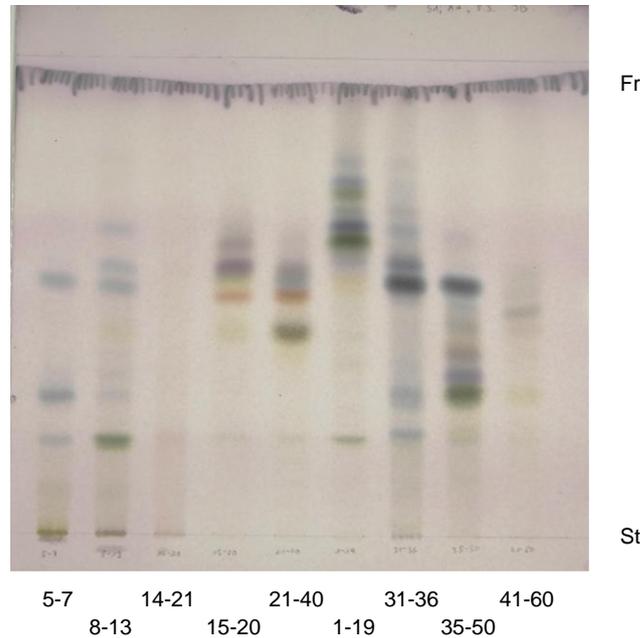
Die Fractionen 5-7, 8-13, 31-36 und 35-50 zeigten eine bei der Detektion mit AASS ebenfalls blau gefärbte Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,30 und die Fractionen 15-20 und 21-40 eine braun gefärbte Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,52.

Die Fractionen 8-13 und 31-36 enthielten die bei der Detektion mit AASS blau gefärbte Substanz KK5 mit einem Rf-Wert von ca. 0,60.

Die Isolierung dieser Komponenten war ein zusätzliches Ziel der Aufarbeitung der neun Fractionen.

Abbildung 9: DC der neun Fraktionen, Detektion mit AASSstationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten, 20 x 20 cm

mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)

**3.1.2. Fraktion aus dem Ethylacetatextrakt der Seitenwurzeln**

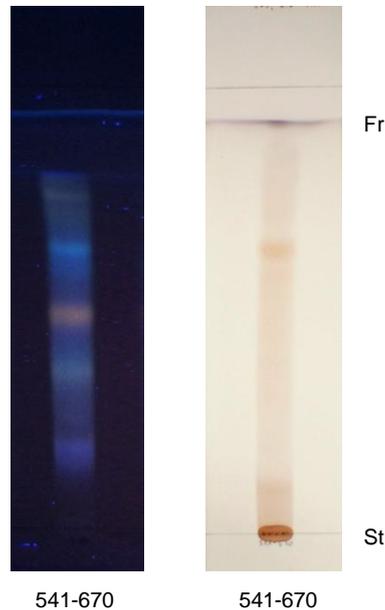
Das Dünnschichtchromatogramm der Fraktion 541-670 (*siehe Kap. 2.1.2, S. 7*) zeigte bei der Detektion mit NR/PEG eine orange fluoreszierende Komponente bei einem R_f-Wert von ca. 0,50 sowie zwei weitere blau fluoreszierende Zonen bei R_f-Werten von ca. 0,37 und 0,67 als Hauptkomponenten.

Die Detektion mit AASS zeigte eine braun gefärbte Komponente bei einem R_f-Wert von ca. 0,67 sowie polare Inhaltsstoffe, die nicht vom Start eluierten (*siehe Abb.10, S. 15*).

**Abbildung 10: DC der Fraktion 541-670, links Detektion mit NR/PEG,
rechts Detektion mit AASS**

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten, 5 x 20 cm

mobile Phase B: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 4 : 4)



3.2. Aufarbeitung der Fraktion 8-13

Die Fraktion 8-13 (5,9 g) (*siehe Kap. 2.1.1, S. 6 f.*) wurde mit 60 ml Aqua dest. versetzt und drei Mal mit je 60 ml Ethylacetat extrahiert, um stark polare Komponenten (Tannine etc.) abzutrennen.

Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden mit dem Rotavapor unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Eindampfrückstand betrug 690 mg.

Um aus der verbleibenden Wasserphase weitere Inhaltsstoffe zu extrahieren, wurde diese erneut drei Mal mit je 50 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten n-Butanol-Phasen wurden zur Trockene eingedampft und es wurde ein Eindampfrückstand von 2750 mg erhalten.

Das Ethylacetatextrakt und das n-Butanolextrakt wurden anschließend mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 fraktioniert (*siehe Kap. 3.2.1*

und 3.2.2, S. 16 ff.), um KK1, aber auch KK5 und die beiden, bei Detektion mit AASS blau gefärbten Komponenten mit den Rf-Werten von ca. 0,68 und 0,30 (siehe Kap.3.1.1, S. 13 f.) zu isolieren.

3.2.1. Säulenchromatographie 1

Durchmesser: 2,5 cm
Füllhöhe: 75 cm
stationäre Phase: Kieselgel 60
mobile Phase: Ethylacetat (H₂O-gesättigt) – Methanol (90 : 10)
Auftragsmenge: 690 mg Ethylacetat-Extrakt (in Methanol gelöst) aufgezo-
gen auf 1,5 g Kieselgel

Es wurden 184 Fraktionen zu je ca. 5 ml/30 min gesammelt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu 14 Sammelfraktionen vereinigt (siehe Tab.1, S. 17).

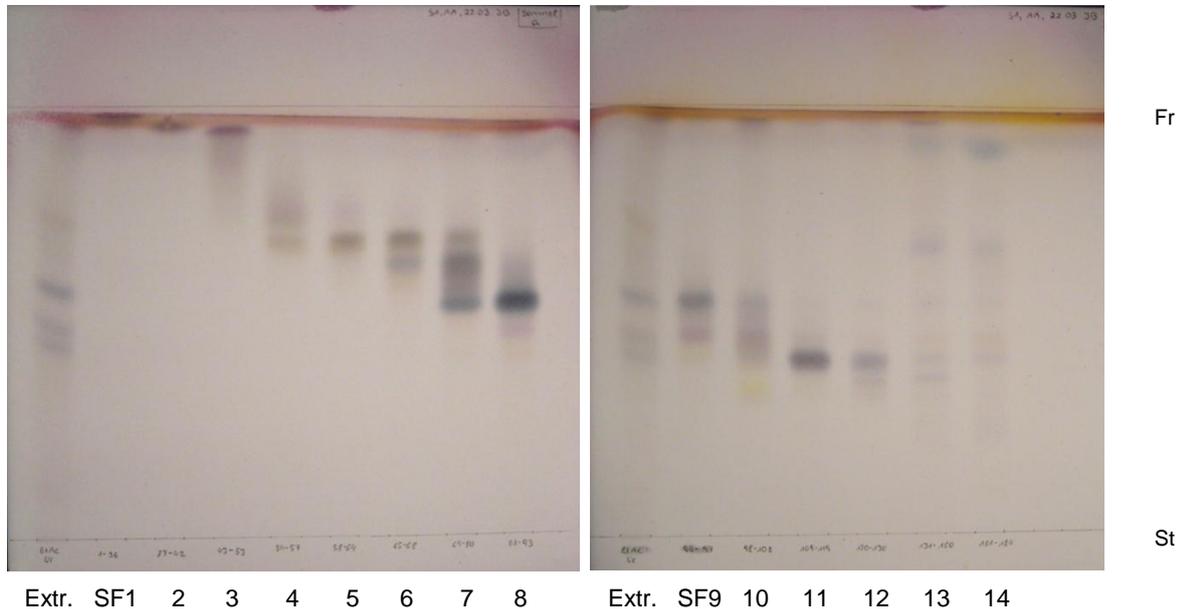
Tabelle 1: Sammelfractionen der SC 1

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)
1	1-36	16,8
2	37-42	15,0
3	43-53	74,9
4	54-57	19,7
5	58-64	41,2
6	65-68	18,7
7	69-80	44,3
8	81-93	48,4
9	94-97	15,2
10	98-108	31,6
11	109-119	20,5
12	120-130	14,9
13	131-180	24,5
14	181-184	2,6

Von den Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 11, S. 18).

Abbildung 11: DC der SF der SC 1, Detektion mit AASSstationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten, 20 x 20 cm

mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)

**Ergebnisse der SC 1**

In Sammelfractionen 1 bis 5 wurden apolare Begleitstoffe abgetrennt.

In Sammelfractionen 11 und 12 wurde die nach Detektion mit AASS blau gefärbte Substanz KK1 bei einem R_f-Wert von ca. 0,41 detektiert.

Die Sammelfractionen 7, 8 und 9 enthielten eine mit AASS blau gefärbte Komponente mit einem R_f-Wert von ca. 0,56, die besonders in SF 8 angereichert war.

3.2.2. Säulenchromatographie 2

Durchmesser: 3,5 cm

Füllhöhe: 86 cm

stationäre Phase: Kieselgel 60

mobile Phase: Gradientenelution mit EtAc (H₂O-gesättigt) – Methanol:

Fraktion 1-55: EtAc (H₂O-gesättigt) – Methanol (90 : 10)

Fraktion 56-243: EtAc (H₂O-gesättigt) – Methanol (80 : 20)

Auftragsmenge: 2,75 g n-Butanolextrakt (in Methanol gelöst) aufgezogen auf 5 g Kieselgel

Es wurden 234 Fraktionen gesammelt, die Fraktionsgröße war für die Fraktionen 1-145 je ca. 5 ml/30 min und die Fraktionen 146-234 je ca. 10 ml/60 min.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu 17 Sammelfraktionen vereinigt (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Sammelfraktionen der SC 2

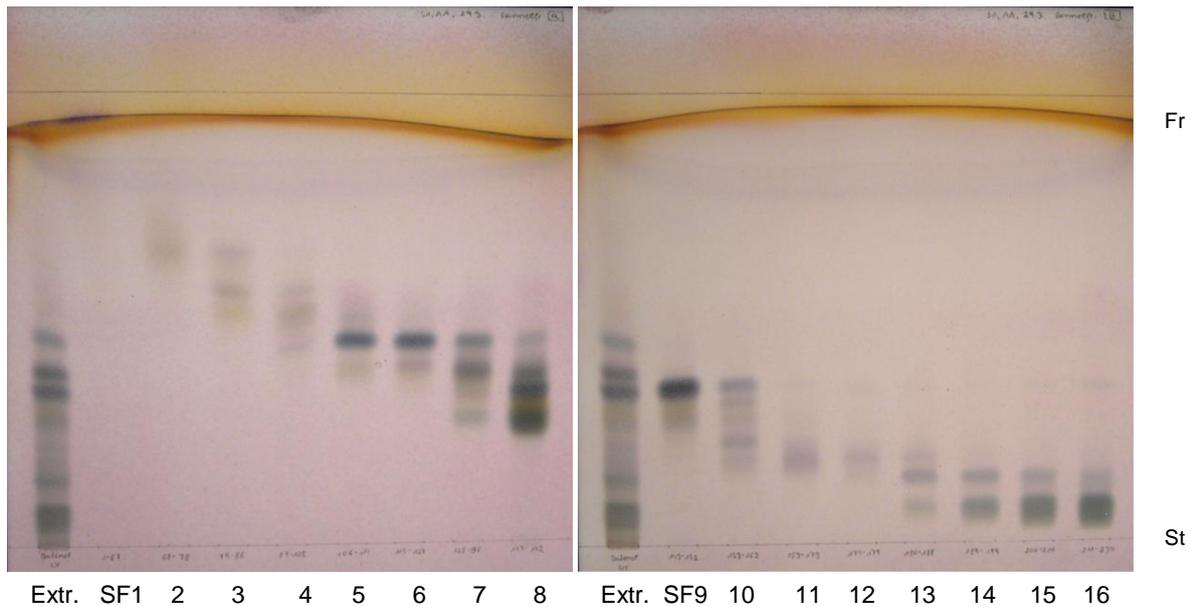
Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-67	37,9
2	68-78	7,8
3	79-86	14,9
4	87-105	40,2
5	106-114	40,3
6	115-127	60,0
7	128-136	64,7
8	137-142	94,9
9	143-152	248,9
10	153-162	92,6
11	163-173	70,0
12	174-179	33,7
13	180-188	61,0
14	189-199	152,4
15	200-210	166,1
16	211-234	131,4
17	Nachlauf	113,3

Von den Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 12).

Abbildung 12: DC der SF der SC 2, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 20 cm

mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)



Ergebnisse der SC 2

Die Sammelfractionen 8, 9 und 10 zeigten bei der Detektion mit AASS die blau gefärbte Zone von KK1 bei einem Rf-Wert von ca. 0,37.

In Sammelfractionen 5, 6 und 7 war nach dem Besprühen mit AASS die blau gefärbte Komponente bei einem Rf-Wert von ca. 0,48 sichtbar, die bereits in den Sammelfractionen 7, 8 und 9 der SC 1 bei einem Rf-Wert von ca. 0,56 (siehe Kap. 3.2.1, S. 16 ff.) detektiert worden war.

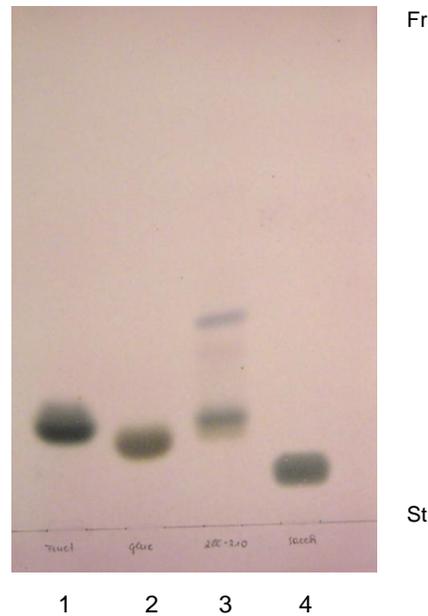
Die Sammelfractionen 13 und 14 wiesen eine bei der Detektion mit AASS blau gefärbte Komponente bei einem Rf-Wert von ca. 0,16 auf.

Die mit AASS blau-grün gefärbten Zonen in Startnähe in den Sammelfractionen 14,15 und 16 ließen aufgrund der Färbung und der Polarität das Vorliegen von Sacchariden vermuten.

Es wurde daher ein DC-Vergleich mit D-Fructose, D-Glucose und D-Saccharose durchgeführt (siehe Abb. 13, S. 21).

Abbildung 13: Vergleich der SF 15 mit Sacchariden, Detektion mit AASSstationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 10 cm

mobile Phase C: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (60 : 8 : 8 : 11)



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	D-Fructose	3	SF 15
2	D-Glucose	4	D-Saccharose

Dieser DC-Vergleich ließ auf das Vorliegen von D-Fructose schließen.

Für die Gewinnung der bei Detektion mit AASS blau gefärbten Komponente mit einem Rf-Wert von 0,56 (*in Abb. 11, S. 18*) bzw. 0,48 (*in Abb. 12, S. 20*) wurden SF 8 von SC 1 (*siehe Kap. 3.2.1, S. 16 ff.*) und die SF 5 und 6 von SC 2 (*siehe Kap. 3.2.2, S. 18 ff.*) vereinigt und mittels Säulenchromatographie fraktioniert (*siehe Kap. 3.2.3, S. 22 ff.*).

SF 11 von SC 1 und SF 9 von SC 2, die überwiegend KK1 enthielten, wurden vereinigt und anschließend einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen (*siehe Kap. 3.7, S. 40 ff.*).

3.2.3. Säulenchromatographie 3

SF 8 von SC 1 (48,4 mg), SF 5 von SC 2 (40,3 mg) und SF 6 von SC 2 (60,0 mg) wurden vereinigt und mittels SC an Kieselgel 60 aufgetrennt, um die bei Detektion mit AASS blau gefärbten Komponente mit einem Rf-Wert von 0,56 (*in Abb. 11, S. 18*) bzw. 0,48 (*in Abb. 12, S. 20*) zu isolieren.

Durchmesser: 2,0 cm

Füllhöhe: 50 cm

stationäre Phase: Kieselgel 60

mobile Phase: Ethylacetat (H₂O-gesättigt) – Methanol (90 : 10)

Auftragsmenge: 148,7 mg Sammelfraktion (in Methanol gelöst) aufgezo-
gen auf 0,4 g Kieselgel

Es wurden 190 Fraktionen zu je ca. 2 ml/30 min gesammelt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu sieben Sammelfractionen vereinigt (*siehe Tab. 3*).

Tabelle 3: Sammelfractionen der SC 3

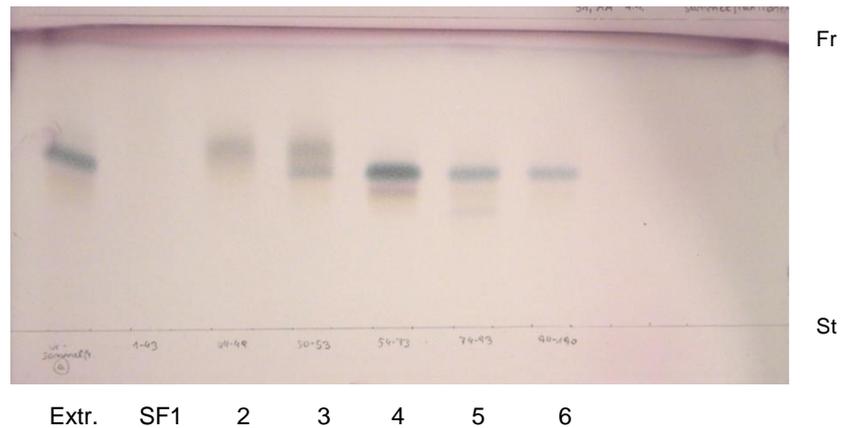
Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)
1	1-43	9,0
2	44-49	10,2
3	50-53	21,9
4	54-73	59,1
5	74-93	6,9
6	94-190	13,4
7	Nachlauf	7,8

Die Sammelfractionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie überprüft (siehe Abb. 14).

Abbildung 14: DC der SF der SC 3, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 10 cm

mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)



Ergebnisse der SC 3

SF 4, 5 und 6 enthielten die nach dem Besprühen mit AASS blau gefärbte Hauptkomponente.

SF 4 wies zusätzlich eine mit AASS rosa-violett gefärbte Komponente bei einem R_f-Wert von ca. 0,46 auf.

Da mittels SC 3 keine Reindarstellung dieser beiden Komponenten erfolgt war, wurden SF 4, 5 und 6 erneut vereinigt und noch einmal mittels SC an Sephadex[®] LH-20 aufgetrennt (siehe Kap. 3.2.4, S. 24 ff.).

3.2.4. Säulenchromatographie 4

Durchmesser: 1,5 cm
 Füllhöhe: 71 cm
 stationäre Phase: Sephadex[®] LH-20
 mobile Phase: Methanol – Aqua dest. (1 : 1)
 Auftragsmenge: 79,3 mg Sammelfraktion (in Methanol – Aqua dest.
 1 : 1 gelöst)

Es wurden 95 Fraktionen zu je ca. 4 ml/30 min gesammelt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu 14 Sammelfraktionen vereinigt (siehe Tab. 4).

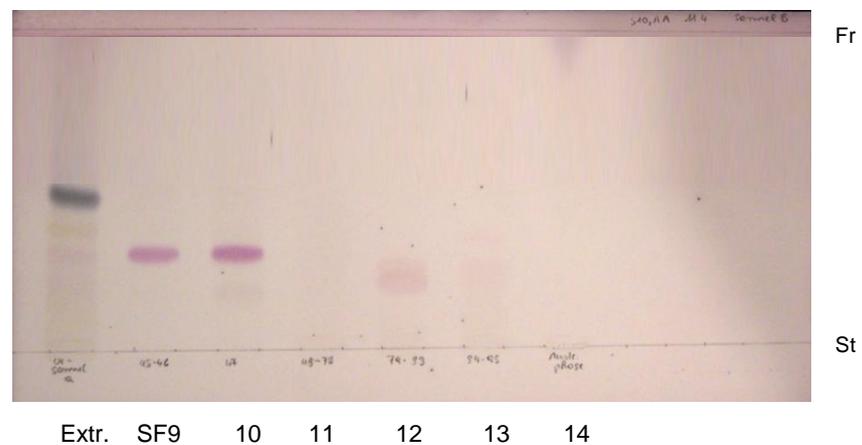
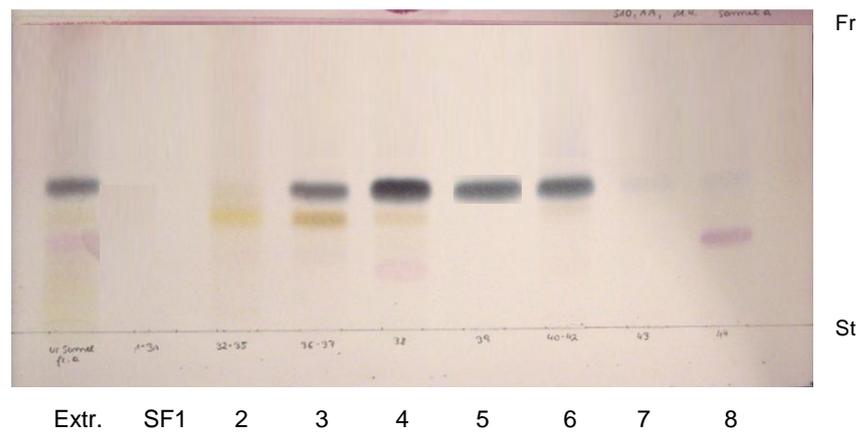
Tabelle 4: Sammelfraktionen der SC 4

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-31	5,5
2	32-35	6,4
3	36-37	10,8
4	38	8,4
5	39	6,6
6	40-42	6,9
7	43	0,8
8	44	0,6
9	45-46	1,3
10	47	0,6
11	48-78	10,6
12	79-83	1,9
13	84-95	3,6
14	Nachlauf	1,5

Von den Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 15).

Abbildung 15: DC der SF der SC 4, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 10 cm
mobile Phase D: Chloroform – Methanol – Aqua dest. (75 : 15 : 1,5)
Entwicklung in Sandwichkammer



Ergebnisse der SC 4

SF 3, 4, 5 und 6 wiesen die bei der Detektion mit AASS blau gefärbte Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,46 (in System D) auf. In SF 5 und 6 lag diese Substanz in chromatographisch einheitlicher Form vor. Diese Komponente wurde als JB-1 bezeichnet.

SF 8, 9 und 10 enthielten die mit AASS rosa-violett gefärbte Komponente bei einem Rf-Wert von ca. 0,30 (in System D). Diese wurde als JB-2 bezeichnet.

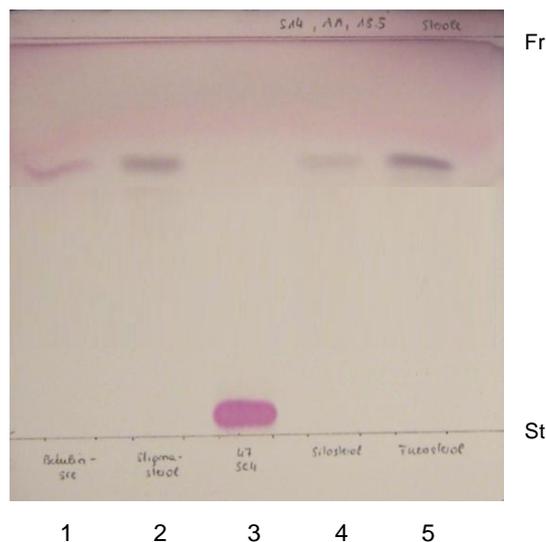
JB-2 ließ aufgrund der rosa-violetten Färbung mit AASS das Vorliegen von Sterolen vermuten.

Es wurde daher ein DC-Vergleich von SF 12 mit Betulinsäure, Stigmasterol, Sitosterol und Fucosterol durchgeführt. Der Vergleich zeigte jedoch, dass JB-2 viel polarer ist als die Sterol-Derivate (*siehe Abb 16*).

Abbildung 16: Vergleich der SF 12 mit Sterolen, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 10 x 10 cm

mobile Phase E: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)



Bahn	Substanz
1	Betulinsäure
2	Stigmasterol
3	SF 12
4	Sitosterol
5	Fucosterol

Für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie wurde für JB-1 SF 6 (ca. 6,9 mg) und für JB-2 SF 9 (ca. 1,3 mg) verwendet (*siehe Kap. 3.8, S. 51 ff.*).

3.3. Aufarbeitung der Fraktion 5-7

Ziel der Aufarbeitung von Fraktion 5-7 (634 mg) (*siehe Kap. 2.1.1, S. 6 f.*) war es, weiteres KK1 zu gewinnen und die bei Detektion mit AASS blau gefärbte Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,30 (*siehe Kap.3.1.1, S. 13 f.*) zu isolieren.

Die Fraktion 5-7 wurde mit 10 ml Aqua dest. versetzt und drei Mal mit je 10 ml n-Butanol extrahiert, um die sehr polaren Begleitstoffe abzutrennen. Die vereinigten n-Butanol-Phasen wurden zur Trockene eingedampft. Der Eindampfrückstand betrug 145,6 mg.

Dieses n-Butanol-Extrakt wurde mittels Säulenchromatographie 5 an Kieselgel 60 fraktioniert:

Säulenchromatographie 5

Durchmesser: 2,0 cm
Füllhöhe: 78 cm
stationäre Phase: Kieselgel 60
mobile Phase: Ethylacetat (H₂O-gesättigt) – Methanol (80 : 20)
Auftragsmenge: 145,6 mg Butanol-Extrakt (in Methanol gelöst) aufgezo-
gen auf 0,4 g Kieselgel

Es wurden 233 Fraktionen zu je ca. 3 ml/30 min gesammelt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu 15 Sammelfractionen vereinigt (*siehe Tab. 5, S. 28*).

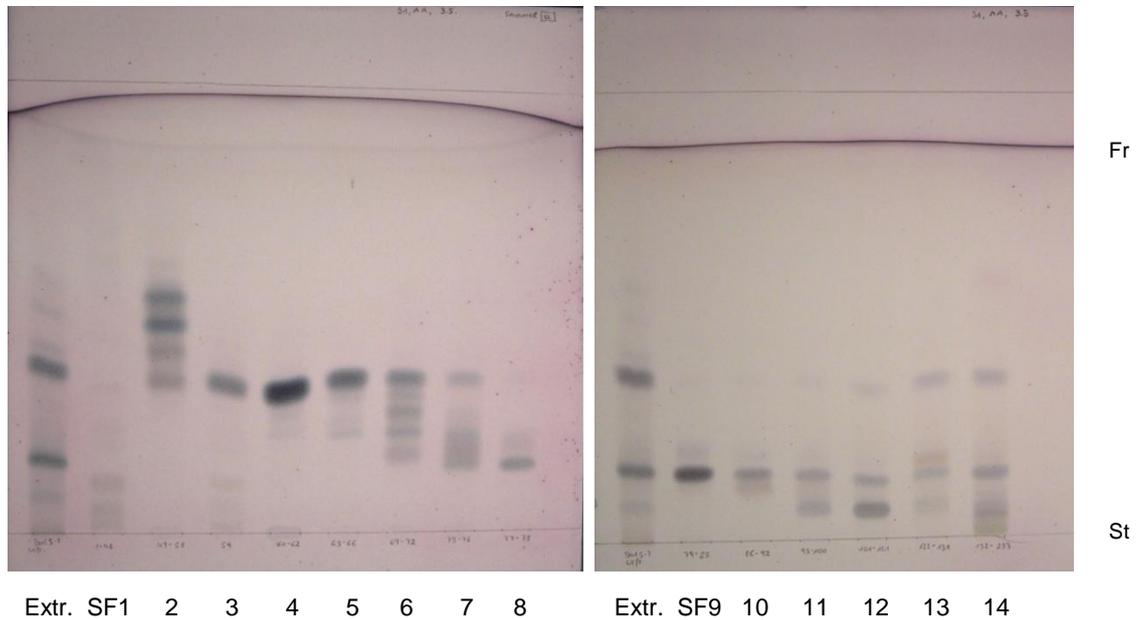
Tabelle 5: Sammelfractionen der SC 5

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)
1	1-46	16,9
2	47-58	8,6
3	59	2,5
4	60-62	12,9
5	63-66	8,8
6	67-72	5,7
7	73-76	3,4
8	77-78	3,7
9	79-85	17,7
10	86-92	6,4
11	93-100	5,3
12	101-121	10,6
13	122-131	3,7
14	132-233	22,8
15	Nachlauf	7,5

Von den Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb.17, S. 29).

Abbildung 17: DC der SF der SC 5, Detektion mit AASSstationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 20 cm

mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)

**Ergebnisse der SC 5**

In SF 3, 4, 5 und 6 war KK1 angereichert.

SF 8, 9 und 10 enthielten als Hauptkomponente die bei Detektion mit AASS blau gefärbte Komponente bei einem R_f-Wert von ca. 0,16, die bereits in den Sammelfractionen 13 und 14 der SC 2 (*siehe Kap. 3.2.2, S. 18 ff.*) detektiert worden war. Diese Komponente wurde JB-3 benannt. Aufgrund der Färbung und der Polarität wurde das Vorliegen eines Glykosides von KK1 oder KK5 vermutet.

In den SF 11 und 12 zeigte sich bei einem R_f-Wert von ca. 0,08 eine weitere mit AASS blau gefärbte Zone. Da diese Komponente jedoch nicht rein vorlag und die Mengen der Sammelfractionen, welche diese Komponente enthielten, für eine weitere Auftrennung zu gering waren, wurde keine Isolierung dieser Komponente durchgeführt.

Für die Strukturaufklärung von JB-3 mittels NMR-Spektroskopie (*siehe Kap. 3.8.2, S. 52 f.*) wurde SF 9 (ca. 17,7 mg) verwendet.

3.4. Aufarbeitung der Fraktionen 31-36 und 35-50

Die Fraktionen 31-36 (83,7 mg) und 35-50 (20,0 mg) (*siehe Kap. 2.1.1, S. 6 f.*) wurden aufgrund ihrer ähnlichen Zusammensetzung vereinigt und gemeinsam mittels Säulenchromatographie 6 weiter fraktioniert, um weiteres KK1, KK5, JB-1 und JB-3 zu gewinnen.

Säulenchromatographie 6

Durchmesser: 1,3 cm
Füllhöhe: 85 cm
stationäre Phase: Kieselgel 60
mobile Phase: Ethylacetat (H₂O-gesättigt) – Methanol (80 : 20)
Auftragsmenge: 103,7 mg Sammelfraktion (in Methanol gelöst) aufgezogen auf 0,38 g Kieselgel

Es wurden 52 Fraktionen zu je ca. 4 ml/30 min gesammelt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu 17 Sammelfraktionen vereinigt (*siehe Tab. 6, S. 31*).

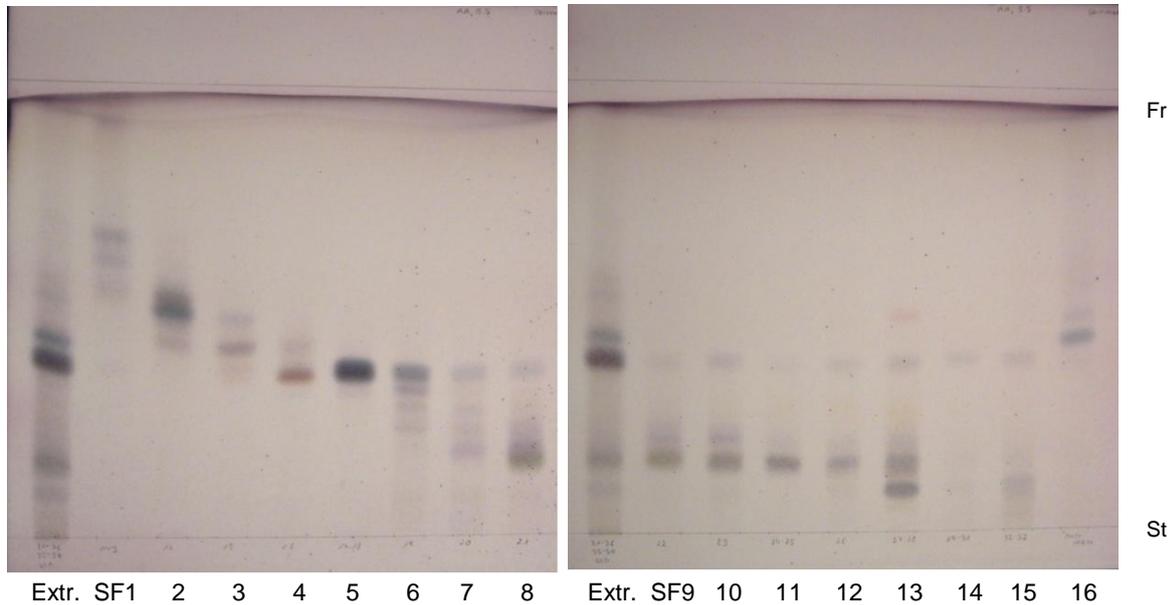
Tabelle 6: Sammelfractionen der SC 6

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)
1	1-13	8,4
2	14	2,6
3	15	2,9
4	16	4,1
5	17-18	16,7
6	19	3,2
7	20	1,7
8	21	3,8
9	22	3,1
10	23	2,4
11	24-25	3,9
12	26	1,6
13	27-28	2,6
14	29-31	3,5
15	32-52	10,1
16	Nachlauf 1	13,4
17	Nachlauf 2	7,3

Von den Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 18, S. 32).

Abbildung 18: DC der SF der SC 6, Detektion mit AASSstationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 20 cm

mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)

**Ergebnisse der SC 6**

In SF 5 war KK1 angereichert.

Die Sammelfractionen 8 bis 13 enthielten die mit AASS blau gefärbte Zone von JB-3 bei einem Rf-Wert von ca. 0,16.

In SF 16 zeigte sich eine bei Detektion mit AASS ebenfalls blaue Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,45, wobei angenommen wurde, dass es sich hierbei um KK5 handelt. Da KK5 erst im Nachlauf eluiert wurde, wurde die Säule noch einmal gespült, um KK5 quantitativ zu erfassen. Dabei wurde in SF 17 weiteres KK5 in chromatographisch einheitlicher Form erhalten (*siehe Abb. 19, S. 33*).

**Abbildung 19: DC-Vergleich von SF 16 und SF 17 mit KK5,
Detektion mit AASS**

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 5 x 10 cm
mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)



3.5. Aufarbeitung der Fraktionen 15-20 und 21-40

Die Fraktionen 15-20 (107,9 mg) und 21-40 (72,6 mg) (siehe Kap. 2.1.1, S. 6 f.) wurden vereinigt und gemeinsam mittels SC fraktioniert (siehe Kap. 3.5.1), um KK1 und die braun gefärbte Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,52 (siehe Kap.3.1.1, S. 13 f.) zu gewinnen.

3.5.1. Säulenchromatographie 7

Durchmesser: 2,0 cm
 Füllhöhe: 86 cm
 stationäre Phase: Kieselgel 60
 mobile Phase: Ethylacetat (H₂O-gesättigt) – Methanol (90 : 10)
 Auftragsmenge: 180,5 mg Sammelfraktion (in Methanol gelöst) aufgezogen auf 0,40 g Kieselgel

Es wurden 147 Fraktionen zu je ca. 3 ml/30 min gesammelt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu 14 Sammelfraktionen vereinigt (siehe Tab. 7).

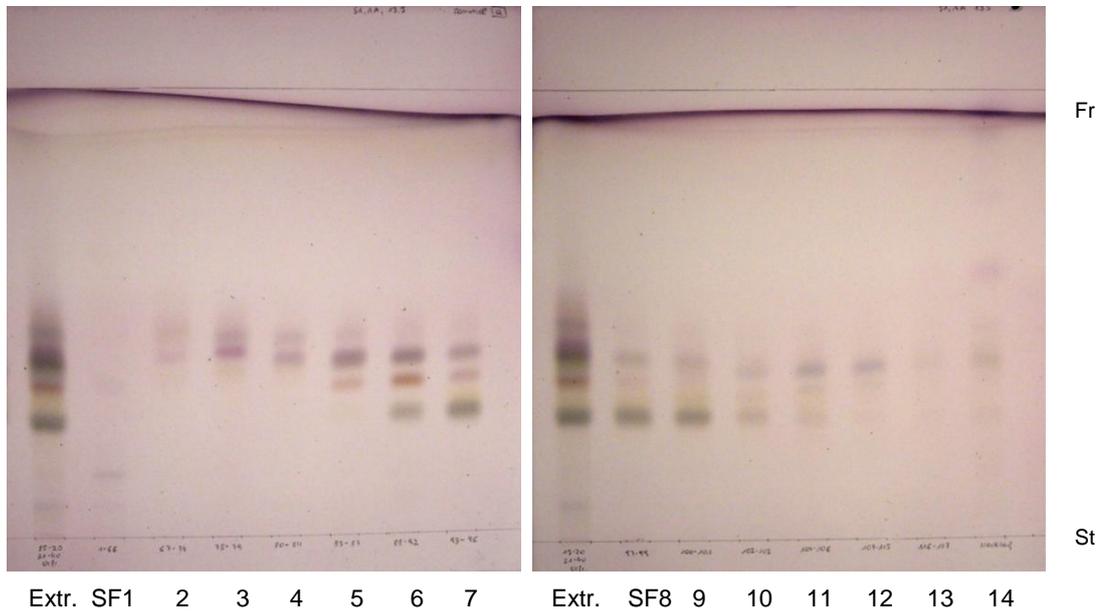
Tabelle 7: Sammelfraktionen der SC 7

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-66	12,4
2	67-74	15,6
3	75-79	14,7
4	80-84	13,6
5	85-87	7,5
6	88-92	11,0
7	93-96	9,9
8	97-99	7,0
9	100-101	3,9
10	102-103	3,1
11	104-106	3,3
12	107-115	9,0
13	116-147	19,9
14	Nachlauf	10,2

Von den Sammelfraktionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb.20, S. 35).

Abbildung 20: DC der SF der SC 7, Detektion mit AASSstationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 20 cm

mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)



Da mittels SC 7 an Kieselgel keine Reindarstellung der Komponente mit Rf-Wert von ca. 0,52 erfolgt war, wurden SF 5, 6, 7, 8 und 9 erneut vereinigt und noch einmal mittels SC an Sephadex[®] LH-20 aufgetrennt (siehe Kap. 3.5.2).

3.5.2. Säulenchromatographie 8

Durchmesser: 1,3 cm
 Füllhöhe: 86 cm
 stationäre Phase: Sephadex[®] LH-20
 mobile Phase: Methanol – Aqua dest. (1 : 1)
 Auftragsmenge: 39,3 mg Sammelfraktion (in Methanol – Aqua dest. 1 : 1 gelöst)

Es wurden 55 Fraktionen zu je ca. 3 ml/30 min gesammelt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu sieben Sammelfraktionen vereinigt (siehe Tab. 8).

Tabelle 8: Sammelfraktionen der SC 8

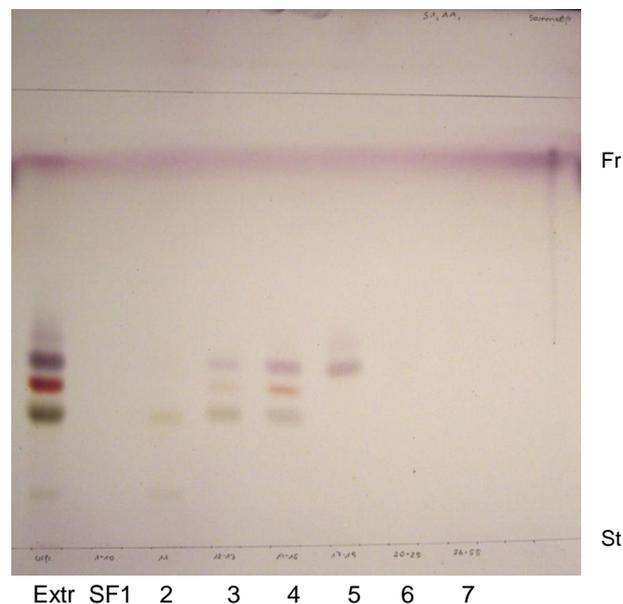
Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-10	2,4
2	11	2,6
3	12-13	12,0
4	14-16	9,4
5	17-19	4,2
6	20-25	4,2
7	26-55	4,3

Die Sammelfraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf ihre Zusammensetzung untersucht (siehe Abb. 21).

Abbildung 21: DC der SF der SC 8, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 20 cm

mobile Phase A: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 8 : 11)



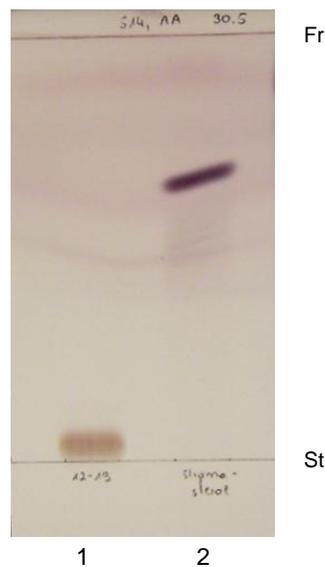
Ergebnisse der SC 8

Auch mit Hilfe der SC 8 konnten die drei Komponenten nicht vollständig voneinander getrennt werden. SF 5 enthielt jedoch die bei Detektion mit AASS violett gefärbte Zone mit einem Rf-Wert von ca. 0,45 als Einzelkomponente. Diese wurde als JB-4 bezeichnet.

JB-4 wurde wegen seiner violetten Färbung mit AASS auf das Vorliegen eines Sterols überprüft und ein DC-Vergleich von SF 3 mit Stigmasterol durchgeführt. Der Vergleich zeigte, dass JB-4 viel polarer ist als das Sterol (*siehe Abb. 22*).

Abbildung 22: Vergleich der SF 3 mit Stigmasterol, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 5 x 10 cm
mobile Phase E: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)



Bahn	Substanz
1	SF 3
2	Stigmasterol

Für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie (*siehe Kap. 3.8, S. 51 ff.*) standen in SF 5 4 mg JB-4 zur Verfügung.

3.6. Aufarbeitung der Fraktion 541-670

Die Auftrennung der Fraktion 541-670 aus dem Ethylacetatextrakt der Seitenwurzeln (650 mg) (siehe Kap. 2.1.2, S. 7) wurde mittels Solid Phase Extraction durchgeführt.

Ziel der Fraktionierung war es, die nach Besprühen mit NR/PEG orange fluoreszierende Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,50 (siehe Kap. 3.1.2, S. 14 f.) zu isolieren.

In einer vorangegangenen Diplomarbeit ^[5] wurde die Isolierung dieses Inhaltsstoffes aus der nachfolgenden Sammelfraktion bereits versucht.

Es wurden DC-Vergleiche mit Referenzsubstanzen ähnlicher Polarität durchgeführt, die nach Detektion mit NR/PEG ähnliche Fluoreszenzfärbung zeigen.

Dabei konnte das Vorliegen von Apigenin, Quercetin, Hyperosid, Isorhamnetin, Quercitrin, Isoquercitrin, Orientin und Vitexin ausgeschlossen werden.

Eine Isolierung der Komponente bei einem Rf-Wert von ca. 0,50 war im Rahmen jener Diplomarbeit ^[5] aufgrund zu geringer Mengen der Fraktionen nicht möglich gewesen.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Fraktion 541-670 (650 mg) mit 30 ml Aqua dest. versetzt und vier Mal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert, um die stark polaren Inhaltsstoffe abzutrennen.

Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden zur Trockene eingedampft. Der Eindampfrückstand betrug ca. 280 mg und wurde mittels SPE fraktioniert.

SPE 1:

stationäre Phase: Varian Mega Bond Elut™ C18 12 ml Kartuschen

mobile Phase: Gradientenelution mit Aqua dest., Methanol 5 %, 10 %, 15 %, 20 % und 100 %

Auftragsmenge: 280 mg Ethylacetatfraktion (gelöst in Methanol) aufgeteilt auf zwei Kartuschen

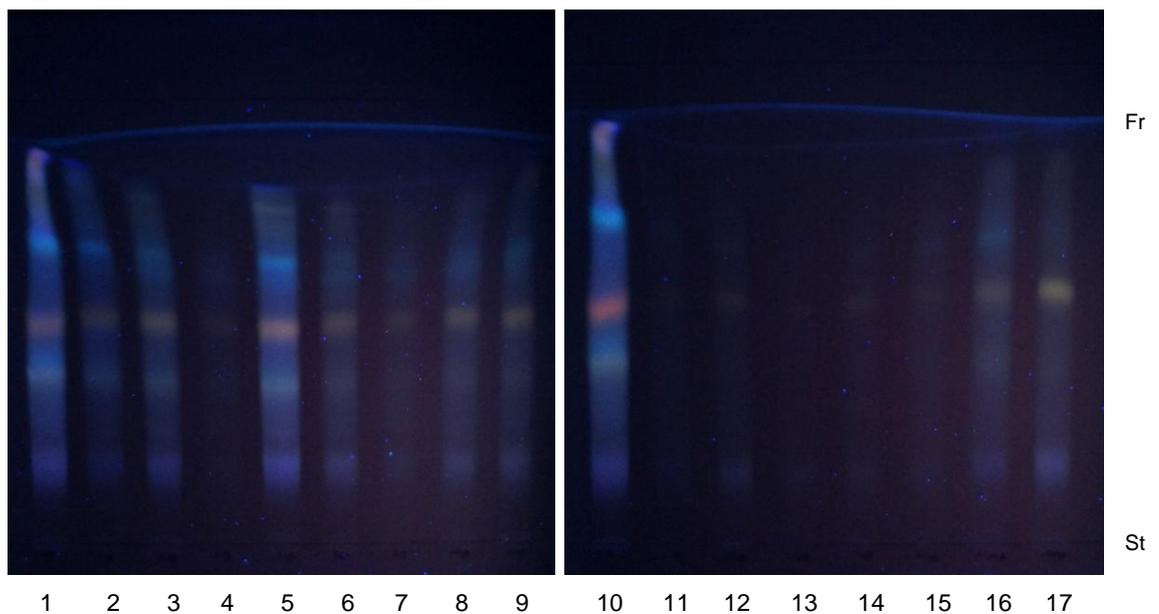
Von jedem Elutionsmittel wurden mit einer Durchflussrate von 8 ml/min pro Kartusche (Kartusche A und B) je drei Fraktionen (bezeichnet als Fraktion a, b und c) zu je 10 ml gesammelt. Anschließend wurden jeweils die entsprechenden Fraktionen von Kartusche A und B vereinigt und mittels Lyophilisieren zur Trockene gebracht.

Die Fraktionen wurden anschließend dünnschichtchromatographisch überprüft (siehe Abb. 23).

**Abbildung 23: DC der Fraktionen der SPE 1,
Detektion mit NR/PEG**

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 20 cm

mobile Phase B: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Aqua dest. (70 : 8 : 4 : 4)



Bahn	Substanz	Menge (mg)	Bahn	Substanz	Menge (mg)
1	EtAc-Extrakt		10	EtAc-Extrakt	
2	Aqua dest. a	66,5	11	MeOH 10 % c	3,1
3	Aqua dest. b	29,5	12	MeOH 15 % a	0,7
4	Aqua dest. c	10,7	13	MeOH 15 % b	1,6
5	MeOH 5 % a	8,1	14	MeOH 15 % c	0,2
6	MeOH 5 % b	3,7	15	MeOH 20 % a	1,4
7	MeOH 5 % c	1,5	16	MeOH 20 % b + c	1,0
8	MeOH 10 % a	1,8	17	MeOH 100 %	4,8
9	MeOH 10 % b	1,8			

Ergebnisse der SPE 1

Bei der Detektion mit NR/PEG zeigte sich, dass mit Aqua dest. kaum fluoreszierende Inhaltsstoffe abgetrennt werden konnten.

Das erste Eluat mit Methanol (MeOH 5 % a) enthielt den Hauptanteil an fluoreszierenden Komponenten.

Die Fraktionen MeOH 15 %, MeOH 20 % und MeOH 100 % wiesen kaum noch fluoreszierende Inhaltsstoffe auf.

Eine Reindarstellung der nach Besprühen mit NR/PEG orange fluoreszierenden Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,50 konnte mit dieser SPE nicht erreicht werden. Eine weitere Auftrennung war im Rahmen dieser Diplomarbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

3.7. Enzymatische Hydrolyse von KK1

Zur enzymatischen Abspaltung der Glucose von KK1 wurden SF 11 (20,5 mg) von SC 1 (*siehe Kap. 3.2.1, S. 16 ff.*) und die SF 9 (248,9 mg) von SC 2 (*siehe Kap. 3.2.2, S 18 ff.*) vereinigt. Diese Fraktion (269,4 mg) enthielt neben KK1 nur noch wenige Verunreinigungen, deren Abtrennung jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht zielführend schien.

3.7.1. Vorversuche zur Hydrolyse

Zuerst wurden zwei Vorversuche mit ca. 3 mg Probe durchgeführt.

Es sollte ermittelt werden, welche Spaltprodukte gebildet werden und welche Inkubationszeit gewählt werden soll.

Im ersten Vorversuch wurden 2,6 mg Probe in 1 ml Ringerlösung (pH 7,4) gelöst. Zur Lösung wurden 2,6 mg β -Glucuronidase (Sigma, Nr. G 0751 aus *Helix pomatia*) zugegeben.

Der Ansatz wurde für 7 Stunden in einem auf 37°C temperierten Brutschrank inkubiert ^[7].

Das auf Raumtemperatur abgekühlte Hydrolysat wurde anschließend zwei Mal mit je 1 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten Chloroformphasen zur Trockene eingedampft. Dabei wurden 0,8 mg Eindampfrückstand erhalten.

Im zweiten Vorversuch wurde der Hydrolyseansatz in gleicher Weise und gleicher Menge hergestellt, jedoch nur 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

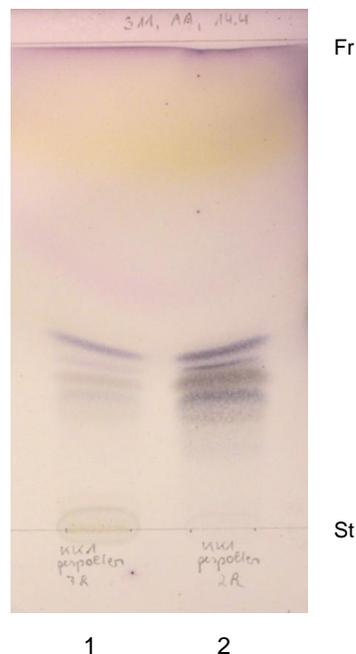
Das Hydrolysat wurde wie im ersten Versuch weiterverarbeitet. Es wurden 0,4 mg Eindampfrückstand erhalten.

Die Chloroformextrakte beider Ansätze wurden dünnschichtchromatographisch überprüft (siehe Abb.24).

Abbildung 24: DC der Eindampfrückstände nach Hydrolyse von KK1, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 5 x 10 cm

mobile Phase F: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure – Methanol (10 : 4 : 1 : 1)



Bahn	Substanz
1	Eindampfrückstand Vorversuch 1
2	Eindampfrückstand Vorversuch 2

Es zeigten sich sowohl nach 7 Stunden als auch 2 Stunden Inkubationszeit sechs identische Spaltprodukte.

Es wurde daher eine Inkubationszeit von 3 Stunden für die Spaltung einer größeren Menge von KK1 festgelegt.

3.7.2. Hydrolyse von KK1 in größerem Ansatz

Es wurden 150,8 mg KK1 in 60 ml Ringerlösung gelöst und mit 150,9 mg β -Glucuronidase (Sigma, Nr. G 0751 aus *Helix pomatia*) versetzt.

Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Hydrolysat drei Mal mit je 60 ml Chloroform extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurde nach jedem Verteilungsschritt zentrifugiert.

Die vereinigten Chloroformphasen wurden zur Trockene eingedampft und 41,4 mg Eindampfrückstand erhalten, der dünnschichtchromatographisch überprüft wurde (*siehe Abb.25*).

Abbildung 25: DC des Eindampfrückstands nach Hydrolyse von KK1, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 5 x 20 cm
mobile Phase G: Chloroform – Methanol – Aqua dest. (85 : 8 : 0,4)



Bei der Detektion mit AASS zeigten sich in System G die identischen Spaltprodukte, die bereits im Dünnschichtchromatogramm der Vorversuche in System F (*siehe Abb. 24, S. 41*) detektiert worden waren.

Die mit AASS blau gefärbte Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,31 stellte in diesem Chromatogramm die Hauptkomponente dar.

Zur Reindarstellung der Hauptkomponente nach Hydrolyse wurde das Hydrolysat (40 mg) mittels Säulenchromatographie fraktioniert (*siehe Kap. 3.7.3*).

3.7.3. Säulenchromatographie 9

Durchmesser: 1,3 cm

Füllhöhe: 86 cm

stationäre Phase: Kieselgel 60

mobile Phase: Gradientenelution mit Chloroform – Methanol – Aqua dest.
Gemischen:

Fraktion 1-97: Chloroform – Methanol – Aqua dest.
(95 : 1,5 : 0,1)

Fraktion 98-144: Chloroform – Methanol – Aqua dest.
(90 : 3,5 : 0,2)

Fraktion 145-Nachlauf: Chloroform – Methanol – Aqua dest.
(85 : 8 : 0,5)

Auftragsmenge: 40 mg KK1-Hydrolysat (in Chloroform gelöst)
aufgezogen auf 0,15 g Kieselgel

Es wurden 216 Fraktionen gesammelt, die Fraktionsgröße war für die Fraktionen 1-143 je ca. 2 ml/30 min und die Fraktionen 144-216 je ca. 4 ml/60 min.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu 17 Sammelfraktionen vereinigt (*siehe Tab. 9, S. 44*).

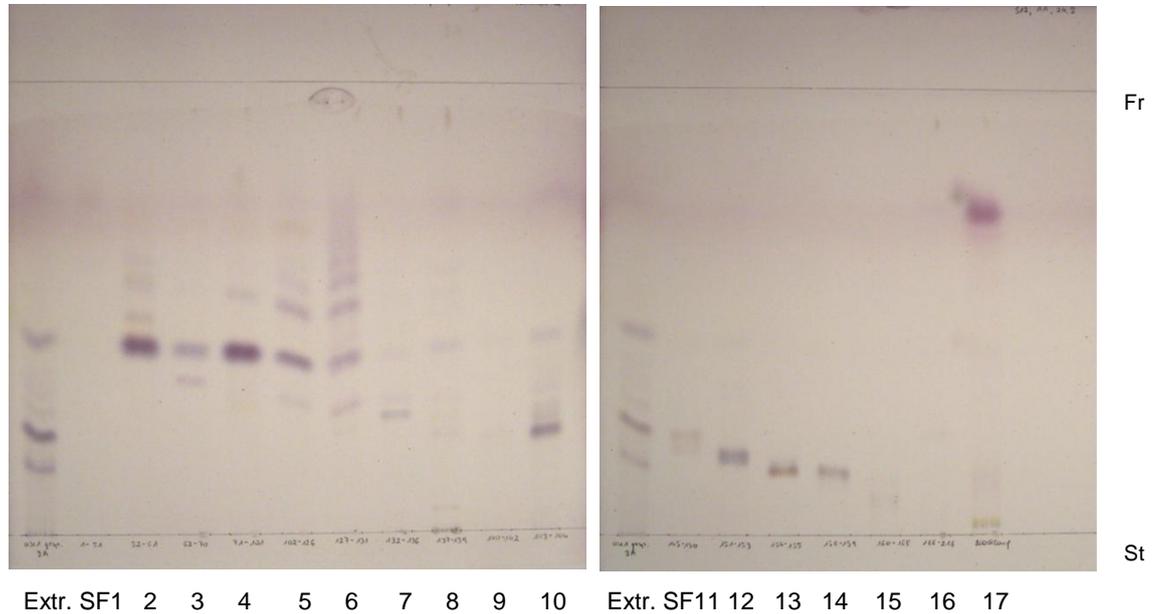
Tabelle 9: Sammelfractionen der SC 9

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)
1	1-51	1,7
2	52-61	3,5
3	62-70	3,2
4	71-101	7,0
5	102-126	4,7
6	127-131	3,5
7	132-136	2,8
8	137-139	2,0
9	140-142	1,1
10	143-144	0,3
11	145-150	1,7
12	151-153	0,9
13	154-155	1,3
14	156-159	1,2
15	160-165	1,3
16	166-216	1,0
17	Nachlauf	2,2

Von den Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 26, S. 45).

Abbildung 26: DC der SF der SC 9, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten 20 x 20 cm
mobile Phase G: Chloroform – Methanol – Aqua dest. (85 : 8 : 0,4)

**Ergebnisse der SC 9**

Die Sammelfractionen 2, 3, 4 und 5 zeigten eine bei Detektion mit AASS blau gefärbte Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,40.

Die Sammelfraction 10 wies die mit AASS blau gefärbte Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,22 auf, welche in *Abbildung 25* (siehe S. 42) die Hauptkomponente darstellte.

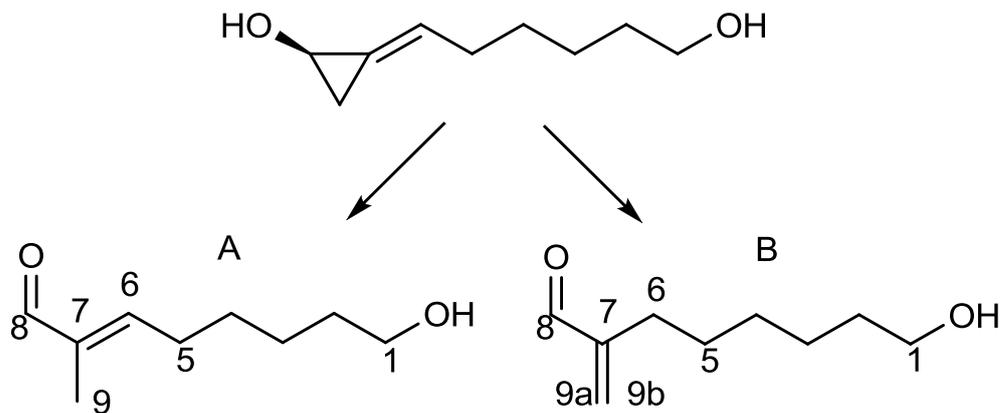
Aufgrund von Begleitsubstanzen und der geringen Menge von SF 10 (0,3 mg) war eine Strukturaufklärung der mit AASS blau gefärbten Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,22 nicht möglich.

Es wurde daher eine Strukturaufklärung der bei Detektion mit AASS blau gefärbten Komponente mit einem Rf-Wert von ca. 0,40 durchgeführt. Diese wurde als Substanz K1 bezeichnet und es standen ca. 7 mg aus SF 4 für die NMR-Spektroskopie zur Verfügung (siehe Kap. 3.7.4, S. 46 f.).

3.7.4. Strukturaufklärung der Substanz K1

Mittels NMR-Spektroskopie wurde die Substanz K1 als Gemisch zweier Aldehyde identifiziert. Es konnten im Vergleich zu Substanz KK1 ^[2] keine Signale des Cyclopropanrings und der L-Glucose festgestellt werden. Dies ließ darauf schließen, dass der Glucoserest erfolgreich abgespalten worden war, jedoch auch eine Öffnung des Cyclopropanrings stattgefunden hatte (*siehe Abb. 27*).

Abbildung 27: Strukturformel von Aldehyd A und B



In Komponente A (Aldehyd A) stimmten die ¹H- und ¹³C-NMR-Verschiebungen der Protonen an C1 bis C4 bzw. dieser C-Atome sehr gut mit jenen von KK1 überein (*siehe Tab. 10, S. 47*). Die Protonen an C5 zeigten eine geringfügige Verschiebung nach tieferem Feld. C5 war etwas nach höherem Feld verschoben. Die Signale von C6 bis C9 und der jeweiligen Protonen bewiesen die Spaltung des Cyclopropanrings: C8 kam bei $\delta = 197,18$ ppm zur Resonanz und konnte mit dem Singlett bei $\delta = 9,37$ ppm als Aldehyd identifiziert werden. C9 war nach $\delta = 9,09$ ppm verschoben und damit als Methylgruppe identifizierbar.

In Komponente B (Aldehyd B) stimmten die ¹³C-NMR-Verschiebungen von C1 bis C6 und C8 weitgehend mit denen von Komponente A überein. Die Verschiebungen der Signale von C7 und C9 (C bzw. CH₂ im aromatischen

Bereich) zeigten eindeutig das Vorliegen der Doppelbindung zwischen C7 und C9.

Verbindung A und B lagen in der untersuchten Fraktion im Verhältnis 3 : 1 vor.

Tabelle 10: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Aldehyd A und B

		^1H (ppm)	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	^{13}C (ppm)
A				
1	CH ₂	3.560	t 6.6	62.76
2	CH ₂	1.565	m	33.41
3	CH ₂	1.437	m	26.71
4	CH ₂	1.567	m	29.28
5	CH ₂	2.415	t 7.4 7 t 7.4 / q 0.9	29.95
6	CH	6.641	t 7.4 / q 1.3	156.89
7	C	-	-	140.60
8	CH	9.367	s	197.18
9	CH ₃	1.727	t 0.9 / d 1.3	9.09
B				
1	CH ₂	3.538	t 6.6	62.91
2	CH ₂	1.538	m	33.54
3	CH ₂	1.373	m	26.68
4	CH ₂	1.356	m	30.21
5	CH ₂	1.466	m	29.08
6	CH ₂	2.238	t 7.6 / d 1.3 / d 0.6	28.72
7	C	-	-	151.92
8	CH	9.517	s	196.42
9a	CH ₂	6.336	d 0.8 / t 1.3	135.30
9b		6.090	d 0.8 / t 0.6	-

Die Öffnung des Cyclopropanrings war nicht im Rahmen der enzymatischen Hydrolyse erfolgt, sondern offensichtlich erst bei der anschließenden Auftrennung des Hydrolysats an Kieselgel 60. Kieselgel ist leicht sauer und in diesem Milieu kam es zur Öffnung des Cyclopropanrings zu den Verbindungen Aldehyd A und B.

3.7.5. Wiederholung der Hydrolyse

Auf dieser Hypothese basierend wurde erneut eine Hydrolyse durchgeführt.

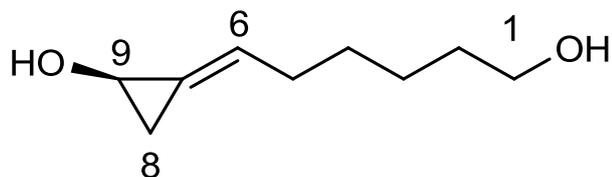
Es wurden (*analog zu Kap. 3.7.2, siehe S. 42 f.*) 81,9 mg KK1 in 33 ml Ring-
erlösung gelöst und mit 82,1 mg β -Glucuronidase (Sigma, Nr. G 0751 aus
Helix pomatia) versetzt.

Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Hydrolysat drei Mal mit je 35
ml Chloroform extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurde nach jedem
Extraktionsschritt zentrifugiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden zur
Trockene eingedampft und 16 mg Eindampfrückstand erhalten.

Da dieses Chloroformextrakt (Hydrolysat C) bei der DC-Kontrolle nur geringe
Anteile an Begleitsubstanzen aufwies, wurde direkt mittels NMR-
Spektroskopie analysiert (*siehe Kap. 3.7.6*).

3.7.6. Strukturaufklärung von Hydrolysat C

Hydrolysat C (Reinheit ca. 90 %) zeigte im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum (*siehe Tab. 11, S. 49*) keine Zuckersignale. Die Signale der Protonen an den C-
Atomen C1 bis C6 im ^1H -NMR und jene von C1 bis C5 im ^{13}C -NMR stimmten
ausgezeichnet mit KK1 überein. Aus den Verschiebungen von C7 bis C9
wurde deutlich, dass der Cyclopropanring intakt geblieben war. H9 kam als
Tripledublett bei $\delta = 3,77$ ppm und C9 bei $\delta = 46,48$ ppm zur Resonanz, was
die Substitution mit einer OH-Gruppe bestätigte. Anhand dieser Daten im
Vergleich mit KK1 wurde Hydrolysat C eindeutig als (2E)-2-
(hydroxyhexyliden)cyclopropanol identifiziert (*siehe Abb. 28, S. 49*).

Abbildung 28: Strukturformel von Hydrolysat C

(2E)-2-(hydroxyhexylidene)cyclopropanol

Tabelle 11: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Hydrolysat C

		^1H (ppm)	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	^{13}C (ppm)
1	CH_2	3.540	t 6.6	62.94
2	CH_2	1.543	m	33.51
3	CH_2	1.390	m	26.55
4	CH_2	1.504	m	29.94
5	CH_2	2.217	m	32.46
6	CH	6.071	t 2.7 / d 1.1 / t 6.8	122.62
7	C	-	-	126.17
8	CH_2	1.302	d 10.1 / d 6.2 / d 2.7 / t 1.9	13.12
		1.054	d 10.1 / d 2.7 / d 2.7 / t 1.9	
9	CH	3.767	d 6.7 / d 2.7 / d 1.1	46.48

3.7.7. Testung von Hydrolysat C an SW480 Zellen

Hydrolysat C wurde auf Zytotoxizität an SW480 Zellen (eine humane kolorektale Adenokarzinom Zelllinie) getestet ¹.

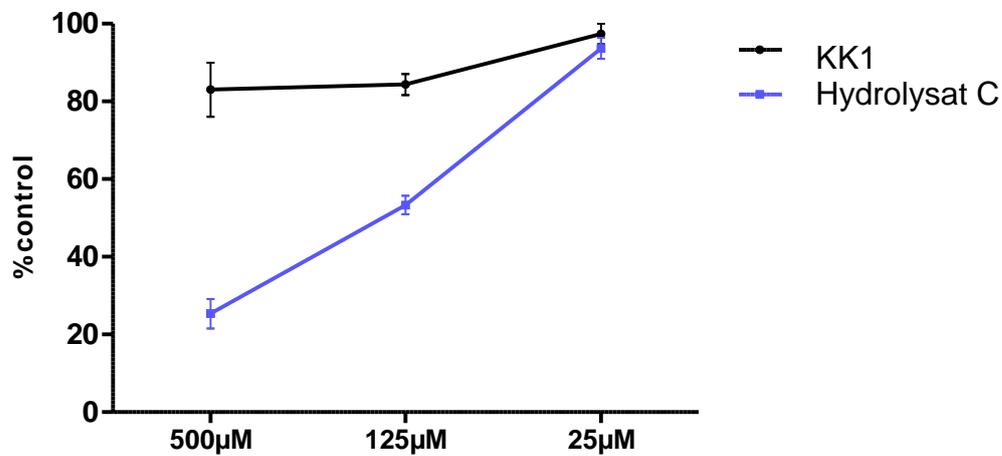
Die SW480 Zellen wurden auf 24-Wellplatten kultiviert und für 48 Stunden mit steigenden Konzentrationen (25, 125 und 500 μM) von Hydrolysat C bzw. KK1 inkubiert.

¹ Ich danke Kerstin Kainz für die Durchführung des Neutralrot-Assays.

Der Neutralrot-Assay zeigte, dass KK1 zu keiner signifikanten Reduktion der SW480 Zellen führte, die Überlebensrate der Zellen lag über 80 % in allen drei Konzentrationen.

Hydrolysat C zeigte eine stärkere zytotoxische Aktivität als KK1. Bei einer Konzentration von 500 μM betrug die Überlebensrate der SW480 Zellen unter 25 % (siehe Abb. 29).

Abbildung 29: Überlebensrate der SW480 Zellen im Neutralrot-Assay ^[2]



3.8. Strukturaufklärung der isolierten Substanzen

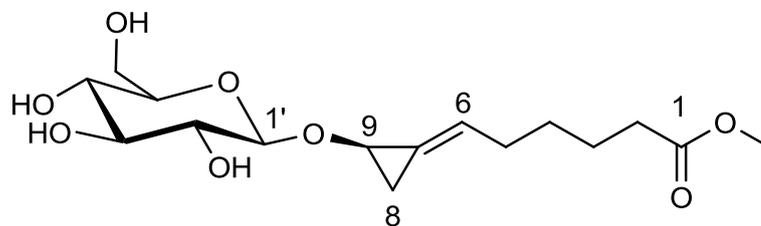
Die Substanzen JB-1, JB-2, JB-3 und JB-4 wurden mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie untersucht. Aufgrund der relativ geringen Mengen war eine Strukturaufklärung der nicht ganz reinen Substanzen JB-2 und JB-4 nicht möglich.

3.8.1. Strukturaufklärung der Substanz JB-1

Im MS wurde ein Molekulargewicht von 346 für Substanz JB-1 ermittelt. Das Fragmentierungsmuster zeigte eine Abspaltung einer Hexose.

Im NMR von Substanz JB-1 wurde die Hexose bestätigt. Die Verschiebungen im ^1H - und ^{13}C -NMR (siehe Tab. 12, S. 52) korrelierten ausgezeichnet mit jenen von KK5 [2]. Lediglich für die Protonen an C2 wurde eine Tieffeldverschiebung von 0,2 ppm im ^1H -NMR beobachtet. Zusätzlich war das Singlett einer Methylgruppe bei $\delta = 3,65$ ppm sichtbar. Die Hochfeldverschiebungen von C1, C2 und C3 im ^{13}C -NMR um 7 ppm, 4,5 ppm und 1,9 ppm bestätigten das Vorliegen des Methylesters von KK5. Substanz JB-1 wurde als (6E)-6[2-(β -glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]-hexansäuremethylester identifiziert (siehe Abb. 30).

Abbildung 30: Strukturformel von JB-1



(6E)-6[2-(β -glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]-hexansäuremethylester

Tabelle 12: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von JB-1

		^1H (ppm)	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	^{13}C (ppm)
	CH ₃	3.651	s	51.98
1	C	-	-	175.91
2	CH ₂	2.336	t 7.4	34.62
3	CH ₂	1.637	m	25.63
4	CH ₂	1.509	m	29.36
5	CH ₂	2.231	t 7.5 / t 1.8 / d 6.8 / d 1.0	32.06
6	CH	6.106	t 2.7 / d 1.1 / t 6.8	123.65
7	C	-	-	124.24
8a	CH ₂	1.344	d 10.1 / d 6.2 / d 2.7 / t 1.8	11.87
8b		1.247	d 10.1 / d 2.7 / d 2.7 / t 1.8	
9	CH	4.182	d 6.2 / d 2.7 / d 1.1 / t 1.0	52.66
1'	CH	4.390	d 7.9	104.16
2'	CH	3.136	d 7.9 / d 9.2	74.72
3'	CH	3.350	d 9.2 / d 8.9	78.05 ^a
4'	CH	3.285	d 8.9 / d 9.8	71.57
5'	CH	3.304	d 9.8 / d 2.0 / d 5.5	78.08 ^a
6'	CH ₂	3.880	d 2.3 / d 11.9	62.79
		3.681	d 5.5 / d 11.9	

^a Signale austauschbar

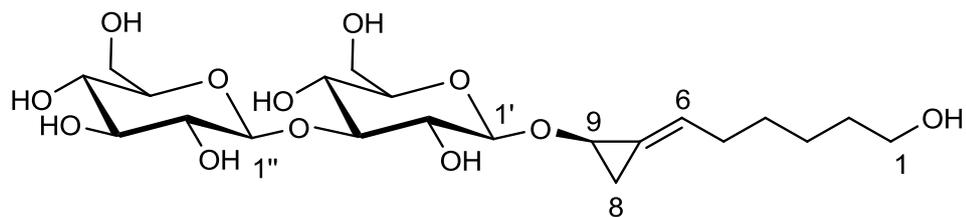
3.8.2. Strukturaufklärung der Substanz JB-3

Mittels NMR-Spektroskopie konnte auch JB-3 als ein weiteres Methylen-cyclopropanglykosid identifiziert werden, dessen Aglykon mit KK1 übereinstimmte.

Im MS wurde ein Molekulargewicht von 480 für Substanz JB-3 ermittelt. Das Fragmentierungsmuster zeigte eine Abspaltung von zwei Hexosen.

Im NMR wurden im Zuckerbereich die Signale von zwei Glucosen detektiert. Anhand der Tieffeldverschiebung von C3' um 10 ppm wurde die 1→3 Verknüpfung der Zucker nachgewiesen und die Struktur als (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropyl-1→3-diglucosid aufgeklärt (*siehe Abb. 31, S. 53*).

Abbildung 31: Strukturformel von JB-3



(2E)-2-(hydroxyhexylden)cyclopropyl-1→3-diglucosid

Tabelle 13: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von JB-3

		^1H (ppm)	$J_{\text{H,H}}$ (Hz)	^{13}C (ppm)
1	CH ₂	3.542	t 6.7	62.93
2	CH ₂	1.545	t 7.8 / t 6.7	33.50
3	CH ₂	1.394	t 7.5 / t 7.8	26.59
4	CH ₂	1.513	t 7.5 / t 7.5	29.82
5	CH ₂	2.235	t 7.5 / t 1.8 / d 6.8 / d 1.0	32.45
6	CH	6.124	t 2.7 / d 1.1 / t 6.8	124.14
7	C	-	-	123.78
8a	CH ₂	1.344	d 10.1 / d 6.2 / d 2.7 / t 1.8	11.85
8b		1.249	d 10.1 / d 2.7 / d 2.7 / t 1.8	
9	CH	4.183	d 6.2 / d 2.7 / d 1.1 / t 1.0	52.72
1'	CH	4.450	d 7.9	103.71
2'	CH	3.343	d 7.9 / d 9.2	74.06
3'	CH	3.551	d 9.2 / d 8.9	87.90
4'	CH	3.417	d 8.9 / d 9.8	69.98
5'	CH	3.347	d 9.8 / d 2.2 / d 5.6	77.78 ^a
6'	CH ₂	3.892	d 2.2 / d 11.9	62.65
		3.705	d 5.6 / d 11.9	
1''	CH	4.547	d 7.9	105.23
2''	CH	3.263	d 7.9 / d 9.2	75.48
3''	CH	3.374	d 9.2 / d 8.9	77.72 ^a
4''	CH	3.268	d 8.9 / d 9.8	71.54
5''	CH	3.322	d 9.8 / d 2.3 / d 6.4	78.17
6''	CH ₂	3.882	d 2.3 / d 11.9	62.62
		3.632	d 6.4 / d 11.9	

^a Signale austauschbar

4. Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, aus Fraktionen von Wasser- und Methanolextrakten des Rhizoms von *Metaxya rostrata* sowie aus einer Fraktion eines Ethylacetatextraktes der Seitenwurzeln Reinsubstanzen zu isolieren.

Die Isolierung von (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropyl- β -glucopyranosid (KK1) aus methanolischen Extrakten des Rhizoms stellte das Hauptziel dar. KK1 war bereits in einer vorangegangenen Dissertation ^[2] als ein Hauptinhaltsstoff des Rhizoms identifiziert und strukturell aufgeklärt worden. KK1 wurde auf verschiedene biologische Aktivitäten (wie zum Beispiel Zytotoxizität) getestet, zeigte jedoch keine Wirksamkeit (siehe Kap. 1, S. 1 f.).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte geklärt werden, ob KK1 erst nach Abspaltung des Zuckerrestes biologisch wirksam wird.

Dazu wurden insgesamt etwa 280 mg KK1 aus Fraktionen von Wasser- und Methanolextrakten des Rhizoms isoliert und anschließend mit β -Glucuronidase enzymatisch hydrolysiert (siehe Kap. 3.7, S. 40 ff.).

Nach einer ersten enzymatischen Hydrolyse wurde im Anschluss eine Auftrennung des Hydrolysats mittels SC an Kieselgel durchgeführt. Die Abspaltung des Zuckerrestes führte jedoch zu einer erheblichen Labilität des Cyclopropanrings und zur Oxidation zum Aldehyd durch Säurespuren in der stationären Phase der SC (siehe Kap. 3.7.4, S. 46 f.).

Bei einer zweiten enzymatischen Hydrolyse wurde auf eine weitere Auftrennung des Hydrolysats verzichtet. Es wurde das Aglykon (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropanol erhalten, die unerwünschte Ringöffnung erfolgreich vermieden.

Ein Zytotoxizitätstest an SW480 Zellen bestätigte die Annahme, dass das Aglykon stärker aktiv ist als das Glykosid (siehe Kap. 3.7.7, S. 49 f.).

Zusätzlich wurden aus Fraktionen von Wasser- und Methanolextrakten des Rhizoms mit Hilfe der Säulenchromatographie vier weitere Sammelfractionen

gewonnen, die unter Verwendung der beschriebenen mobilen Phasen jeweils eine Substanz in reiner Form zu erhalten schienen.

Diese vier Substanzen wurden als JB-1, JB-2, JB-3 und JB-4 bezeichnet.

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie konnte JB-1 als (6E)-6[2-(β -glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]-hexansäuremethylester und JB-3 als (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropyl-1 \rightarrow 3-diglucosid identifiziert werden (*siehe Kap. 3.8.1 und 3.8.2, S. 51 ff.*).

Aufgrund von Begleitsubstanzen und der geringen Mengen war eine Strukturaufklärung von JB-2 und JB-4 nicht möglich.

5. Zusammenfassung

Das getrocknete Rhizom des Baumfarns *Metaxya rostrata* wird in Costa Rica in Form einer wässrigen Suspension ethnomedizinisch zur Behandlung von Ulcera und Tumoren des Gastrointestinaltraktes eingesetzt ^[1].

Im Rahmen vorangegangener Dissertationen und Diplomarbeiten wurden bereits einige Inhaltsstoffe aus dem Baumfarn isoliert und auf zytotoxische Aktivität gegenüber Kolonkarzinomzelllinien getestet.

Auch das Methylencyclopropanglykosid (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropyl- β -glucopyranosid (KK1), einer der Hauptinhaltsstoffe im Rhizom von *Metaxya rostrata*, wurde auf biologische Aktivität getestet, zeigte bisher jedoch keine Wirksamkeit.

In der vorliegenden Diplomarbeit sollte geklärt werden, ob KK1 nach Abspaltung des Zuckerrestes biologisch wirksam wird.

Dazu wurde eine größere Menge KK1 mit Hilfe der Säulenchromatographie aus Fraktionen methanolischer Extrakte des Rhizoms isoliert und anschließend enzymatisch hydrolysiert. Das gewonnene Aglykon (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropanol zeigte im Zytotoxizitätstest an SW480 Zellen eine stärkere Wirksamkeit als KK1.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnten zwei weitere Methylencyclopropanglykosidderivate isoliert werden, die mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie als (6E)-6[2-(β -glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]-hexansäuremethylester (JB-1) und (2E)-2-(hydroxyhexyliden)-cyclopropyl-1 \rightarrow 3-diglucosid (JB-3) identifiziert wurden. Beide Substanzen sind neue Naturstoffe.

6. Summary

Suspensions of the dried rhizome from the tree fern *Metaxya rostrata* in water are used in Costa Rican ethnic medicine against intestinal ulcers and tumors ^[1].

Within the scope of several Ph.D. and diploma theses several compounds had been isolated and tested for their cytotoxic activity against colorectal carcinoma cells.

The methylcyclopropanglycoside (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropyl- β -glucopyranoside (KK1), one of the major components of the rhizome of *Metaxya rostrata*, was tested in several assays for its biological activity, but remained without effects.

The objective of this thesis was to clarify whether KK1 would turn active after removal of the sugar.

Therefore a higher amount of KK1 was isolated from water and methanol extracts of the rhizome by column chromatography followed by enzymatic hydrolysis. The obtained aglycon (2E)-2-(hydroxyhexyliden)cyclopropanol showed a stronger cytotoxicity on SW480 cells as compared to KK1.

Within the scope of this thesis two further methylcyclopropanglycosides were obtained, which were identified as (6E)-6[2-(β -glucopyranosyloxy)-cyclopropylidene]-hexanoicmethylester (JB-1) and (2E)-2-(hydroxyhexylidene)cyclopropyl-1 \rightarrow 3-diglucoside (JB-3) by NMR spectroscopy and mass spectrometry. Both are new natural compounds.

7. Abkürzungsverzeichnis

AASS	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
DC	Dünnschichtchromatographie
DDA	Data-dependent acquisition
ESI	Elektronenspray Ionisation
EtAc	Ethylacetat
Extr.	Extrakt
f./ff.	folgende
FM	Fließmittel
Fr	Front
HPLC	High performance liquid chromatography
Kap.	Kapitel
LC	Liquid chromatography
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NR/PEG	Naturstoffreagens A/Polyethylenglykol 400
RP	Reversed Phase
S.	Seite
SC	Säulenchromatographie
SF	Sammelfraktion
SPE	Solid Phase Extraction
St	Start
Tab.	Tabelle
VLC	Vacuum Liquid Chromatography

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Metaxya rostrata</i> (C.Presl) ^[2]	1
Abbildung 2: Pflanzenmaterial von <i>Metaxya rostrata</i> ^[2]	3
Abbildung 3: Strukturformel von KK1	3
Abbildung 4: Strukturformel von KK5	4
Abbildung 5: Übersicht der Fraktionen des Wasserextraktes	6
Abbildung 6: Übersicht der Fraktionen des Methanolextraktes	7
Abbildung 7: Sandwichkammer (Firma Desaga)	8
Abbildung 8: SPE Kammer mit Kartuschen	10
Abbildung 9: DC der neun Fraktionen, Detektion mit AASS	14
Abbildung 10: DC der Fraktion 541-670, links Detektion mit NR/PEG, rechts Detektion mit AASS	15
Abbildung 11: DC der SF der SC 1, Detektion mit AASS.....	18
Abbildung 12: DC der SF der SC 2, Detektion mit AASS.....	20
Abbildung 13: Vergleich der SF 15 mit Sacchariden, Detektion mit AASS	21
Abbildung 14: DC der SF der SC 3, Detektion mit AASS.....	23
Abbildung 15: DC der SF der SC 4, Detektion mit AASS.....	25
Abbildung 16: Vergleich der SF 12 mit Sterolen, Detektion mit AASS.....	26
Abbildung 17: DC der SF der SC 5, Detektion mit AASS.....	29
Abbildung 18: DC der SF der SC 6, Detektion mit AASS.....	32
Abbildung 19: DC-Vergleich von SF 16 und SF 17 mit KK5, Detektion mit AASS	33
Abbildung 20: DC der SF der SC 7, Detektion mit AASS.....	35
Abbildung 21: DC der SF der SC 8, Detektion mit AASS.....	36
Abbildung 22: Vergleich der SF 3 mit Stigmasterol, Detektion mit AASS	37
Abbildung 23: DC der Fraktionen der SPE 1, Detektion mit NR/PEG	39
Abbildung 24: DC der Eindampfrückstände nach Hydrolyse von KK1, Detektion mit AASS	41
Abbildung 25: DC des Eindampfrückstands nach Hydrolyse von KK1, Detektion mit AASS	42
Abbildung 26: DC der SF der SC 9, Detektion mit AASS.....	45

Abbildung 27: Strukturformel von Aldehyd A und B..... 46
Abbildung 28: Strukturformel von Hydrolysat C 49
Abbildung 29: Überlebensrate der SW480 Zellen im Neutralrot-Assay ^[2] 50
Abbildung 30: Strukturformel von JB-1 51
Abbildung 31: Strukturformel von JB-3 53

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sammelfractionen der SC 1	17
Tabelle 2: Sammelfractionen der SC 2	19
Tabelle 3: Sammelfractionen der SC 3	22
Tabelle 4: Sammelfractionen der SC 4	24
Tabelle 5: Sammelfractionen der SC 5	28
Tabelle 6: Sammelfractionen der SC 6	31
Tabelle 7: Sammelfractionen der SC 7	34
Tabelle 8: Sammelfractionen der SC 8	36
Tabelle 9: Sammelfractionen der SC 9	44
Tabelle 10: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Aldehyd A und B	47
Tabelle 11: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Hydrolysat C	49
Tabelle 12: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von JB-1	52
Tabelle 13: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von JB-3	53

10. Literaturverzeichnis

- [1] Virtbauer J, Krenn L, Kählig H, Hübner A, Donath O, Marian B. Chemical and pharmacological investigations of *Metaxya rostrata*. Zeitschrift für Naturforschung. 2008; 63c: 469-475
- [2] Kainz K. Phytochemical Investigation and Bioactivity-guided Isolation of Cytotoxic Compounds from *Metaxya rostrata*. Dissertation, Universität Wien. 2011
- [3] Virtbauer J. Bioassay-guided chemische Untersuchungen von tropischen Arzneipflanzen. Dissertation, Universität Wien. 2007
- [4] Pemmer T. Phytochemische Untersuchungen der Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata*. Diplomarbeit, Universität Wien. 2011
- [5] Schmidt N. Phytochemische Untersuchung der Sekundärstoffe in Wurzeln von *Metaxya rostrata*. Diplomarbeit, Universität Wien. 2012
- [6] Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Springer-Verlag Berlin. 1983
- [7] Reznicek G, Susman O, Böhm K. Bestimmung der Reihenzugehörigkeit von Monosacchariden aus pflanzlichen Glykosiden mittels GC-MS. Scientia Pharmaceutica. 1993; 61, 35-45

11. Curriculum vitae

Name: Johanna Bleier

Geburtsdatum und -ort: 23.01.1987, Braunau am Inn

Staatsangehörigkeit: Österreich

Familie: DI Dr. Johann Bleier
Gabriele Bleier
Schwester Mag. Martina Bleier

Ausbildung

1993-1997 Volksschule Mining
1997-2001 Gymnasium Braunau
2001-2006 Höhere Lehranstalt für wirtschaftliche Berufe
Braunau
Juni 2006 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg
seit Oktober 2007 Pharmaziestudium an der Universität Wien
März 2011-Juni 2011 Praktische Arbeit der Diplomarbeit am Department
für Pharmakognosie der Universität Wien

Praktika

2008 Ferialpraxis in der Firma Österr. Vialit GmbH im
Bereich Synthese von Bindemitteln auf Basis
nachwachsender Rohstoffe
2009 Ferialpraktikum in der Stadtapotheke Altheim
2010 Ferialpraktikum in der Anstaltsapotheke Kranken-
haus St. Josef, Braunau am Inn

12. Anhang

Abbildung 1: $^1\text{H-NMR}$ von Substanzgemisch K1 in MeOH-d_4

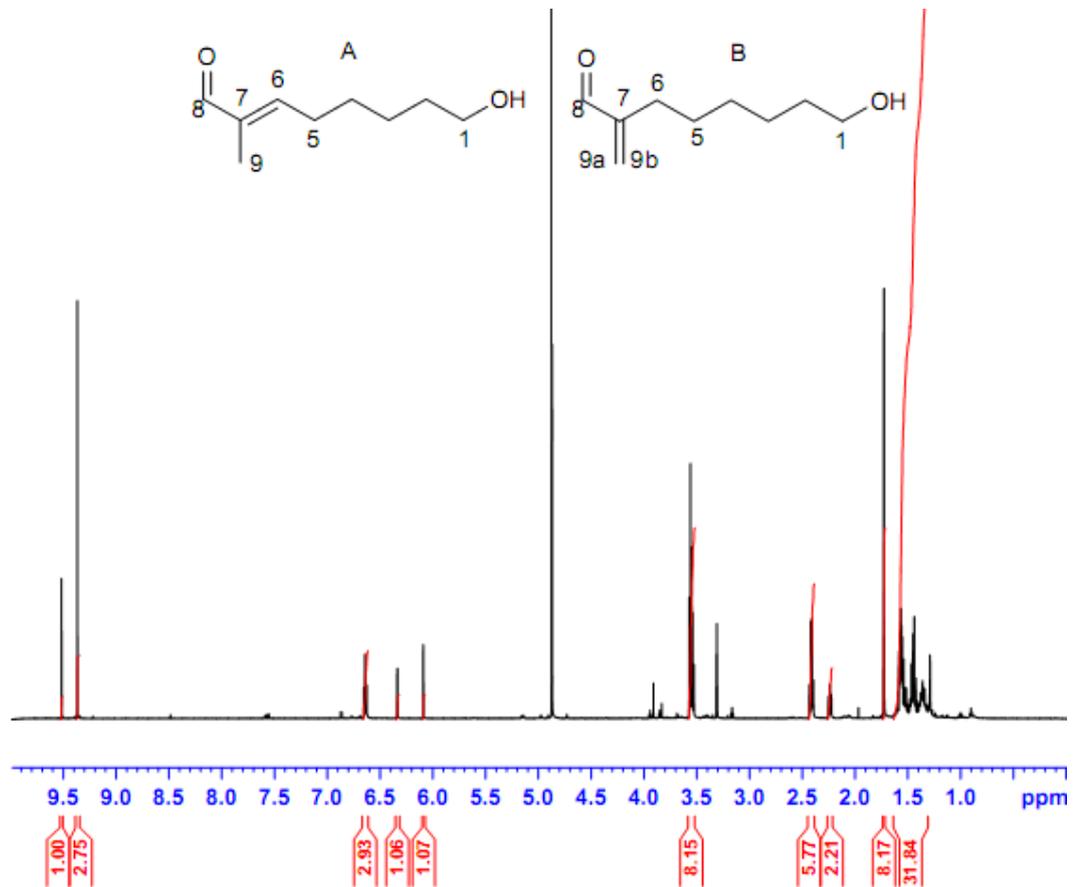


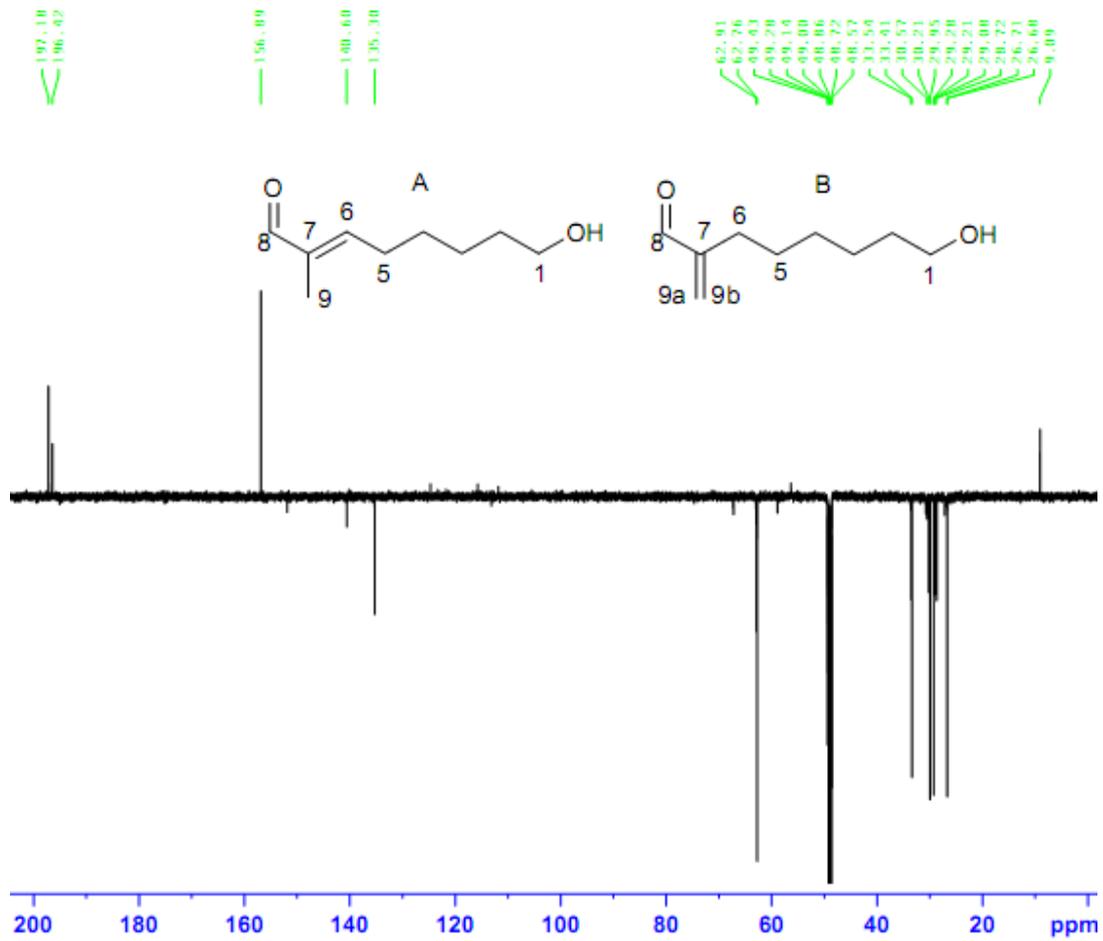
Abbildung 2: ^{13}C -NMR von Substanzgemisch K1 in MeOH-d_4 

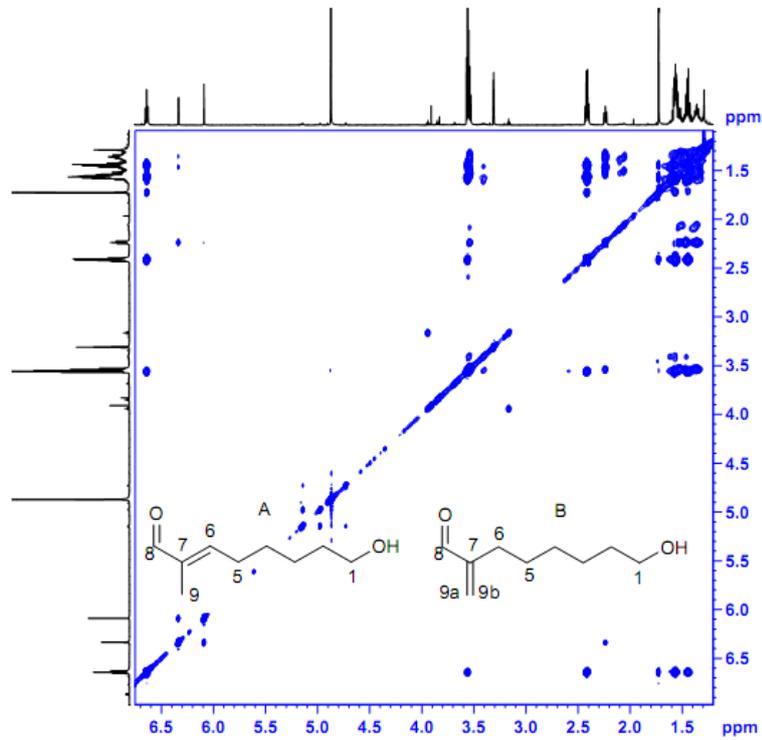
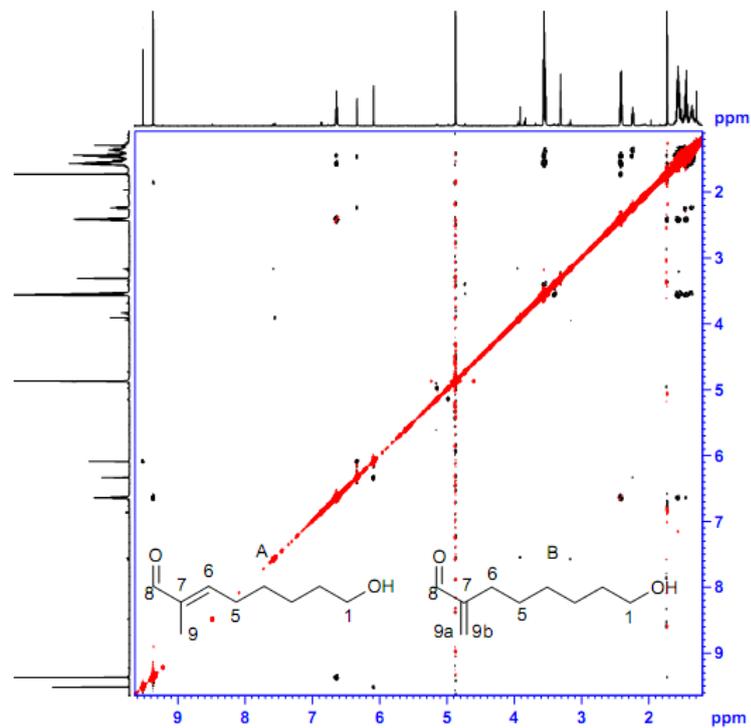
Abbildung 4: TOCSY-Spektrum von Substanzgemisch K1 in MeOH-d₄Abbildung 5: NOESY-Spektrum von Substanzgemisch K1 in MeOH-d₄

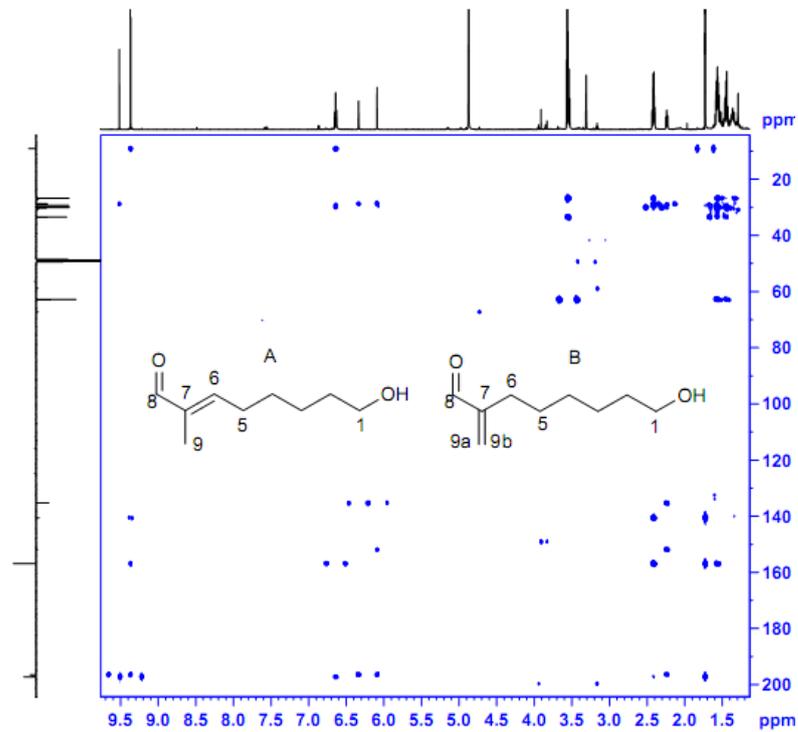
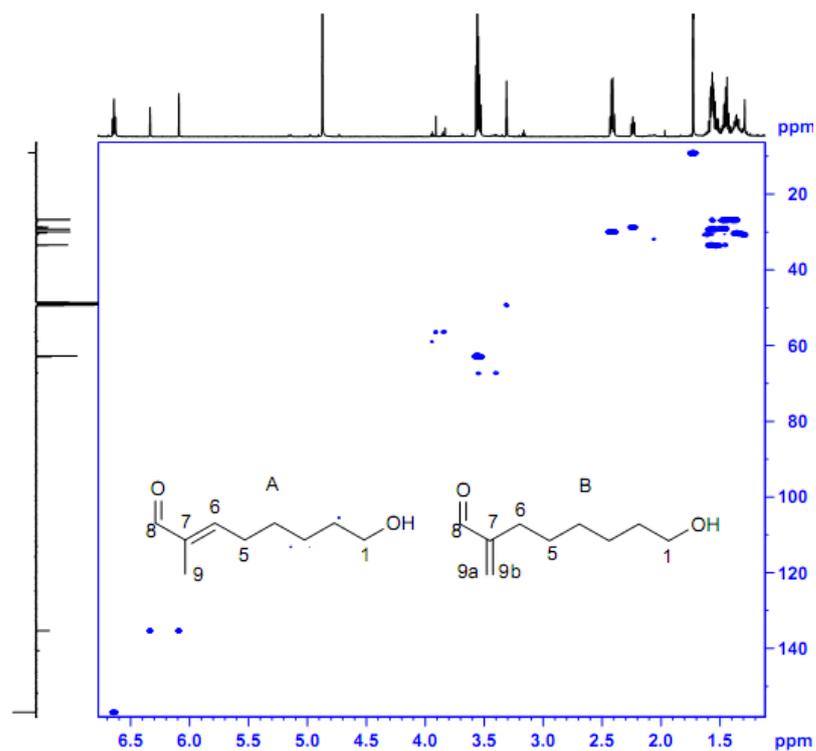
Abbildung 6: HMBC-Spektrum von Substanzgemisch K1 in MeOH-d₄Abbildung 6: HSQC-Spektrum von Substanzgemisch K1 in MeOH-d₄

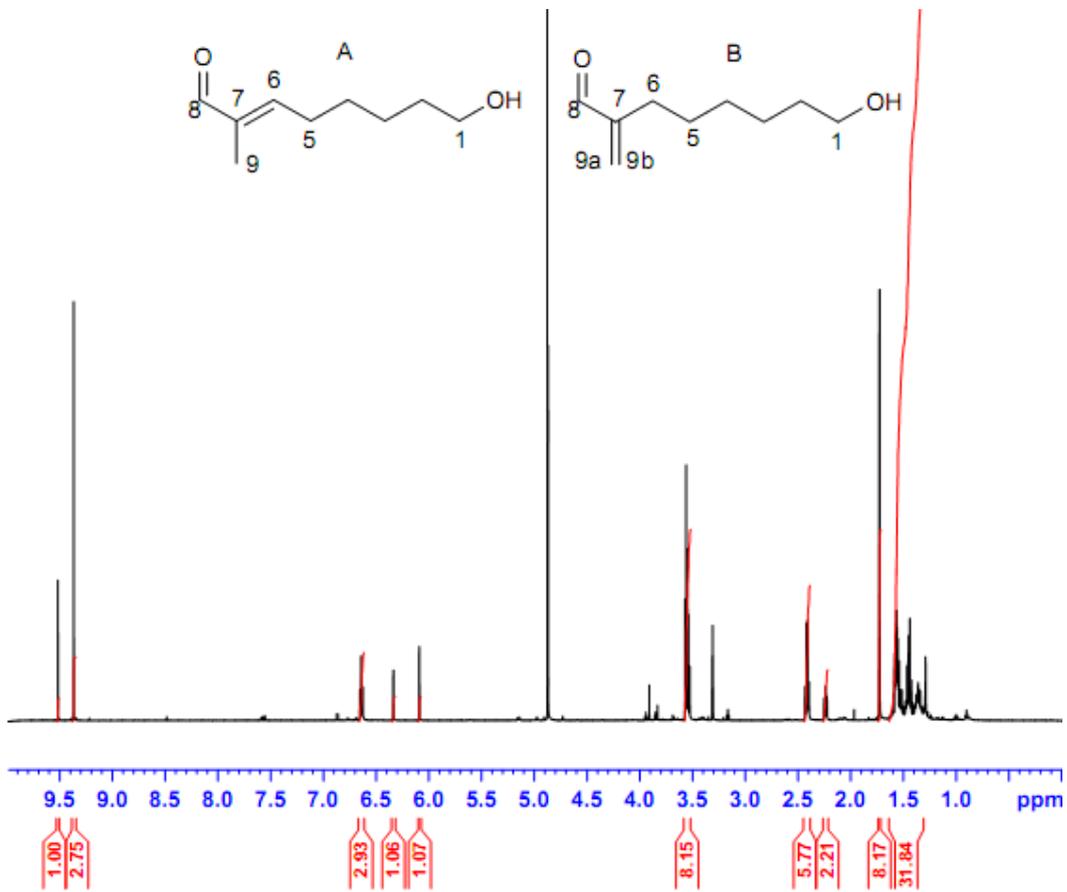
Abbildung 8: $^1\text{H-NMR}$ von Hydrolysat C in MeOH-d_4 

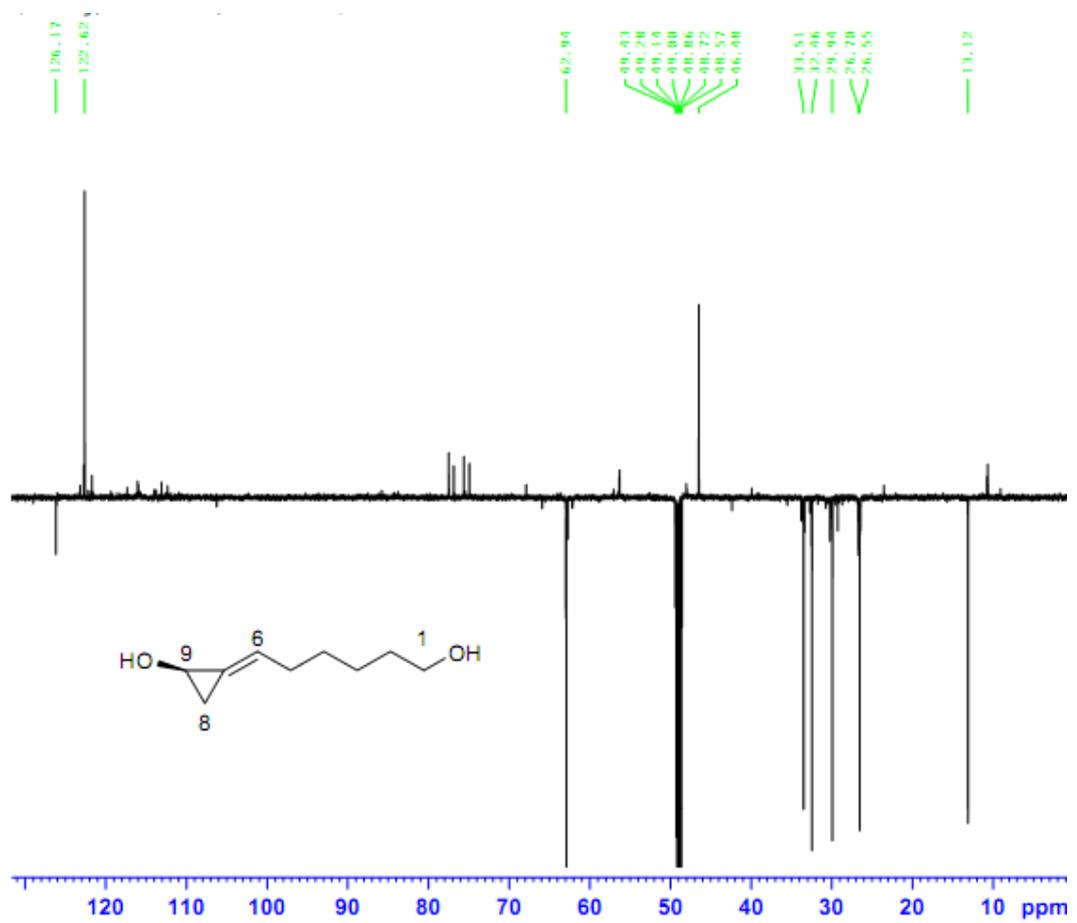
Abbildung 9: ^{13}C -NMR von Hydrolysat C in MeOH-d_4 

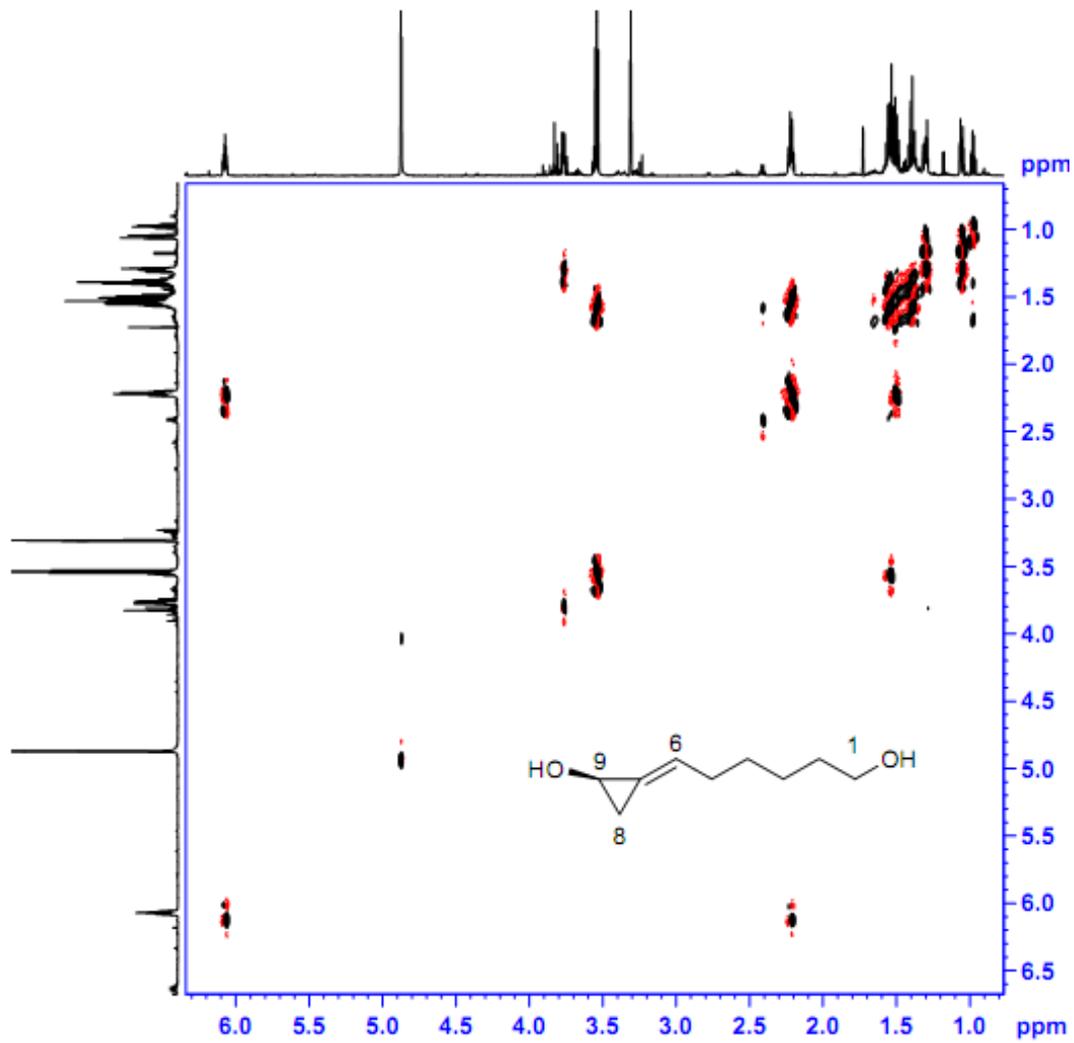
Abbildung 10: COSY-Spektrum von Hydrolysat C in MeOH-d₄

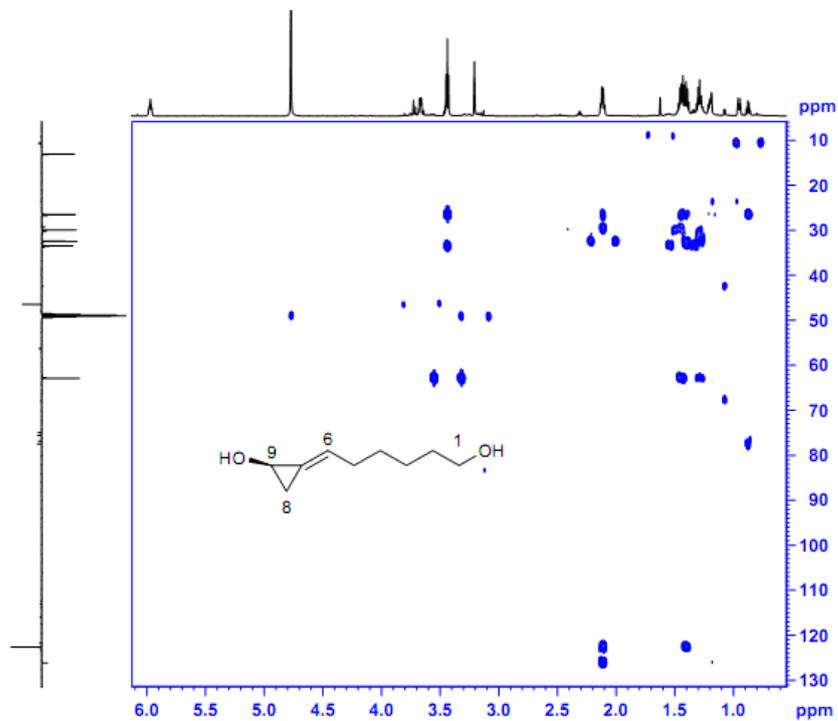
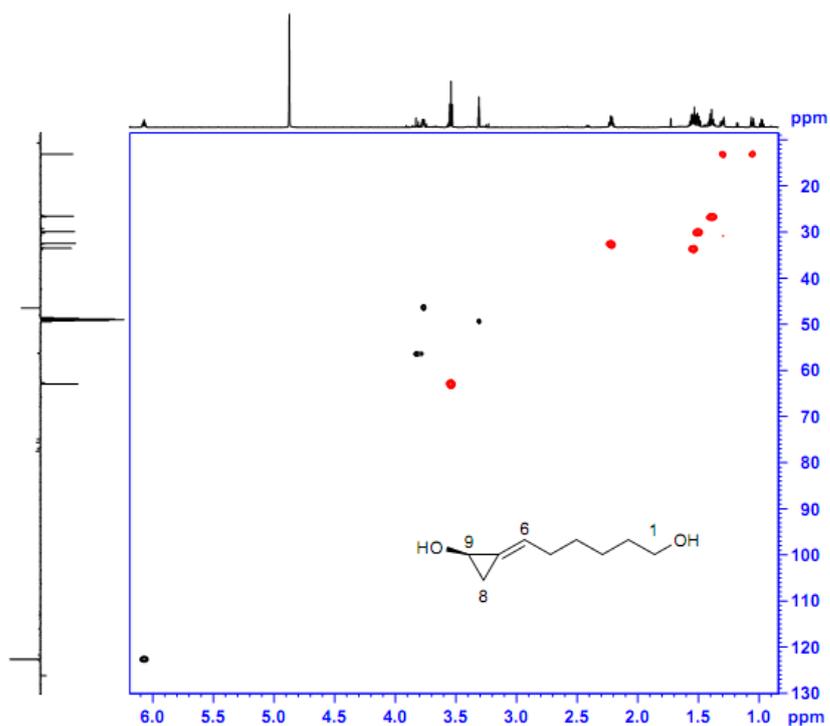
Abbildung 11: HMBC-Spektrum von Hydrolysat C in MeOH-d₄Abbildung 12: HSQC-Spektrum von Hydrolysat C in MeOH-d₄

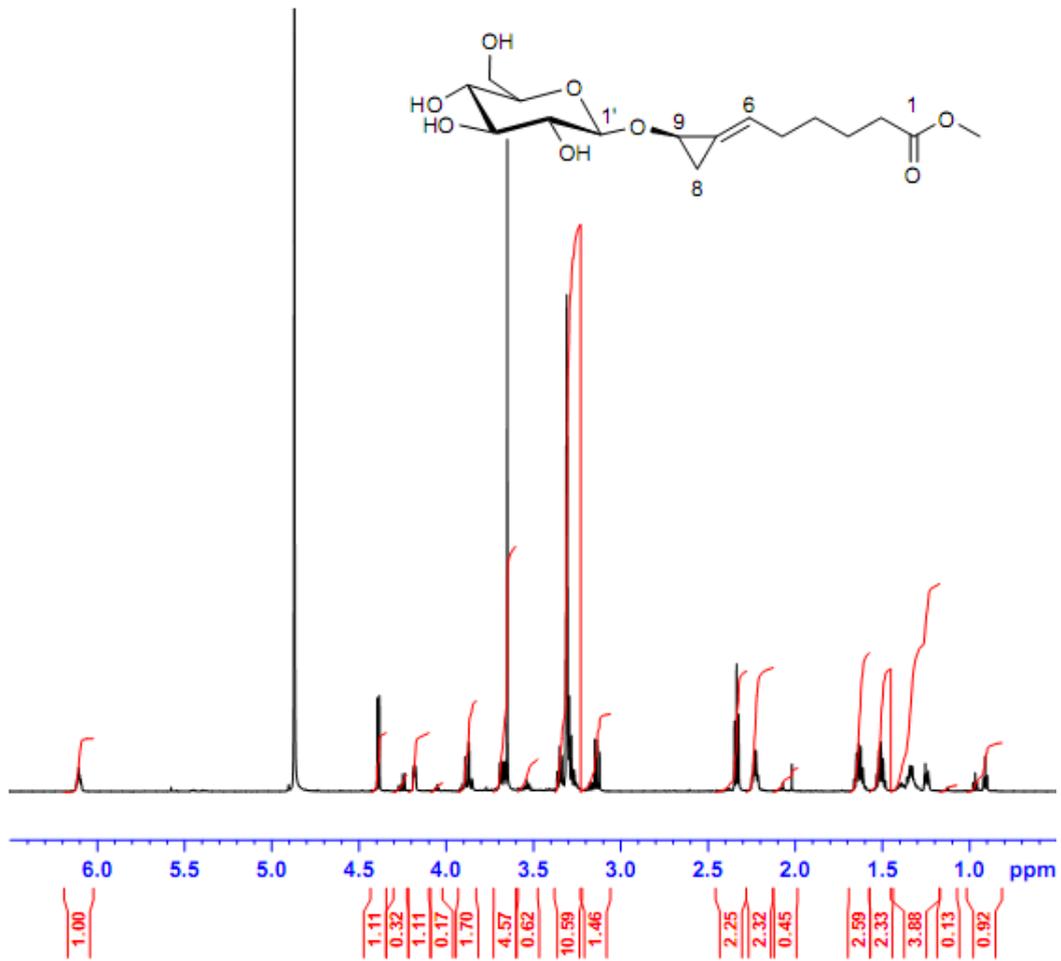
Abbildung 13: $^1\text{H-NMR}$ von Substanz JB-1 in MeOH-d_4 

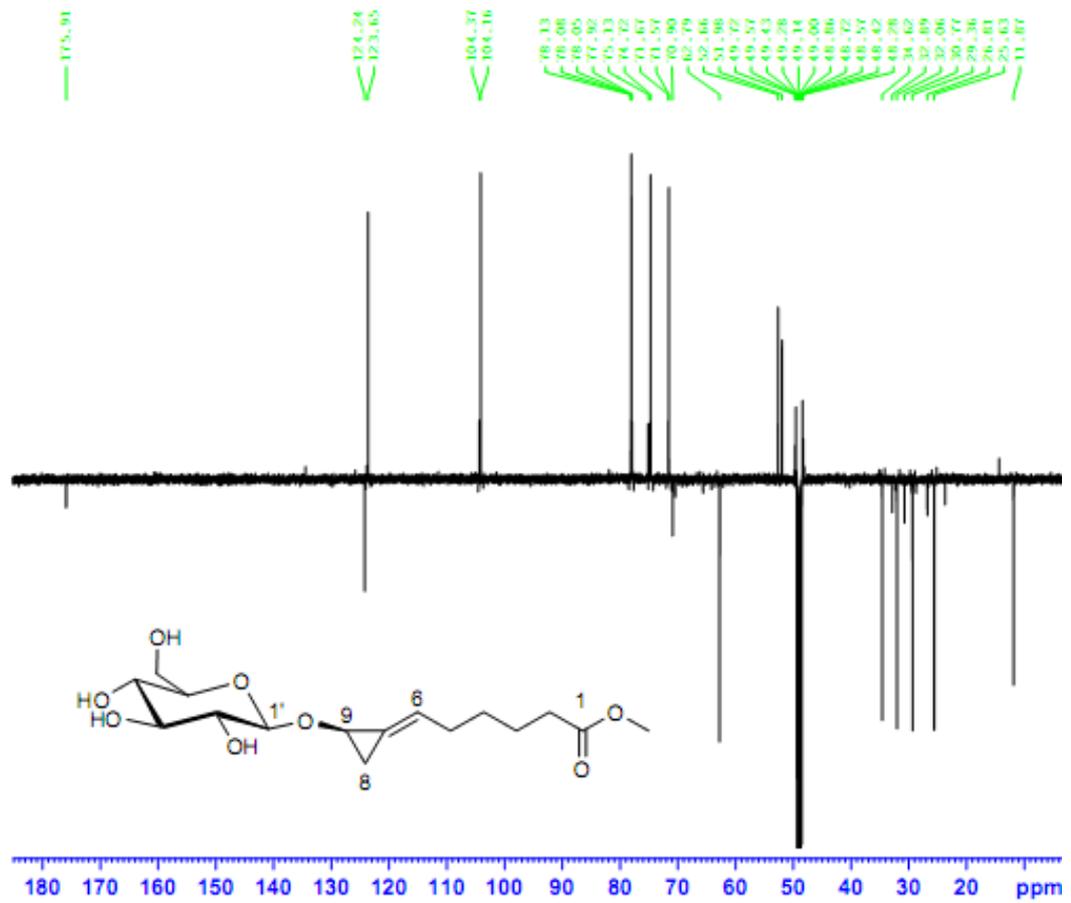
Abbildung 14: ^{13}C -NMR von Substanz JB-1 in MeOH-d_4 

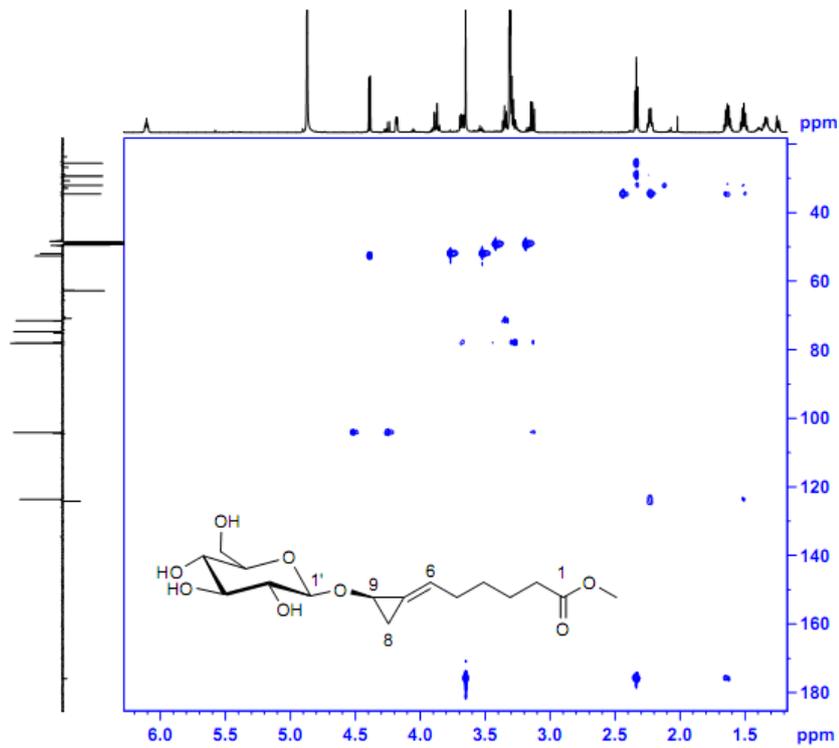
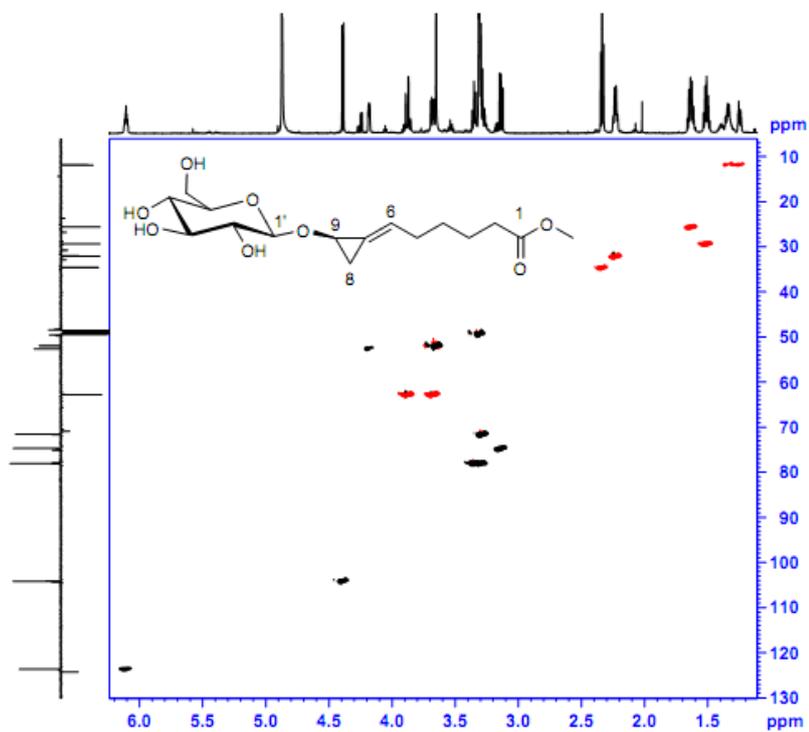
Abbildung 15: HMBC-Spektrum von Substanz JB-1 in MeOH-d₄Abbildung 16: HSQC-Spektrum von Substanz JB-1 in MeOH-d₄

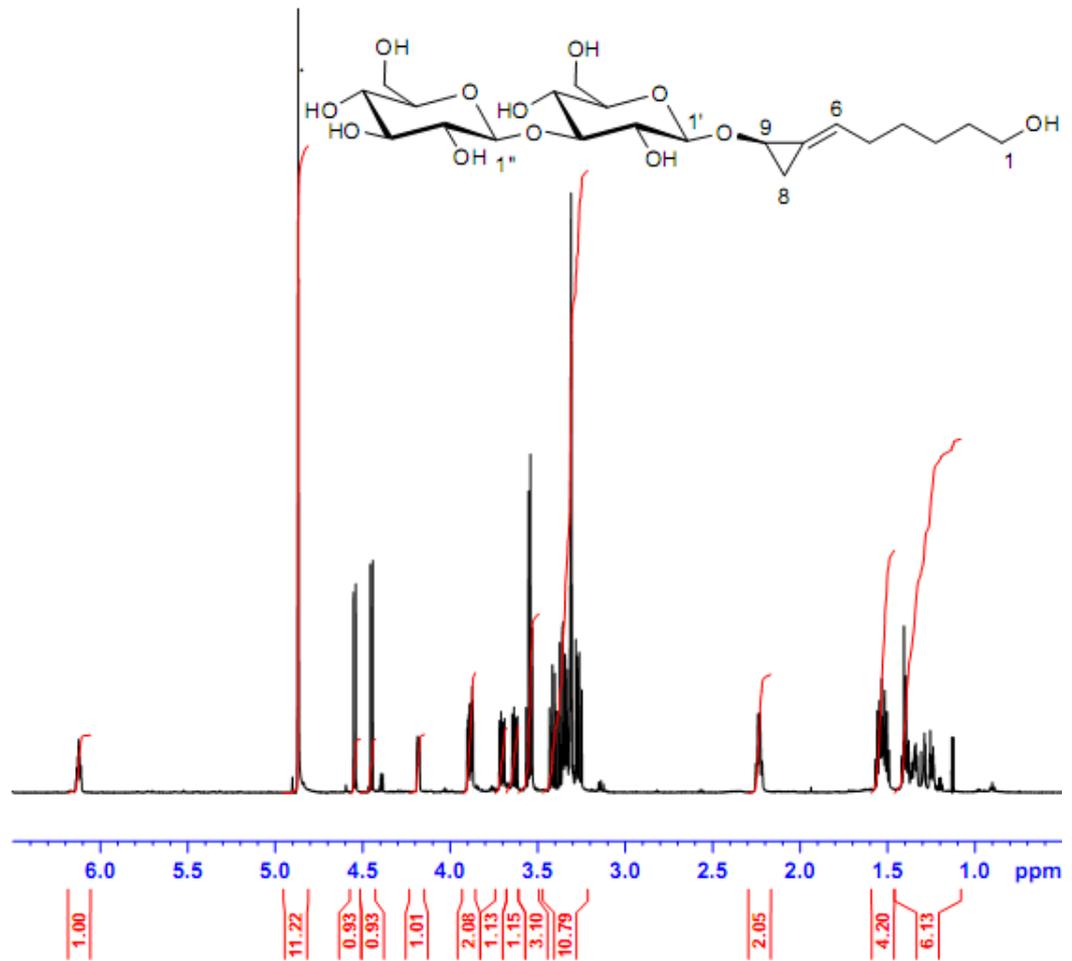
Abbildung 17: $^1\text{H-NMR}$ von Substanz JB-3 in MeOH-d_4 

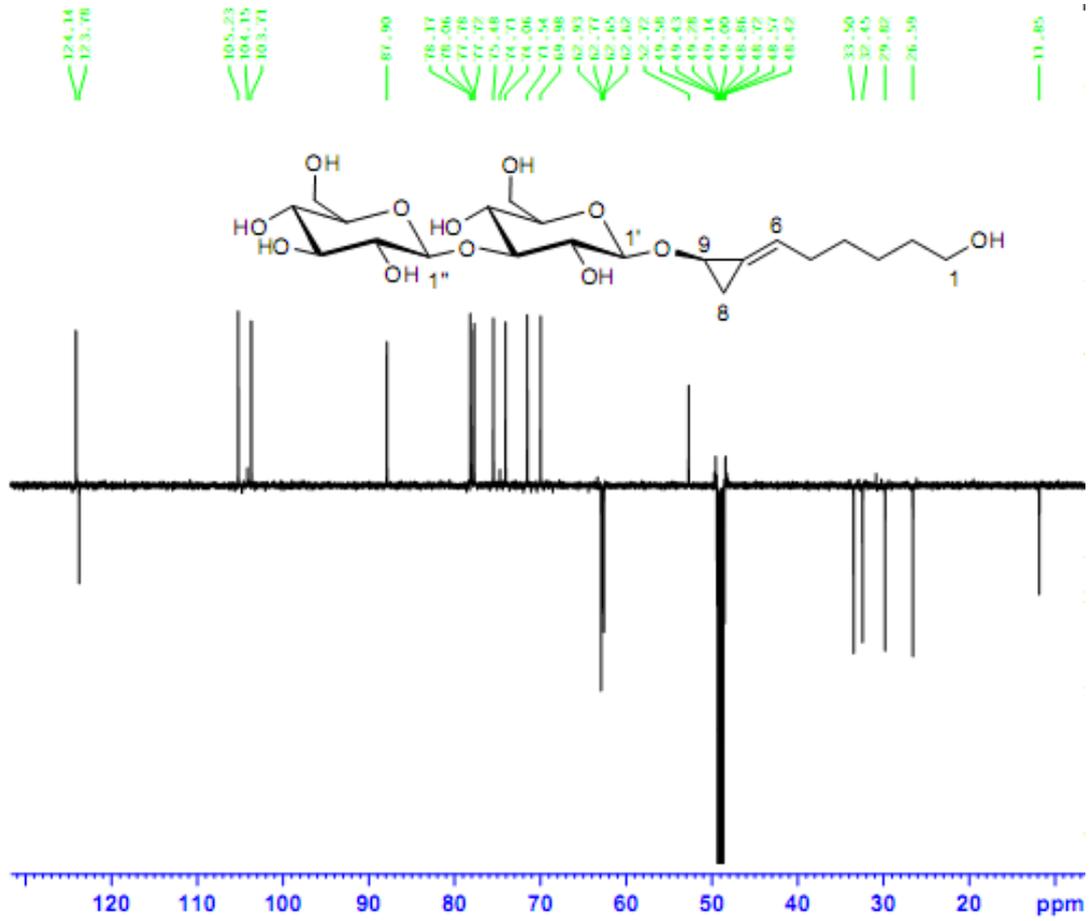
Abbildung 18: ^{13}C -NMR von Substanz JB-3 in MeOH-d_4 

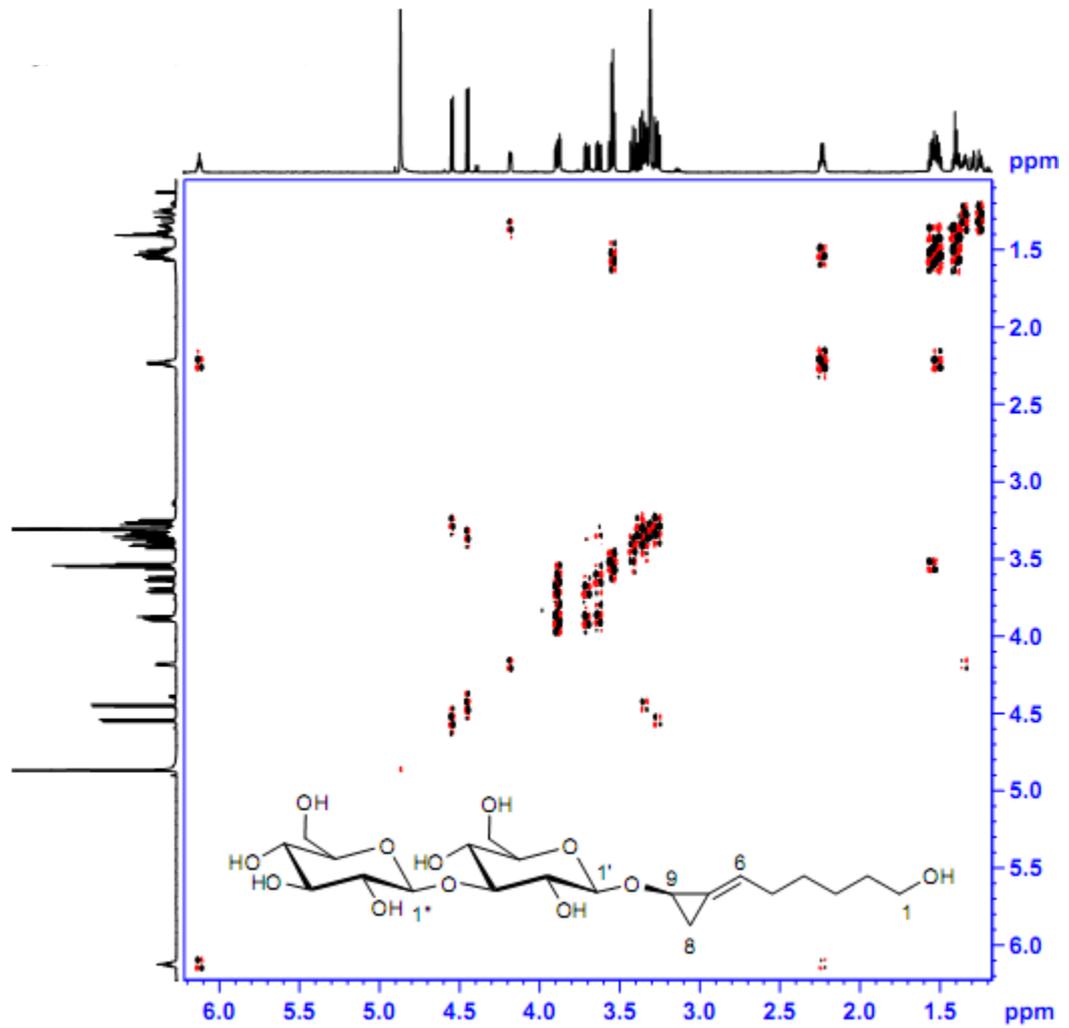
Abbildung 19: COSY-Spektrum von Substanz JB-3 in MeOH-d₄

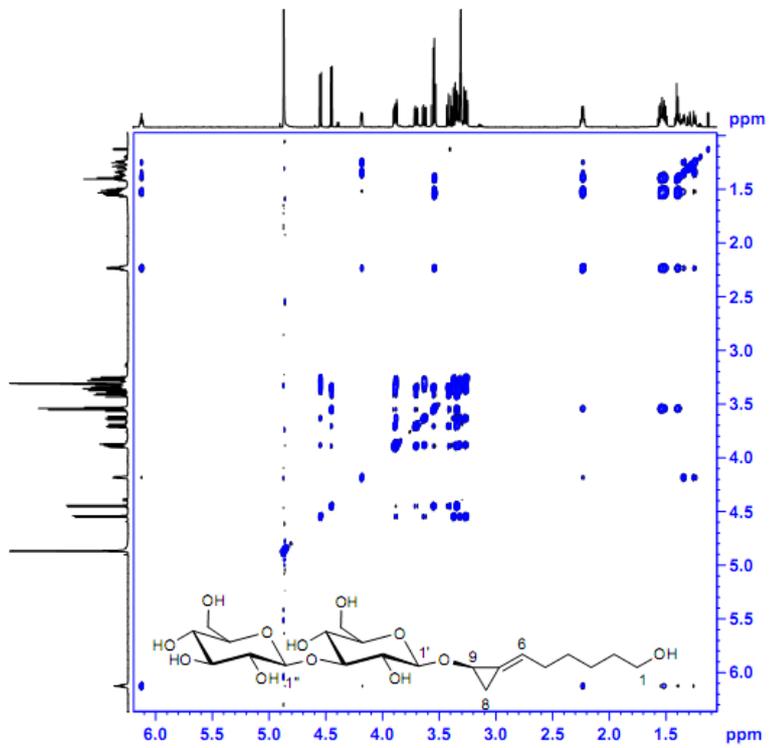
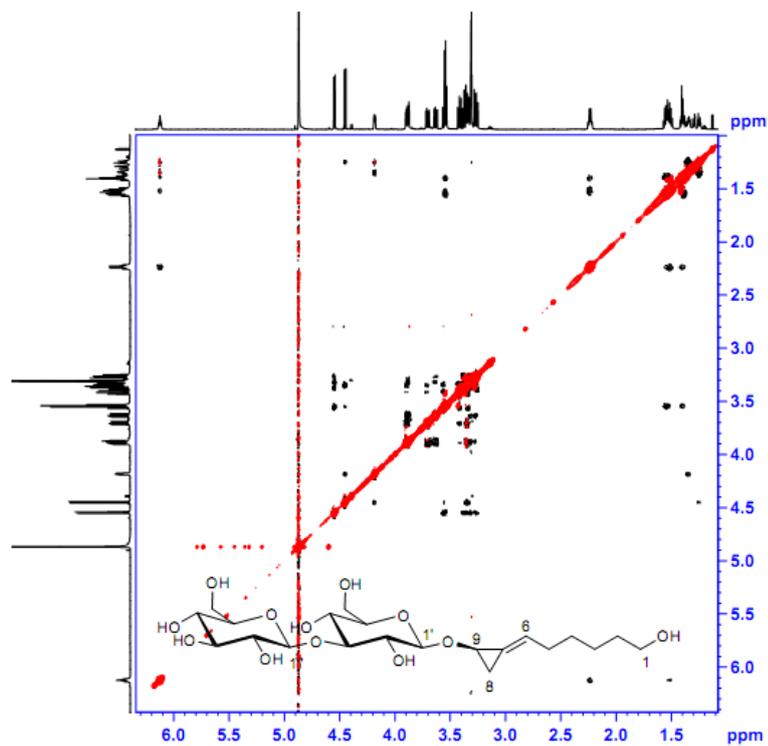
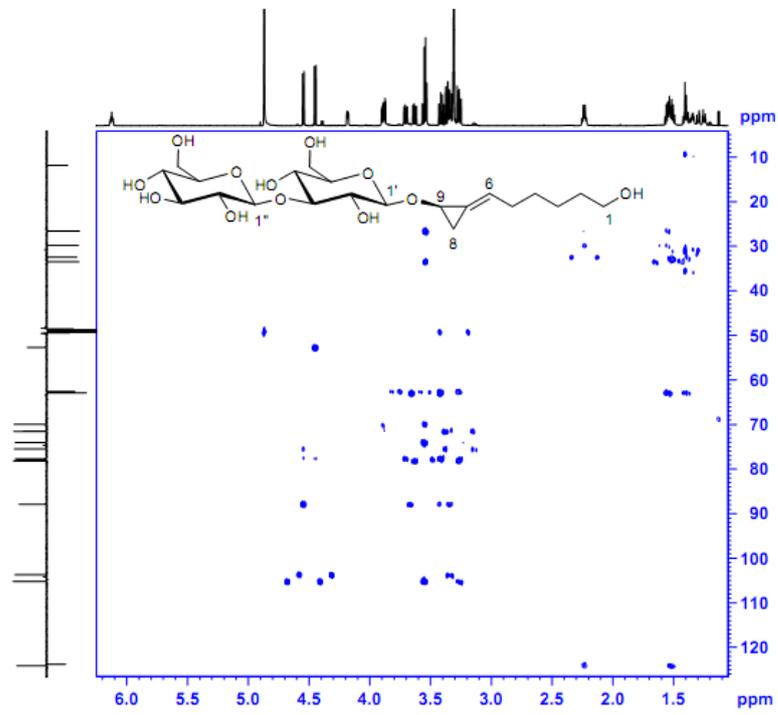
Abbildung 20: TOCSY-Spektrum von Substanz JB-3 in MeOH-d₄Abbildung 20: NOESY-Spektrum von Substanz JB-3 in MeOH-d₄

Abbildung 21: HMBC-Spektrum von Substanz JB-3 in MeOH-d₄Abbildung 22: HSQC-Spektrum von Substanz JB-3 in MeOH-d₄