



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Analyse phenolischer Inhaltsstoffe von *Drosera peltata* mittels narrow bore HPLC

Verfasserin

Sonja Fischer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

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

Danksagung

Dem Vorstand des Departments für Pharmakognosie, Frau Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch, danke ich vielmals für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Bei Frau a.o. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn möchte ich mich herzlich für die nette Zusammenarbeit, die sehr gute Betreuung bei allen Fragen und Problemen, wie auch für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Weiters danke ich Herrn Dr. Hamid-Reza Adhami und Frau Dr. Kerstin Kainz für ihre Hilfe während meines praktischen Arbeitens.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Andrea und Josef Fischer, die mir dieses Studium ermöglichten und mich während dieser Jahre immer unterstützten.

Abkürzungsverzeichnis

2-GH	2“-Galloylhyperosid
8-OH-K	8-Hydroxykämpferol
8-OH-K-7-O-G	8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid
AcCN	Acetonitril
A	Peakfläche
DME.....	Dimethylellagsäure
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
EW.....	Einwaage
Fl	Flavonoid
f _K	Standardkorrekturfaktor
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IQ.....	Isoquercitrin
M-3-O-G	Myricetin-3-O-galaktosid
MeOH	Methanol
MG.....	Molekulargewicht
Qu-7-O-G.....	Quercetin-7-O-glucosid
RSD	Relative Standard Deviation
St	Standard
Stabwn.....	Standardabweichung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden.....	4
2.1. Pflanzenmaterial und Referenzsubstanzen	4
2.2. Extraktion der Droge	6
2.3. Herstellung und Aufreinigung der Trockenextrakte	6
2.4. Hochleistungsflüssigchromatographie	8
3. Ergebnisse und Diskussion	9
3.1. Optimierung einer RP-HPLC-Methode für <i>Drosera peltata</i>	9
3.2. Validierung der Methode	13
3.2.1. Eichung mit internem Standard	13
3.2.2. Reproduzierbarkeit	34
3.2.3. Bestimmungs- und Nachweisgrenze	36
3.2.4. Wiederfindungsraten	37
3.3. Flavonoidmuster und -gehalt in <i>Drosera peltata</i>	39
3.3.1. Flavonoide in <i>Drosera peltata</i> Handelsmustern.....	39
3.3.2. Flavonoide in Mustern von <i>Drosera peltata</i> aus der <i>in vitro</i> Kultivierung ..	45
3.4. HPLC-Überprüfung der Extrakte für LC-NMR	51
3.4.1. <i>Drosera binata</i>	51
3.4.2. <i>Drosera hilaris</i>	52
3.4.3. <i>Drosera peltata</i>	54
3.5. Entwicklung einer HPLC-Methode für <i>Drosera hilaris</i>	55

4. Zusammenfassung.....	60
5. Quellenangabe	63
6. Tabellen und Abbildungsübersicht	65
6.1. Tabellenübersicht	65
6.2. Abbildungsübersicht	67
ANHANG: UV-Spektren der Phenole	69

1. Einleitung und Problemstellung

Die Familie der Droseraceae wurde lange Zeit in die vier Gattungen *Drosophyllum*, *Dionaea*, *Aldrovanda* und *Drosera* eingeteilt [1].

Die Gattung *Drosera*, der Sonnentau, umfasst um die 150 meistens ausdauernde Arten [2, 3]. Sie kommen weltweit vor und sind vor allem auf der südlichen Hemisphäre in Australien, Afrika und Südamerika am stärksten vertreten. In Europa sind drei Arten einheimisch: *Drosera rotundifolia* L., *Drosera intermedia* HAYNE und *Drosera anglica* HUDSON [4].

Vor allem *Drosera rotundifolia* wurde seit dem siebzehnten Jahrhundert als Herba Droserae häufig zur Behandlung von Keuchhusten oder Krampfhusten eingesetzt [5], wobei die getrockneten, blühenden, oberirdischen Pflanzenteile verwendet werden [6].

Da jedoch die europäischen Arten aufgrund der Einengung ihres Lebensraumes vom Aussterben bedroht sind, werden andere Arten, zurzeit vor allem *Drosera madagascariensis* DC. für pharmazeutische Zwecke verwendet. Auch die asiatische Art *Drosera peltata* SMITH dient als Ersatz [4]. Allerdings führt die exzessive Sammlung dieser Arten aus Wildvorkommen auch bereits zu Engpässen und das Drogenmaterial enthält niedrige Wirkstoffkonzentrationen [7, 8].

Der Sonnentau wächst auf nährstoffarmen, feuchten Böden wie Torf in Mooregebieten. Es ist eine fleischfressende Pflanze, die notwendige Nährstoffe, vor allem Stickstoff und Phosphor, aus gefangenen Insekten gewinnt [9].

Drosera hat aktive Klebefallen, wobei die Beute mit beweglichen Drüsenhaaren, die auf der Blattoberseite vorhanden sind, gefangen wird [10] (siehe Abbildung 1, S. 2).

Die Evolution der Blätter mit Fallensystem aus Blättern, die nicht fleischfressend sind, ist bisher ungeklärt und es gibt keine allgemein akzeptierten Hypothesen. Die aktiven Klebefallen könnten sich aber aus einem normalen Blatt mit klebrigen Drüsen entwickelt haben [2].

Abbildung 1: *Drosera peltata* [11]



Die wichtigsten pharmakologisch aktiven Inhaltsstoffe in Herba Droserae sind Naphthochinone, Phenolcarbonsäurederivate und Flavonoide. Lange Zeit wurden die Effekte von Sonnentau den Naphthochinonen, vor allem 7-Methyljuglon und Plumbagin zugeschrieben, die für viele *Drosera* Arten charakteristisch sind [12, 13].

Es zeigten jedoch mehrere Studien, dass die Handelsware der Droge Naphthochinone nur in Spuren enthält [7, 14].

In aktuellen in-vitro Studien wurde nachgewiesen, dass die antiphlogistische und spasmolytische Wirkung eines ethanolischen Extraktes von *Drosera madagascariensis* im Zusammenhang mit den enthaltenen Flavonoiden steht [15].

Die Inhaltsstoffe von *Drosera peltata* wurden bisher wenig untersucht, wobei neben Naphthochinonen vor allem die Flavonoide Quercetin, Gossypetin, Gossypin und Isogossypitrin beschrieben wurden [16]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher das Muster polarer Phenole in *Drosera peltata* eingehend untersucht werden.

Das Ziel der Diplomarbeit war es, eine optimierte HPLC-Methode für die Analyse von *Drosera peltata* zu entwickeln, um eine Auftrennung der phenolischen Inhaltsstoffe in möglichst kurzer Analysezeit zu erreichen. Außerdem sollte durch Verwendung einer narrow-bore Säule der Verbrauch an mobiler Phase vermindert werden.

Für eine exakte Quantifizierung der Inhaltsstoffe sollte die entwickelte Methode für die interne Standardisierung mit Saponarin geeicht werden. Die Wiederfindungsraten für mehrere Phenole und die Reproduzierbarkeit der Methode sowie die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für die einzelnen Analyten sollten für die Validierung der Methode bestimmt werden.

Mit der validierten Methode sollten die Inhaltstoffmuster von Handelsmustern von *Drosera peltata* analysiert werden und mit jenen von Drogenmustern aus der in-vitro Kultivierung verglichen werden.

Neben der Ausarbeitung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung der Flavonoide und Phenolcarbonsäurederivate in Extrakten aus *Drosera peltata*, sollte in der vorliegenden Arbeit auch eine HPLC-Trennung dieser Stoffe in *Drosera hilaris* CHAM. & SCHLECHTD. ausgearbeitet werden.

Zusätzlich sollten Extrakte verschiedener Drosera-Arten für LC-NMR-Untersuchungen hergestellt, aufgereinigt und analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial und Referenzsubstanzen

Es wurde folgendes Drogenmaterial von *Drosera peltata* für die Untersuchungen verwendet:

Aus dem Handel:

- 1) *Drosera peltata*: Paul Muggenburg GmbH&Co, Alveslohe, Typmuster 0583.11, Erntezeitpunkt 23.11.1994
- 2) *Drosera peltata*: Paul Muggenburg GmbH&Co, Alveslohe, Typmuster 0583.04, Erntezeitpunkt 17.6.1991
- 3) *Drosera peltata*: Paul Muggenburg GmbH&Co, Alveslohe, Typmuster 0583.07, Erntezeitpunkt 9.4.1992
- 4) *Drosera peltata*: Kräuterhof, Salzburg

Aus der *in vitro* Kultivierung am Department für Pharmakognosie der Universität Wien.¹

- 5) *Drosera peltata* Muster 143
- 6) *Drosera peltata* Muster 299 (luftgetrocknet)
- 7) *Drosera peltata* Muster 300 (lyophilisiert)
- 8) *Drosera peltata* (akklimatisiert von 10.7.1997 bis 8.9.1997)

¹ Herzlichen Dank an Ass. Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch für die zur Verfügung gestellten Pflanzenmuster.

Für die Validierung der HPLC Methode wurden folgende Referenzsubstanzen verwendet:

- Saponarin: Applichem Biochemica, Chemica Synthesis Services, Darmstadt, A5314,0020
- Quercetin: CHR, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. 7136
- Ellagsäure: Fluka BioChemika, Buchs Schweiz, 45140, 341423/1 995
- Gossypetin: Indofine Chemical Company, Hillsborough NJ, G-500 [489-35-0]
- Hyperosid: Rotichrom® CHR, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. 42151
- Myricitrin: Extrasynthese, Genay, France, Art. S:22-24/25
- Kämpferol: CHR, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. 3689559
- Isoquercitrin: Rotichrom® TLC, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. 5573.1
- Myricetin: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Art. 0461, Charge 4319569
- Gossypitrin: Die Substanz wurde freundlicherweise von Dr. P. Christen (Université de Genève, Laboratoire de chimie analytique pharmaceutique) zur Verfügung gestellt.

2.2. Extraktion der Droge

Die getrockneten oberirdischen Teile der Pflanze wurden zuerst pulverisiert (Sieb Nr. 4) und danach folgendermaßen extrahiert:

0,200 g Droge wurden mit 40 ml Methanol in einem Rundkolben am Wasserbad bei 70°C unter Rückfluss für 30 Minuten extrahiert.

Nach dem Abkühlen wurde in einen 50 ml Messkolben filtriert, dreimal mit jeweils 3 ml Methanol nachgewaschen und auf 50,00 ml aufgefüllt.

Als interner Standard wurde in DMSO gelöstes Saponarin (Konzentration: 0,20 mg/ml DMSO) verwendet, wobei 1 ml Drogenextrakt aus *Drosera peltata* mit 150 µl Saponarinlösung versetzt wurde.

Nach dem Zentrifugieren wurden 3 µl mittels HPLC vermessen.

2.3. Herstellung und Aufreinigung der Trockenextrakte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Trockenextrakte verschiedener *Drosera*-Arten hergestellt und für LC-NMR Untersuchungen aufgereinigt.

Die Trockenextrakte von *Drosera petiolaris* DC. und *Drosera binata* Labill. wurden wie folgt hergestellt:

2 g Droge wurden mit 15 ml Petrolether für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad extrahiert, um apolare Stoffe abzutrennen. Die Droge wurde abfiltriert, getrocknet und mit 200 ml Methanol für 30 Minuten bei 50°C am Ultraschallbad extrahiert. Danach wurde in einen Rundkolben filtriert, mit Methanol nachgespült und eingedampft. Das eingedampfte Filtrat wurde in einem weiteren Reinigungsschritt, um sehr polare Stoffe abzutrennen, mit 40 ml Wasser versetzt und im Scheidetrichter dreimal mit je 40 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die gesammelten Ethylacetatphasen wurden am Rotavapor eingedampft und im Exsiccator getrocknet.

Von den Arten *Drosera peltata*, *Drosera hilaris*, *Drosera binata*, *Drosera pygmaea* DC., *Drosera adelae* F. Muell. und *Drosera burmanni* Vahl standen methanolische, mit Ethylacetat aufgereinigte Extrakte zur Verfügung, aus denen mit Petrolether apolare Begleitstoffe entfernt wurden.

Dazu wurde jeweils der Trockenextrakt (0,2 g) in einem Rundkolben mit 5-6 ml Petrolether versetzt und 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 3.600 g zentrifugiert, danach der Überstand abdekantiert und das Präzipitat im Exsiccator getrocknet.

Die Petroletherfraktionen und die aufgereinigten Extrakte wurden mittels HPLC untersucht.

Für die Analysen wurden 0,3 mg der aufgereinigten Extrakte pro ml beziehungsweise 1 mg der Petroletherfraktion pro ml in Methanol gelöst. Nach Zentrifugation wurden 3 µl pro Lauf in die HPLC injiziert.

2.4. Hochleistungsflüssigchromatographie

System: SHIMADZU

Pumpe: LC-20AD

Detektor: SPD-M20A diode array detector, wavelength: 220-500 nm

Column oven: CTO-20AC

Auto injector: SIL-20AC

Stationäre Phase: Dionex Acclaim® 120 C18, 150 mm × 2,1 mm × 3 µm

Mobile Phase: A) H₂O mit CH₃COOH auf pH 2,8 eingestellt

B) Acetonitril (AcCN) mit 8 ml CH₃COOH/l

Gradient: Beginn mit 13% Phase B und 87% Phase A für 8 Minuten

bis zur Minute 40 Steigerung auf 40% B

Purge: 5 Minuten mit 100% B

Equilibrierung: 10 Minuten mit 13% B

Flussrate: 0,45 ml/min

Injektionsvolumen: 3 µl

Temperatur: 25°C

Detektion: 360 nm

Interner Standard: Saponarin

3. Ergebnisse und Diskussion

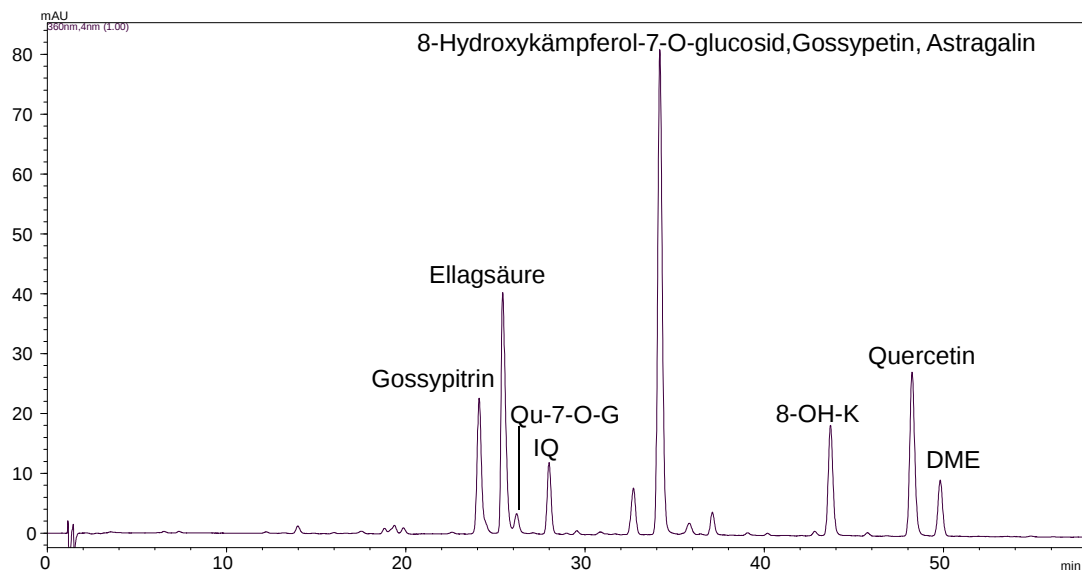
3.1. Optimierung einer RP-HPLC-Methode für *Drosera peltata*

Für *Drosera peltata* war in einer früheren Arbeit [17] eine HPLC-Methode für eine Hypersil BDS C18-Säule (4 x 250 mm, 5 µm) entwickelt worden. Die Methode führte jedoch zu teilweiser Koelution der Inhaltsstoffe. Da bei anderen medizinisch verwendeten *Drosera*-Arten eine Verkürzung der Analysezeit bei gleichzeitig verbesserter Auftrennung durch Verwendung einer narrow-bore Säule erreicht werden konnte [18], sollte ausgehend davon die HPLC-Methode für *Drosera peltata* angepasst werden. Dafür wurde als stationäre Phase ebenfalls eine Dionex Acclaim® 120 C18 Säule (150 mm × 2,1 mm, 3 µm) verwendet und die mobile Phase (H₂O mit CH₃COOH auf pH 2,8 eingestellt und Acetonitril mit 8 ml CH₃COOH/l) übernommen.

Zur Methodenentwicklung wurde ein Trockenextrakt verwendet. Es sollte eine Methode entwickelt werden, bei der Komponenten mit ähnlicher Polarität nicht koeluieren und zugleich die Elutionszeit aller relevanten Inhaltsstoffe möglichst kurz bleibt.

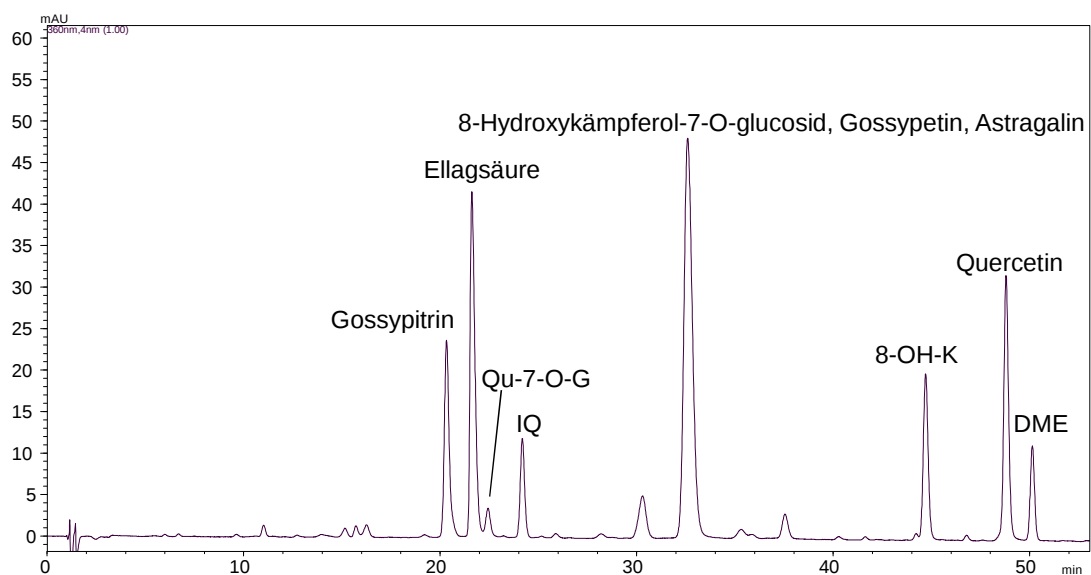
Es wurde zuerst eine relativ lange Elutionszeit gewählt um alle Einzelkomponenten getrennt zu erfassen. Dabei kam es jedoch trotzdem zur Koelution von 8-Hydroxy-kämpferol-7-O-glucosid, Gossypetin und Astragalin (siehe Abbildung 2, S. 10).

Abbildung 2: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera peltata*
Gradient: 5 min 9% B, bis 55 min auf 25% B



Um auch die drei koeluierenden Substanzen zu trennen, wurde ein mehrstufiger Gradient entwickelt, der im Bereich der koeluierenden Stoffe eine isokratische Stufe aufwies. Die Methode führte jedoch zu keiner verbesserten Auftrennung (siehe Abbildung 3, S. 10).

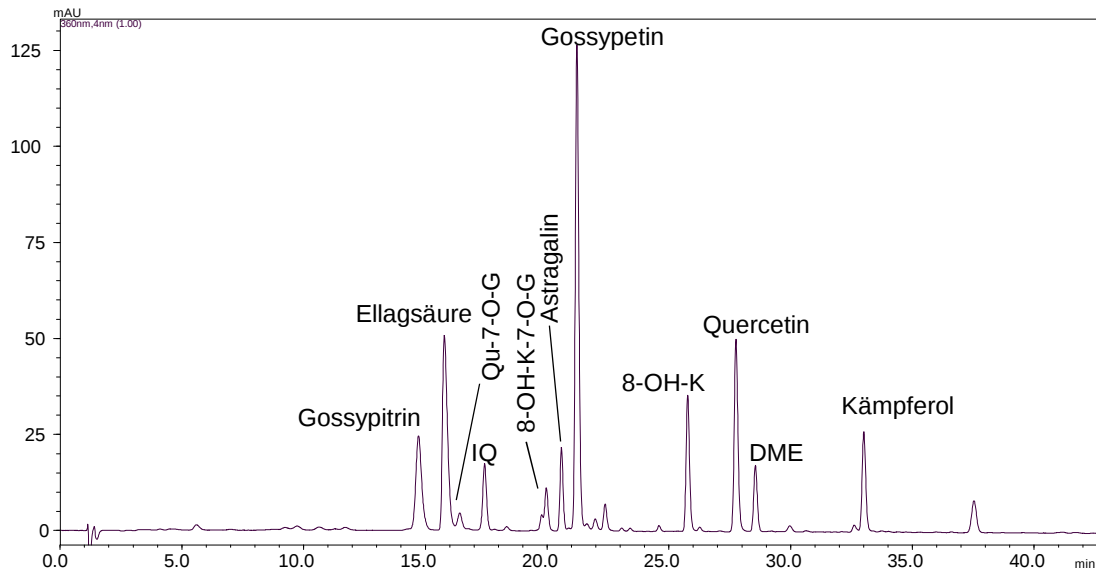
Abbildung 3: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera peltata*
Gradient: Start mit 9% B, in 20 min auf 15% B, bis 30 min 15% B isokratisch, bis 50 min auf 25% B



Obwohl bei der Verwendung des Gradienten, der für die medizinisch verwendeten *Drosera*-Arten entwickelt worden war [18], in Vorarbeiten keine völlig zufriedenstell-

ende Auftrennung der koeluiierenden Analyten erzielt worden war, wurde in einem weiteren Versuch eine ähnliche Elution erprobt (siehe Abbildung 4, S. 11).

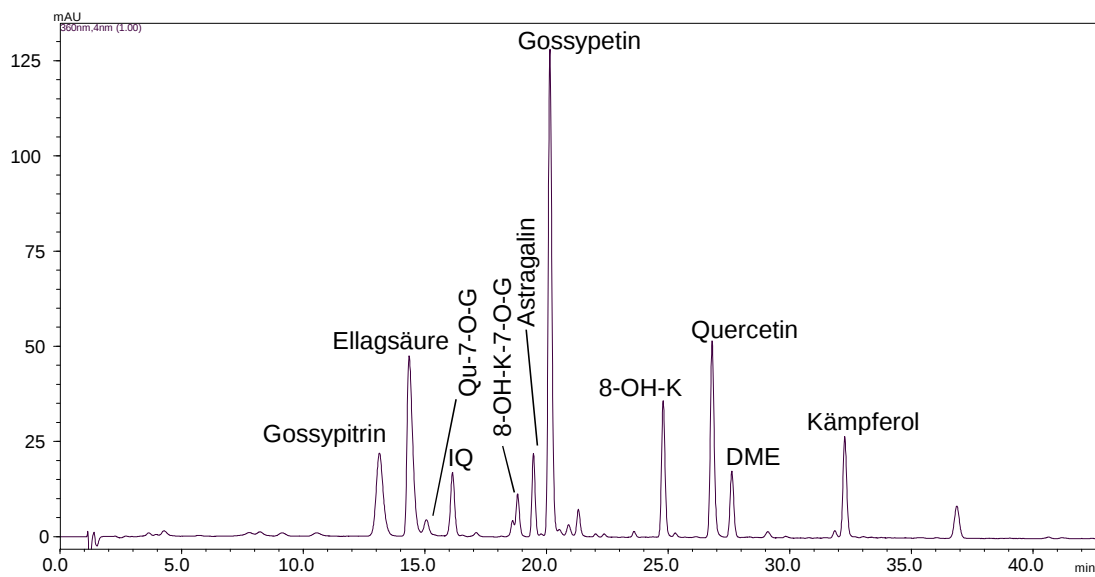
Abbildung 4: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera peltata*
Gradient: 8 min 12% B, bis 40 min auf 40% B



Dieser Gradient führte zu einer Auftrennung von Astragalin und Gossypetin. 8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid koeluierte allerdings mit einer zweiten Substanz. Es wurden weitere Versuche durchgeführt, wobei jedoch keine vollständige Auftrennung dieser beiden Komponenten möglich war.

Das beste Ergebnis wurde mit einem geringfügig geänderten Gradienten erreicht (siehe Abbildung 5, S. 12).

Abbildung 5: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera peltata*
Gradient: 8 min 13% B, bis 40 min auf 40% B



Es wurden weitere Gradienten erprobt, um die Analysezeit zu verkürzen (siehe Abbildung 6, S. 12 und Abbildung 7, S. 13).

Abbildung 6: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera peltata*
Gradient: 5 min 14% B, bis 40 min auf 40% B

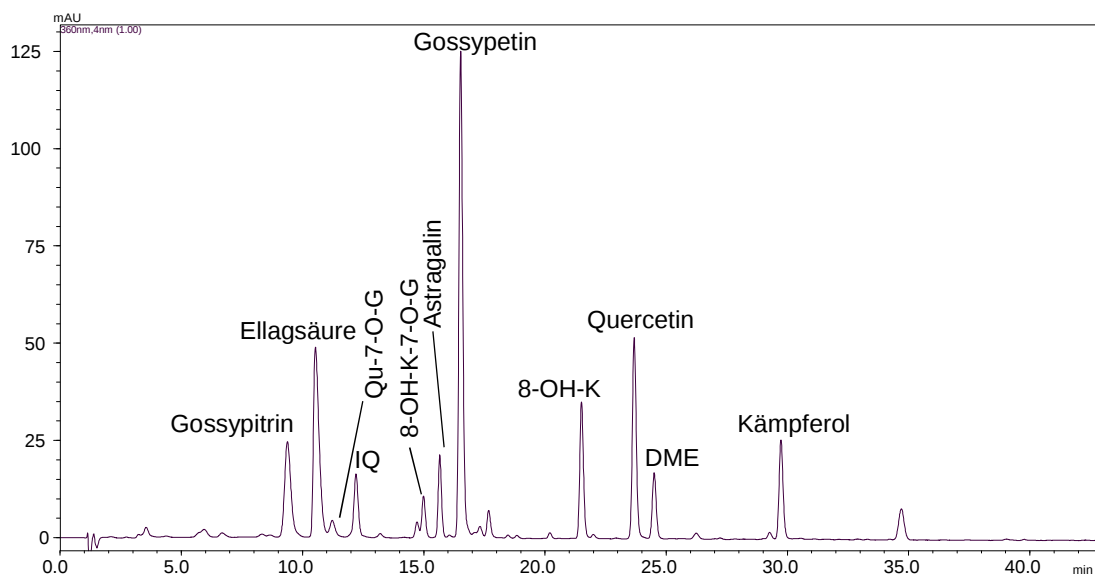
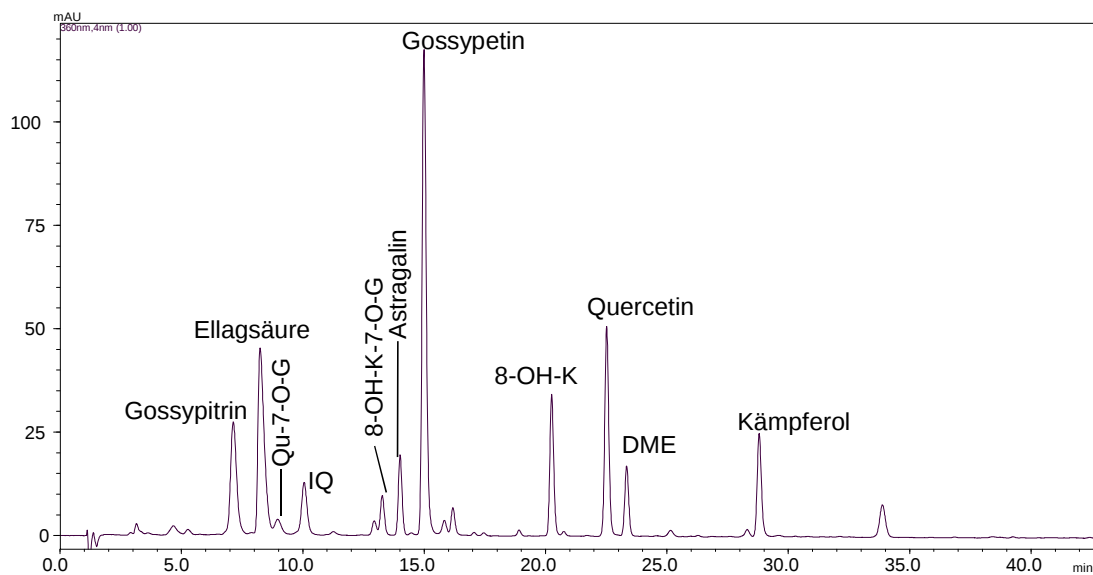


Abbildung 7: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera peltata*
Gradient: 5 min 15% B, bis 40 min auf 40% B



Obwohl eine Verkürzung der Methode um ca. fünf Minuten möglich war, bestand bei den beiden letzten Methoden die Gefahr der Überlagerung eines Analyten mit dem internen Standard. Daher wurde in der Folge der in Kapitel 2.4. angegebene Gradient für die Analysen eingesetzt.

3.2. Validierung der Methode

Die für die Analytik von Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren in *Drosera peltata* entwickelte HPLC-Methode wurde nach folgenden Punkten validiert:

3.2.1. Eichung mit internem Standard

Die Eichung des Systems wurde mit dem internen Standard Saponarin durchgeführt. Dazu wurden für die Flavonoide und Phenolcarbonsäuren, die quantitativ bestimmt werden sollten, Lösungen in jeweils fünf verschiedenen Konzentrationen hergestellt und gleichzeitig mit immer derselben Konzentration von Saponarin mit der entwickelten Methode HPLC analytisch bestimmt.

Mit den ermittelten Werten wurden Kalibrierungsgeraden erstellt und die Korrekturfaktoren für die interne Standardisierung mit Saponarin berechnet.

Für die Stammlösungen der Substanzen wurden 1-2 mg Ellagsäure, Gossypetin, Quercetin, Isoquercitrin, Kämpferol, Myricetin, Myricitrin bzw. Hyperosid genau eingewogen und in 5,00 ml DMSO gelöst und mit Methanol auf 25,00 ml aufgefüllt. 1 mg Gossypitrin wurde in 1,00 ml DMSO gelöst und mit Methanol auf 5,00 ml aufgefüllt. 1 mg des internen Standards Saponarin wurde in 5,00 ml DMSO gelöst.

Alle Stammlösungen wurden mittels HPLC analysiert und die Reinheit der verwendeten Substanzen ermittelt (siehe Abbildung 8 - Abbildung 16, S. 14 - 18).

Abbildung 8: Chromatogramm der Stammlösung von Ellagsäure
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

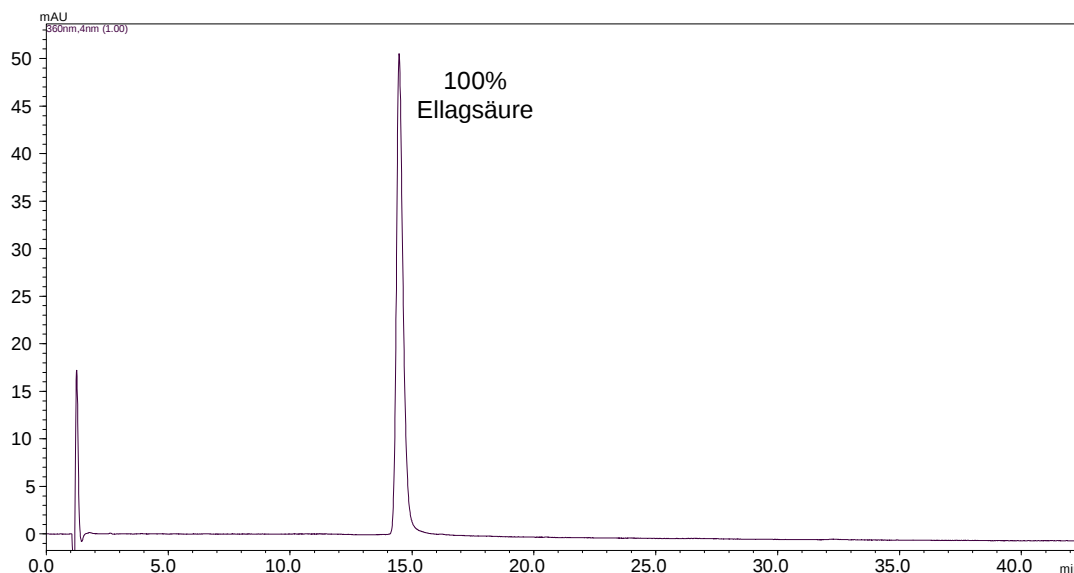


Abbildung 9: Chromatogramm der Stammlösung von Gossypetin
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

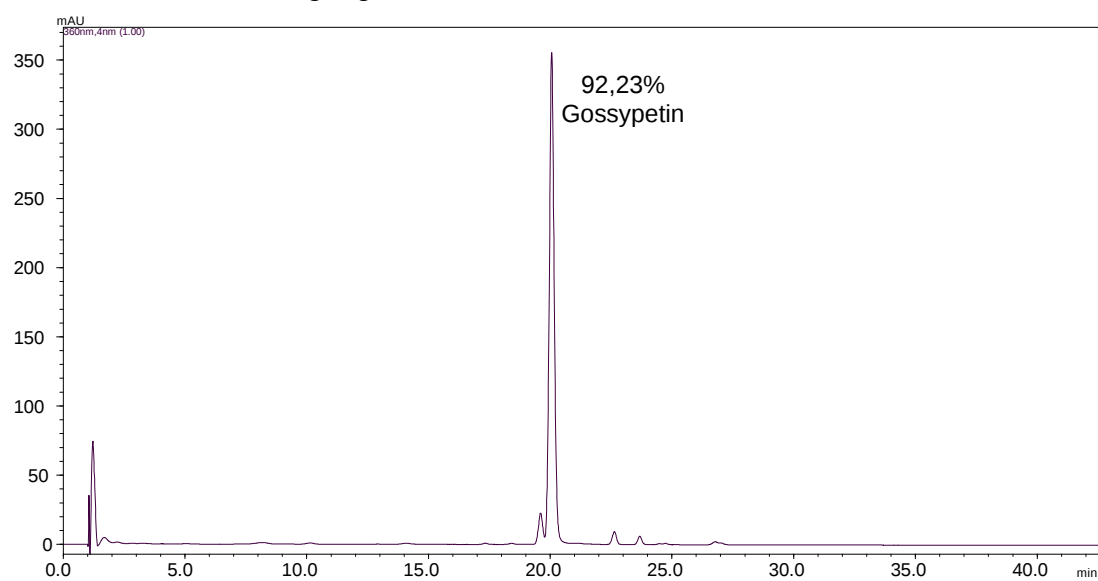


Abbildung 10: Chromatogramm der Stammlösung von Quercetin
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

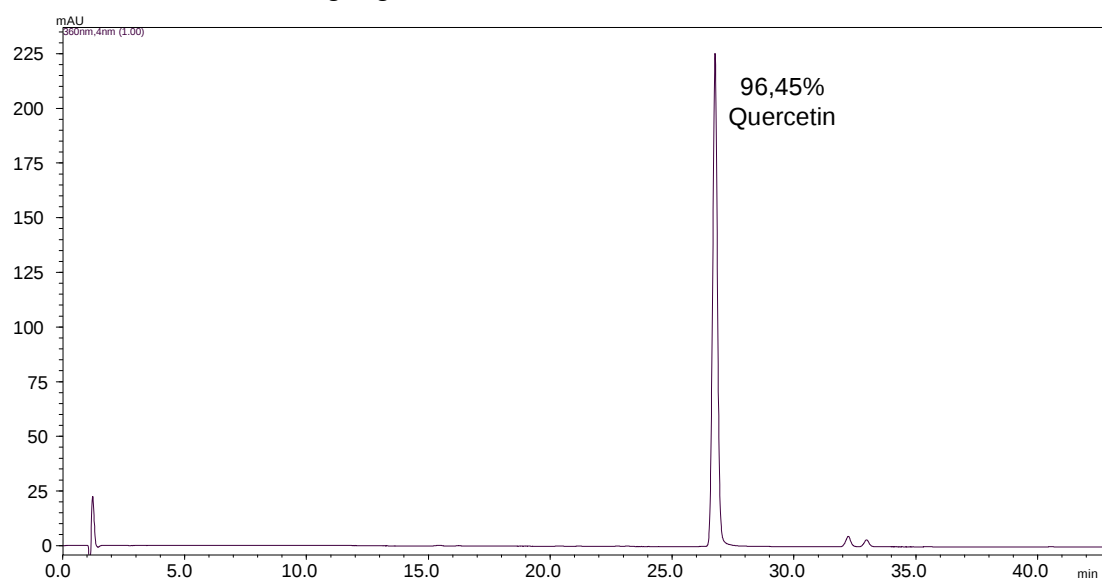


Abbildung 11: Chromatogramm der Stammlösung von Isoquercitrin
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

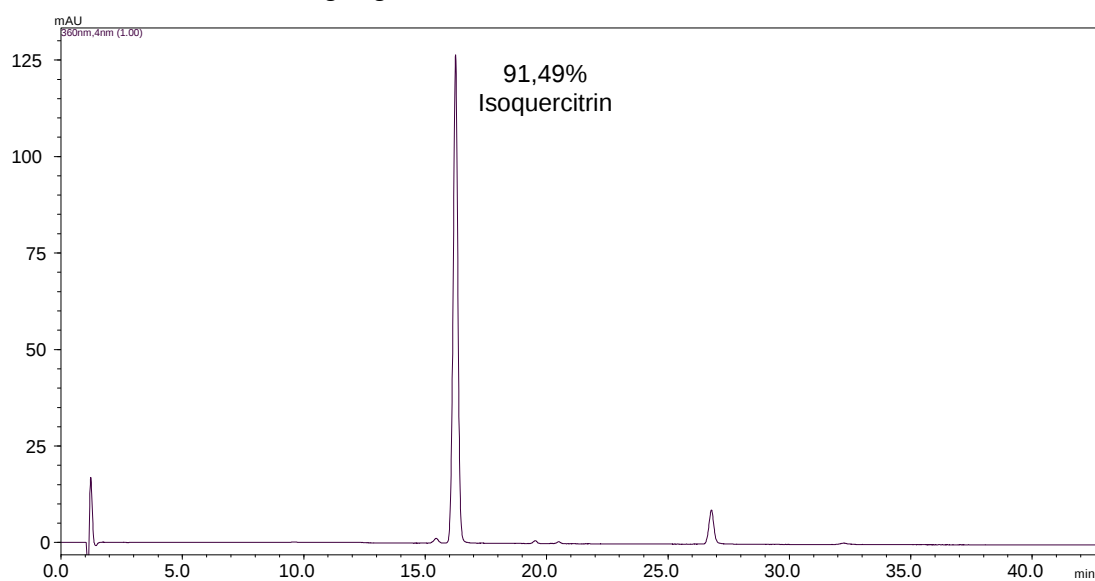


Abbildung 12: Chromatogramm der Stammlösung von Gossypitrin
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

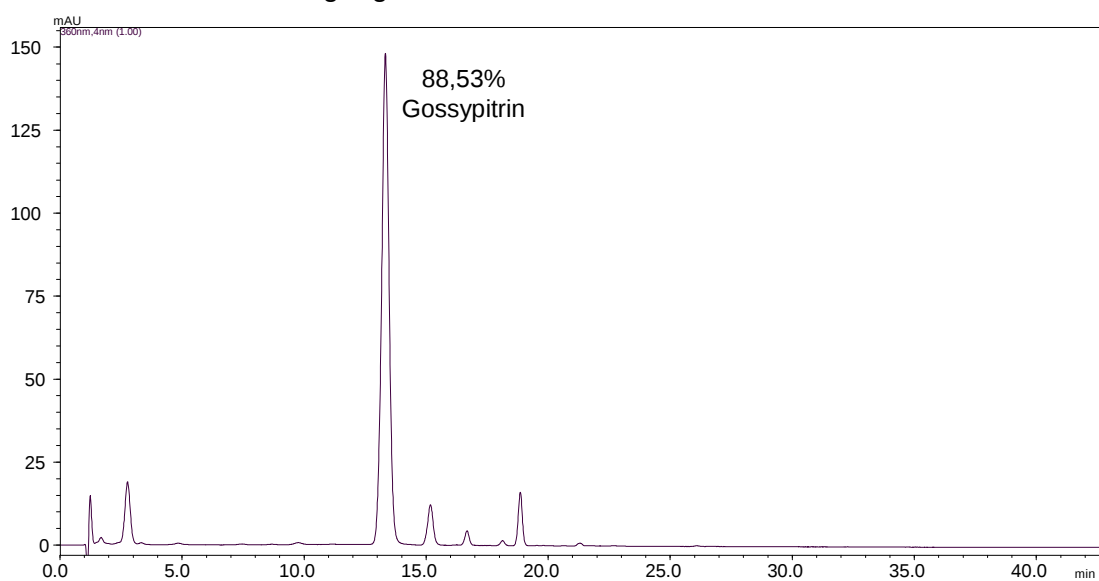


Abbildung 13: Chromatogramm der Stammlösung von Kämpferol
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

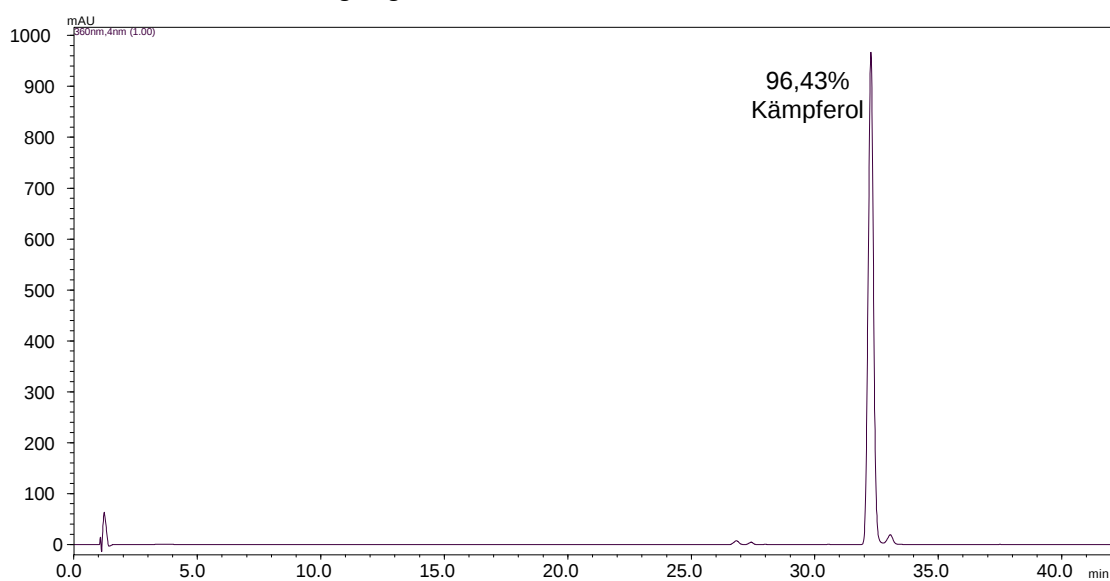


Abbildung 14: Chromatogramm der Stammlösung von Myricetin
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

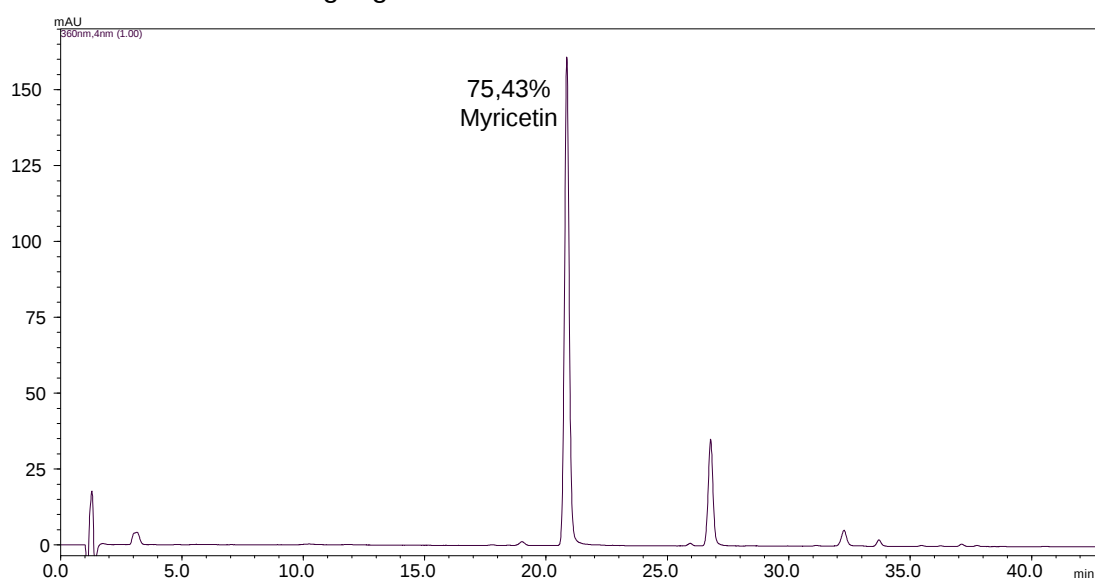


Abbildung 15: Chromatogramm der Stammlösung von Myricitrin
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

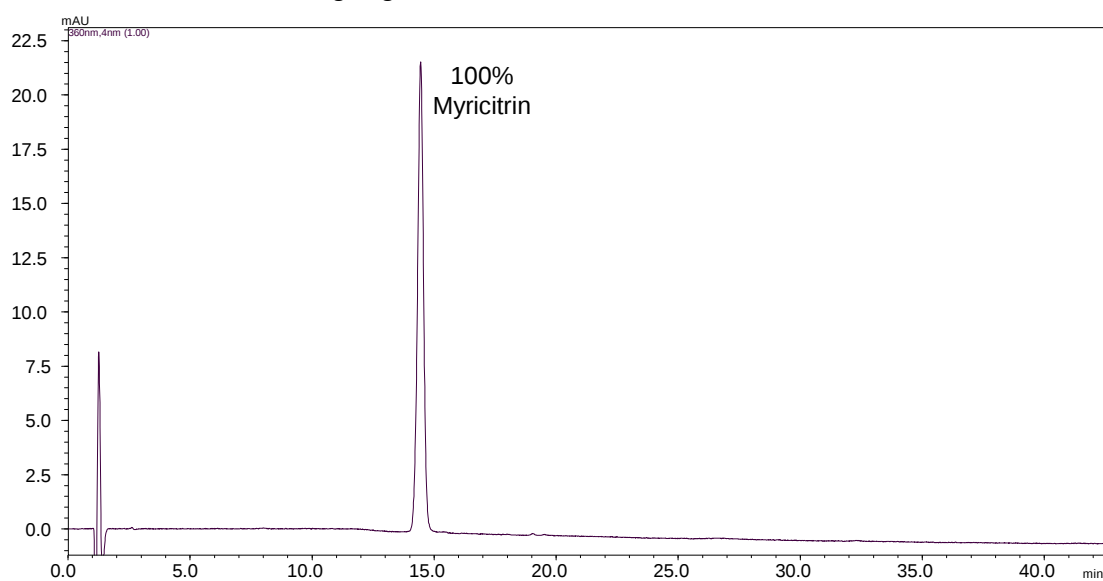
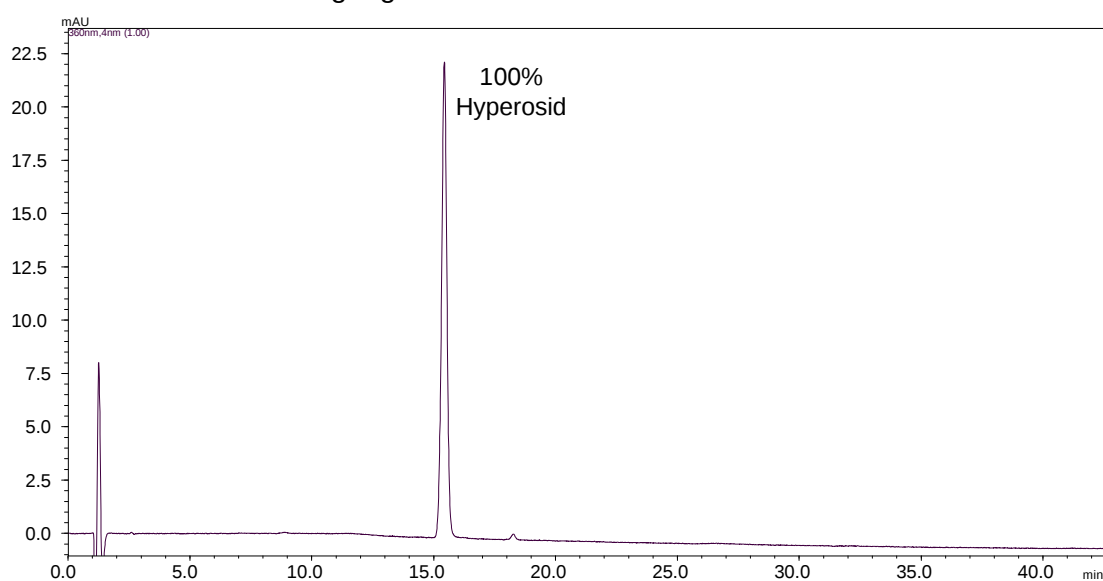


Abbildung 16: Chromatogramm der Stammlösung von Hyperosid
HPLC-Bedingungen siehe S. 8



Für die Berechnung der Korrekturfaktoren wurden die Einwaagen der Reinsubstanzen entsprechend der ermittelten Reinheit korrigiert, bevor sie für weitere Berechnungen herangezogen wurden.

Tabelle 1: Konzentrationen der Stammlösungen in µl/ml

Phenol	EW in µg/ml
Ellagsäure	90,8
Gossypetin	37,6
Quercetin	45,9
Isoquercitrin	54,2
Gossypitrin	162,9
Kämpferol	53,6
Myricetin	48,0
Myricitrin	38,8
Hyperosid	26,0
Saponarin	236,0 bzw. 230,0

Zur Bestimmung der Korrekturfaktoren wurden aus den Stammlösungen drei Serien von Eichlösungen hergestellt (siehe Tabelle 2, S. 19, Tabelle 4, S. 20 und Tabelle 6, S. 21), die fünf verschiedene Konzentrationen jedes Analyten enthielten. Dabei wurden die abgedeckten Konzentrationsbereiche auf die üblichen Gehalte der Komponenten in Proben von *Drosera peltata* [17] abgestimmt. Jede Eichlösung wurde zweimal analysiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Eichlösungen Serie A in µl

	1	2	3	4	5
Saponarin	150	150	150	150	150
Ellagsäure	80	110	140	20	55
Gossypetin	245	15	60	180	120
Quercetin	10	210	50	100	160
MeOH	15	15	100	50	15
Gesamt	500	500	500	500	500

Daraus ergaben sich folgende Konzentrationen:

Tabelle 3: Konzentrationen der Eichlösungen Serie A in µg/ml

	1	2	3	4	5
Saponarin	70,80	70,80	70,80	70,80	70,80
Ellagsäure	14,53	19,98	25,42	3,63	9,99
Gossypetin	18,44	1,13	4,52	13,55	9,03
Quercetin	0,92	19,28	4,59	9,18	14,69

Abbildung 17: Chromatogramm der Eichlösung A5
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

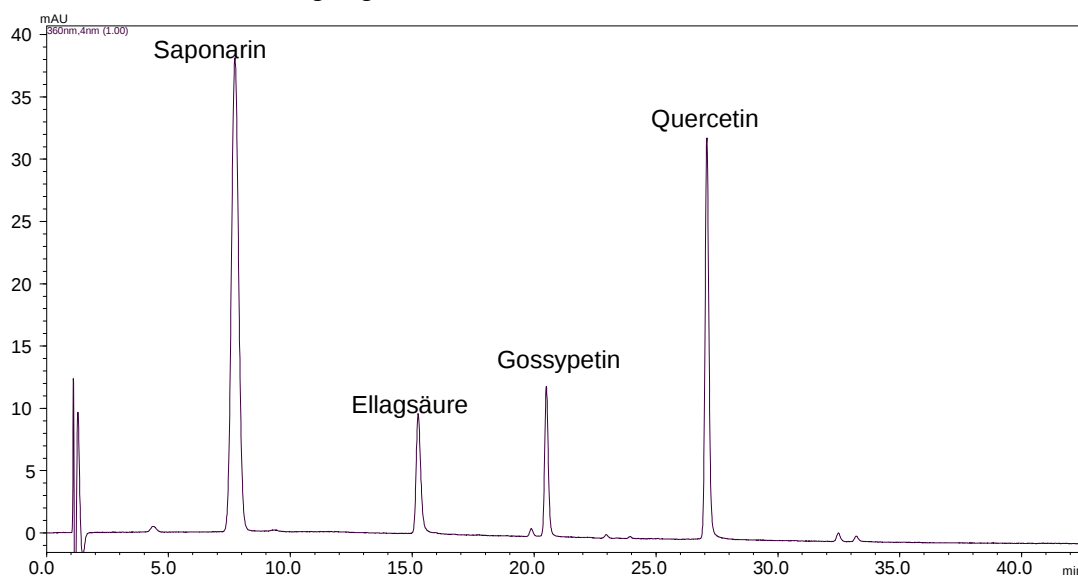
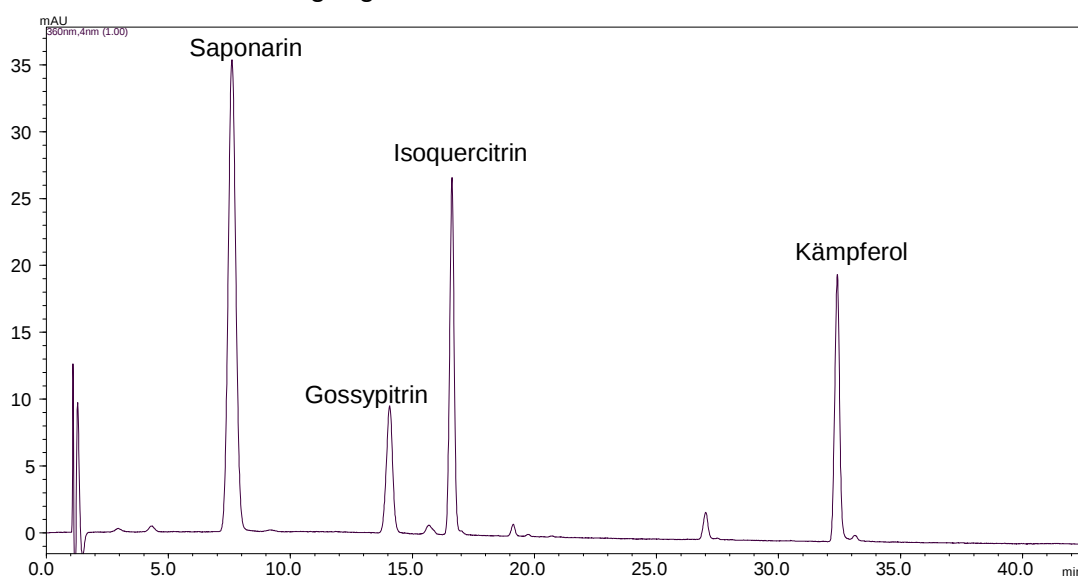


Tabelle 4: Zusammensetzung der Eichlösungen Serie B in µl

	1	2	3	4	5
Saponarin	150	150	150	150	150
Isoquercitrin	300	10	205	85	170
Gossypitrin	15	270	55	200	135
Kämpferol	10	20	90	65	45
MeOH	25	50	-	-	-
Gesamt	500	500	500	500	500

Tabelle 5: Konzentrationen der Eichlösungen Serie B in µg/ml

	1	2	3	4	5
Saponarin	70,80	70,80	70,80	70,80	70,80
Isoquercitrin	32,50	1,08	22,21	9,21	18,41
Gossypitrin	4,89	87,96	17,92	65,16	43,98
Kämpferol	1,07	2,14	9,65	6,97	4,83

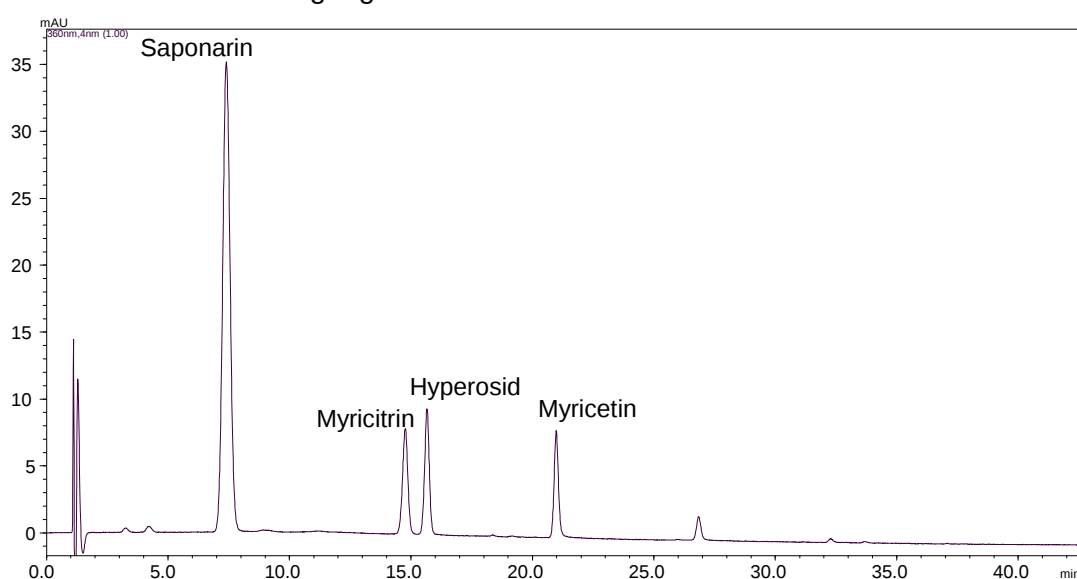
Abbildung 18: Chromatogramm der Eichlösung B3
HPLC-Bedingungen siehe S. 8**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Eichlösungen Serie C in µl

	1	2	3	4	5
Saponarin	150	150	150	150	150
Myricetin	10	25	40	60	80
Myricitrin	70	200	155	110	25
Hyperosid	200	65	110	155	20
MeOH	70	60	45	25	225
Gesamt	500	500	500	500	500

Tabelle 7: Konzentrationen der Eichlösungen Serie C in µg/ml

	1	2	3	4	5
Saponarin	69,00	69,00	69,00	69,00	69,00
Myricetin	0,96	2,40	3,84	5,76	7,68
Myricitrin	5,43	15,52	12,03	8,65	1,94
Hyperosid	10,40	3,38	5,72	8,06	1,04

Abbildung 19: Chromatogramm der Eichlösung C4
HPLC-Bedingungen siehe S. 8



Der Standardkorrekturfaktor f_K wurde mit folgender Formel berechnet:

$$f_K = \frac{EW_{Fl} \cdot A_{St}}{EW_{St} \cdot A_{Fl}}$$

EW_{Fl} ...Einwaage des Flavonoids

EW_{St} ...Einwaage des Standards (Saponarin)

A_{Fl} ...Peakfläche des Flavonoids

A_{St} ...Peakfläche des Standards

Berechnung des Korrekturfaktors für Myricitrin

Tabelle 8: Korrekturfaktoren für Myricitrin

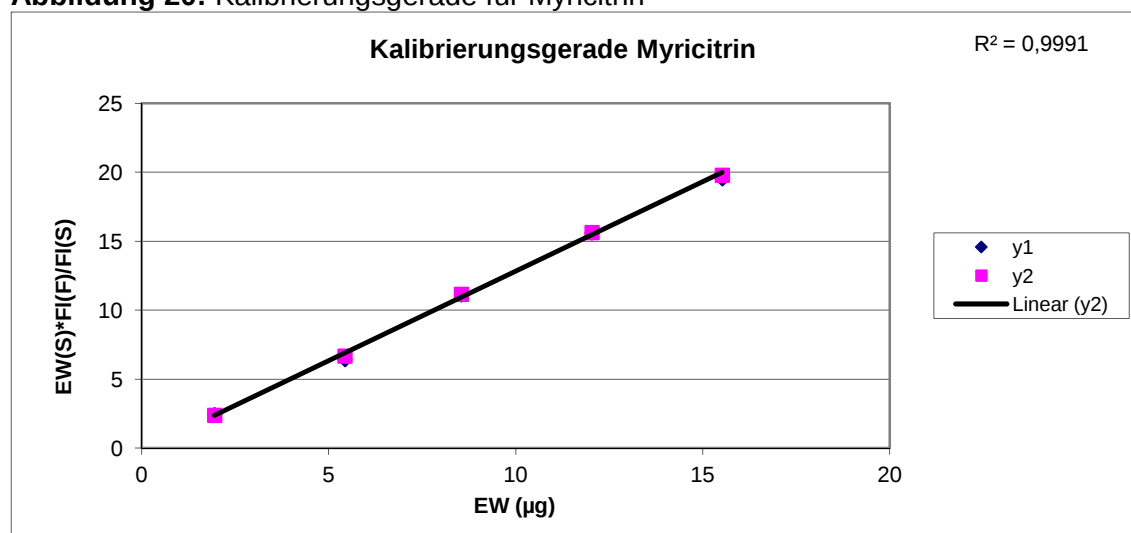
	25µl EL C5	70µl EL C1	110µl EL C4	155µl EL C3	200µl EL C2	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	0,798	0,846	0,769	0,771	0,795	0,796	± 0,028	± 3,52
f_k 2	0,810	0,814	0,765	0,770	0,784	0,789	± 0,020	± 2,53

Der Korrekturfaktor für Myricitrin betrug 0,792.

Tabelle 9: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Myricitrin

EW in µg	1,94	5,43	8,54	12,03	15,52
y1	2,43	6,42	11,11	15,60	19,52
y2	2,39	6,67	11,16	15,63	19,79

Abbildung 20: Kalibrierungsgerade für Myricitrin



Berechnung des Korrekturfaktors für Hyperosid

Tabelle 10: Korrekturfaktoren für Hyperosid

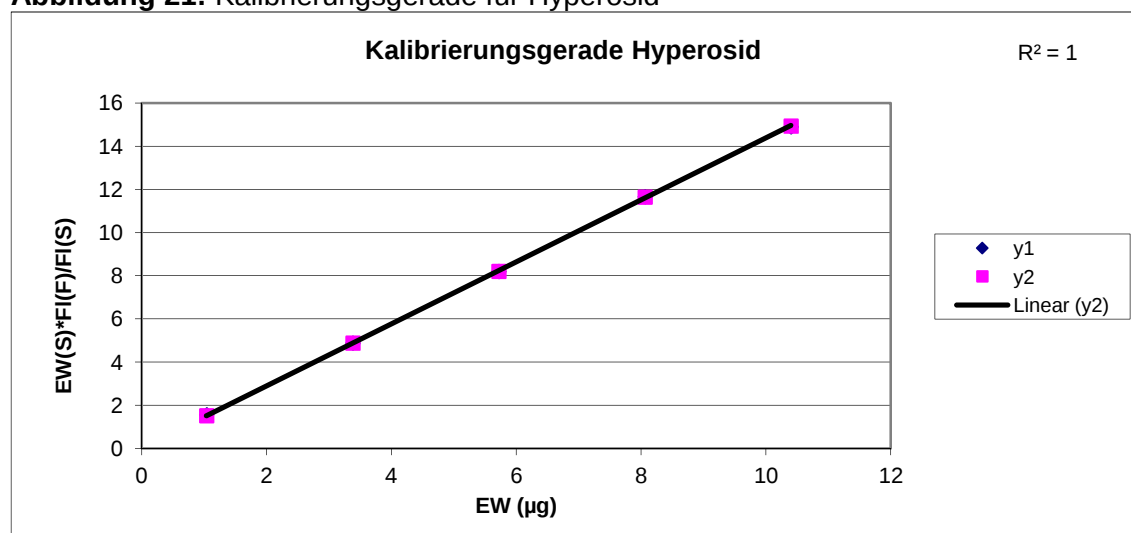
	20µl EL C5	65µl EL C2	110µl EL C3	155µl EL C4	200µl EL C1	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	0,661	0,692	0,698	0,691	0,698	0,688	± 0,014	± 2,03
f_k 2	0,686	0,692	0,697	0,693	0,696	0,693	± 0,004	± 0,58

Der Korrekturfaktor für Hyperosid betrug 0,690.

Tabelle 11: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Hyperosid

EW in µg	1,04	3,38	5,72	8,06	10,40
y1	1,57	4,88	8,20	11,66	14,90
y2	1,52	4,88	8,21	11,64	14,93

Abbildung 21: Kalibrierungsgerade für Hyperosid



Berechnung des Korrekturfaktors für Gossypetin

Tabelle 12: Korrekturfaktoren für Gossypetin

	15µl EL A2	60µl EL A3	120µl EL A5	180µl EL A4	245µl EL A1	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	1,067*	0,826	0,787	0,796	0,792	0,800	± 0,015	± 1,88
f_k 2	0,971*	0,806	0,805	0,796	0,755	0,790	± 0,021	± 2,66

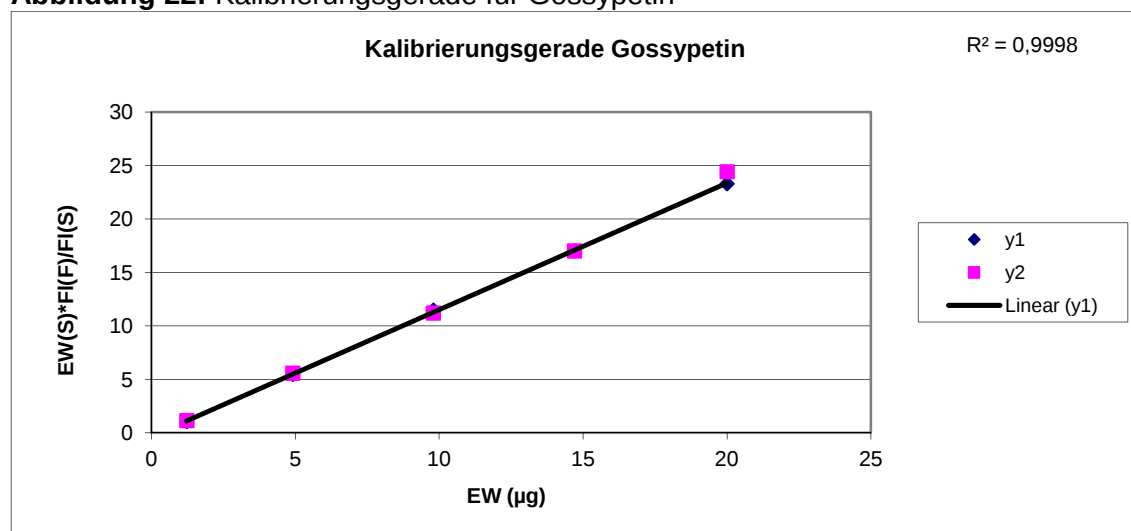
Der Korrekturfaktor für Gossypetin betrug 0,795.

*Da sich diese f_k-Werte deutlich von den übrigen Werten unterschieden und offensichtlich außerhalb des linearen Bereiches der Eichgerade lagen, wurden sie nicht in der Berechnung des Mittelwertes berücksichtigt.

Tabelle 13: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Gossypetin

EW in µg	1,22	4,90	9,79	14,69	19,99
y1	1,06	5,46	11,47	17,01	23,29
y2	1,16	5,60	11,22	17,01	24,42

Abbildung 22: Kalibrierungsgerade für Gossypetin



Berechnung des Korrekturfaktors für Quercetin

Tabelle 14: Korrekturfaktoren für Quercetin

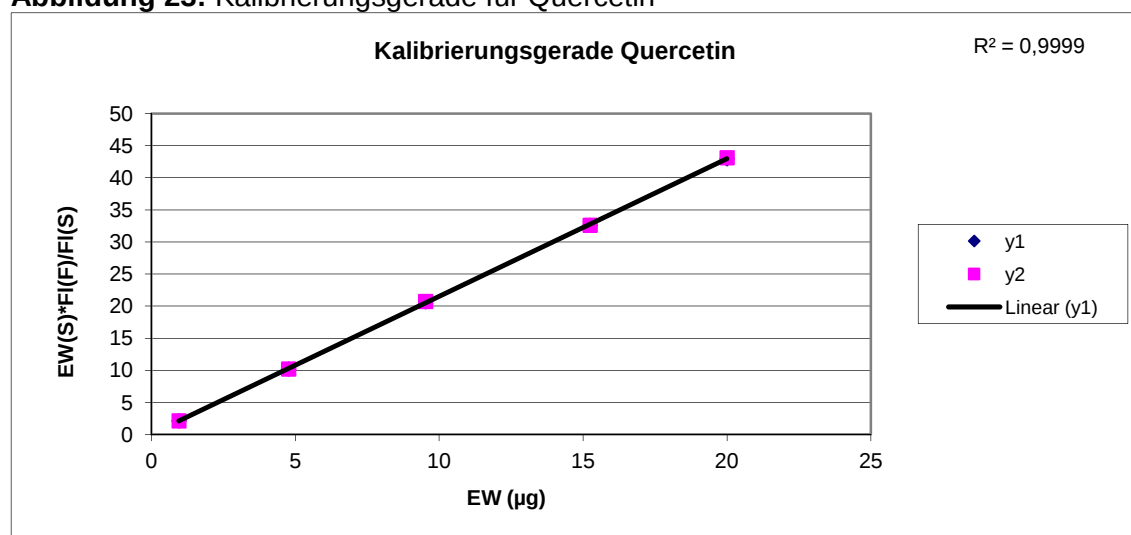
	10µl EL A1	50µl EL A3	100µl EL A4	160µl EI A5	210µl EL A2	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	0,433	0,450	0,444	0,451	0,449	0,445	± 0,007	± 1,57
f_k 2	0,430	0,449	0,443	0,451	0,447	0,444	± 0,008	± 1,80

Der Korrekturfaktor für Quercetin betrug 0,445.

Tabelle 15: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Quercetin

EW in µg	0,95	4,76	9,52	15,23	19,99
y1	2,12	10,20	20,69	32,60	42,99
y2	2,14	10,22	20,74	32,58	43,11

Abbildung 23: Kalibrierungsgerade für Quercetin



Berechnung des Korrekturfaktors für Myricetin

Tabelle 16: Korrekturfaktoren für Myricetin

	10µl EL C1	25µl EL C2	40µl EL C3	60µl EL C4	80µl EL C5	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	0,738	0,696	0,641	0,621	0,600*	0,674	± 0,046	± 6,82
f_k 2	0,720	0,688	0,626	0,621	0,604*	0,664	± 0,042	± 6,33

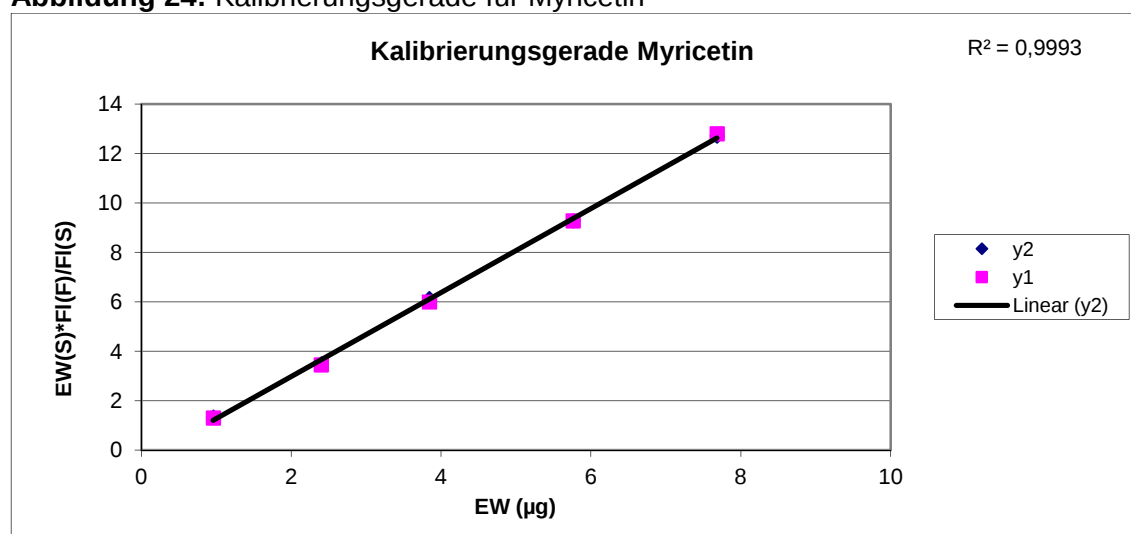
Der Korrekturfaktor für Myricetin betrug 0,669.

*Da sich diese f_k-Werte deutlich von den übrigen Werten unterschieden und offensichtlich außerhalb des linearen Bereiches der Eichgerade lagen, wurden sie nicht in der Berechnung des Mittelwertes berücksichtigt.

Tabelle 17: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Myricetin

EW in µg	0,96	2,40	3,84	5,76	7,68
y1	1,30	3,45	5,99	9,27	12,80
y2	1,33	3,49	6,13	9,27	12,71

Abbildung 24: Kalibrierungsgerade für Myricetin



Berechnung des Korrekturfaktors für Gossypitrin

Tabelle 18: Korrekturfaktoren für Gossypitrin

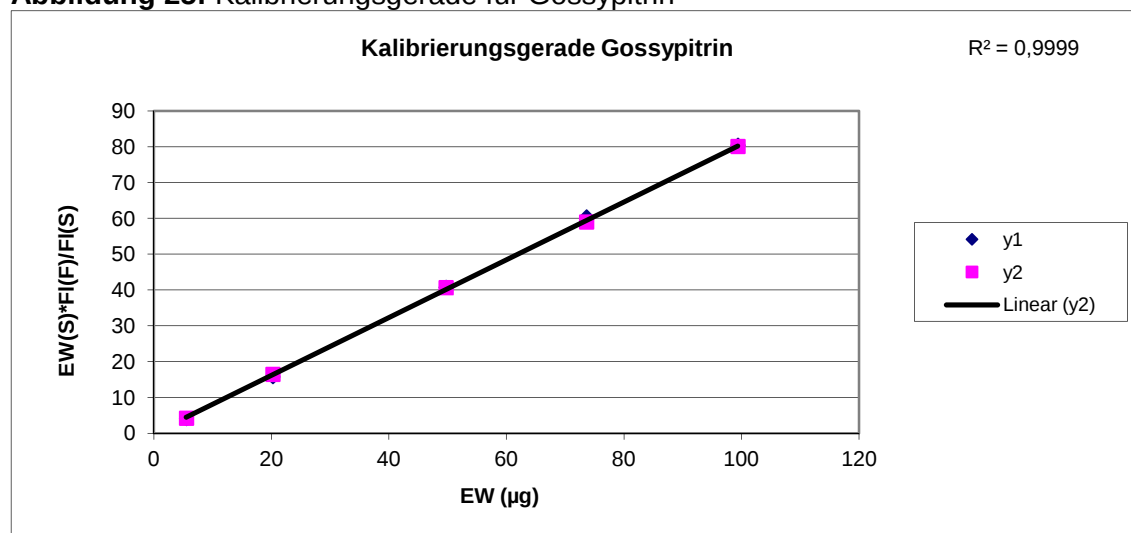
	15µl EL B1	55µl EL B3	135µl EL B5	200µl EL B4	270µl EL B2	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	1,185	1,135	1,080	1,078	1,093	1,114	± 0,041	± 3,68
f_k 2	1,163	1,090	1,082	1,104	1,098	1,108	± 0,029	± 2,62

Der Korrekturfaktor für Gossypitrin betrug 1,111.

Tabelle 19: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Gossypitrin

EW in µg	5,52	20,24	49,68	73,60	99,36
y1	4,12	15,78	40,73	60,40	80,46
y2	4,20	16,43	40,62	58,99	80,07

Abbildung 25: Kalibrierungsgerade für Gossypitrin



Berechnung des Korrekturfaktors für Kämpferol

Tabelle 20: Korrekturfaktoren für Kämpferol

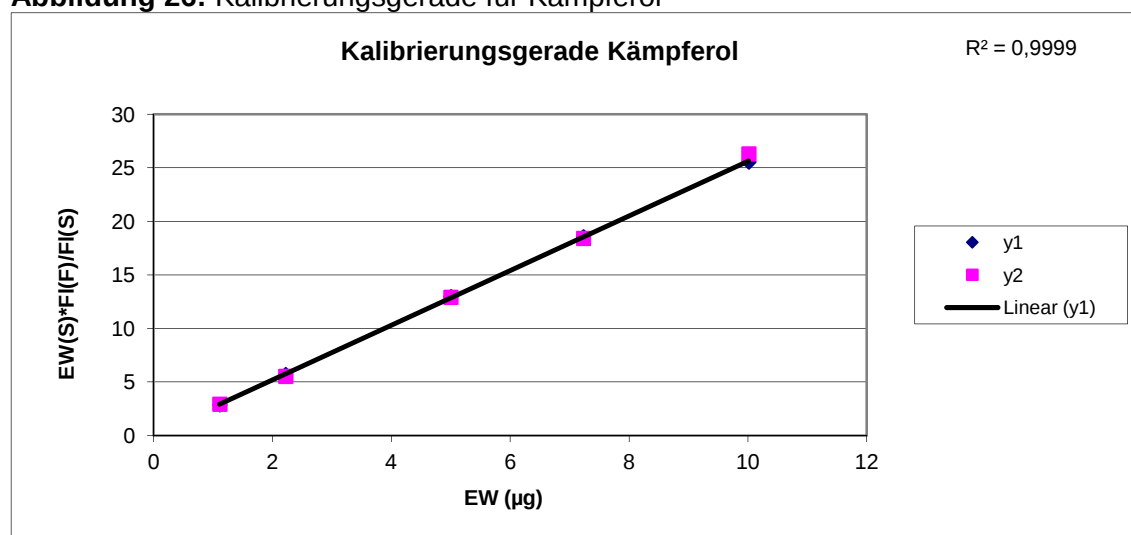
	10µl EL B1	20µl EL B2	45µl EL B5	65µl EL B4	90µl EL B3	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	0,376	0,375	0,372	0,375	0,381	0,376	± 0,003	± 0,80
f_k 2	0,364	0,388	0,374	0,379	0,367	0,374	± 0,009	± 2,41

Der Korrekturfaktor für Kämpferol betrug 0,375.

Tabelle 21: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Kämpferol

EW in µg	1,11	2,22	5,00	7,23	10,01
y1	2,86	5,72	12,98	18,57	25,54
y2	2,94	5,52	12,91	18,40	26,30

Abbildung 26: Kalibrierungsgerade für Kämpferol



Berechnung des Korrekturfaktors für Isoquercitrin

Tabelle 22: Korrekturfaktoren für Isoquercitrin

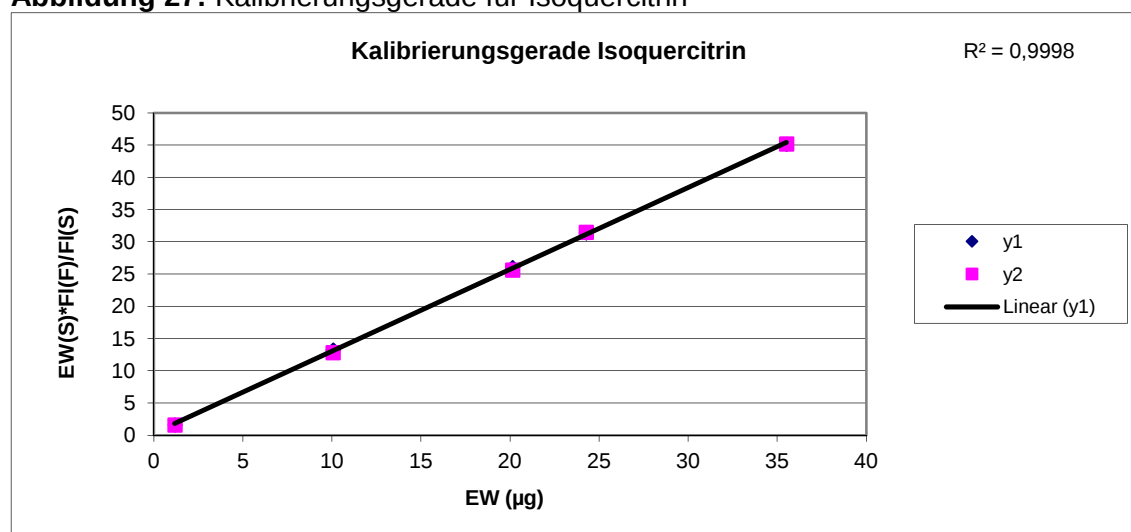
	10µl EL B2	85µl EL B4	170µl EL B5	205µl EL B3	300µl EL B1	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	0,686	0,697	0,708	0,708	0,720	0,704	± 0,011	± 1,56
f_k 2	0,685	0,718	0,719	0,706	0,719	0,709	± 0,013	± 1,83

Der Korrekturfaktor für Isoquercitrin betrug 0,707.

Tabelle 23: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Isoquercitrin

EW in µg	1,18	10,06	20,13	24,27	35,52
y1	1,58	13,22	26,02	31,37	45,13
y2	1,58	12,82	25,60	31,47	45,19

Abbildung 27: Kalibrierungsgerade für Isoquercitrin



Berechnung des Korrekturfaktors für Ellagsäure

Tabelle 24: Korrekturfaktoren für Ellagsäure

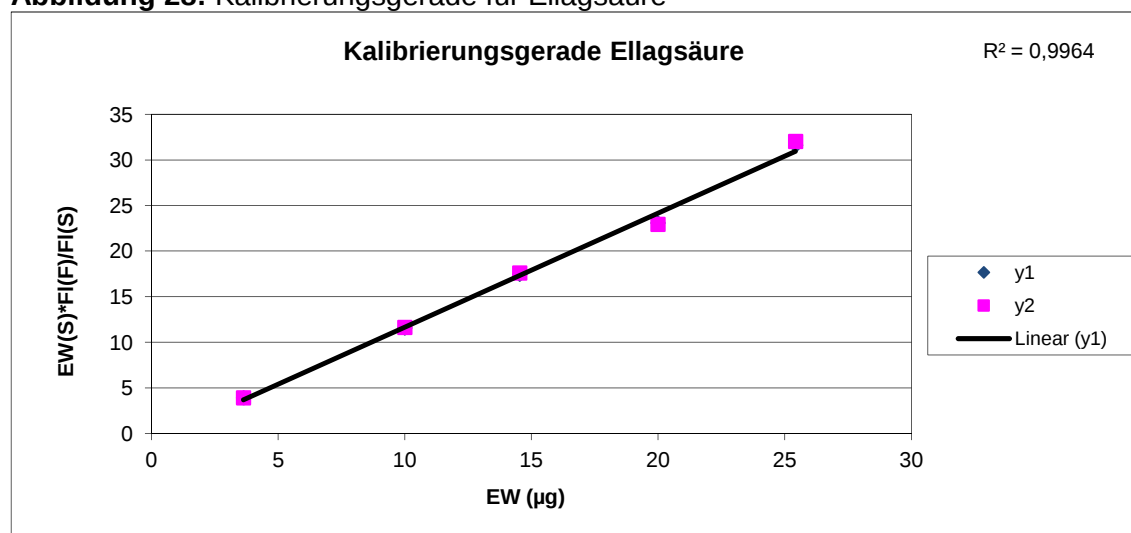
	20µl EL A4	55µl EL A5	80µl EL A1	110µl EL A2	140µl EL A3	MW	STABW	RSD [%]
f_k 1	0,928	0,862	0,832	0,865	0,804	0,858	± 0,041	± 4,78
f_k 2	0,923	0,858	0,825	0,871	0,794	0,854	± 0,044	± 5,15

Der Korrekturfaktor für Ellagsäure betrug 0,856.

Tabelle 25: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Ellagsäure

EW in µg	3,63	9,99	14,53	19,98	25,42
y1	3,92	11,59	17,46	23,10	31,63
y2	3,94	11,65	17,62	22,95	32,04

Abbildung 28: Kalibrierungsgerade für Ellagsäure



Da die Kalibrierungsgeraden alle annähernd linear und durch den Nullpunkt verliefen, konnten sie zur Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe in *Herba Droserae peltatae* verwendet werden.

Berechnung des Korrekturfaktors für Myricetin-3-O-galaktosid

Myricetin-3-O-galaktosid stand nicht in ausreichender Menge als Reinsubstanz zur Verfügung. Deswegen wurde der Standardkorrekturfaktor mithilfe jenes von Myricitrin mit folgender Formel berechnet:

$$f_K = \frac{MG_{M3OG} \cdot f_{K M}}{MG_M}$$

MG_M ...Molekulargewicht Myricitrin = 464,37

MG_{M3OG} ...Molekulargewicht Myricetin-3-O-galaktosid = 480,37

$f_{K M}$...Korrekturfaktor für Myricitrin = 0,792

Der berechnete Standardkorrekturfaktor für Myricetin-3-O-galaktosid betrug 0,819.

Berechnung des Korrekturfaktors für 2“-Galloylhyperosid

Da 2“-Galloylhyperosid ebenfalls nicht als Reinsubstanz zur Verfügung stand, wurde der Korrekturfaktor von Hyperosid zur Berechnung herangezogen.

$$f_K = \frac{MG_{2''-GH} \cdot f_{K H}}{MG_H}$$

MG_H ...Molekulargewicht Hyperosid = 464,38

$MG_{2''-GH}$...Molekulargewicht 2“-Galloylhyperosid = 633,35

$f_{K H}$...Korrekturfaktor für Hyperosid = 0,690

Der berechnete Standardkorrekturfaktor für 2“-Galloylhyperosid betrug 0,942.

Berechnung des Korrekturfaktors für dimethylierte Ellagsäure

Auch für dimethylierte Ellagsäure wurde mit Ellagsäure kalibriert und anschließend der Korrekturfaktor mit folgender Formel berechnet:

$$f_K = \frac{MG_{DME} \cdot f_{KE}}{MG_E}$$

MG_E ...Molekulargewicht Ellagsäure = 302,2

MG_{DME} ...Molekulargewicht dimethylierte Ellagsäure = 330,2

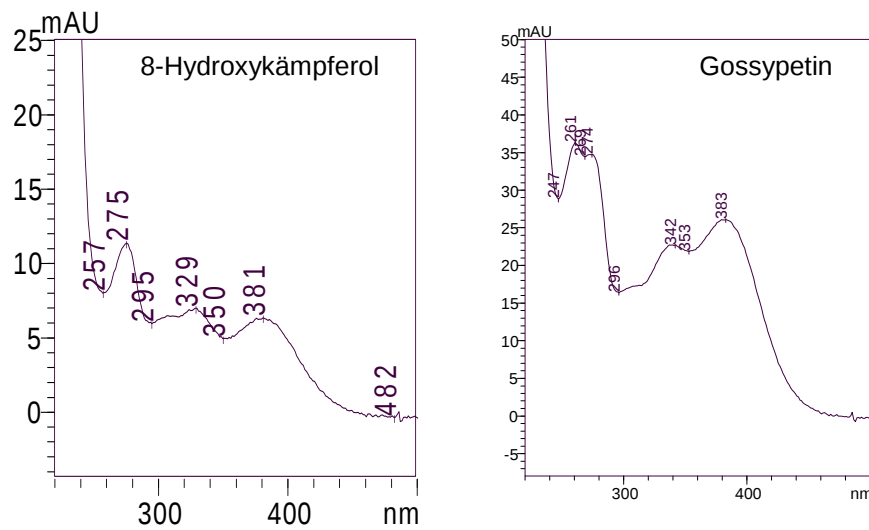
f_{KE} ...Korrekturfaktor für Ellagsäure = 0,856

Der berechnete Standardkorrekturfaktor für dimethylierte Ellagsäure betrug 0,936.

Der Korrekturfaktor für Astragalin wurde mit einem Wert von 0,755 von einer früheren Diplomarbeit, bei der mit dem gleichen HPLC System gearbeitet wurde, übernommen [18].

Da für 8-Hydroxykämpferol keine Referenz vorhanden war, wurde es aufgrund der Ähnlichkeit der UV-Spektren als Gossypetin quantifiziert.

Abbildung 29: UV-Spektren von 8-Hydroxykämpferol und Gossypetin



3.2.2. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Methode, bezüglich Extraktion und Analyse, sollte sowohl intra-day als auch inter-day geprüft werden. Dazu wurden insgesamt acht Proben von *Drosera peltata* mit Methanol extrahiert (siehe Kapitel 2.2, S. 6) und mittels HPLC analysiert (siehe Kapitel 2.4., S. 8). Vier Aufarbeitungen inklusive Analysen wurden an einem Tag durchgeführt, vier weitere innerhalb der anschließenden zwei Wochen.

Es wurden der Gehalt und die Retentionszeiten der phenolischen Inhaltsstoffe bestimmt und mit Hilfe der Mittelwerte, der Standardabweichungen und der Variationskoeffizienten (RSD) die Reproduzierbarkeit der Methode gezeigt.

Tabelle 26: Reproduzierbarkeit der Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe in *Drosera peltata* (intra-day und inter-day)

Phenol	Intraday (n=4)		Inter-day (n=8)	
	% Mittelwert ± STABW	RSD [%]	% Mittelwert ± STABW	RSD [%]
Gossypitrin	2,178 ± 0,056	± 2,57	2,113 ± 0,083	± 3,93
Ellagsäure	0,532 ± 0,015	± 2,82	0,524 ± 0,014	± 2,67
Qu-7-O-G	0,155 ± 0,003	± 1,94	0,151 ± 0,005	± 3,18
Isoquercitrin	0,693 ± 0,004	± 0,58	0,687 ± 0,008	± 1,16
8-OH-K-7-O-G	0,364 ± 0,018	± 5,02	0,361 ± 0,017	± 4,68
Astragalin	0,557 ± 0,017	± 3,05	0,547 ± 0,020	± 3,66
Gossypetin	0,299 ± 0,006	± 2,01	0,289 ± 0,013	± 4,79
8-OH-K	0,074 ± 0,005	± 6,57	0,068 ± 0,006	± 9,36
Quercetin	0,130 ± 0,002	± 1,54	0,127 ± 0,004	± 3,15
DME	0,033 ± 0,002	± 6,06	0,035 ± 0,003	± 8,57
Kämpferol	0,088 ± 0,002	± 2,27	0,087 ± 0,002	± 2,30
Gesamt	5,029 ± 0,120	± 2,39	4,920 ± 0,152	± 3,09

Die ermittelten Variationskoeffizienten (RSD) waren bis auf jene von dimethylierter Ellagsäure und 8-Hydroxykämpferol sehr niedrig zwischen $\pm 0,58\%$ und $5,02\%$, womit eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Extraktion und Analysenmethode gezeigt werden konnte. Die etwas höheren Variationskoeffizienten von dimethylierter Ellagsäure und 8-Hydroxykämpferol lassen sich dadurch erklären, dass die Komponenten nur in sehr niedrigen Konzentrationen in der Droge vorlagen.

Tabelle 27: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Phenole (intra-day und inter-day)

Phenol	Intraday (n=4)		Inter-day (n=8)	
	% Mittelwert ± STABW	RSD [%]	% Mittelwert ± STABW	RSD [%]
Gossypitrin	13,96 ± 0,06	± 0,41	13,60 ± 0,42	± 3,08
Ellagsäure	15,05 ± 0,07	± 0,47	14,75 ± 0,36	± 2,41
Qu-7-O-G	15,56 ± 0,06	± 0,36	15,28 ± 0,32	± 2,13
Isoquercitrin	17,55 ± 0,05	± 0,23	17,08 ± 0,40	± 2,35
8-OH-K-7-O-G	19,11 ± 0,01	± 0,07	18,98 ± 0,16	± 0,82
Astragalin	20,70 ± 0,00	± 0	20,38 ± 0,27	± 1,30
Gossypetin	21,38 ± 0,03	± 0,12	21,03 ± 0,30	± 1,42
8-OH-K	24,93 ± 0,03	± 0,12	24,65 ± 0,24	± 0,97
Quercetin	27,95 ± 0,00	± 0	27,65 ± 0,24	± 0,85
DME	27,78 ± 0,03	± 0,09	27,54 ± 0,27	± 0,98
Kämpferol	33,35 ± 0,00	± 0	33,09 ± 0,20	± 0,62

Mit der entwickelten HPLC-Methode wurde eine hinreichende Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten erzielt.

3.2.3. Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Zur Validierung der Methode wurden außerdem das Quantifizierungs- und das Detektionslimit für die Analyten bestimmt.

Die Bestimmungsgrenze bezeichnet jene Menge an Substanz, die gerade noch quantitativ bestimmbar ist. Im Chromatogramm entspricht das einem Signal-Rausch Verhältnis von 10:1. Die Nachweisgrenze bezeichnet jene Menge an Substanz die bei einem Signal-Rausch Verhältnis von 3:1 gerade noch detektierbar ist.

Zur Bestimmung wurde ein Extrakt von *Drosera peltata* (Herstellung siehe Kapitel 2.2, S. 6) mit bekannter Konzentration der Inhaltsstoffe mit Methanol so weit verdünnt

bis die Peaks das entsprechende Verhältnis zum Grundrauschen erreicht hatten. Daraus wurde die Menge der in die HPLC eingespritzten Substanz berechnet.

Tabelle 28: Quantifizierungslimit und Detektionslimit der wichtigsten Phenole

	Quantifizierungslimit (ng)	Detektionslimit (ng)
Gossypitrin	2,399	0,720
Ellagsäure	1,904	0,571
Isoquercitrin	0,980	0,299
Astragalin	0,986	0,296
Gossypetin	1,646	0,494
Quercetin	0,499	0,150
DME	1,403	0,421
Kämpferol	0,548	0,187

Alle Detektionslimits und fast alle Quantifizierungslimits lagen unter 1 ng. Somit konnte eine hohe Empfindlichkeit des Systems gezeigt werden.

3.2.4. Wiederfindungsraten

Um sicherzustellen, dass die Analyten quantitativ mit der gewählten Extraktionsmethode extrahiert werden, wurden die Wiederfindungsraten einzelner Phenole bestimmt.

Als Substanzen wurden Ellagsäure, repräsentativ für Ellagsäurederivate, Kämpferol für apolare Flavonoide und Gossypetin für polare Flavonoide verwendet.

Ein Drogenmuster (Muster 3), dessen Inhaltsstoffe mehrfach bestimmt worden waren, wurde vor der Extraktion mit zwei verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Reinsubstanz (siehe Kapitel 2.1, S. 5) versetzt, die 25% beziehungsweise 50% der ursprünglich bestimmten Menge entsprachen. Im Extrakt sollten theoretisch 125% oder 150% der Substanz wiedergefunden werden.

Tabelle 29: Wiederfindungsraten von Gossypetin

Gossypetin	+ 25% berechnet	+ 25% gemessen	%	+ 50% berechnet	+ 50% gemessen	%
1	403,4 µg	383,1 µg	94,95	470,2 µg	477,1 µg	101,47
2	397,4 µg	444,0 µg	111,71	471,5 µg	523,5 µg	111,02

Es wurden im Durchschnitt 104,79% Gossypetin wiedergefunden.

Tabelle 30: Wiederfindungsraten von Ellagsäure

Ellagsäure	+ 25% berechnet	+ 25% gemessen	%	+ 50% berechnet	+ 50% gemessen	%
1	529,1 µg	599,3 µg	113,26	629,6 µg	680,0 µg	108,02
2	1213,5 µg	1106,1 µg	91,15	1232,0 µg	1353,3 µg	109,84

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate von Ellagsäure betrug 105,57%.

Tabelle 31: Wiederfindungsraten von Kämpferol

Kämpferol	+ 25% berechnet	+ 25% gemessen	%	+ 50% berechnet	+ 50% gemessen	%
1	222,9 µg	210,8 µg	94,56	265,2 µg	288,6 µg	108,83
2	218,5 µg	231,3 µg	105,84	264,7 µg	276,2 µg	104,36

Es wurden durchschnittlich 104,79% Kämpferol wiedergefunden.

Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten von annähernd 100% ($\pm 10\%$) zeigten, dass es während der Probenvorbereitung beziehungsweise der Analyse nicht zu Verlusten an Analyten kam.

3.3. Flavonoidmuster und -gehalt in *Drosera peltata*

Die entwickelte HPLC-Methode wurde angewandt, um das Flavonoid- und Phenolcarbonsäuremuster in Handelsmustern von *Drosera peltata* zu untersuchen und mit *Drosera peltata* aus der *in vitro* Kultivierung zu vergleichen.

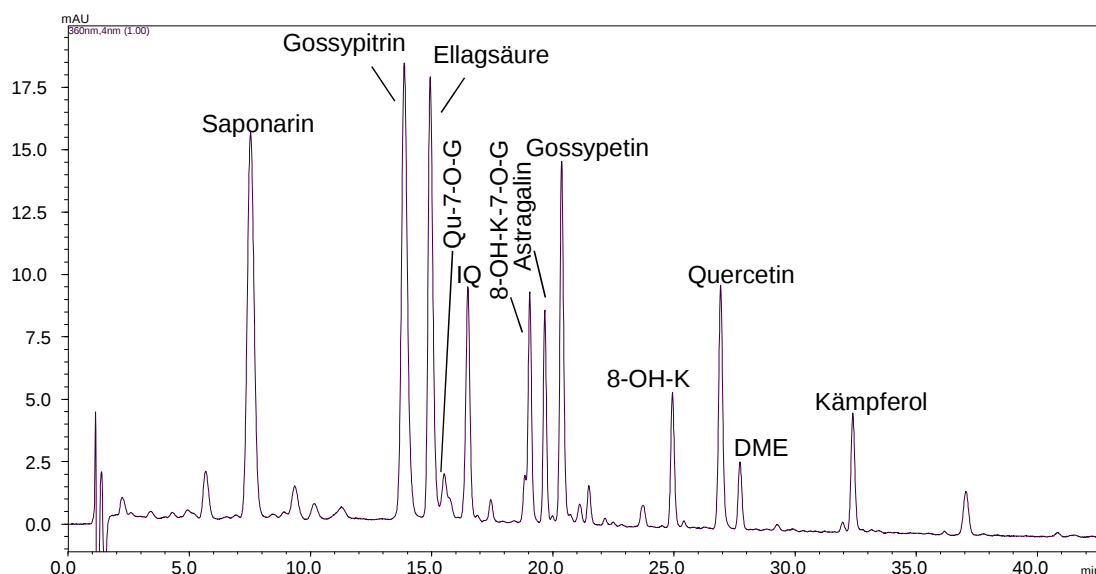
Die Drogenmuster wurden mit Methanol extrahiert (siehe Kapitel 2.2, Seite 6) und mittels HPLC analysiert. Von den mit internem Standard Saponarin versetzten Analysenlösungen wurden jeweils 3 µl in die HPLC eingespritzt.

3.3.1. Flavonoide in *Drosera peltata* Handelsmustern

Es standen vier Handelsmuster aus Wildsammlungen für die Untersuchung zur Verfügung.

Die bisher unbekannten Komponenten X5, X6 und X10 konnten mittels LC-MS und LC-NMR als 8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid, 8-Hydroxykämpferol und Quercetin-7-O-glucosid identifiziert² und quantitativ bestimmt werden.

Abbildung 30: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 1
HPLC-Bedingungen siehe S. 8



² Ich danke Dr. M. Zehl (Univ. Wien, Department für Pharmakognosie) für die LC-MS der Substanzen und Dr. J. Conrad und Fr. C. Braunberger (Univ. Hohenheim, Fachbereich Chemie) für die LC-NMR Untersuchungen.

Für die Bestimmung der Konzentration der Inhaltsstoffe mithilfe des internen Standards wurde folgende Formel angewandt:

$$\% \text{ Flavonoid} = \frac{EW_{\text{St}} \cdot A_{\text{Fl}} \cdot 100 \cdot f_K}{EW_{\text{Dr}} \cdot A_{\text{St}}}$$

EW_{Dr} ...Einwaage der Droge

EW_{St} ...Einwaage des Standards (Saponarin)

A_{Fl} ...Peakfläche des Flavonoids

A_{St} ...Peakfläche des Standards

f_K ...Standardkorrekturfaktor

Tabelle 32: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 1

Phenol	Gehalt in % (n=2)
Gossypitrin	0,895 ± 0,038
Ellagsäure	0,549 ± 0,017
Quercetin-7-O-glucosid	0,054 ± 0,008
Isoquercitrin	0,208 ± 0,000
8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid	0,260 ± 0,015
Astragalin	0,162 ± 0,005
Gossypetin	0,318 ± 0,013
8-Hydroxykämpferol	0,113 ± 0,006
Quercetin	0,134 ± 0,003
Dimethylellagsäure	0,070 ± 0,001
Kämpferol	0,054 ± 0,000
Gesamt	2,817 ± 0,089

In diesem Muster stellten Gossypitrin, Ellagsäure und Gossypetin die Hauptkomponenten dar, während Quercetin-7-O-glucosid, 8-Hydroxykämpferol, Dimethylellagsäure und Kämpferol nur in niedrigen Mengen detektiert werden konnten. Isoquercitrin, 8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid, Astragalin und Quercetin lagen in mittleren Konzentrationen vor.

Abbildung 31: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 2
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

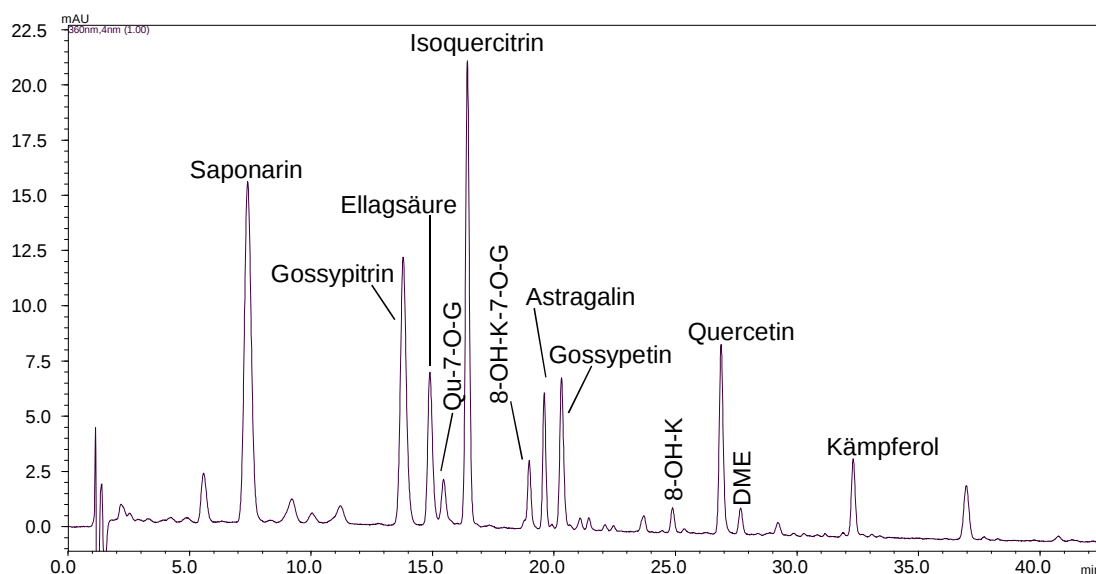


Tabelle 33: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 2

Phenol	Gehalt in % (n=2)
Gossypitrin	0,577 ± 0,013
Ellagsäure	0,207 ± 0,003
Quercetin-7-O-glucosid	0,050 ± 0,000
Isoquercitrin	0,420 ± 0,001
8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid	0,097 ± 0,001
Astragalin	0,108 ± 0,001
Gossypetin	0,153 ± 0,003
8-Hydroxykämpferol	0,022 ± 0,000
Quercetin	0,110 ± 0,000
Dimethylellagsäure	0,031 ± 0,000
Kämpferol	0,036 ± 0,002
Gesamt	1,811 ± 0,019

Bei diesem Muster waren Gossypitrin und Isoquercitrin die Hauptkomponenten, während Quercetin-7-O-glucosid, 8-Hydroxykämpferol, Dimethylellagsäure und Kämpferol nur in Spuren vorkamen. Ellagsäure, 8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid, Astragalin, Gossypetin und Quercetin lagen in mittlerer Konzentration vor.

Abbildung 32: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 3
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

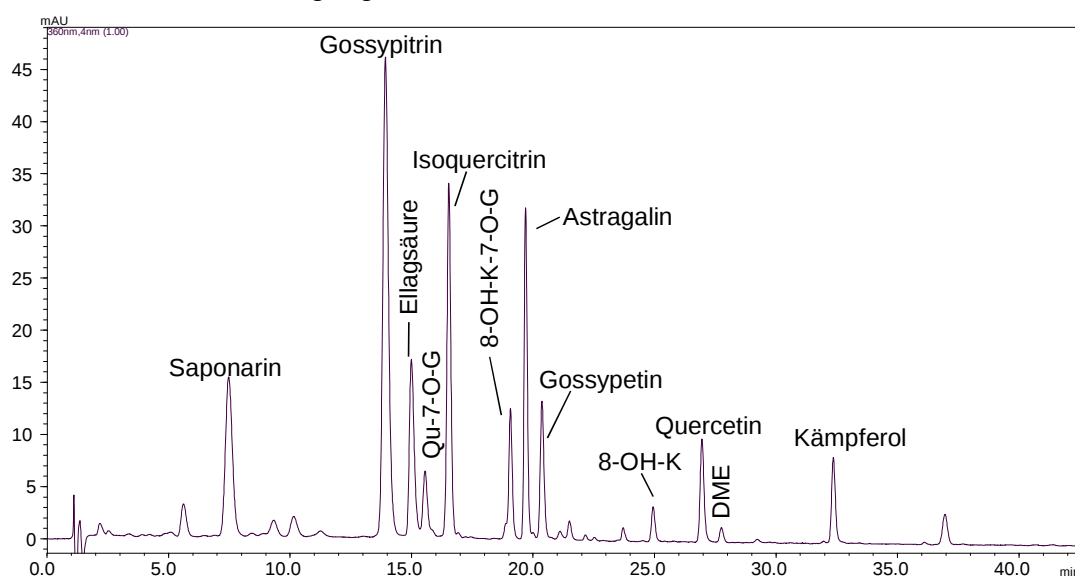
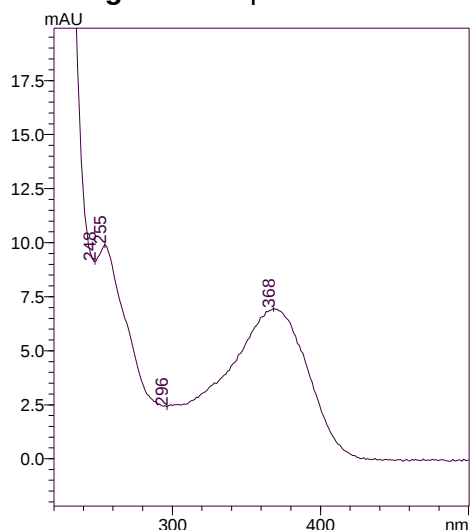


Tabelle 34: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 3

Phenol	Gehalt in % (n=8)
Gossypitrin	2,113 ± 0,083
Ellagsäure	0,524 ± 0,014
Quercetin-7-O-glucosid	0,151± 0,005
Isoquercitrin	0,687 ± 0,008
8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid	0,361 ± 0,017
Astragalin	0,547 ± 0,020
Gossypetin	0,289 ± 0,013
8-Hydroxykämpferol	0,068 ± 0,006
Quercetin	0,127 ± 0,004
Dimethylellagsäure	0,035 ± 0,003
Kämpferol	0,087 ± 0,002
Gesamt	4,920 ± 0,152

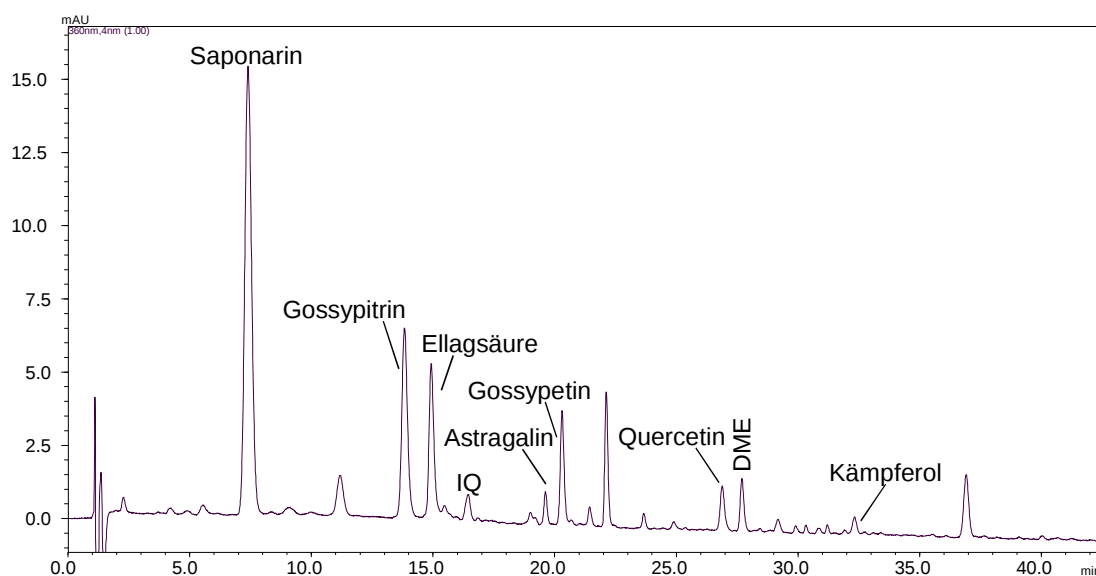
Auch das Muster 3 enthielt Gossypitrin, Ellagsäure und Isoquercitrin als Hauptkomponenten und Astragalin lag in höherer Konzentration vor. Von dem Peak, der bei Minute 15,6 zwischen Ellagsäure und Isoquercitrin eluierte, wurde ein UV-Spektrum aufgenommen (siehe Abbildung 33, Seite 43).

Abbildung 33: UV-Spektrum von Peak bei Minute 15,6 (Muster 3)



Aufgrund des Maximums im UV-Spektrum bei 368 nm wurde auf das Vorliegen eines hydroxylierten Flavonoides geschlossen. Bei Untersuchungen mittels LC-MS und LC-NMR wurde die Substanz als Quercetin-7-O-glucosid identifiziert³.

Abbildung 34: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 4
HPLC-Bedingungen siehe S. 8



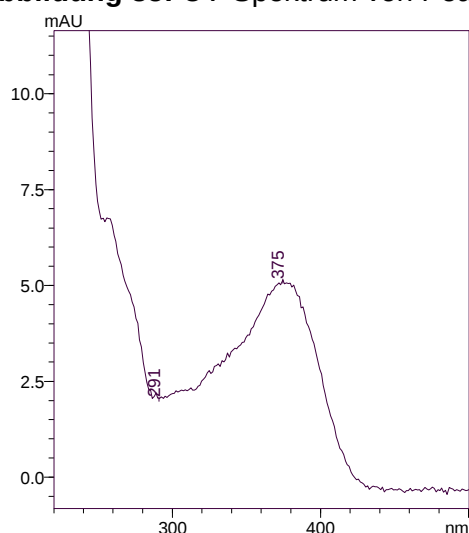
³ Dank Dr. M. Zehl (Univ. Wien, Department für Pharmakognosie), Dr. J. Conrad und Fr. C. Braunberger (Univ. Hohenheim, Fachbereich Chemie).

Tabelle 35: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 4

Phenol	Gehalt in % (n=2)
Gossypitrin	0,209 ± 0,020
Ellagsäure	0,164 ± 0,005
Isoquercitrin	0,023 ± 0,003
Gossypetin	0,084 ± 0,006
Quercetin	0,021 ± 0,002
Dimethylellagsäure	0,047 ± 0,003
Gesamt	0,630 ± 0,038

Bei diesem Muster war die Gesamtkonzentration der phenolischen Inhaltsstoffe sehr niedrig im Vergleich zu den anderen Handelsmustern. Nur Gossypitrin, Ellagsäure und Gossypetin lagen in mittleren Konzentrationen vor. Isoquercitrin, Quercetin und Dimethylellagsäure waren sehr niedrig konzentriert und andere Komponenten, die in den anderen Handelsmustern detektiert wurden, waren nicht quantifizierbar. Ein zusätzlicher unbekannter Peak mit einer Retentionszeit von 22,2 Minuten wurde detektiert.

Abbildung 35: UV-Spektrum von Peak bei Minute 22,2 (Muster 4)



Das UV-Spektrum des unbekannten Peaks ließ aufgrund des Maximums bei 375 nm darauf schließen, dass es sich um ein mehrfach hydroxyliertes Flavonoid handelte.

3.3.2. Flavonoide in Mustern von *Drosera peltata* aus der *in vitro* Kultivierung

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte überprüft werden, ob das Flavonoidmuster von *Drosera peltata* aus der pflanzlichen Gewebekultur mit jenem aus Wildsammlungen übereinstimmt. Außerdem war zu klären, wie sich das Flavonoidmuster bei der Akklimatisierung im Glashaus verändert und ob es durch unterschiedliche Trocknung des Frischmaterials beeinflusst wird.

Zur Untersuchung wurden vier verschiedene Muster eines Klons von *Drosera peltata* herangezogen (siehe Kapitel 2.1, Seite 4). Drei Muster kamen direkt aus der pflanzlichen Gewebekultur, ein Muster war nach der Akklimatisierung im Glashaus geerntet worden. Eine der Proben aus der Gewebekultur war lyophilisiert, zwei waren luftgetrocknet.

Abbildung 36: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 5, luftgetrocknet
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

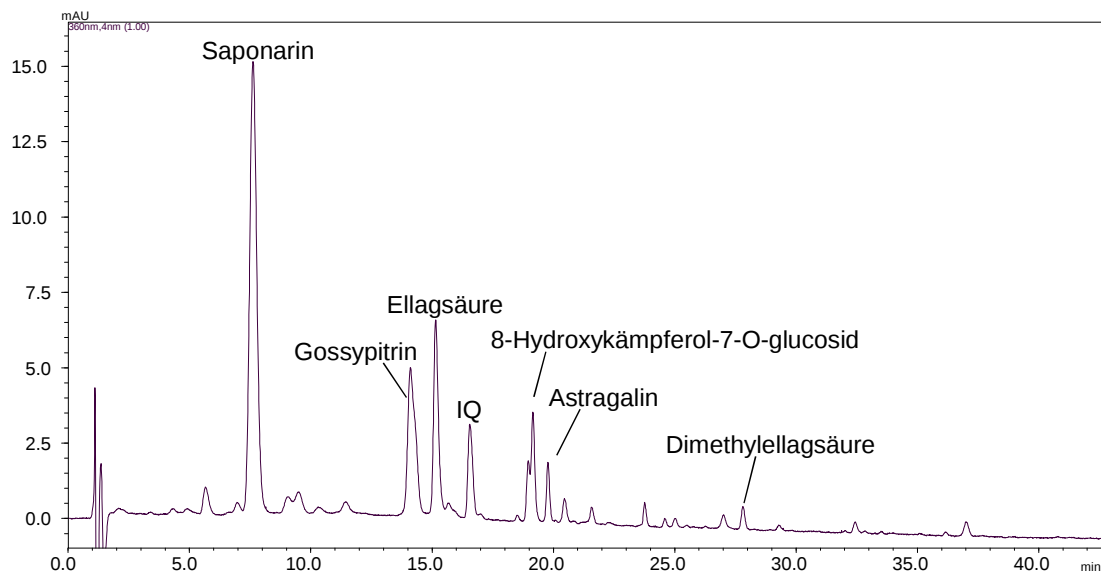


Tabelle 36: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 5, luftgetrocknet

Phenol	Gehalt in % (n=2)
Gossypitrin	0,292 ± 0,018
Ellagsäure	0,199 ± 0,001
Isoquercitrin	0,078 ± 0,002
8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid	0,097 ± 0,011
Astragalin	0,032 ± 0,004
Dimethylellagsäure	0,018 ± 0,000
Gesamt	0,698 ± 0,037

Die Konzentration der Inhaltsstoffe war erheblich niedriger als bei den Handelsmustern aus der Wildsammlung. Ein Grund dafür könnte sein, dass Pflanzen in der pflanzlichen Gewebekultur üblicherweise weniger sekundäre Stoffwechselprodukte bilden [19].

Der Vergleich desselben Klon nach Lufttrocknung beziehungsweise Gefrier-trocknung sollte zeigen, ob bei der schonenderen Lyophilisierung höhere Konzen-trationen an Flavonoiden und Ellagsäurederivaten erhalten bleiben.

Abbildung 37: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 6, luftgetrocknet
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

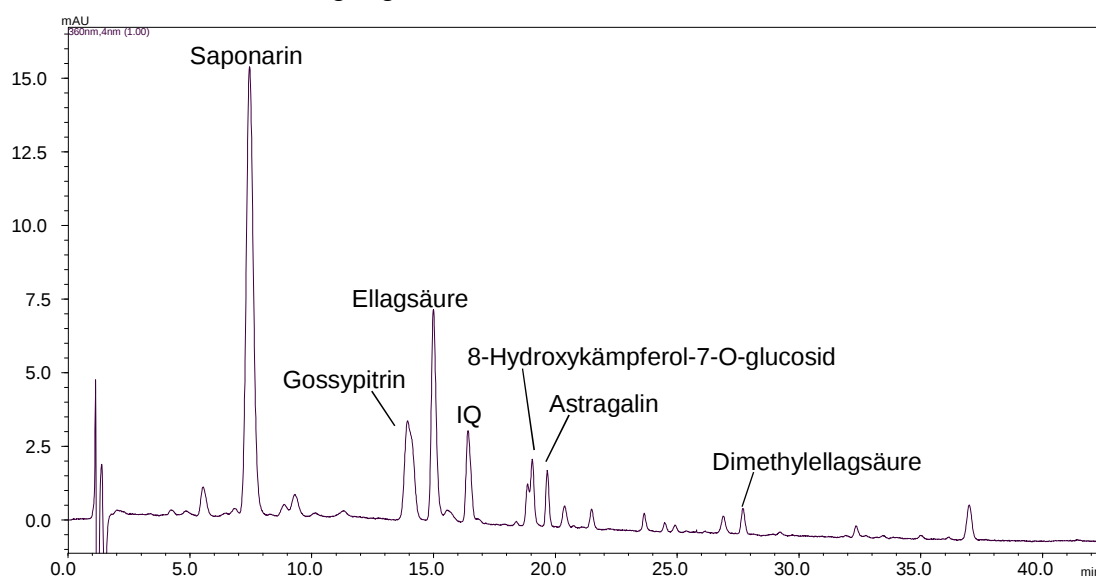


Tabelle 37: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 6, luftgetrocknet

Phenol	Gehalt in % (n=2)
Gossypitrin	0,219 ± 0,013
Ellagsäure	0,191 ± 0,001
Isoquercitrin	0,073 ± 0,004
8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid	0,062 ± 0,004
Astragalin	0,030 ± 0,001
Dimethylellagsäure	0,021 ± 0,000
Gesamt	0,596 ± 0,023

Abbildung 38: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 7, lyophilisiert
HPLC-Bedingungen siehe S. 8

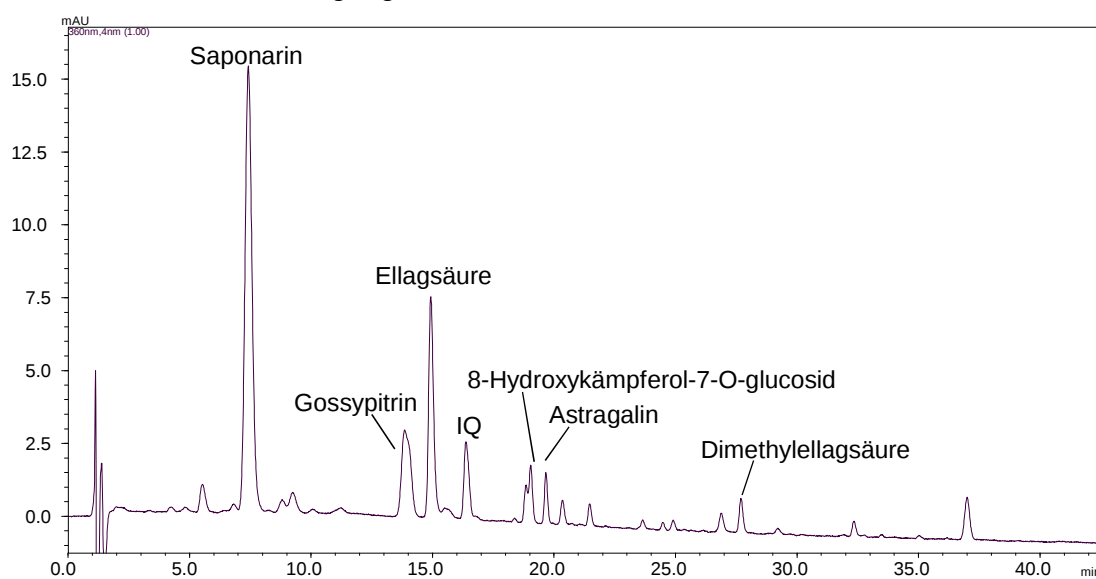


Tabelle 38: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 7, lyophilisiert

Phenol	Gehalt in % (n=2)
Gossypitrin	0,218 ± 0,003
Ellagsäure	0,237 ± 0,003
Isoquercitrin	0,071 ± 0
8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid	0,058 ± 0,001
Astragalin	0,031 ± 0
Dimethylellagsäure	0,031 ± 0,001
Gesamt	0,647 ± 0,008

Es war zu erkennen, dass die Art wie die Droge getrocknet worden war, keinen großen Einfluss auf die Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe hatte. Allerdings war der Gehalt an Ellagsäurederivaten in der lyophilisierten Probe etwas höher, was darauf schließen lässt, dass für diese Komponente die schonendere Trocknung zu bevorzugen wäre.

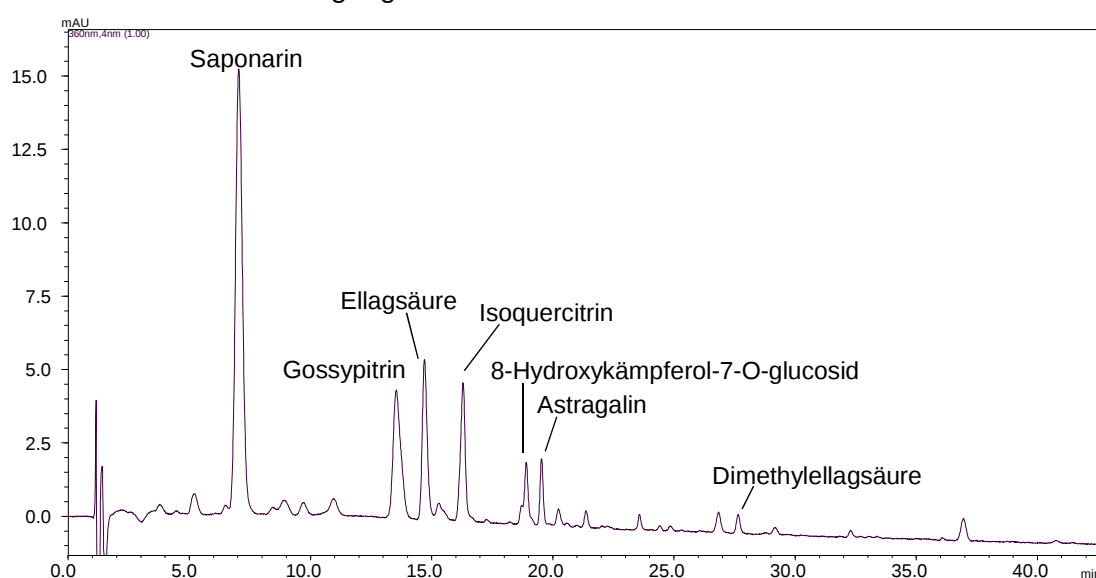
Abbildung 39: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 8, akklimatisiert HPLC-Bedingungen siehe S. 8

Tabelle 39: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 8, akklimatisiert

Phenol	Gehalt in % (n=2)
Gossypitrin	0,237 ± 0,018
Ellagsäure	0,151 ± 0,011
Isoquercitrin	0,101 ± 0,011
8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid	0,062 ± 0,001
Astragalin	0,033 ± 0,004
Dimethylellagsäure	0,014 ± 0,001
Gesamt	0,598 ± 0,046

Bei der akklimatisierten Probe konnte gezeigt werden, dass sich bei ca. zweimonatiger Kultivierung im Glashaus zwar das Verhältnis der Komponenten zueinander geringfügig verändert hatte, allerdings war die Gesamtkonzentration der Inhaltsstoffe nicht angestiegen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Pflanzen im Glashaus noch so gut geschützt sind, dass eine Steigerung der Produktion an Flavonoiden, die auch als UV-Schutz für die Pflanze interpretiert werden, offensichtlich kaum oder erst relativ langsam erfolgt [20].

Der Vergleich der Muster aus dem Handel mit jenen aus der Gewebekultur zeigte, dass das Inhaltstoffmuster aller Proben übereinstimmte, es jedoch große Unterschiede bezüglich der Konzentrationen gab. Die Gesamtkonzentration der Phenole war bei den Mustern aus der Gewebekultur wesentlich geringer. Die Konzentration der einzelnen Komponenten unterschied sich sowohl innerhalb der Handelsmuster als auch innerhalb der in-vitro kultivierten Pflanzen. Die Inhaltsstoffe Quercetin-7-O-glucosid, Gossypetin, 8-Hydroxykämpferol, Quercetin und Kämpferol, die in den Mustern aus dem Handel in niedrigen Konzentration vorlagen, befanden sich in den Mustern aus der Gewebekultur unter der Bestimmungsgrenze. Gossypitrin, Ellagsäure, Isoquercitrin und Astragalin waren die Hauptkomponenten in fast allen Mustern, nur in Muster 4 waren kaum Isoquercitrin und Astragalin nachzuweisen.

Tabelle 40: Gegenüberstellung der Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe in Mustern von *Drosera peltata* aus dem Handel und der Gewebekultur

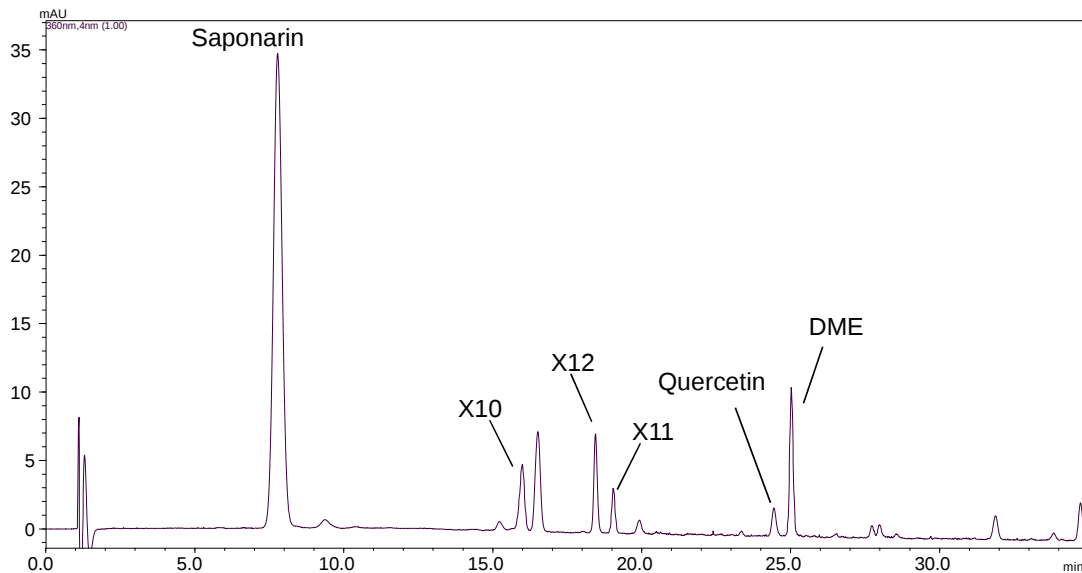
Phenol	Handelsmuster				Gewebekultur			
	1	2	3	4	5	6	7	8
Gossypitrin	0,895	0,577	2,313	0,290	0,292	0,219	0,218	0,237
Ellagsäure	0,549	0,207	0,524	0,164	0,199	0,191	0,237	0,151
Qu-7-O-G	0,054	0,050	0,151	-	-	-	-	-
Isoquercitrin	0,208	0,420	0,687	0,023	0,078	0,073	0,071	0,101
8-OH-K-7-O-G	0,260	0,097	0,361	-	0,097	0,062	0,058	0,062
Astragalin	0,162	0,108	0,547	-	0,032	0,030	0,031	0,033
Gossypetin	0,318	0,153	0,289	0,084	-	-	-	-
8-OH-K	0,113	0,022	0,068	-	-	-	-	-
Quercetin	0,134	0,110	0,127	0,021	-	-	-	-
DME	0,070	0,031	0,035	0,047	0,018	0,021	0,031	0,014
Kämpferol	0,054	0,036	0,087	-	-	-	-	-
Gesamt	2,817	1,811	4,920	0,630	0,698	0,596	0,647	0,598

3.4. HPLC-Überprüfung der Extrakte für LC-NMR

Da in vorangegangenen Untersuchungen in verschiedenen *Drosera*-Arten eine Reihe von Analyten detektiert worden war [17], die mit Vergleichssubstanzen nicht identifiziert werden konnten, sollten diese Extrakte mittels LC-NMR untersucht werden. Wegen der geringen Empfindlichkeit dieser Methode mussten die Analyten angereichert und Begleitstoffe soweit wie möglich entfernt werden. Dazu wurden methanolische Extrakte von *Drosera binata*, *Drosera hilaris* und *Drosera peltata* mit Petrolether extrahiert. Die aufgereinigten Extrakte sowie die abgetrennten Petrolether-Fractionen wurden auf das Muster von phenolischen Inhaltsstoffen überprüft. Es sollten durch den Reinigungsschritt der Extrakte mit Petrolether keine der phenolischen Inhaltsstoffe abgetrennt werden.

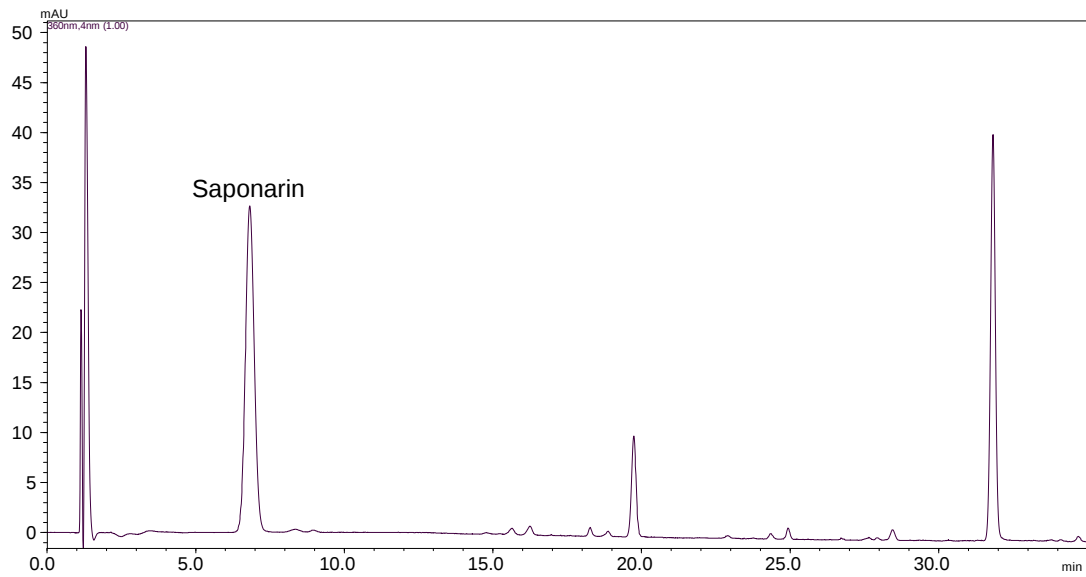
3.4.1. *Drosera binata*

Abbildung 40: Chromatogramm des aufgereinigten methanolischen Extraktes von *Drosera binata*. Elutionsgradient: 12% Phase B für 8 Minuten, Steigerung auf 20,5% bis zur Minute 15,1 und auf 43,9% bis zur Minute 32



Die Peaks konnten bis auf Quercetin und Dimethylellagsäure nicht identifiziert werden. Die UV-Spektren und Retentionszeiten der unbekannten Inhaltsstoffe X10, X11 und X12 stimmten mit vorangegangenen Untersuchungen von *Drosera binata* überein.

Abbildung 41: Chromatogramm der Petrolether-Fraktion nach Aufreinigung von *Drosera binata*. Elutionsgradient: 12% Phase B für 8 Minuten, Steigerung auf 20,5% bis zur Minute 15,1 und auf 43,9% bis zur Minute 32

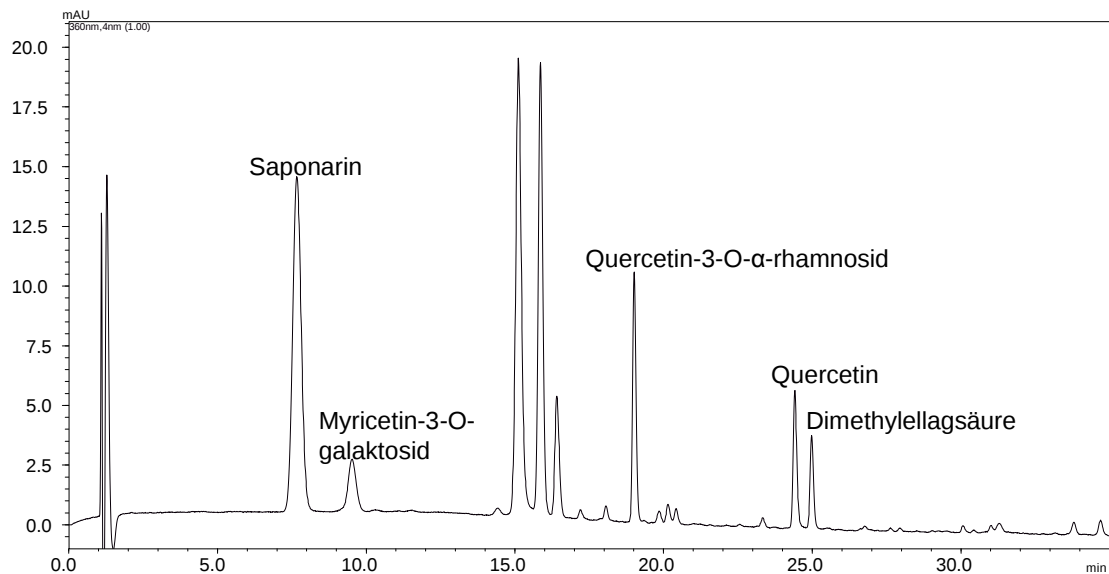


Durch die UV-Spektren der bei 360nm detektierten Peaks im Chromatogramm der Petrolether-Fraktion konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Flavonoide handelte.

3.4.2. *Drosera hilaris*

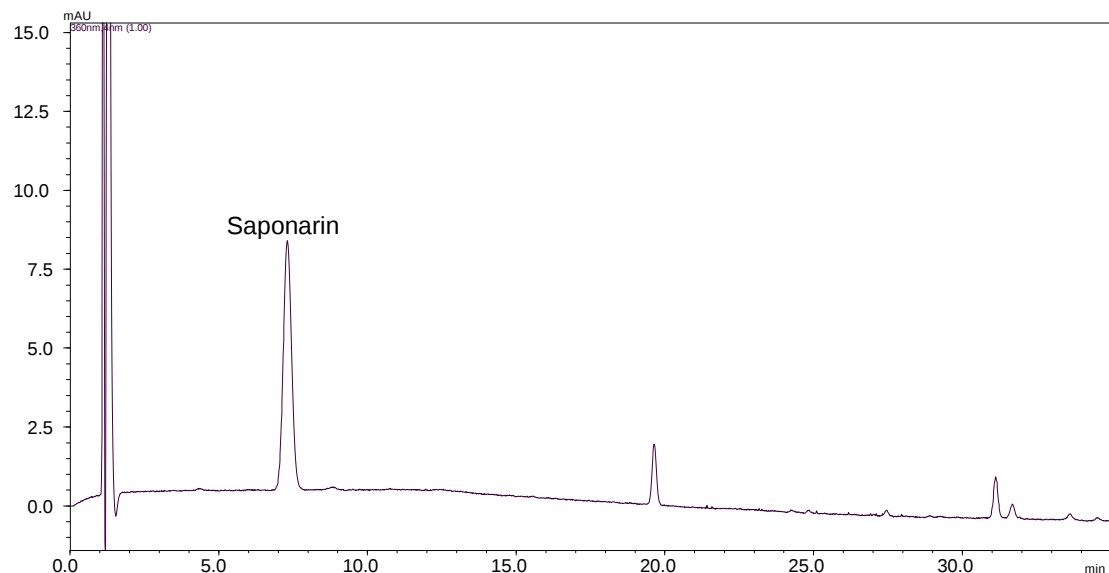
Von *Drosera hilaris* wurde unter den gleichen Bedingungen eine Untersuchung auf die phenolischen Inhaltsstoffe durchgeführt.

Abbildung 42: Chromatogramm des aufgereinigten methanolischen Extraktes von *Drosera hilaris*. Elutionsgradient: 12% Phase B für 8 Minuten, Steigerung auf 20,5% bis zur Minute 15,1 und auf 43,9% bis zur Minute 32



Zwischen Minute 15 und 17 kam es zur Koelution mehrerer Inhaltsstoffe des Extraktes. Eine LC-NMR Untersuchung sollte klären, um welche Substanzen es sich handelt.

Abbildung 43: Chromatogramm der Petrolether-Fraktion nach Aufreinigung von *Drosera hilaris*. Elutionsgradient: 12% Phase B für 8 Minuten, Steigerung auf 20,5% bis zur Minute 15,1 und auf 43,9% bis zur Minute 32



Auch bei der Aufreinigung des Extraktes aus *Drosera hilaris* konnte durch die UV-Spektren der detektierten Peaks ausgeschlossen werden, dass mit Petrolether relevante phenolische Inhaltsstoffe abgetrennt wurden.

3.4.3. *Drosera peltata*

Abbildung 44: Chromatogramm des aufgereinigten methanolischen Extraktes von *Drosera peltata*. Elutionsgradient: 12% Phase B für 8 Minuten, Steigerung auf 20,5% bis zur Minute 15,1 und auf 43,9% bis zur Minute 32

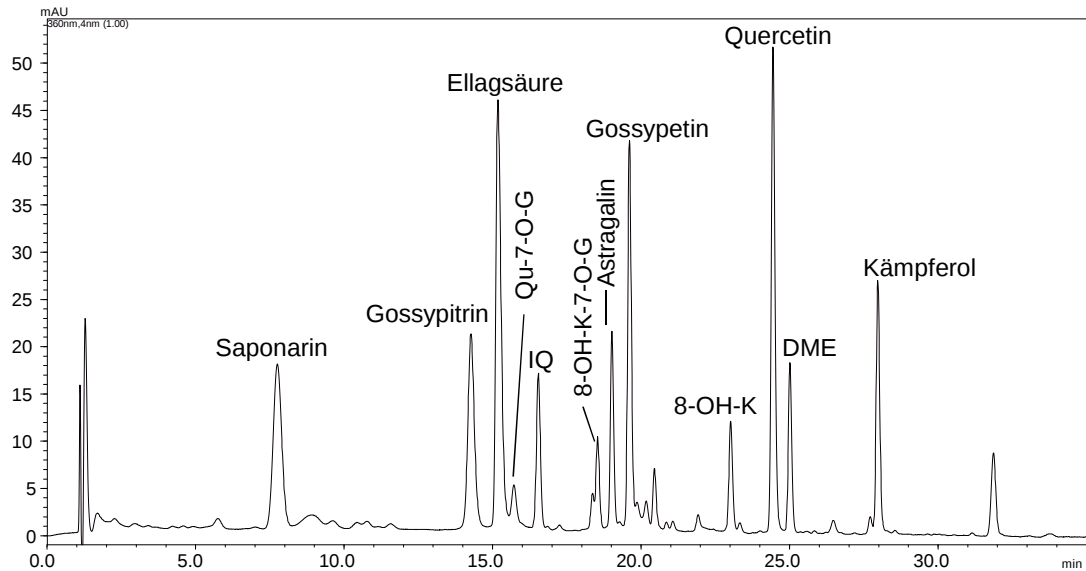
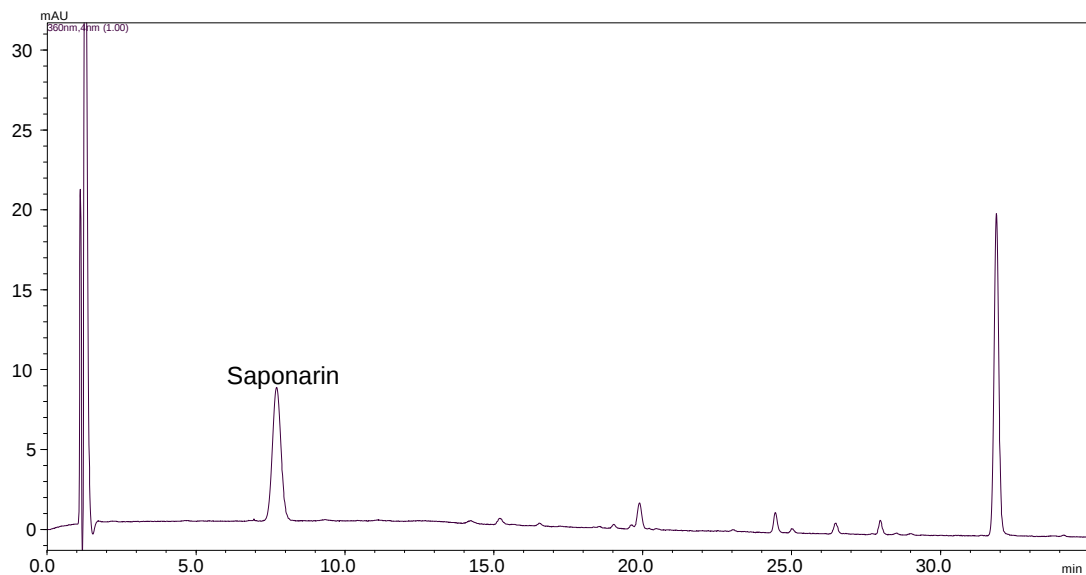


Abbildung 45: Chromatogramm der Petrolether-Fraktion nach Aufreinigung von *Drosera peltata*. Elutionsgradient: 12% Phase B für 8 Minuten, Steigerung auf 20,5% bis zur Minute 15,1 und auf 43,9% bis zur Minute 32



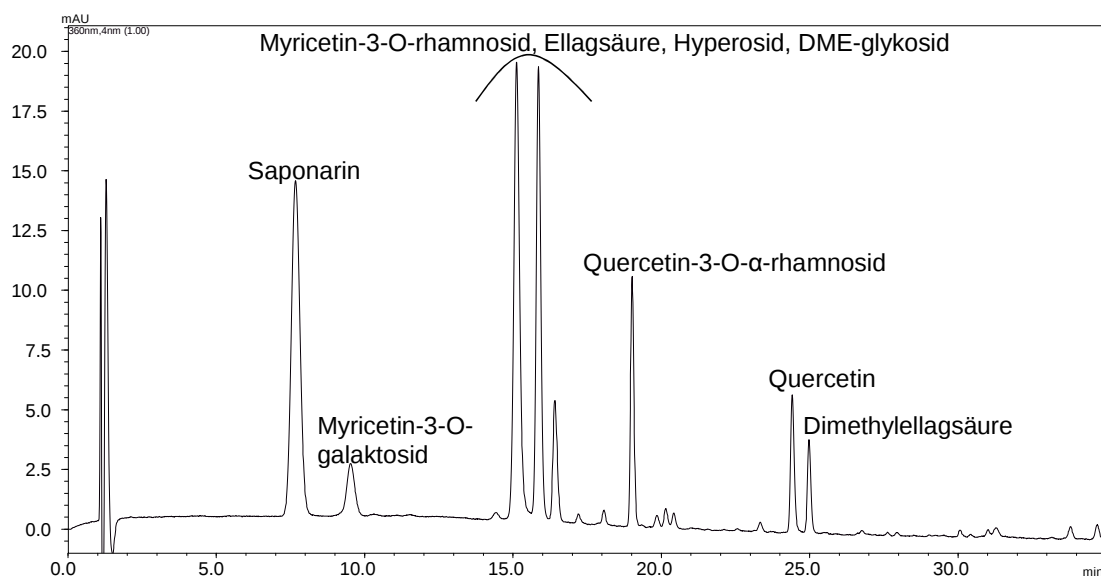
Auch bei *Drosera peltata* konnte nachgewiesen werden, dass keine relevanten Inhaltsstoffe durch den Aufreinigungsschritt mit Petrolether abgetrennt wurden.

3.5. Entwicklung einer HPLC-Methode für *Drosera hiliaris*

Das Inhaltstoffmuster von *Drosera hiliaris* unterschied sich weitgehend von dem Muster von *Drosera peltata* und der entwickelte Gradient konnte aufgrund der Koelution mehrerer Flavonoide nicht für diese Drosera-Art übernommen werden.

Es sollte daher für die Trennung dieser Komponenten durch Veränderung des Gradientenprofils eine geeignete HPLC-Methode entwickelt werden. Dazu wurde die Elution der Analyten im ersten Schritt unter Verwendung des für die medizinisch verwendeten Drosera Arten entwickelten Gradienten überprüft [21] (siehe Abbildung 46, S. 55).

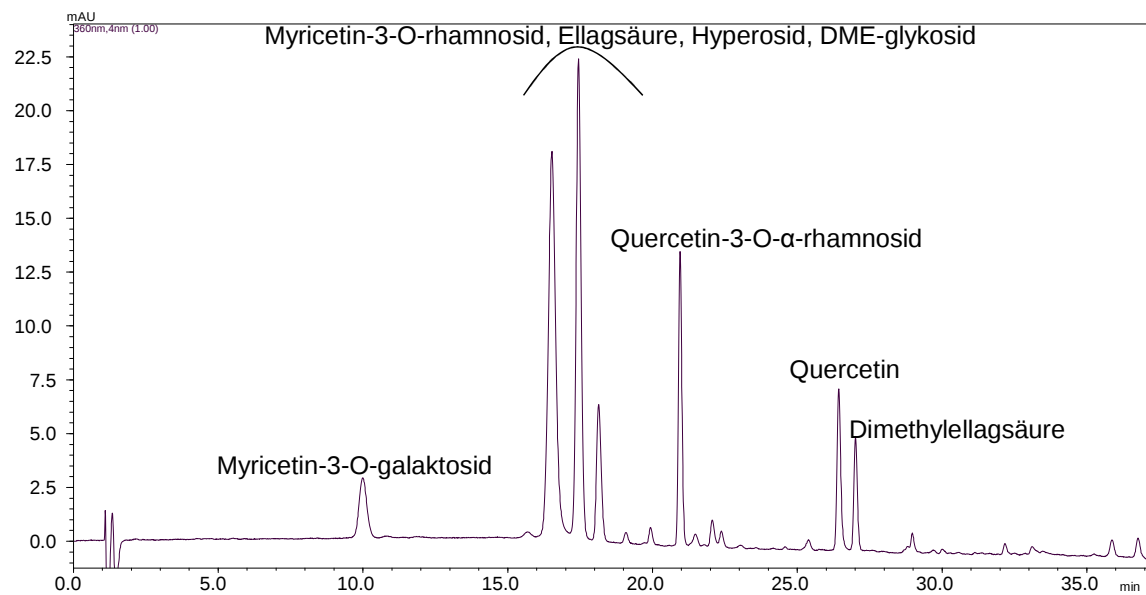
Abbildung 46: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera hiliaris*
Gradient: 8min 12% B, bis 15,1min auf 20,5% B, bis 32min auf 43,9% B



Der Gradient führte bei *Drosera hiliaris* zu einer Überlagerung von Myricetin-3-O-rhamnosid mit Ellagsäure, Hyperosid und einem Dimethylellagsäureglykosid.

Daher wurde versucht, die Peaks besser aufzutrennen, indem die Steigerung der Konzentration von Fließmittelkomponente B erst bei 10 Minuten begann (siehe Abbildung 47, S. 56).

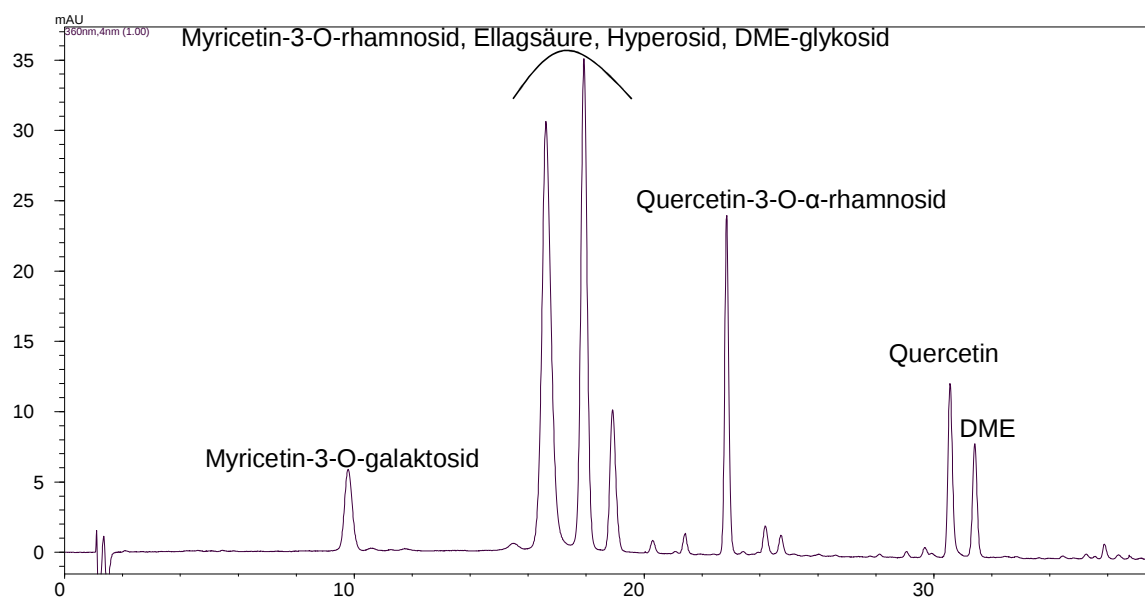
Abbildung 47: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera hiliaris*
Gradient: 10min 12% B, bis 17,1min auf 20,5% B, bis 34min auf 43,9% B



Der Gradient brachte keine verbesserte Auftrennung der Peaks.

Der isokratische Schritt von zehn Minuten mit 12% Phase B wurde belassen, die Steigung auf 43,9% erfolgte langsamer und wurde bis zur Minute 50 verlängert (siehe Abbildung 48, S. 56).

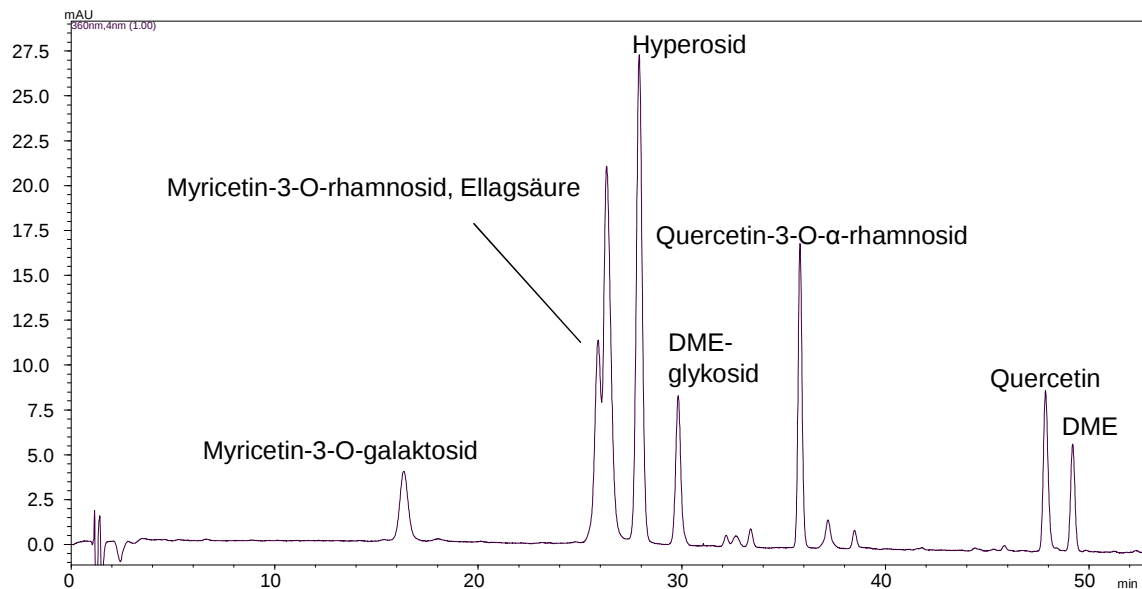
Abbildung 48: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera hiliaris*
Gradient: 10min 12% B, bis 50min auf 43,9% B



Obwohl die Auflösung der drei Peaks verbessert wurde, kam es nicht zur vollständigen Trennung der vier Substanzen. Daher wurde der isokratische Schritt mit 10%

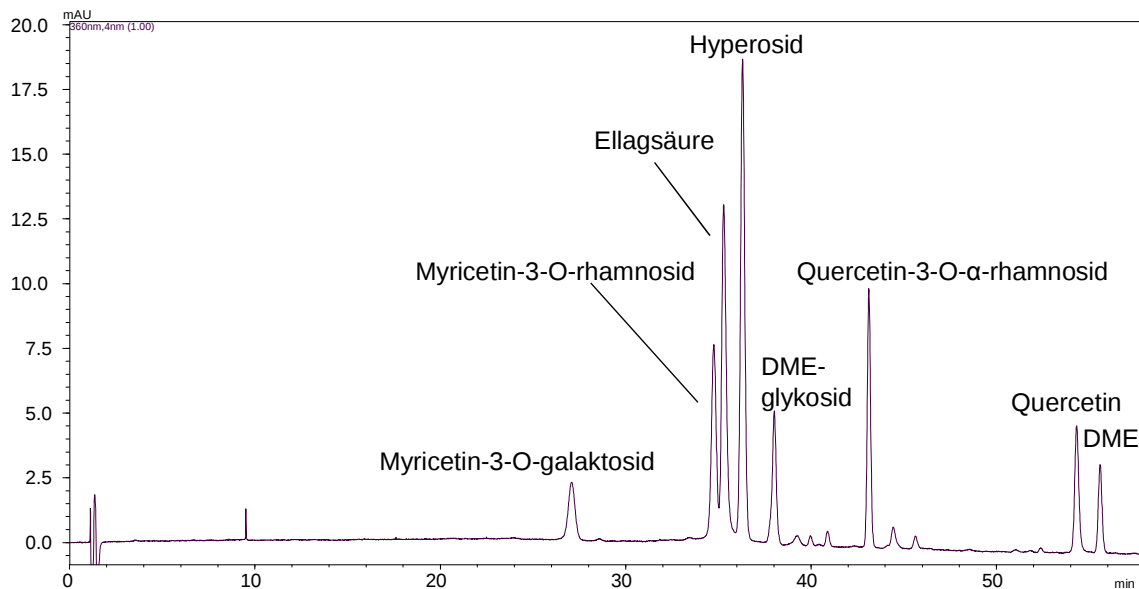
Phase B auf 15 Minuten verlängert und die Steigung des Gradienten abgeflacht, indem Phase B innerhalb von 50 Minuten nur auf eine Konzentration von 25% erhöht wurde (siehe Abbildung 49, S.57)

Abbildung 49: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera hiliaris*
Gradient: 15min 10% B, bis 50min auf 25% B



Mit diesem Elutionsgradienten konnte eine Antrennung der Peaks von Myricetin-3-O-rhamnosid und Ellagsäure erzielt werden. Um diese Trennung zu verbessern, wurde die isokratische Elution auf 20 Minuten verlängert und mit nur 9% Phase B eluiert. Danach erfolgte bis zur Minute 55 eine Steigerung auf 25% Phase B (siehe Abbildung 50, S.58).

Abbildung 50: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera hilaris*
Gradient: 20min 9% B, bis 55min auf 25% B

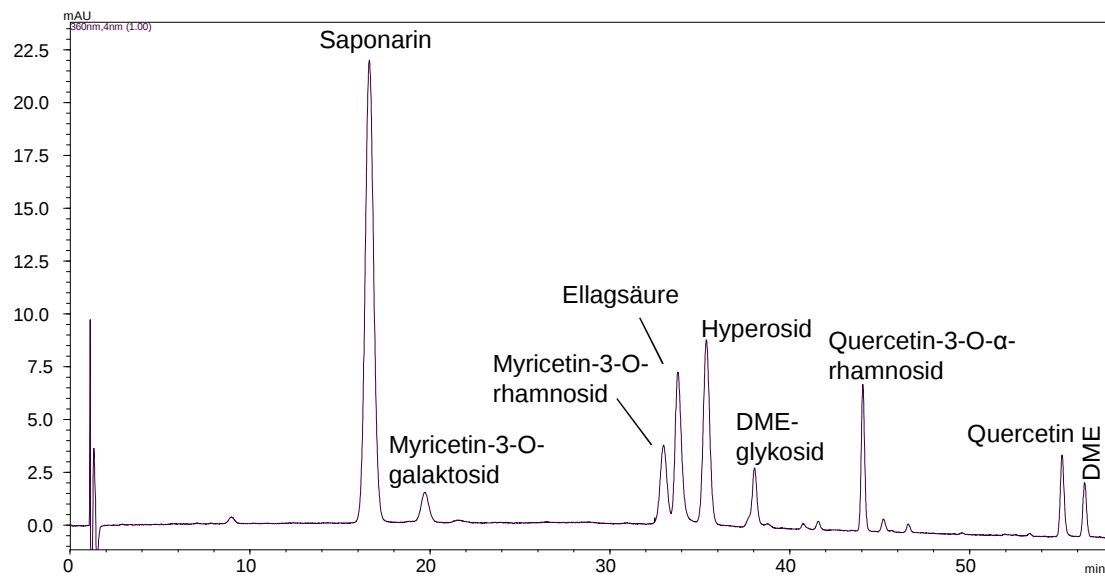


Bei diesem Gradienten konnte eine relativ gute Auftrennung von Myricetin-3-O-rhamnosid und Ellagsäure erzielt werden, allerdings war die Auflösung noch nicht zufriedenstellend für eine präzise Quantifizierung der Analyten.

Da die Erniedrigung der Konzentration der Fließmittelkomponente B die Auftrennung verbessert hatte, wurden mehrere Versuche unter Verkürzung der isokratischen Phase bei noch niedrigeren Anfangskonzentrationen durchgeführt, die jedoch alle nicht zur Verbesserung führten.

Die beste Auftrennung wurde mit 25 Minuten isokratischer Elution mit 10% Phase B und einer Steigerung des Gradienten in 50 Minuten auf 25% Phase B erreicht. Allerdings musste die Laufzeit wegen der späten Elution von Dimethylellagsäure bei dieser Methode auf 55 Minuten verlängert werden. Für die spätere Quantifizierung des Extraktes wurde Saponarin als Standard zugesetzt (siehe Abbildung 51, S. 59).

Abbildung 51: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von *Drosera hilaris*
Gradient: 25min 10% B, bis 55min auf 25% B



Es wurde eine Reihe weiterer Versuche durchgeführt, um die Elution der Komponenten etwas zu beschleunigen, die allerdings nicht erfolgreich waren.

Die entwickelte Methode ermöglichte durch vollständige Auftrennung der Inhaltsstoffe eine präzise Quantifikation.

4. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Diplomarbeit war die Entwicklung einer HPLC Methode, die eine präzise quantitative Analyse der polaren phenolischen Inhaltsstoffe von *Drosera peltata* und *Drosera hilaris* ermöglichte. Nach einer umfassenden Validierung sollte die Methode zur Untersuchung des Flavonoid- und Phenolcarbonsäuremusters in Handelsmustern von *Drosera peltata* im Vergleich mit *Drosera peltata* aus der *in vitro* Kultivierung angewandt werden.

Die Droge wurde mit Methanol extrahiert und mit folgendem HPLC-System analysiert: Als stationäre Phase wurde eine narrow bore Säule Dionex Acclaim® 120 C18, 150 mm × 2,1 mm × 3 µm eingesetzt. Die mobile Phase setzte sich aus Komponente A (H₂O mit CH₃COOH auf pH 2,8 eingestellt) und Komponente B (Acetonitril mit 8 ml CH₃COOH/l) zusammen.

Als interner Standard eignete sich Saponarin, da es mit keiner der zu analysierenden Substanzen koeluiert, die Laufzeit nicht verlängert und bisher in der Gattung *Drosera* nicht nachgewiesen wurde.

Es wurde ein Gradient mit einer 8-minütigen isokratischen Phase bei 13% B am Beginn und einer Steigerung bis zur Minute 40 auf 40% B (siehe Abbildung 5, S. 12) entwickelt.

Diese Methode wurde eingesetzt, um vier Handelsmuster von *Drosera peltata* zu analysieren.

Alle Muster stammten aus Wildsammlungen und ihr Inhaltstoffmuster stimmte qualitativ sehr gut überein. Zusätzlich zu Gossypitrin, Ellagsäure, Isoquercitrin, Astragalin, Gossypetin, Quercetin, Dimethylellagsäure und Kämpferol wurden erstmals Quercetin-7-O-glucosid, 8-Hydroxykämpferol-7-O-glucosid und 8-Hydroxykämpferol in *Drosera peltata* nachgewiesen. In der Konzentration der einzelnen Inhaltsstoffe als auch in der Gesamtphenolkonzentration wurden deutliche Unterschiede zwischen den Proben festgestellt.

In drei Handelsmustern waren die Hauptinhaltsstoffe Gossypitrin, Ellagsäure, Isoquercitrin und Astragalin. Die Gesamtflavonoidkonzentration lag zwischen 1,811% und 4,920%.

Bei dem vierten Handelsmuster wurden Gossypitrin und Ellagsäure als Hauptinhaltsstoffe nachgewiesen und die Gesamtflavonoidkonzentration lag mit 0,630% deutlich unter den anderen Drogenmustern.

Diese Werte wurden mit vier Mustern von *Drosera peltata* aus der in-vitro Kultivierung verglichen. Ein Muster war im Glashaus akklimatisiert worden, die anderen stammten direkt aus der Gewebekultur, wobei davon zwei Muster luftgetrocknet waren und eines lyophilisiert.

Zusammenfassend kann für alle Muster aus der in-vitro Kultivierung gesagt werden, dass die Gesamtphenolkonzentration deutlich niedriger war als jene der Handelsmuster und ein Großteil der analysierten Inhaltsstoffe unter der Bestimmungsgrenze lag.

Bei Muster 5 betrug die Gesamtkonzentration der phenolischen Inhaltsstoffe 0,698% und die Hauptkomponenten waren Gossypitrin und Ellagsäure. Das luftgetrocknete Muster 6 zeigte eine ähnliche Verteilung der Inhaltsstoffe, wobei die Konzentration nur 0,596% betrug. Auch die lyophilisierte Droge von Muster 7 zeigte trotz schonender Trocknungsweise mit 0,647% nur eine geringfügig höhere Konzentration an Flavonoiden. Das Drogenmuster der akklimatisierten Pflanze hatte ebenfalls eine ähnliche Gesamtphenolkonzentration von 0,598%.

Die Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen überein, bei denen in *Drosera peltata* Quercetin, Gossypetin und Gossypin detektiert worden waren [4].

Die Validierung der Methode und des HPLC-Systems hinsichtlich Reproduzierbarkeit, Bestimmung- und Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate einzelner Analyten brachte zufriedenstellende Ergebnisse.

Für die Reproduzierbarkeit sowohl intra- als auch interday wurde eine Probe viermal am selben Tag und viermal innerhalb von weiteren vierzehn Tagen extrahiert und analysiert. Die RSD betrug zwischen 0,58 - 9,36%. Die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen der einzelnen Analyten lagen zwischen 0,150 und 2,399 ng und die Wiederfindungsraten lagen annähernd bei 100%.

Auch für *Drosera hilaris* wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Das Problem bei dieser Art bestand darin, dass es zu einer Überlagerung der Substanzen Myricetin-3-O-rhamnosid, Ellagsäure, Hyperosid mit einem Dimethylellagsäureglykosid kam. Nur durch eine entsprechende Verlängerung der Analysezeit aufgrund eines sehr flachen Elutionsgradienten konnte eine Grundlinientrennung der Peaks erreicht werden.

Die beste Auftrennung wurde mit einem Gradienten erzielt, der 25 Minuten mit 10% B und 90% A isokratisch war und bis zur Minute 55 auf 25% B gesteigert wurde (siehe Abbildung 51, Seite 59).

Weiters wurden im Rahmen dieser Arbeit Trockenextrakte verschiedener *Drosera*-Arten für Analysen mittels LC-NMR mit Petrolether aufgereinigt und es konnte sichergestellt werden, dass durch den Reinigungsschritt keine relevanten Inhaltsstoffe abgetrennt wurden.

5. Quellenangabe

1. Cronquist A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, 1981.
2. Juniper B., Robins R., Joel D. The carnivorous plants. Academic Press, London, 1989.
3. Lowrie A. Carnivorous plants of Australia. Vol. 3: University of Western Australia Press, Western Australia, 1998.
4. Krenn L., Kartnig T. Sonnentau - Aktuelles über medizinisch genutzte Drosera-Arten. Z Phytother 2005; 26: 197-202.
5. Czygan F., Hiller K. Droserae Herba. 4th ed. Teedrogen und Phytopharmaka, Wiss. Verl.-GesmbH ed. M. Wichtl, Stuttgart, 2002.
6. Jänicke C., Grünwald J., Brendler T. Handbuch Phytotherapie: Indikationen - Anwendungen - Wirksamkeit - Präparate. Wiss. Verl.-GesmbH, Stuttgart, 2003.
7. Krenn L., Länger R., Kopp B. Qualitätsprüfung von Sonnentaukraut. Dtsch Apoth Ztg 1995; 135: 867-870.
8. Lange D. Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation. TRAFFIC International, Cambridge 1998.
9. Kamarainen T., Uusitalo J., Jalonen J., Laine K., Hohtola A. Regional and habitat differences in 7-methyljuglone content of Finnish *Drosera rotundifolia*. Phytochemistry 2003; 63: 309-14.
10. Rivadavia F., Kondo K., Kato M., Hasebe M. Phylogeny of the sundews, *Drosera* (Droseraceae), based on chloroplast *rbcL* and nuclear 18S ribosomal DNA Sequences. Am J Bot 2003; 90: 123-30.
11. http://home.vicnet.net.au/~barringo/flora/plant_photos.htm, 12. Juli 2011, 19:50.

12. Wawrosch C., Benda E., Kopp B. An Improved 2-step Liquid Culture System for Efficient In Vitro Shoot Proliferation of Sundew (*Drosera rotundifolia* L.). *Sci Pharm* 2009; 77: 827-835.
13. Culham A., Gornall R. The taxonomic significance of naphthoquinones in the Droseraceae. *Biochem Syst Ecol* 1994; 22: 507-515.
14. Krenn L., Blaeser U., Hausknost-Chenicek N. Determination of naphthoquinones in *Drosera herba* by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Liq Chrom Rel Technol* 1998; 3149-3160.
15. Melzig M., Pertz H., Krenn L. Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Droserae herba*. *Phytomedicine* 2001; 8: 225-9.
16. Ramachandran Nair A.G., Shanmugasundaram P., Madhusudhanan K.P. Naphthoquinones and flavonols from leaves of *Drosera peltata*. *Filoterapia* 1990; 61: 85-86.
17. Strohbach J. HPLC Analytik von phenolischen Sekundärstoffen in *Drosera*-Arten. Diplomarbeit Universität Wien, 2008.
18. Crnogorac M. Analyse phenolischer Inhaltsstoffe von *Drosera*-Arten mittels narrow bore HPLC. Diplomarbeit Universität Wien, 2010.
19. Bonnet M., Coumans M., Ramault J., Gaspar T. Vegetative multiplication in vitro of the sundew *Drosera rotundifolia*. *Arch Int Physiol Biochim* 1984; 92: 16-17.
20. Weiler E., Nover L. *Allgemeine und Molekulare Botanik*. Thieme, Stuttgart, 2008; 109
21. Zehl M., Braunberger C., Conrad J. Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important *Drosera* species by LC-DAD, LC-NMR, NMR, and LC-MS. *Anal Bioanal Chem* 2011; 400: 2565-76.

6. Tabellen und Abbildungsübersicht

6.1. Tabellenübersicht

Tabelle 1: Konzentrationen der Stammlösungen in $\mu\text{l/ml}$	19
Tabelle 2: Zusammensetzung der Eichlösungen Serie A in μl	19
Tabelle 3: Konzentrationen der Eichlösungen Serie A in $\mu\text{g/ml}$	20
Tabelle 4: Zusammensetzung der Eichlösungen Serie B in μl	20
Tabelle 5: Konzentrationen der Eichlösungen Serie B in $\mu\text{g/ml}$	21
Tabelle 6: Zusammensetzung der Eichlösungen Serie C in μl	21
Tabelle 7: Konzentrationen der Eichlösungen Serie C in $\mu\text{g/ml}$	22
Tabelle 8: Korrekturfaktoren für Myricitrin	23
Tabelle 9: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Myricitrin.....	23
Tabelle 10: Korrekturfaktoren für Hyperosid	24
Tabelle 11: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Hyperosid.....	24
Tabelle 12: Korrekturfaktoren für Gossypetin	25
Tabelle 13: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Gossypetin	25
Tabelle 14: Korrekturfaktoren für Quercetin.....	26
Tabelle 15: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Quercetin	26
Tabelle 16: Korrekturfaktoren für Myricetin	27
Tabelle 17: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Myricetin.....	27
Tabelle 18: Korrekturfaktoren für Gossypitrin	28
Tabelle 19: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Gossypitrin	28
Tabelle 20: Korrekturfaktoren für Kämpferol	29
Tabelle 21: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Kämpferol.....	29
Tabelle 22: Korrekturfaktoren für Isoquercitrin.....	30
Tabelle 23: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Isoquercitrin	30
Tabelle 24: Korrekturfaktoren für Ellagsäure	31
Tabelle 25: Koordinaten der Kalibrierungsgeraden von Ellagsäure	31
Tabelle 26: Reproduzierbarkeit der Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe in <i>Drosera peltata</i> (intra-day und inter-day)	35

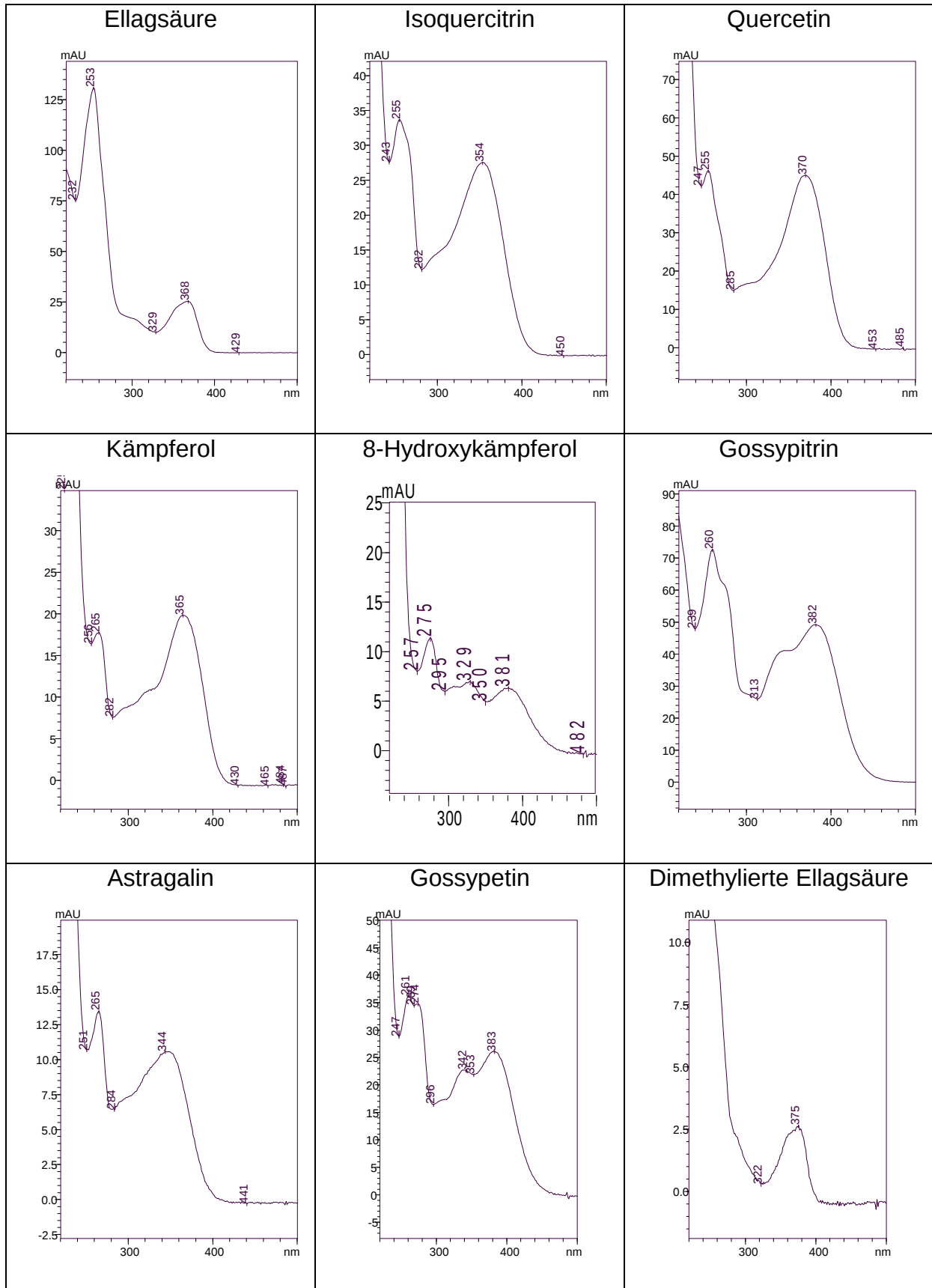
Tabelle 27: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Phenole (intra-day und inter-day)	36
Tabelle 28: Quantifizierungslimit und Detektionslimit der wichtigsten Phenole	37
Tabelle 29: Wiederfindungsraten von Gossypetin	38
Tabelle 30: Wiederfindungsraten von Ellagsäure	38
Tabelle 31: Wiederfindungsraten von Kämpferol	38
Tabelle 32: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 1	40
Tabelle 33: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 2	41
Tabelle 34: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 3	42
Tabelle 35: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 4	44
Tabelle 36: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 5	46
Tabelle 37: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 6	47
Tabelle 38: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 7	48
Tabelle 39: Konzentration der phenolischen Inhaltsstoffe in Muster 8	49
Tabelle 40: Gegenüberstellung der Konzentrationen der phenolischen Inhaltsstoffe in Mustern von <i>Drosera peltata</i> aus dem Handel und der Gewebekultur	50

6.2. Abbildungsübersicht

Abbildung 1: <i>Drosera peltata</i>	2
Abbildung 2: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. peltata</i>	10
Abbildung 3: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. peltata</i>	10
Abbildung 4: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. peltata</i>	11
Abbildung 5: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. peltata</i>	12
Abbildung 6: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. peltata</i>	12
Abbildung 7: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. peltata</i>	13
Abbildung 8: Chromatogramm der Stammlösung von Ellagsäure	14
Abbildung 9: Chromatogramm der Stammlösung von Gossypetin	15
Abbildung 10: Chromatogramm der Stammlösung von Quercetin.....	15
Abbildung 11: Chromatogramm der Stammlösung von Isoquercitrin.....	16
Abbildung 12: Chromatogramm der Stammlösung von Gossypitrin	16
Abbildung 13: Chromatogramm der Stammlösung von Kämpferol.....	17
Abbildung 14: Chromatogramm der Stammlösung von Myricetin.....	17
Abbildung 15: Chromatogramm der Stammlösung von Myricitrin.....	18
Abbildung 16: Chromatogramm der Stammlösung von Hyperosid	18
Abbildung 17: Chromatogramm der Eichlösung A5.....	20
Abbildung 18: Chromatogramm der Eichlösung B3.....	21
Abbildung 19: Chromatogramm der Eichlösung C4.....	22
Abbildung 20: Kalibrierungsgerade für Myricitrin	23
Abbildung 21: Kalibrierungsgerade für Hyperosid	24
Abbildung 22: Kalibrierungsgerade für Gossypetin.....	25
Abbildung 23: Kalibrierungsgerade für Quercetin	26
Abbildung 24: Kalibrierungsgerade für Myricetin	27
Abbildung 25: Kalibrierungsgerade für Gossypitrin.....	28
Abbildung 26: Kalibrierungsgerade für Kämpferol	29
Abbildung 27: Kalibrierungsgerade für Isoquercitrin	30
Abbildung 28: Kalibrierungsgerade für Ellagsäure.....	31
Abbildung 29: UV-Spektren von 8-Hydroxykämpferol und Gossypetin.....	34
Abbildung 30: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 1.....	39
Abbildung 31: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 2.....	41

Abbildung 32: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 3.....	42
Abbildung 33: UV-Spektrum von Peak bei Minute 15,6 (Muster 3).....	43
Abbildung 34: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 4.....	43
Abbildung 35: UV-Spektrum von Peak bei Minute 22,2 (Muster 4).....	44
Abbildung 36: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 5.....	45
Abbildung 37: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 6.....	46
Abbildung 38: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 7.....	47
Abbildung 39: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von Muster 8.....	48
Abbildung 40: Chromatogramm des aufgereinigten methanolischen Extraktes von <i>Drosera binata</i>	51
Abbildung 41: Chromatogramm der Petrolether-Fraktion nach Aufreinigung von <i>Drosera binata</i>	52
Abbildung 42: Chromatogramm des aufgereinigten methanolischen Extraktes von <i>Drosera hilaris</i>	53
Abbildung 43: Chromatogramm der Petrolether-Fraktion nach Aufreinigung von <i>Drosera hilaris</i>	53
Abbildung 44: Chromatogramm des aufgereinigten methanolischen Extraktes von <i>Drosera peltata</i>	54
Abbildung 45: Chromatogramm der Petrolether-Fraktion nach Aufreinigung von <i>Drosera peltata</i>	54
Abbildung 46: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. hilaris</i>	55
Abbildung 47: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. hilaris</i>	56
Abbildung 48: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. hilaris</i>	56
Abbildung 49: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. hilaris</i>	57
Abbildung 50: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. hilaris</i>	58
Abbildung 51: Chromatogramm des methanolischen Extraktes von <i>D. hilaris</i>	59

ANHANG: UV-Spektren der Phenole



Kurzfassung

Das Ziel der Diplomarbeit war die Untersuchung des Flavonoid- und Phenolcarbonsäuremusters in Handelsmustern von *Drosera peltata* und der Vergleich mit Proben von *Drosera peltata* aus der *in vitro* Kultivierung.

Es wurde für *Drosera peltata* eine narrow-bore RP-HPLC Methode entwickelt, die eine präzise quantitative Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe ermöglicht. Die verwendete stationäre Phase war eine C18 Säule (150 mm × 2,1 mm, 3 µm Partikelgröße). Als mobile Phase wurden Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B), jeweils mit Essigsäure versetzt, verwendet.

Acht unterschiedliche Drogenmuster von *Drosera peltata* wurden mit Methanol extrahiert. Die Inhaltsstoffe der Extrakte konnten mit dem entwickelten Elutionsgradienten gut aufgetrennt werden und wurden mit Hilfe des internen Standards Saponarin quantifiziert.

Zur Validierung der Methode wurde auf die Reproduzierbarkeit der Extraktion und Analyse und auf die Wiederfindungsrate einzelner Analyten geprüft. Außerdem wurden die Quantifizierungs- und Detektionslimits aller phenolischen Komponenten bestimmt, wobei eine hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit gezeigt werden konnte.

Die phenolischen Inhaltsstoffe in *Drosera peltata* konnten mit der optimierten HPLC-Methode sehr gut aufgetrennt und quantifiziert werden, und ein Vergleich der Handelsmuster mit Mustern aus der *in vitro* Kultivierung wurde möglich gemacht.

Abstract

The objective of this thesis was to analyse flavonoids and phenolcarboxylic acids in commercial samples of *Drosera peltata* in comparison with samples from *in vitro* cultivation.

A RP-HPLC method, which allowed the accurate quantitative analysis of the phenolic compounds, was developed for *Drosera peltata*. The stationary phase was a C18 column (150 mm × 2.1 mm, 3 µm particle size) and as mobile phase water and acetonitrile (each acidified with acetic acid) were used.

Eight different samples of *Drosera peltata* were extracted with methanol and a satisfying separation of the compounds by gradient elution was achieved. For the quantification saponarin was used as an internal standard.

The developed method was validated in terms of reproducibility of the extraction and analysis as well as the recovery of flavonoids. Furthermore, the limits of detection and quantification were determined and a satisfying sensitivity and reproducibility was shown.

With the optimized HPLC-method, an excellent separation and quantification of phenolic compounds in *Drosera peltata* was achieved and the commercial samples were compared with samples from *in vitro* cultivation.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sonja Fischer

Adresse: Korneuburgerstraße 49, 2103 Langenzersdorf

Geburt: 7. April 1986 in Stockerau

Staatsbürgerschaft: Österreich

Eltern: Andrea Fischer (geb. Leonbacher), Josef Fischer

Familienstand: ledig

Ausbildung

1992 - 1996 Volksschule Langenzersdorf

1996 - 2004 Gymnasium Franklinstraße 21, Wien

9. Juni 2004 Matura

2004 - 2013 Studium an der Universität Wien

Studienrichtung Pharmazie

10/10 - 01/11 praktischer Teil der Diplomarbeit am Institut für
Pharmakognosie