



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Isolierung und Quantifizierung von Diterpen-Harzsäuren
aus dem Fichtenfaulpech“

verfasst von / submitted by

Gregor Mauser

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

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

A 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Betreuerin ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter meine tiefste Dankbarkeit ausdrücken. Für die Möglichkeit an diesem Projekt mitzuarbeiten, für die überaus gute Betreuung und ihre Expertise, die sie mit einer Art vermitteln kann, bei der ihre Motivation und Begeisterung für die Pharmakognosie weitergegeben wird. Außerdem möchte ich auch meinem Zweitbetreuer Mag. Thomas Göls herzlichst danken. Er stand mir bei jeder kniffligen Situation sofort zur Seite und konnte mit seinem Wissen und seiner Genauigkeit bedeutende Impulse setzen. Dadurch konnte die Arbeit sehr erleichtert werden, weil ich immer wusste, dass ich auf seine Unterstützung bauen kann.

Beide konnten so ab der ersten Sekunde ein exzellentes Arbeitsklima schaffen, in dem man sich sofort sehr wohl fühlte, wodurch der Ansporn, die gesteckten Ziele zu erreichen, immens gesteigert wurde.

Danke den HPCCC-Troubleshooting-Expertinnen Mag. Julia Langeder und Mag. Julia Zwirchmayr. Ohne euch hätte ich dieses Instrument wahrscheinlich nie zum Laufen gebracht.

Mein Dank gilt auch Univ.-Prof. Mag. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Ressourcen, damit Ergebnisse für diese Diplomarbeit erarbeitet werden konnten, sowie ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Johannes Saukel der dieses Projekt ins Leben gerufen hat.

Allgemein danke ich jedem des Pharmakognosie-Departments. Es war eine Ehre mit euch zusammenzuarbeiten und ich werde immer erfreut auf diese Zeit zurückblicken.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Mama, die mich durch teils lange Telefonate nach Vorarlberg immer wieder von neuem antreiben konnte. Ohne die Unterstützung von ihr, sowie all meinen anderen Verwandten, wäre dieses Studium nie möglich gewesen. Außerdem konnten meine guten Freunde mir die Studienzeit sehr versüßen, wobei Spaß nie zu kurz kam, danke dafür. Da mir bei der Formatierung dieser Arbeit oft die Grenzen aufgezeigt wurden, bedanke ich mich ebenfalls bei meiner Freundin, die mir durch ihre Wordskills sehr weiterhelfen konnte.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	4
3. Experimenteller Teil	5
3.1. Pflanzenmaterial.....	5
3.2. Dünnschichtchromatographie (DC).....	7
3.3. Gaschromatographie (GC).....	8
3.3.1. Geräte.....	11
3.3.2. Stationäre Phasen.....	12
3.3.3. Derivatisierung.....	13
3.4. Gegenstromverteilungschromatographie (CCC).....	14
3.4.1. Vortests.....	16
3.4.2. Methoden.....	17
3.5. Lösungsmittel und Substanzen.....	21
4. Spezieller Teil/Ergebnisse	22
4.1. Charakterisierung der Harzsäurefraktionen.....	22
4.2. Isolierung von Harzsäuren mittels HPCCC.....	25
4.2.1. Auswahl eines geeigneten HEMWat-Systems mittels Vortests.....	25
4.2.1.1. Überprüfung der Vortests mittels DC.....	25
4.2.1.2. Überprüfung der Vortests mittels GC.....	26
4.2.2. HPCCC Methode HEMWat-System 25 NP.....	27
4.2.2.1. Fraktionsvergleich mittels DC.....	28
4.2.2.2. Fraktionsvergleich mittels GC.....	30
4.2.3. Optimierung der HPCCC Methode mit verschiedenen Elutionsprogrammen.....	32
4.2.4. Elutionsprogramm 21OP_21UP-27UP RP.....	35
4.2.4.1. Fraktionsvergleich mittels DC.....	36
4.2.4.2. Fraktionsvergleich mittels GC.....	40
4.3. Vergleich der gaschromatographischen Systeme.....	43
4.3.1. Vergleich der stationären Phasen.....	43
4.3.2. Apparativer Vergleich Shimadzu vs. Perkin Elmer.....	47
4.4. Quantifizierung von Dehydroabietinsäure.....	49
4.4.1. LOD + LOQ.....	49
4.4.2. Eichgerade.....	51
5. Diskussion und Schlussfolgerung/Ausblick	53
6. Zusammenfassung/Abstract	55
7. Literaturverzeichnis	58
8. Abkürzungsverzeichnis	61
9. Anhang	62

1. Einleitung

Picea abies (L.) H. KARST., die Gewöhnlich-Fichte, ist eine Pflanzenart, die in der Familie der Pinaceae (Kieferngewächse) vertreten ist. Nach Verletzungen des Stamms werden zum

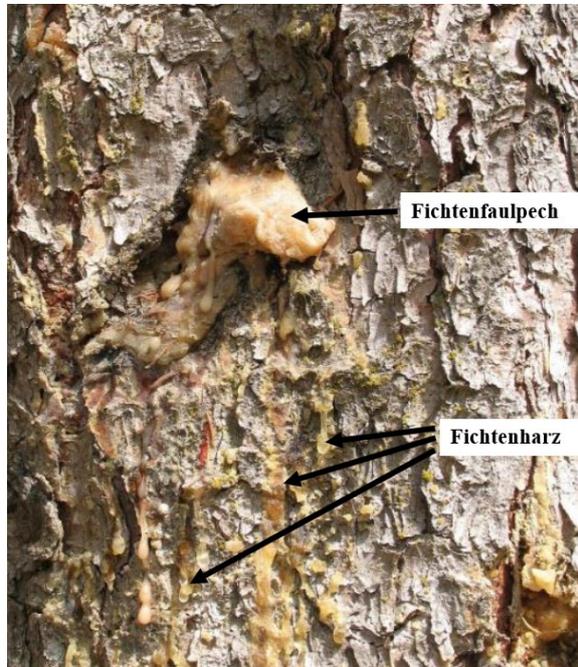


Bild 1: Fichtenstamm mit austretendem Fichtenfaulpech und dem runterlaufenden Fichtenharz

Schutz vor Dehydratation, Insekten, insbesondere Borkenkäfer (Trapp & Croteau, 2001), und verschiedenen pathogenen Mikroorganismen,

Ausscheidungen unterschiedlichen Typs freigesetzt, um die Wunden zu verschließen (Holmbom et al., 2008). Laut der Monographie

„*Piceae abietis pix recens*“ im Österreichischen Arzneibuch wird einerseits die Austrittsstelle direkt mit einer hell- bis dunkelgelben, knetbaren Masse, dem Fichtenfaulpech,

verschlossen, andererseits wird am Rand der Wunde ein bernsteinfarbenes, klares, sehr klebriges Harz abgesondert, welches den Stamm in dünnen Linien hinunterläuft (ÖAB, 2020),

siehe Bild 1 (S. 1). Die Unterscheidung dieser beiden pflanzlichen Absonderungen ist entscheidend, da die chemische Zusammensetzung unterschiedlich ist.

Die Hauptkomponenten des Fichtenfaulpechs sind Monoterpene in Form von ätherischem Öl und Diterpene, deren Hauptanteil Harzsäuren ausmachen. Außerdem sind Lignane, wie Pinoresinol, phenolische Säuren und noch weitere unbekannte Substanzen enthalten (Arno Sipponen et al., 2007).

In Bild 2 (S. 3) sind die Strukturformeln der am häufigsten vorkommenden Harzsäuren (Pimarsäure, Sandarakopimarsäure, Levopimarsäure, Palustrinsäure, Abietinsäure, Neoabietinsäure, Dehydroabietinsäure, Isopimarsäure) abgebildet. Diese sekundären Pflanzenstoffe sind lipophile Strukturen vom Diterpen-Typ (C_{20}). Sie werden in den Epithelzellen der Harzgänge gebildet. Über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) werden aktive Isopreneinheiten (C_5) synthetisiert, die durch eine sukzessive Kopf-Schwanz Kondensation zu Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) kondensiert werden. Dieses GGPP wird dann durch die Diterpen-Synthase zu einem trizyklischen Kohlenstoffgerüst umgebaut

und von CYP450-Enzymen zu Säuren und anderen Derivaten oxidiert (Keeling & Bohlmann, 2006; Hamberger et al., 2011).

Da die Harzsäuren eine wichtige Rolle im Koniferen-Abwehrsystem spielen (Trapp & Croteau, 2001), liegt es nahe, dass diese, eventuell auch in Kombination mit anderen Pflanzeninhaltsstoffen, einen signifikanten antimikrobiellen Effekt ausüben können.

Dieser antimikrobielle Effekt in Verbindung mit einer wundheilungsfördernden Wirkung könnte auch die jahrzehntelange Tradition von Fichtenfaulpech-haltigen Salben für die Behandlung von akuten und chronischen Wunden, Ulcera und verschiedensten Hautinfektionen im Alpenbereich und Skandinavien erklären.

Diese Zubereitungen werden, wie es in der Monographie „*Unguentum picis recentis Piceae abietis officinale*“ im Österreichischen Arzneibuch (ÖAB, 2020) und bei Arno Sipponen & Laitinen (2011) steht, durch Erhitzen von Fichtenfaulpech, das zuvor mit einem stumpfen Metall- oder Holzwerkzeug von der Austrittsstelle abgekratzt wird, mit Schweineschmalz oder Butter hergestellt.

Zusätzlich zur antimikrobiellen Wirkung wurde in einigen Studien das wundheilungsfördernde Potential von Fichtenfaulpech und deren Inhaltsstoffen dargelegt. Bei zwei an Patienten durchgeführten Studien wirkte sich die Fichtenfaulpechsalbe positiv auf die Wundheilung bei Ulcera (A. Sipponen et al., 2008) und schlecht heilenden Operationswunden (Arno Sipponen et al., 2012) aus. Es konnte ein bakteriostatischer Effekt gegen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecalis* (VRE) und andere Gram positive Bakterien *in vitro* (Rautio et al., 2007) und ein antimykotischer Effekt gegen Dermatophyten *in vitro* (Rautio et al., 2012) festgestellt werden. All diese Mikroorganismen spielen eine wichtige Rolle bei der Infektion von Wunden.

Durch Göls et al. (2020) konnte gezeigt werden, dass vor allem die Harzsäuren, sowie Pinoresinol, ein Lignan, die Migration und Proliferation von Keratinozyten *in vitro* steigern. Diese beiden Parameter spielen eine zentrale Rolle bei der Reepithelialisierung von Wunden, bei der Epithelgewebe neu gebildet wird

Auf diesen Grundlagen aufbauend könnte das Fichtenfaulpech in Zukunft neue Wirkstoffe liefern, die den immer öfters auftretenden Antibiotikaresistenzen entgegenwirken und eine neue Therapieoption für chronische oder schlecht heilende Wunden eröffnen. Bis dahin ist es aber noch ein weiter Weg, auf dem die involvierten wirksamen Inhaltsstoffe und deren Wirkmechanismen genauer erforscht werden müssen.

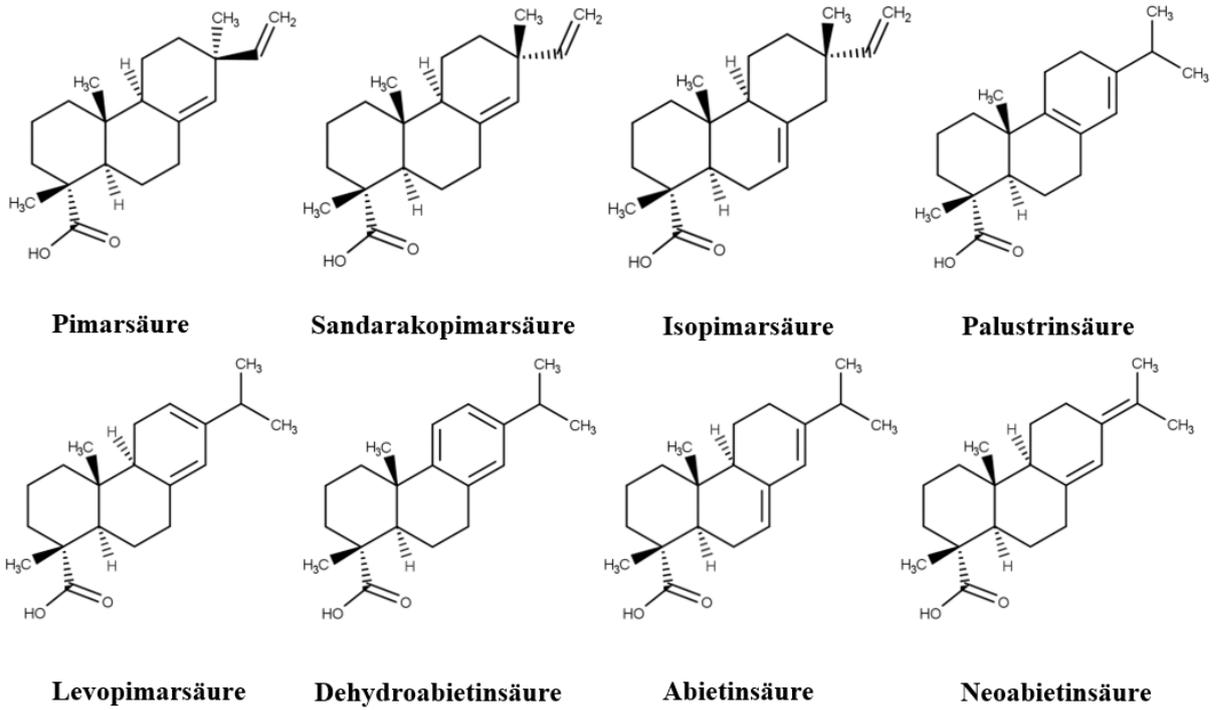


Bild 2: Strukturformeln der am häufigsten vorkommenden Harzsäuren in *Picea abies* (L.) H. KARST

2. Zielsetzung

Da die untersuchten Diterpen-Harzsäuren, die Hauptkomponenten des Fichtenfaulpechs, strukturell sehr ähnlich sind (siehe Bild 2, S. 3), gestaltet sich eine Auftrennung und Isolierung dementsprechend schwierig. Bis auf die Dehydroabietinsäure konnten die Harzsäuren mit unterschiedlichsten chromatographischen Methoden, wie Säulenchromatographie oder HPLC, nur unzureichend voneinander getrennt werden.

Infolgedessen wurde als weitere Trennmethode die Gegenstromverteilungschromatographie (CCC) in Erwägung gezogen, bei der, durch viele Durchmischungsvorgänge von zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten, die Analyten anhand ihrer Verteilung in diesem 2-phasigen System aufgetrennt werden können. Diese Trennmethode weist Parallelen zur Trennung von Substanzen in einem Scheidetrichter auf.

Ein Ziel dieser Diplomarbeit ist daher eine HPCCC-Methode zu etablieren, bei der die Diterpen-Harzsäuren isoliert werden können. Die Isolierung ist einerseits wichtig, um die Harzsäuren im Fichtenfaulpech zu quantifizieren und andererseits, um weitere *in vitro* Testungen mit den Einzelsubstanzen, oder Kombinationen aus diesen, durchzuführen.

Außerdem soll mittels Gaschromatographie eine Eichgerade der Dehydroabietinsäure erstellt werden, die schon in früheren Arbeiten mittels Niederdruck-Flüssigchromatographie (LPLC) isoliert werden konnte. Dadurch wird die Quantifizierung dieser Substanz im Fichtenfaulpech ermöglicht.

3. Experimenteller Teil

In diesem Teil wird das verwendete Pflanzenmaterial beschrieben. Außerdem werden alle im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten chromatographischen Methoden erklärt und deren Ablauf beschrieben.

3.1. Pflanzenmaterial

Ausgangsmaterial ist das Fichtenfaulpech, welches mit einem Holz- oder Metallwerkzeug von der Austrittsstelle am Baumstamm abgekratzt wird. Gesammelt wurde es im Lungau, Österreich, in Kooperation mit den Österreichischen Bundesforsten. Bei der Identifizierung war Prof. Johannes Saukel behilflich. Gelagert wurde es bei -20 °C in einem Metallbehälter.

Das Fichtenfaulpech (Chargenr.: LU01) wurde in Wasser gekocht und über mehrere flüssig-flüssig Extraktionsschritte in verschiedene Fraktionen aufgetrennt (Göls et al., 2020). Im Zuge einer früheren Diplomarbeit (Fröstl, 2019) wurden die Harzsäuren mittels Ionenaustauschchromatographie von der NaOH-Fraktion abgetrennt, wobei man die angereicherte Harzsäurefraktion (AH) erhalten hat. Diese AH wurde mittels Niederdruck-Flüssigchromatographie weiter aufgereinigt, zur vorgereinigten Harzsäurefraktion (VH), siehe Bild 3 (S. 6). Diese beiden Fraktionen wurden in dieser Arbeit für weitere Auftrennungs- bzw. Aufreinigungsschritte verwendet.

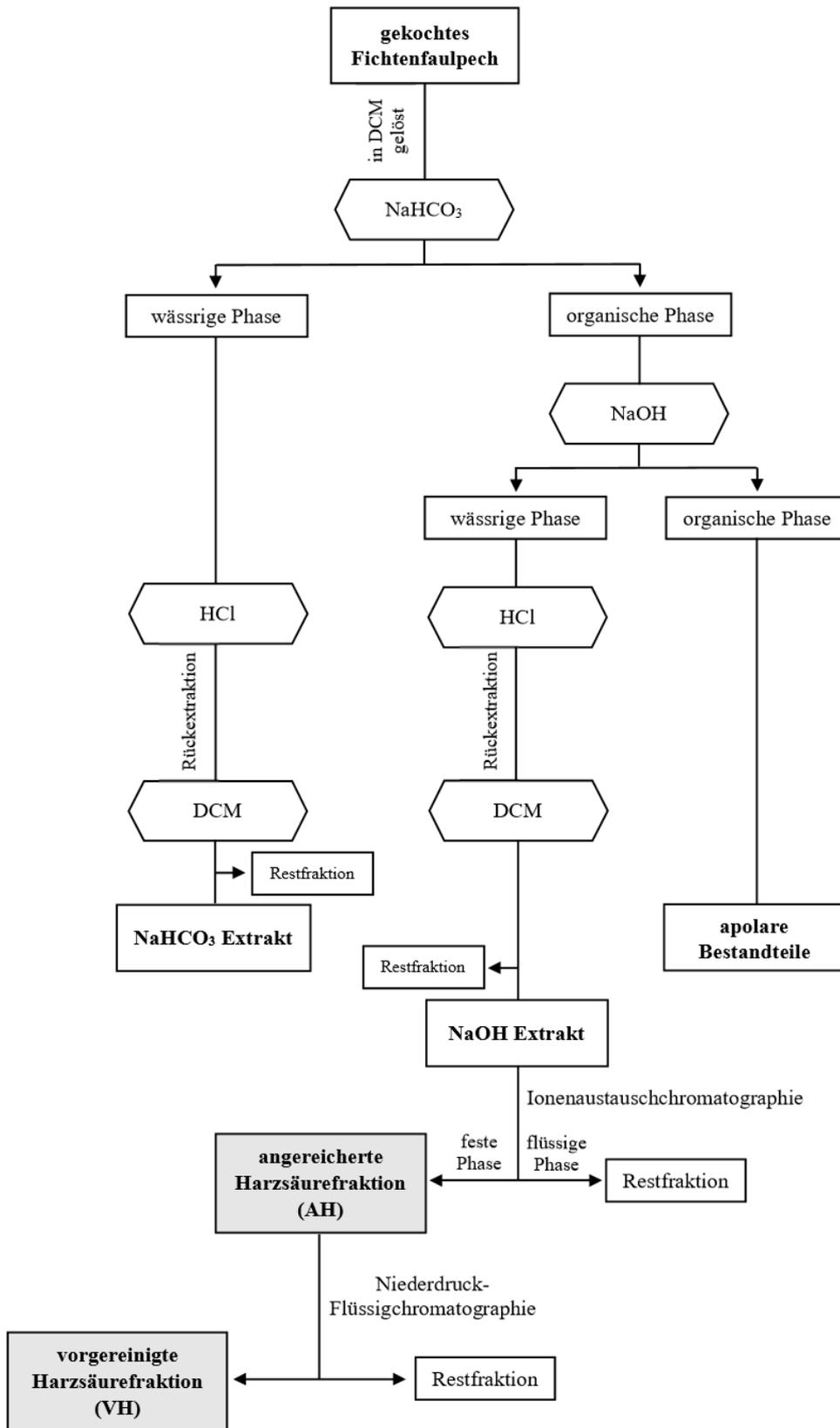


Bild 3: Flüssig-flüssig Extraktion des gekochten Fichtenfaulpechs

3.2. Dünnschichtchromatographie (DC)

In dieser Diplomarbeit wird die Dünnschichtchromatographie qualitativ verwendet, um die Harzsäuren in den verschiedenen Fraktionen einer HPCCC Auftrennung zu detektieren (siehe Kapitel 4.2.2.1, S. 28, 4.2.3, S. 32 und 4.2.4.1, S. 36). Außerdem wird die DC bei der Auswahl eines geeigneten HEMWat-Systems für die HPCCC angewendet (siehe Kapitel 4.2.1.1, S. 25).

Die Dünnschichtchromatographie ist ein Verfahren, bei dem es zu Interaktionen von Substanzen zwischen einer mobilen und einer stationären Phase kommt. Die stationäre Phase befindet sich auf einer dünnen Platte aus Glas, Aluminium oder Kunststoff und kann chemisch unterschiedlich, je nachdem was für Analyten aufzutrennen sind, aufgebaut sein. Hauptsächlich werden polare Silicagele/Kieselgele (poröses, amorphes SiO_2), Aluminiumoxid (Al_2O_3), Cellulose, Polyamid, aber auch modifizierte Silicagele (z.B. RP-Material) verwendet. Wenn polare Silicagele, wie in unserem Fall, zum Einsatz kommen, wird normalerweise ein apolares Fließmittelgemisch eingesetzt, welches als Hauptkomponente apolare Lösungsmittel wie beispielsweise Ether, Toluol oder Chloroform enthält. Dem kann zusätzlich ein polarer Bestandteil, wie Methanol oder Ethylacetat beigesetzt werden. Mit einer Säure (z.B. Trifluoressigsäure) oder Base (z.B. Ammoniak) können unterschiedliche pH-Werte eingestellt werden. Diese sogenannten Modifier kommen zum Einsatz, um die Schärfe der Substanz-Zonen zu erhöhen, und dadurch eine bessere Trennleistung zu gewährleisten.

Für die Auftragung wird das Substanzgemisch in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und bandenförmig mit einer Glaskapillare, die bis zu 5 μl aufnehmen kann, aufgetragen. Wenn die DC-Platte trocken ist, wird sie aufrecht in eine kammergesättigte Trennkammer, die vorher bodendeckend mit Fließmittel befüllt und mit einem Filterpapier ausgekleidet wurde, gestellt. Durch Kapillarkräfte wird die mobile Phase nach oben gezogen, welche die Analyten aus dem Auftragungsfeld mitnimmt. Diese interagieren, je nach chemischen Eigenschaften, mehr oder weniger mit der stationären Phase und werden daher mehr oder weniger stark zurückgehalten. Im besten Fall werden die zu analysierenden Substanzen in schmale Banden aufgetrennt, die dann unter Tageslicht, UV_{254} oder UV_{366} vor oder nach Derivatisierung mit einem Sprühreagens ausgewertet werden können (Gey, 2015).

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde jede DC-Analyse nach dem in Tabelle 1 (S. 8) beschriebenen Schema, mit den beschriebenen Bestandteilen durchgeführt. Zusätzlich wurden Retentionsfaktoren (R_f) zur qualitativen Auswertung bestimmt (siehe Kapitel 4.2.4.1, S. 36). Der R_f -Wert wird wie folgt berechnet:

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke Analyt}}{\text{Laufstrecke mobile Phase}}$$

Tabelle 1: Bestandteile und Schema der DC-Analyse

stationäre Phase	Merck Silicagel 60 F ₂₅₄ auf Aluminium, durchschnittliche Partikelgröße 9,5-11,5 µm
mobile Phase	97+3+0,1 (Chloroform+Methanol+Trifluoressigsäure v/v/v)
Entwicklung	bei Kammersättigung
Derivatisierung	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz aufgetragen mit dem CAMAG Chromatogramm Immersion Device, danach Erhitzung bei 105°C für zirka 2 min
Auswertung	UV ₃₆₆ nach Derivatisierung mit CAMAG TLC Visualizer, Software: CAMAG visionCATS

3.3. Gaschromatographie (GC)

Mit der Gaschromatographie können flüchtige Substanzen, die beim Verdampfen stabil bleiben, aufgetrennt werden. Dies trifft besonders auf kleine und apolare Moleküle zu, aber insgesamt auf nur zirka 20 % aller organischen Verbindungen (Gey, 2015). Durch verschiedene Derivatisierungsmethoden wie Methylierung, Trimethyl-Silylierung oder Acetylierung kann dieser Prozentsatz noch leicht gesteigert werden (siehe Kapitel 3.3.3, S. 13).

Als mobile Phase dient bei der GC ein inertes, also reaktionsarmes, Trägergas, wie z.B. Helium oder Stickstoff. Die stationäre Phase ist ein viskoser Flüssigkeitsfilm, der an der Innenseite einer Kapillarsäule angebracht ist (siehe Kapitel 3.3.2, S. 12). Die Säule kann 60 m und länger sein und besteht aus hochreinem Quarzglas (fused silica), das außerhalb mit einem stabilitätserhaltenden organischen Polymerfilm beschichtet ist. Aufgrund der Länge wird eine hohe Bodenzahl erreicht, weshalb die GC die beste Trennleistung aller chromatographischen Verfahren besitzt, wohlgemerkt, wie oben bereits erwähnt, nur für verdampfbare Substanzgemische. Diese Kapillarsäule, auf einem Metallkäfig aufgerollt, ist in einem beheizbaren Ofen, der bis auf ca. 400 °C geheizt werden kann, verbaut (siehe Bild 4, S. 9). Über

einen Injektor wird die Probenlösung in den Gaschromatographen eingespritzt und bei ca. 300 °C verdampft. Die Analyten werden dann mit dem Trägergas durch die Säule transportiert. Da am Säulenkopf für gewöhnlich eine geringere Temperatur vorherrscht, kondensiert ein Teil der Probe wieder und kann erst bei Erreichen des jeweiligen Siedepunkts wieder verdampfen und in die Trennsäule eintreten.

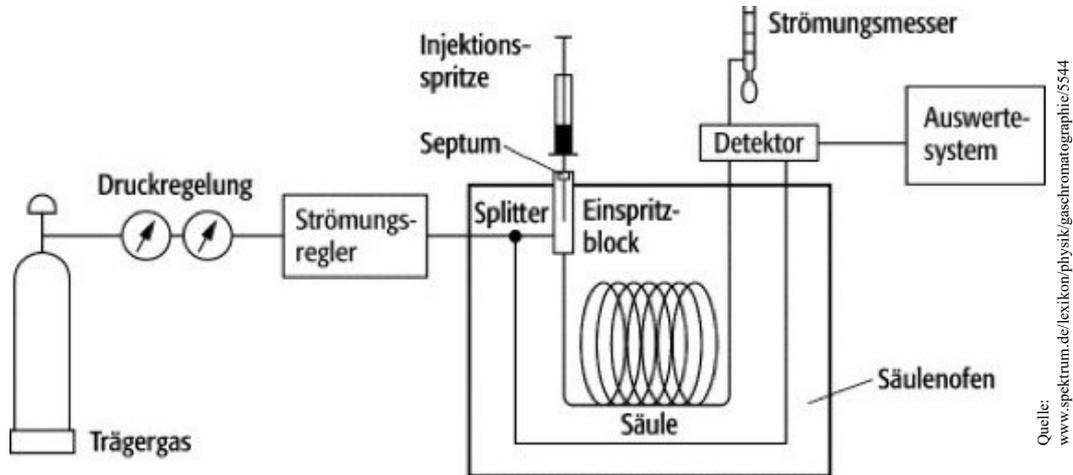


Bild 4: Schematische Darstellung eines Gaschromatographen

Dabei werden die Substanzen durch Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase der Säule nach ihrer Polarität und ihres Siedepunkts aufgetrennt. Die Trennleistung kann dabei durch unterschiedliche chemische Eigenschaften der stationären Phase, Dicke des Beschichtungsfilms sowie Länge oder Säuleninnendurchmesser gesteigert werden. Zusätzlich können modifizierte Temperaturprogramme die Trennung ebenfalls verbessern. Wenn die aufgetrennten Analyten die Säule verlassen, gelangen sie für die Vermessung in einen Detektor.

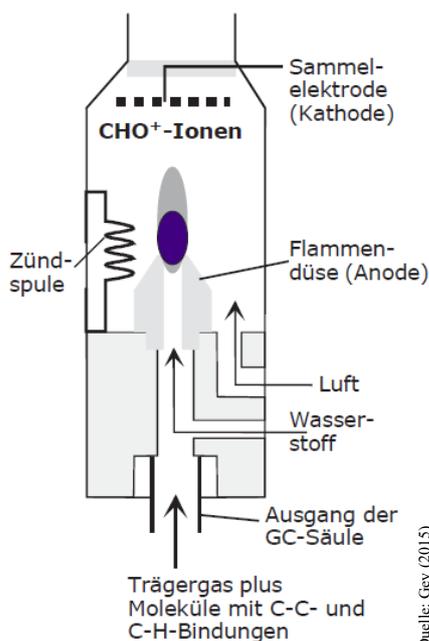


Bild 5: Schematische Darstellung eines Flammenionisationsdetektor (FID)

Es gibt unterschiedliche Detektoren, die, je nachdem was für Substanzen zu analysieren sind, besser oder schlechter geeignet sind.

Der Flammenionisationsdetektor (siehe Bild 5, S. 9) ist einer der am häufigsten eingesetzten Detektoren in der GC, da er fast alle kohlenstoffhaltigen Moleküle detektiert, eine geringe Nachweisgrenze und einen weiten linearen Detektionsbereich besitzt. Durch synthetische Luft und Wasserstoff wird eine Flamme am Brennen gehalten, in welcher die aus der Säule eluierten Substanzen verbrannt und durch Pyrolyse zu C-haltigen Radikalen abgebaut werden. Zusätzlich entstehen aufgrund der Luftzufuhr in der Flamme

angeregte O₂- und OH-Radikale. Beim Oxidationsprozess von C-haltigen Radikalen mit angeregten O₂- bzw. OH-Radikalen entstehen Kationen (z.B. CHO⁺) und Elektronen (e⁻). Durch ein angelegtes elektrisches Potential wandern diese Kationen zur Kathode, über welche der Strom gemessen wird, was zu einem Signal führt. Dieses Signal wird dann von einer GC-Software ausgewertet und als Chromatogramm dargestellt (Cammann, 2001).

In Tabelle 2 (S. 10) ist angegeben, bei welcher Messung die beiden eingesetzten Gaschromatographen mit welcher stationären Phase verwendet wurden. Außerdem sind die verwendeten Geräte in Kapitel 3.3.1 (S. 11), die unterschiedlichen zum Einsatz gekommenen stationären Phasen in Kapitel 3.3.2 (S. 12) und die Derivatisierungsmethode in Kapitel 3.3.3 (S. 13) genauer beschrieben.

Tabelle 2: Einsatzbereich der Gaschromatographen und der stationären Phasen in dieser Diplomarbeit

Säule	Perkin Elmer Autosystem XL GC	Säule	Shimadzu GC-2010
DB-1701 60 m	Charakterisierung der angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6) (Kapitel 4.1, S. 22)	ZB-5	Charakterisierung der vorgereinigten Harzsäurefraktion (VH, siehe Bild 3, S. 6) (Kapitel 4.1, S. 22)
	Fraktionsvergleich mittels GC beim Elutionsprogramm 21OP_21UP-27UP (Kapitel 4.2.4.2, S. 40)		Fraktionsvergleich mittels GC bei HPCCC Methode HEMWat 25 NP (Kapitel 4.2.2.2, S. 30)
	Vergleich der stationären Phase (Kapitel 4.3.1, S. 43)		Carry-Over-Effekt (Kapitel 4.3.2, S. 47)
			Signal-Rausch Verhältnis (Kapitel 4.3.2, S. 47)
	LOD/LOQ (Kapitel 4.4.1, S. 49)	ZB-WAX	Vergleich der stationären Phase (Kapitel 4.3.1, S. 43)
	Quantifizierung von DHAA, Eichgerade (Kapitel 4.4.2, S. 51)		
DB-1701 30 m	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten (Kapitel 4.2.1.2, S. 26 und Kapitel 4.2.3, S. 32)		
	Vergleich der stationären Phase (Kapitel 4.3.1, S. 43)		

3.3.1. Geräte

Es werden zwei unterschiedliche Gaschromatographen für die Analysen verwendet. Zum Einsatz kommen der Perkin Elmer Autosystem XL GC und der Shimadzu GC-2010. In Tabelle 3 (S. 11) werden die zwei Instrumente gegenübergestellt. Die in dieser Tabelle aufgelisteten Einstellungen werden bei jeder Untersuchung verwendet. Im Zuge dieser Arbeit werden die GC Messungen vermehrt mit dem Perkin Elmer durchgeführt, da beim Shimadzu ein Carry-Over-Effekt (siehe Kapitel 4.3.2, S. 47) beobachtet wurde.

Tabelle 3: Gegenüberstellung von Perkin Elmer Autosystem XL GC und Shimadzu GC-2010

	Perkin Elmer Autosystem XL GC	Shimadzu GC-2010
Baujahr	1995	2009-2013
		
Temperatur = programm	Initialtemp. 100 °C 5 min halten, Steigerung auf 200°C mit 15°C/min, Erhöhung auf 280°C mit 2°C/min und 280°C für 10 min halten	Initialtemp. 100°C 5 min halten, Steigerung auf 200°C mit 15°C/min, Erhöhung auf 250°C mit 2°C/min und 250°C für 5 min halten
Injektionsvolumen	1 µl, splitless	1 µl, split ration 1:100
Injektionstemperatur	300 °C	270 °C
mobile Phase	Stickstoff (N ₂), Reinheit: 5.0	Helium (He), Reinheit: 5.0
	Säulenfluss: 2 ml/min	Säulenfluss: 1,3 ml/min
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)	Flammenionisationsdetektor (FID)
	synthetische Luft (N ₂ 80%, O ₂ 20%) Reinheit: 5.0, Wasserstoff (H ₂) Reinheit 5.0	synthetische Luft (N ₂ 80%, O ₂ 20%) Reinheit 5.0, Wasserstoff (H ₂) Reinheit: 5.0
Autosampler	integriert	Shimadzu AOC-20i Autoinjector
Software	Turbochrom Software Interpretation: LabSolutions Postrun Analysis Software und Lablicate OpenChrom Software	LabSolutions Data Analysis Software Interpretation: LabSolutions Postrun Analysis Software und Lablicate OpenChrom Software

3.3.2. Stationäre Phasen

Im vorigen Kapitel wurden die eingesetzten GC-Instrumente genauer beschrieben. Wie in Tabelle 2 (S.10) ersichtlich werden für die gaschromatographischen Messungen verschiedene stationäre Phasen eingesetzt, die in diesem Kapitel erläutert werden. In Tabelle 4 (S. 12) sind die verwendeten Säulen dargelegt.

Tabelle 4: Eigenschaften der eingesetzten stationären Phasen für die GC

Hersteller und Bezeichnung	Durchmesser der Säule	Beschichtungsfilmstärke	Länge
Agilent J&W DB-1701	0,25 mm	0,25 µm	30 m
			60 m
Phenomenex Zebtron ZB-5	0,25 mm	0,25 µm	60 m
Phenomenex Zebtron ZB-WAX	0,25 mm	0,25 µm	60 m

DB-1701

Von der DB-1701 Säule wird eine 30 m und eine 60 m Säule verwendet. Diese Säulen werden ausschließlich im Perkin Elmer Autosystem XL GC verbaut (siehe Tabelle 2, S. 10). Durch Verdoppelung der Säulenlänge wird auch die Bodenzahl verdoppelt. Da die Peakauflösung direkt proportional zur Wurzel der Bodenzahl der stationären Phase ist, sollte diese dadurch um ca. 41 % verbessert werden (siehe Kapitel 4.3.1, S. 43). Die DB-1701 ist eine mittelpolare-apolare Säule mit einer 14% Cyanopropylphenyl- 86% Methyl-polysiloxan Beschichtung (siehe Bild 6, S. 12).

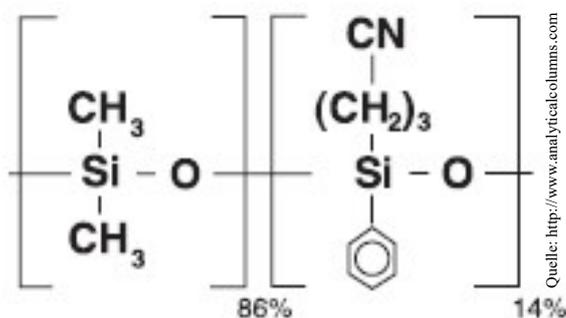


Bild 6: Strukturformel der DB-1701 Beschichtung

ZB-5

Die ZB-5 Säule ist eine apolare Säule, die mit einer 5% Phenyl- 95% Methyl-polysiloxan Beschichtung (siehe Bild 7, S. 13) ausgekleidet ist. Diese Säule wird nur mit dem Shimadzu GC-2010 verwendet (siehe Tabelle 2, S. 10).

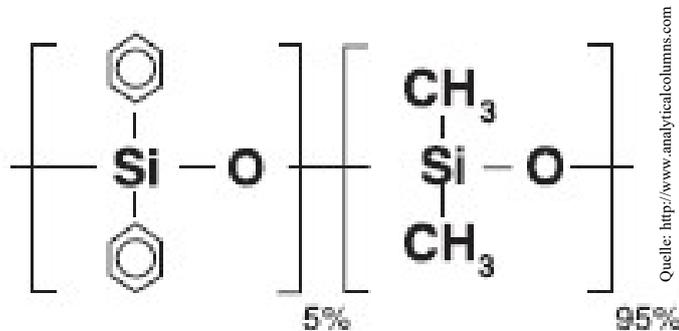


Bild 7: Strukturformel der ZB-5 Beschichtung

ZB-WAX

Bei der ZB-WAX Säule handelt es sich um eine polare stationäre Phase. Die Beschichtung besteht zu 100 % aus Polyethylenglycol (siehe Bild 8, S. 13). Diese Säule wurde ausschließlich in Kapitel 4.3.1 (S. 43) angewendet, um die Trennleistung einer polaren Säule im Vergleich zu den beiden anderen Säulen zu veranschaulichen.



Bild 8: Strukturformel der ZB-WAX Beschichtung

3.3.3. Derivatisierung

Da die Harzsäuren einen Siedepunkt von über 400 °C aufweisen, müssen sie vor jeder GC-Analyse derivatisiert werden, um sie einer GC-Analyse zugänglich zu machen. Die nun beschriebene Methylierungsmethode wurde in einer vorherigen Diplomarbeit ausgearbeitet (Aichner, 2020). Bei der Methylierung wird die Carbonsäuregruppe der Harzsäuren mit einer Methylgruppe verestert, wodurch die Struktur lipophiler wird und sich der Siedepunkt verringert, die Substanz also schneller flüchtig wird.

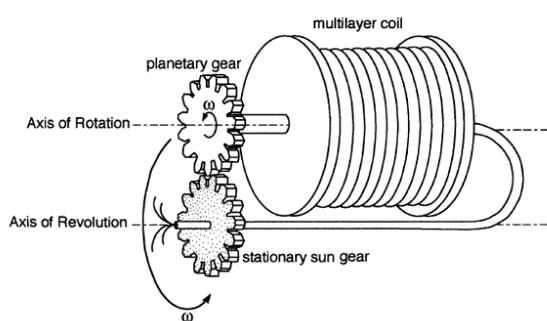
Etwa 1 mg der Probe wird in einem V-Vial eingewogen und in 200 µl Methyl-8-Reagenz (N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal) gelöst. Danach wird das Gefäß mit einem Deckel, der ein Septum enthält, verschlossen und 30 Minuten bei 85° im Trockenschrank erhitzt. Zum Schluss

werden 200 µl Pyridin dazugegeben. Anschließend kann die Probe mittels GC vermessen werden.

3.4. Gegenstromverteilungschromatographie (CCC)

Die Gegenstromverteilungschromatographie (CCC), oder in unserem Fall genauer die Hochleistungs-Gegenstromverteilungschromatographie (HPCCC), ist eine chromatographische Methode, bei der ein Substanzgemisch durch Verteilung der Moleküle in zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten aufgetrennt oder aufgereinigt werden kann. Dieses Verfahren wurde erst Ende der 1960er, Anfang der 1970er Jahre von Yoichiro Ito entwickelt (Ito et al., 1966; Ito & Bowman, 1970), und über die Jahre stetig verbessert. Vorteile gegenüber chromatographischen Methoden mit einer festen Phase sind keine irreversible Adsorption, die Probe wird fast vollständig zurückgewonnen (v.a. im präparativen Modus), außerdem werden die Denaturierung, das Tailing¹ und der Lösungsmittelverbrauch minimiert. Zusätzlich hat dieses Verfahren wirtschaftliche Vorteile, da nach der Anschaffung des Geräts keine teuren stationären Phasen, wie z.B. bei der HPLC oder GC, gekauft werden müssen und für die Methoden nur gewöhnliche Lösungsmittel verwendet werden (Ito & Conway, 1984; Marston, 2007). Negativ anmerken könnte man die Durchführungszeit, welche aber in den letzten Jahren stark verkürzt werden konnte, und die hohe Störungsanfälligkeit der Apparatur, wobei hier vor allem Druckprobleme durch undichte Stellen oder Luft im System erwähnt werden müssen.

Wichtigster Bestandteile der Apparatur ist eine Multilayer-Spule (multilayer-coil) die mit



Quelle: Ito (2005)

Bild 9: Schematische Darstellung der Planetenbewegung der Spule auf der die Trennsäule in mehreren Schichten aufgewickelt ist

einem Umlaufrädergetriebe verbunden ist, über welches eine Planetenbewegung der Spule erzeugt werden kann. Auf dieser Spule ist die Säule, ein Kunststoff-Polymer-Schlauch, in mehrere Schichten spiralförmig aufgewickelt und dreht sich mit derselben Winkelgeschwindigkeit (ω) gleichzeitig um ihre eigene Achse (Axis of Rotation) und um die Zentrifugalachse (Axis of Revolution)

¹ Hauptursache für Tailing ist ein Überladungseffekt, bei dem Bindestellen der stationären Phase von Analyten bereits blockiert sind und dadurch nicht mehr zugänglich sind. Aus diesem Grund bilden sich bei der Messung asymmetrische/unscharfe Peaks bzw. bei der DC unscharfe Substanz-Zonen und die Retentionszeit wird verkürzt. Bei der HPCCC werden die Analyten nicht durch Adsorption/Bindung an eine stationäre Phase zurückgehalten, sondern über die Verteilung der Analyten in unterschiedlich polaren Flüssigkeiten.

(siehe Bild 9, S.14). Durch diese Planetenbewegung und dadurch ausgelöste Zentrifugalkraft, kommt es zu sehr vielen Mischungs- und Entmischungsvorgängen der mobilen und stationären Phase in der Säule. Außerdem kann dadurch die mobile Phase ständig durch die Säule laufen, nach und nach Analyten mitreißen, und am Ende eluieren, während die stationäre Phase in der rotierenden Säule (rotary-seal-free) verbleibt (Ito, 2005).

Bei der HPLCCC wählt man ein zweiphasiges System aus, von dem entweder die Oberphase (apolare Phase) als stationäre Phase und die Unterphase (polare Phase) als mobile Phase verwendet wird (Umkehrphasenmodus) oder umgekehrt (Normalphasenmodus). Dieses System wird aus verschiedenen, teilweise nicht mischbaren Lösungsmitteln hergestellt und dann anhand der Verteilungskoeffizienten der Analyten ausgewählt (siehe Kapitel 3.4.1, S. 16 bzw. Kapitel 4.2.1, S. 25). Über ein Pumpsystem wird die Säule mit der stationären Phase befüllt. Anschließend wird so lange mobile Phase bei zirka 1000-1600 rpm der Spule durchgepumpt, bis das Equilibrium eingestellt ist. Danach wird bei gleicher Umdrehungszahl die Probe eingespritzt, deren Analyten dann nach Polarität bzw. nach dem Verteilungskoeffizient in zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten früher oder später von der mobilen Phase mitgerissen werden. Die eluierende mobile Phase wird in Fraktionen gesammelt. Außerdem kann man Elutionsprogramme durchführen, bei der mehrere mobile Phasen mit unterschiedlicher Polarität verwendet werden, um die Trennleistung noch zu verbessern (Huang et al., 2016). Die Analyse der Fraktionen erfolgt mit einem UV-Vis Detektor oder, wie im Zuge dieser Diplomarbeit, mit einer DC und GC Kontrolle.

Die für die HPLCCC verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 (S. 15) genauer beschrieben und in Bild 10 (S. 16) abgebildet.

Tabelle 5: HPLCCC Instrumente

HPCCC Gerät	Dynamic Extractions Spectrum	
Pumpe	Ecom Alpha 10 Plus Isocratic Pump	
Kühlung	Thermo Scientific Accel 500 LC	
analytische Säule^a	Material:	FEP (Tetrafluorethylen-Hexafluorpropylen-Copolymer)
	Volumen:	22 ml
präparative Säule^a	Material:	PFA (Perfluoralkoxy-Polymere)
	Volumen:	136 ml

^a: fix im Gerät verbaut

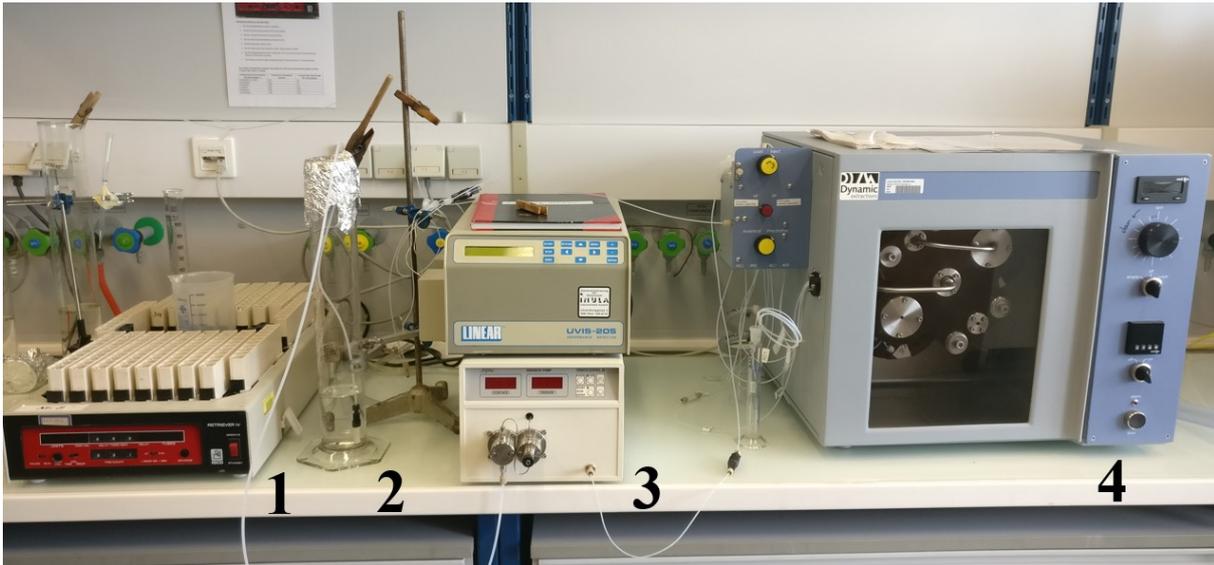


Bild 10: HPCCC Versuchsaufbau, 1: Fraktionssammler; 2: Lösungsmittelgemisch; 3: Pumpe; 4: HPCCC Gerät

3.4.1. Vortests

In dieser Diplomarbeit werden die HEMWat-Systeme als zweiphasige Lösungsmittelgemische verwendet. HEMWat steht für die Anfangsbuchstaben der Lösungsmittel **H**exan/**H**eptan, **E**thylacetat, **M**ethanol und **W**asser (**water**) (Friesen & Pauli, 2005). Diese Lösungsmittel werden mit unterschiedlichen Volumsverhältnissen gemischt und sind in 28 etablierte Systeme aufgeteilt, wobei System 1 sehr polar und System 28 sehr apolar ist (Skalicka-Woźniak & Garrard, 2014). In Tabelle 6 (S. 17), Tabelle 13 (S. 27) und Tabelle 14 (S. 27) sind die für die Vortests verwendeten Mischverhältnisse angegeben.

Zuerst stellt man eine 10 mg/ml Lösung der AH (siehe Bild 3, S. 6) her, wobei diese in Methanol gelöst wird. Das HEMWat-System wird mit einem Gesamtvolumen von 6 ml in einer Schliffeprouvette vorbereitet, wobei 1 ml des Methanolteils von der zuvor angefertigten AH-Lösung stammt. Anschließend wird die Epruvette gut durchgeschüttelt und so lange stehen gelassen, bis sich das Equilibrium eingestellt hat. Man entnimmt nun von der Oberphase und der Unterphase jeweils 1 ml und pipettiert sie in zwei separate Gefäße. Nun kann man entweder mittels DC visuell auswerten oder nach Derivatisierung der Proben mittels GC-Analyse den Verteilungskoeffizienten bestimmen.

Zur Berechnung des Verteilungskoeffizienten K werden nach der GC-Analyse der Ober- und Unterphase die Peakflächen (AUC) der Harzsäurepeaks bestimmt. Um eine gute Trennleistung zu garantieren, sollte sich K in der Nähe von 1 befinden (Pauli et al., 2008). Bei der HPCCC kann entweder im Normalphasen- oder im Umkehrphasenmodus (NP/normal phase oder

RP/reversed phase) gearbeitet werden. Je nachdem in welchem Modus die HPCCC Methode durchgeführt wird, wird K wie folgt bestimmt:

Normalphase:

$$K = \frac{AUC \text{ Unterphase}}{AUC \text{ Oberphase}}$$

Umkehrphase:

$$K = \frac{AUC \text{ Oberphase}}{AUC \text{ Unterphase}}$$

3.4.2. Methoden

In diesem Kapitel sind die verschiedenen, in dieser Diplomarbeit angewendeten, HPCCC Methoden in ihren Grundzügen beschrieben. Es wurden analytische isokratische HPCCC Läufe sowie analytische und präparative HPCCC Elutionsprogramme durchgeführt. Außerdem sind in Tabelle 6 (S. 17) Mischverhältnisse von HEMWat-Systemen (Skalicka-Woźniak & Garrard, 2014) dargestellt, die vermehrt in dieser Arbeit angewendet werden. Die verschiedenen Lösungsmittel werden, je nach benötigtem Volumen, in einen Scheidetrichter gegeben und gut durchmischt. Wenn sich die beiden Phasen getrennt haben, wird die Unterphase (UP) und Oberphase (OP) in zwei separate Messzylinder gefüllt.

Tabelle 6: Mischverhältnisse der HEMWat-Systeme Nr. 20-28 in v/v/v/v (Skalicka-Woźniak & Garrard, 2014)

HEMWat-System Nr.:	Hexan	Ethylacetat	Methanol	Wasser
20	2	1	2	1
21	5	2	5	2
22	3	1	3	1
23	4	1	4	1
24	5	1	5	1
25	6	1	6	1
26	9	1	9	1
27	19	1	19	1
28	1	-	1	-

Analytische isokratische HPCCC:

Alle isokratisch durchgeführten HPCCC Methoden, also jene Methoden, bei denen nur ein HEMWat-System verwendet wird, werden im analytischen Modus betrieben.

Zuerst wird die Probe, ca. 25 mg, in 0,5 ml der Ober- und 0,5 ml der Unterphase des verwendeten HEMWat-Systems gelöst. Nachdem die 22 ml fassende analytische Säule, siehe Tabelle 5 (S. 15), mit der stationären Phase mit einem Fluss von 2 ml/min bei 200 rpm befüllt wurde, wird die mobile Phase mit einem Fluss von 1 ml/min bei 1600 rpm durchgepumpt. Die mobile Phase verdrängt einen Teil der stationären Phase, wobei das Erreichen des Equilibriums anhand der Phasentrennung des aufgefangenen Eluats gekennzeichnet wird. Danach wird sofort die gelöste Probe über eine 1 ml fassende Einspritzspindel injiziert.

Anschließend werden zirka 50 ml der mobilen Phase mit einem Fluss von 1 ml/min durchgepumpt. Die eluierte mobile Phase wird zu je 0,5 ml pro Fraktion gesammelt. Zum Schluss wird wieder auf 200 rpm gestellt und etwa 25 ml der stationären Phase in Fraktionen gesammelt. In Tabelle 7 (S. 18) sind alle im Zuge dieser Diplomarbeit durchgeführten analytischen isokratischen HPCCC Methoden aufgelistet.

Tabelle 7: Analytische isokratische HPCCC Methoden

Methode
HEMWat 25 NP
HEMWat 26 NP
HEMWat 26 RP
HEMWat 28 NP

Analytisches HPCCC Elutionsprogramm:

Im analytischen Modus werden zuerst 22 ml der stationären Phase mit einem Fluss von 2 ml/min bei 200 rpm eingefüllt. Danach wird die mobile Phase mit einem Fluss von 1 ml/min bei 1600 rpm eingeleitet, bis sich das Equilibrium einstellt. Zum Einspritzen der Probe wird eine 1 ml Spindel verwendet. Etwa 22 mg der AH (siehe Bild 3, S. 6) werden davor in 0,5 ml der Oberphase und 0,5 ml der Unterphase des verwendeten Start-HEMWat-Systems gelöst. Diese vorbereitete Probe wird nun eingespritzt und es werden Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt.

Nach der Injektion werden stufenweise von jeder mobilen Phase 30 ml durch die Säule gepumpt und in Fraktionen gesammelt, was 60 Fraktionen pro mobiler Phase entspricht. Es werden beim Stand von 30 ml im Messzylinder 50 ml der neuen mobilen Phase dazugegeben, was bedeutet, dass vor jedem Wechsel 20 ml mit einer Pipette entfernt werden müssen. Auf Bild 10 (S.16) ist

bei Nr. 2 der Messzylinder, aus dem das Lösungsmittelgemisch in das HPCCC Instrument gepumpt wird, abgebildet. Dieses Programm wird mit jeder mobilen Phase wiederholt. Zum Schluss wird bei niedriger Umdrehungszahl, 200 rpm, die stationäre Phase bei einem Fluss von 2 ml/min abgelassen und 15 Fraktionen zu je 2 ml gesammelt. In Tabelle 8 (S. 19) sind alle durchgeführten analytischen HPCCC Elutionsprogramme aufgelistet.

Tabelle 8: Analytische HPCCC Elutionsprogramme

Methode	stationäre Phase	mobile Phase
28OP_28UP-25UP RP	HEMWat 28 OP	HEMWat 28 UP → 27 UP → 26 UP → 25 UP
28OP_22UP-27UP RP	HEMWat 28 OP	HEMWat 22 UP → 24 UP → 25 UP → 26 UP → 27 UP
28OP_20UP-24UP RP	HEMWat 28 OP	HEMWat 20UP → 22 UP → 23 UP → 24 UP
20OP_20UP-24UP RP	HEMWat 20 OP	HEMWat 20 UP → 21 UP → 22 UP → 23 UP → 24 UP

OP-Oberphase, UP-Unterphase, RP-Umkehrphase, NP-Normalphase, HE MWat-Hexan/Heptan, Ethylacetat, Methanol und Wasser (water) in v/v/v/v (Friesen & Pauli, 2005; Skalicka-Woźniak & Garrard, 2014)

Präparatives HPCCC Elutionsprogramm:

Im präparativen Modus (siehe Tabelle 5, S. 15) werden zuerst 136 ml der stationären Phase bei einem Fluss von 10 ml/min mit 200 rpm eingefüllt. Danach pumpt man die mobile Phase bis zum Equilibrium mit einem Fluss von 6 ml/min bei 1600 rpm durch die Säule. Sollte der Druck zu hoch werden, wird der Fluss auf 4 ml/min zurückgestellt, wobei sich kurz darauf das Equilibrium einstellt. Zum Einspritzen wird eine 12 ml Spindel verwendet. Etwa 200 mg der AH (siehe Bild 3, S. 6) werden davor in 5ml der Oberphase und 5 ml der Unterphase des verwendeten Start-HEMWat-Systems gelöst. Diese 10 ml werden nun über die Einspritzspindel injiziert. Es werden Fraktionen zu je 2,8 ml gesammelt.

Nach der Injektion werden stufenweise von jeder mobilen Phase 140 ml durch die Säule gepumpt und in Fraktionen gesammelt, was 50 Fraktionen pro mobile Phase entspricht. Beim Stand von etwa 80 ml im Messzylinder, von wo das Lösungsmittelgemisch in das HPCCC Gerät gepumpt wird, wird die nächste mobile Phase dazugegeben. Dieses Programm wird mit jeder mobilen Phase wiederholt. Zum Schluss wird bei niedriger Umdrehungszahl, 200 rpm, die stationäre Phase bei einem Fluss von 10 ml/min abgelassen und 15 Fraktionen zu je 10 ml gesammelt. Im Zuge dieser Arbeit wurden drei präparative Elutionsprogramme durchgeführt (siehe Tabelle 9, S. 20)

Tabelle 9: Präparative HPLC Elutionsprogramme

Methode	stationäre Phase	mobile Phase
21OP_21UP-27UP RP	HEMWat 21 OP	HEMWat 21 UP → 23 UP → 25 UP → 27UP
21OP_21UP-26UP-27UP RP	HEMWat 21 OP	HEMWat 21 UP → 23 UP → 25 UP → 26 UP → 27UP
21OP_21UP-24UP-26UP RP	HEMWat 21 OP	HEMWat 21 UP → 24 UP → 25 UP → 26 UP

OP-Oberphase, UP-Unterphase, RP-Umkehrphase, NP-Normalphase, HE MWat-Hexan/Heptan, Ethylacetat, Methanol und Wasser (water) in v/v/v/v (Friesen & Pauli, 2005; Skalicka-Woźniak & Garrard, 2014)

3.5. Lösungsmittel und Substanzen

In Tabelle 10 (S.21) sind alle Lösungsmittel und in Tabelle 11 (S. 21) alle Reinsubstanzen angegeben, die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendet wurden.

Tabelle 10: Liste aller verwendeten Lösungsmittel

Lösungsmittel	Lösungsmittelspezifikation	Hersteller	Ort
Aceton	Aceton Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Acetonitril	Acetonitril HiPerSolv Chromanorm	VWR BDH Prolabo	Wien
Ameisensäure	Formic acid Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Chloroform	Chloroform Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Ethylacetat	Ethylacetat Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Hexan	n-Hexane Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Methanol	Methanol Normapur	VWR BDH Prolabo	Wien
Methyl-8-Reagenz	N,N-Dimethylformamid dimethylacetal	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Pyridin	Pyridin	Merck	Darmstadt
Trifluoressigsäure	Trifluoroacetic acid 61030	Riedel-de Haën AG	Seelze
Wasser	doppelt destilliertes Wasser	deionisiertes Wasser, destilliert mit GFL 2004	Wien

Tabelle 11: Liste aller verwendeten Substanzen

Substanz	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Ort
Dehydroabietinsäure	Dehydroabietinsäure (DHAA)	Division of Pharmacognosy, isoliert und aufgereinigt durch Dr. Marco Stadler	Universität Wien
Isopimarsäure	ChemCruz Isopimaric Acid	Santa Cruz	Dallas
Palmitinsäuremethylester	Methyl palmitate Palmitinsäure-methylester	Fluka Chemie GmbH	Buchs
Levopimarsäure	ChemCruz Levopimaric Acid	Santa Cruz	Dallas
Neoabietinsäure	ChemCruz Neoabietic Acid	Santa Cruz	Dallas
Pimarsäure	Pimaric Acid	MP Biomedicals	Solon

4. Spezieller Teil/Ergebnisse

In diesem Kapitel sind alle Ergebnisse, die im Zuge dieser Diplomarbeit erarbeitet wurden, beschrieben. Zuerst wird in Kapitel 4.1 (S. 22) die AH und die VH (siehe Bild 3, S. 6) mittels GC-Analyse mit Reinsubstanzen verglichen und charakterisiert. Anschließend folgt der größte Themenblock dieser Arbeit, in welchem die Isolierung einzelner Harzsäuren mit der HPCCC beschrieben wird. Dieses Kapitel 4.2 (S. 25) reicht von der Auswahl eines geeigneten HEMWat-Systems über die Etablierung eines Elutionsprogramms bis hin zur Isolierung von zwei Harzsäuren und zwei weiteren noch unbekanntem Substanzen. In Kapitel 4.3 (S. 43) werden die zwei verwendeten Gaschromatographen und die verschiedenen stationären Phasen verglichen. Zum Schluss wird in Kapitel 4.4 (S. 49) mit dem Perkin Elmer Autosystem XL GC eine Eichgerade von Dehydroabietinsäure erstellt und die dazugehörige Validierung durchgeführt.

4.1. Charakterisierung der Harzsäurefraktionen

Um die AH (siehe Bild 3, S. 6) zu charakterisieren, wurde das Substanzgemisch mittels GC aufgetrennt und die jeweiligen Retentionszeiten der Peaks mit Retentionszeiten von käuflich erworbenen Reinsubstanzen (siehe Kapitel 3.5, S. 21) verglichen. Der für die Charakterisierung verwendete Gaschromatograph, sowie die verwendete stationäre Phase, wurde in Kapitel 3.3 (S. 8) beschrieben. Es wurden 2 mg AH und 0,2 mg der jeweiligen Reinsubstanz eingewogen und dann für die GC derivatisiert und vorbereitet, wie in Kapitel 3.3.3 (S.13) beschrieben. Das Chromatogramm der AH enthielt acht Peaks, von denen fünf Peaks durch Vergleich mit den Retentionszeiten der Peaks der Reinsubstanzen ermittelt werden konnten (siehe Bild 11, S. 23). Wobei anzumerken ist, dass die Reinsubstanz Levopimarsäure in einem 54:46 Verhältnis verunreinigt ist (siehe Bild 11, S. 23). Da die Retentionszeit der Verunreinigung (37.3 min) mit der Retentionszeit von DHAA (37.2 min) korreliert, könnte es sich um DHAA handeln. Die Reinsubstanz Pimarsäure ist in einem 85:15 Verhältnis verunreinigt (siehe Bild 11, S. 23). Hierbei könnte die Sandarakopimarsäure zu der Verunreinigung geführt haben, da die Retentionszeiten ebenfalls eng beieinander liegen (Sandarakopimarsäure Retentionszeit: 33.9 min, Verunreinigung Retentionszeit: 33.8 min). Zur Bestimmung dieser Verhältnisse wurde jeweils die Summe der Peakflächen der beiden Harzsäurepeaks auf 100 % gesetzt. Anschließend ermittelte man den prozentualen Anteil der beiden Harzsäurepeaks, und konnte so ein Verhältnis berechnen. Die Peakflächen wurden mit der Opensource Software OpenChrom Lablicate bestimmt.

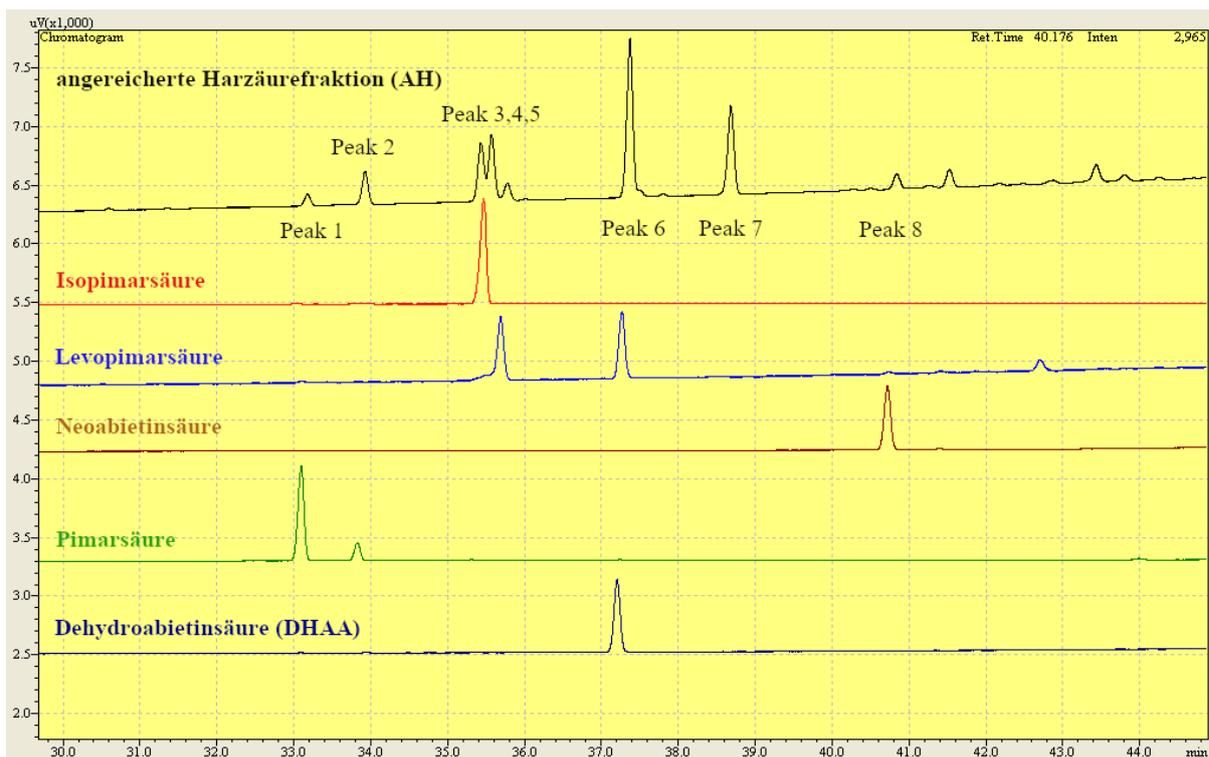


Bild 11: Analyse der angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6) mittels GC-FID (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11) im Vergleich zu den Referenzen Isopimarsäure, Levopimarsäure, Neoabietinsäure, Pimarsäure und Dehydroabietinsäure (DHAA) (siehe Tabelle 11, S.21)

In Tabelle 12 (S. 23) sind die genauen Retentionszeiten der verfügbaren Reinsubstanzen (Pimarsäure, Isopimarsäure, Levopimarsäure, Dehydroabietinsäure, Neoabietinsäure) und die genauen Retentionszeiten der acht verschiedenen Peaks der AH abgebildet. Bei jenen Harzsäuren, die mit einem Stern markiert sind, waren keine Reinsubstanzen vorhanden. Auf Grund von vorangegangenen Untersuchungen mit GC/MS können diese in der angegebenen Reihenfolge zugeordnet werden, was aber noch mit einem Reinsubstanzenvergleich bestätigt werden muss.

Tabelle 12: Vergleich Retentionszeiten der in den Chromatogrammen enthaltenen Peaks aus Bild 11 (S. 23)

Angereicherte Harzsäurefraktion (AH) [min]		Reinsubstanzen [min]	
Peak 1	33.2	33.1	Pimarsäure
Peak 2	33.9		*Sandarakopimarsäure
Peak 3	35.4	35.5	Isopimarsäure
Peak 4	35.6		*Palustrinsäure
Peak 5	35.8	35.7	Levopimarsäure
Peak 6	37.4	37.2	Dehydroabietinsäure
Peak 7	38.7		*Abietinsäure
Peak 8	40.8	40.7	Neoabietinsäure

* bei diesen Harzsäuren waren keine Reinsubstanzen vorhanden

Da in dieser Diplomarbeit zwei verschiedene Harzsäurefraktionen (AH und VH, siehe Bild 3, S. 6) für die Auftrennung verwendet werden, werden die Unterschiede durch einen Chromatogrammvergleich aufgezeigt (siehe Bild 12, S. 24). Weil von AH und VH nur Chromatogramme zur Verfügung stehen, die mit unterschiedlichen GC-Instrumenten, Temperaturprogrammen und stationären Phasen vermessen wurden, siehe Tabelle 2 (S. 10) und Tabelle 3 (S.11), können die Retentionszeiten nicht direkt verglichen werden. Anhand der Chromatogramme, siehe Bild 12 (S. 24), kann man aber klar erkennen, dass sich durch die Aufreinigung mittels Niederdruck-Flüssigchromatographie Peakverhältnisse verändert haben. Die Levopimarsäure wurde durch dieses Verfahren komplett abgetrennt. Außerdem ist von der Palustrinsäure nur noch ein Bruchteil enthalten. Der Anteil von DHAA und von der Abietinsäure wird bei der VH kleiner. Kurz vor DHAA, bei der Retentionszeit von 32.9 min, ist bei der VH ein nicht zuordenbarer Peak zu erkennen der bei der Niederdruck-Flüssigchromatographie entweder durch eine Umlagerung oder Verunreinigung entstanden ist.

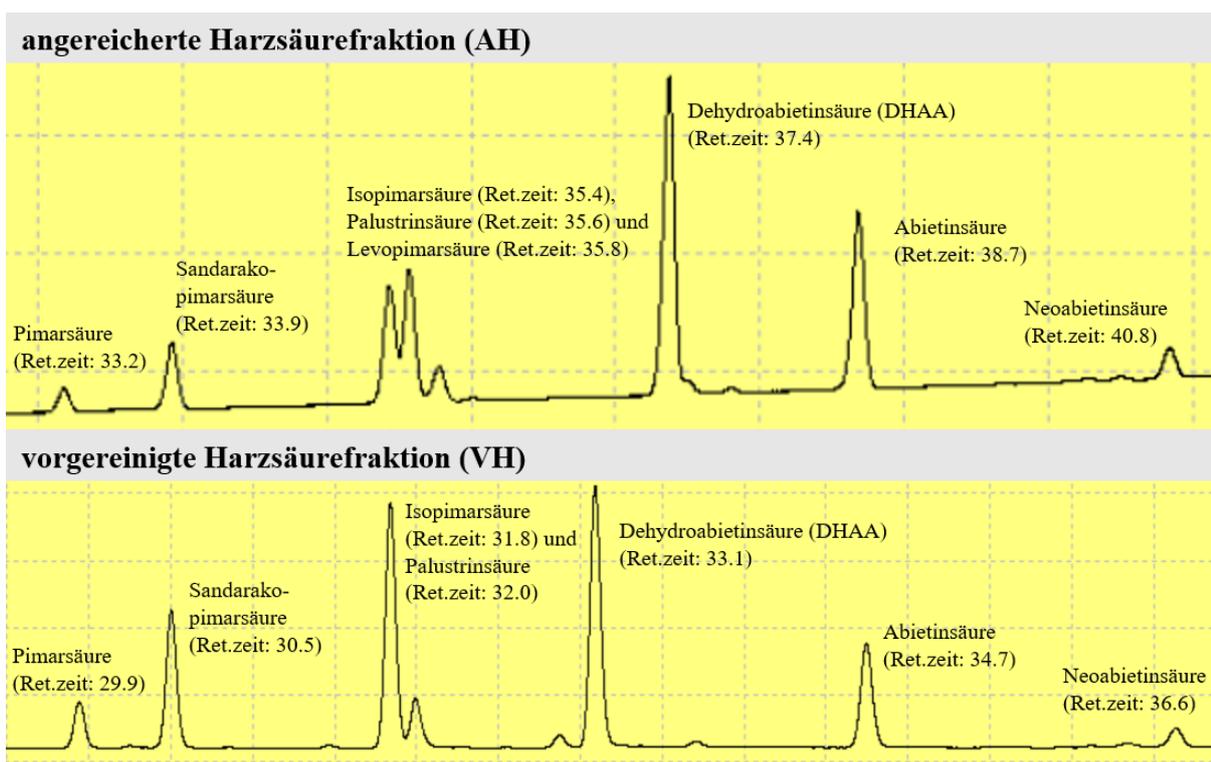


Bild 12: Vergleich der angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6) und der vorgereinigten Harzsäurefraktion (VH, siehe Bild 3, S. 6) mittels GC-FID (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11); Retentionszeit (Ret.zeit) in min

4.2. Isolierung von Harzsäuren mittels HPCCC

Da die verschiedenen Harzsäuren aus den Harzsäurefraktionen eine sehr ähnliche Struktur aufweisen (siehe Bild 2, S. 3) und mit anderen Verfahren bisher nicht getrennt isoliert werden konnten, wurde die Isolierung mittels HPCCC ins Auge gefasst.

In Kapitel 4.2 (S. 25) wird beschrieben, wie und warum ein geeignetes HEMWat-System ausgewählt wird und wie dieses optimiert werden kann, um eine noch bessere Trennleistung zu erreichen.

4.2.1. Auswahl eines geeigneten HEMWat-Systems mittels Vortests

Da es bei der HPCCC zu vielen Mischungs- und Entmischungsvorgängen von zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten kommt, sollte ein System gewählt werden, in dem sich die Harzsäuren gut in beiden Phasen verteilen, damit es zu einer besseren Trennung kommt. Weil die diterpenoiden Harzsäuren apolar sind, orientiert man sich zuerst an den apolaren HEMWat-Systemen, um einen ersten Überblick zu erhalten. Die Vortests wurden daher an den HEMWat-Systemen 20, 22, 24, 26, 28 durchgeführt (siehe Tabelle 6, S.17). Zuerst wurde die Verteilung visuell mittels DC (siehe Kapitel 4.2.1.1, S. 25) ausgewertet, um anschließend mit der GC den genauen Verteilungskoeffizienten K zu bestimmen (siehe Kapitel 4.2.1.2, S. 26). Durch diese Vorauswahl kann viel Zeit bei der HPCCC gespart werden.

4.2.1.1. Überprüfung der Vortests mittels DC

Die zuvor genannten HEMWat-Systeme 20, 22, 24, 26 und 28 (siehe Tabelle 6, S. 17) werden im kleinen Maßstab in Schliffeprouvetten hergestellt und die AH (siehe Bild 3, S. 6) dazugegeben. In Kapitel 3.4.1 (S. 16) ist der genaue Ablauf der Vortests beschrieben. Danach werden die Ober- und Unterphase auf die DC-Platte aufgetragen. Da das Harzsäuregemisch durch die violette Bande angezeigt wird, ist auf Bild 13 (S. 26) klar zu erkennen, dass beim HEMWat-System 20 die Harzsäuren vermehrt in der Oberphase (OP) enthalten sind. Je apolarer die Systeme werden, umso mehr wandern die Harzsäuren in die Unterphase (UP) und reichern sich dort an. In den beiden roten Kästen sind jene Systeme eingerahmt, bei denen die Harzsäuren, visuell gesehen, in der OP und UP etwa gleich verteilt sind, also bei HEMWat-System 24 und HEMWat-System 26.

Im folgenden Kapitel werden die Verteilungskoeffizienten (K) jeder einzelnen Harzsäure mittels gaschromatographischer Analyse im Bereich dieser HEMWat-Systeme ermittelt.

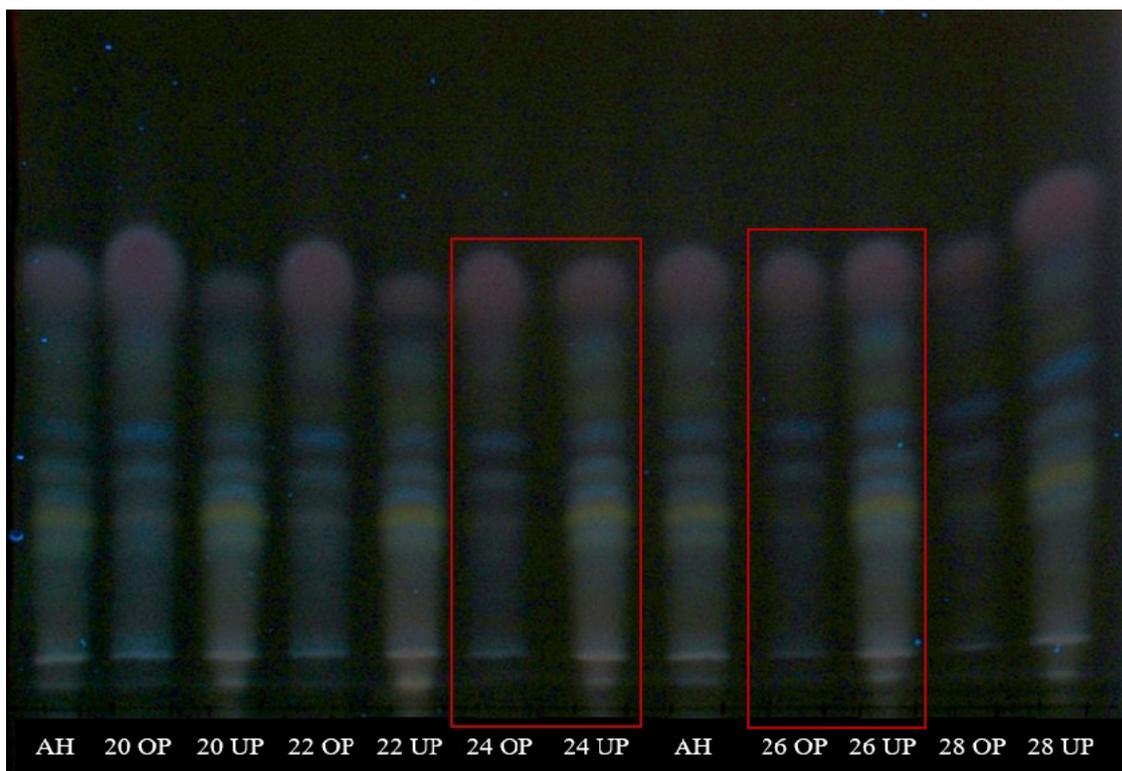


Bild 13: Überprüfung der Verteilung von der angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6) in den HEMWat-Systemen 20, 22, 24, 26 und 28 (siehe Tabelle 6, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

4.2.1.2. Überprüfung der Vortests mittels GC

Für die gaschromatographische Überprüfung der HPLCCC-Vortests werden nun jeweils 1 ml der Oberphase und Unterphase des jeweiligen HEMWat-Systems (siehe Tabelle 13, S. 27 und Tabelle 14, S. 27) entnommen und anschließend wie in Kapitel 3.3.3 (S. 13) beschrieben für die Gaschromatographie vorbereitet und dann vermessen.

Nach der Analyse werden die sieben Harzsäurepeaks integriert und die Peakfläche (AUC, area under the curve) bestimmt. Mit diesen Peakflächen wird der Verteilungskoeffizient K ermittelt, welcher angibt, wie sich eine Substanz in zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten verteilt (für die genaue Berechnung siehe Kapitel 3.4.1, S. 16). Es wird ein Konzentrationsverhältnis von der zu analysierenden Substanz in der mobilen und stationären Phase bestimmt. Wie in Tabelle 13 (S. 27) und Tabelle 14 (S. 27) ersichtlich, wurde K für die jeweiligen HEMWat-Systeme in „reversed phase“ und „normal phase“ bestimmt.

Tabelle 13: Verteilungskoeffizienten (K) der Harzsäuren im reversed-phase-mode (Umkehrphasenmodus) (siehe Kapitel 3.4.1, S. 16)

reversed phase							
HEMWat-System Nr.	Mischverhältnis ^a HEMWat-System	Peak 1	Peak 2	Peak 3+4	Peak 5	Peak 6	Peak 7
24	5:1:5:1	2,21	2,19	1,82	1,60	1,64	1,12
25	6:1:6:1	2,02	1,87	1,94	1,32	1,89	1,80
25,5	15:2:15:2	1,74	1,54	1,64	1,08	1,61	1,89
25,5 A ^b	15:2:15:2	2,39	1,77	1,50	1,34	1,44	0,93
26	9:1:9:1	1,67	1,46	1,22	1,24	1,09	0,68
26,5	14:1:14:1	0,91	0,83	0,65	0,75	0,63	0,36
27	19:1:19:1	0,91	0,96	0,73	0,89	0,72	0,25

^a Mischverhältnis bestehend aus n-Hexan, Ethylacetat, Methanol und Wasser (v/v/v/v). ^bA = +0,006 ml Ameisensäure nach Pauli et al. (2008).

Tabelle 14: Verteilungskoeffizienten (K) der Harzsäuren im normal-phase-mode (Normalphasenmodus) (siehe Kapitel 3.4.1, S. 16)

normal phase							
HEMWat-System Nr.	Mischverhältnis ^a HEMWat-System	Peak 1	Peak 2	Peak 3+4	Peak 5	Peak 6	Peak 7
24	5:1:5:1	0,45	0,46	0,55	0,62	0,61	0,90
25	6:1:6:1	0,49	0,53	0,52	0,76	0,53	0,55
25,5	15:2:15:2	0,57	0,65	0,61	0,93	0,62	0,53
25,5 A ^b	15:2:15:2	0,42	0,57	0,67	0,75	0,70	1,08
26	9:1:9:1	0,60	0,68	0,82	0,81	0,92	1,47
26,5	14:1:14:1	1,10	1,21	1,55	1,34	1,60	2,75
27	19:1:19:1	1,10	1,04	1,37	1,12	1,38	4,06

^a Mischverhältnis bestehend aus n-Hexan, Ethylacetat, Methanol und Wasser (v/v/v/v). ^bA = +0,006 ml Ameisensäure nach Pauli et al. (2008).

Da der „sweet spot“ bei $K=1$ liegt (Pauli et al., 2008) bzw. ein System gewählt werden sollte bei dem sich K im Bereich von 0,5-2 befindet (Ito, 2005), wurden für eine isokratische HPLC Methode die HEMWat-Systeme 25 und 26 im normal phase (NP) Modus gewählt.

4.2.2. HPLC Methode HEMWat-System 25 NP

Diese analytische, isokratische HPLC Methode mit dem HEMWat-System 25 (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17 und Tabelle 6, S. 17) sollte nun klären, ob sich die acht Harzsäuren auftrennen bzw. isolieren lassen. Um dies zu ermitteln, wurden DC und GC Analysen durchgeführt.

Bei dieser Methode wurde die VH (siehe Bild 3, S.6) verwendet. Die Überlegung dahinter war, eine aufgereinigte Version zu verwenden, bei der noch enthaltene Verunreinigungen und Teile der DHAA aus der AH entfernt wurden. Dadurch wollte man erreichen, dass sich durch

Verminderung etwaiger Störfaktoren die Harzsäuren besser auftrennen lassen. Diese VH wurde nur bei dieser Methode verwendet.

Es werden 22,24 mg VH in HEMWat-System 25 gelöst und in das System eingespritzt. Das Verfahren wurde, wie in Kapitel 3.4.2 (S. 17) genauer beschrieben, durchgeführt. Mit einem Fraktionssammler nahm man Fraktionen zu jeweils 0,5 ml auf. Insgesamt waren es 112 Fraktionen der mobilen Phase und 22 Fraktionen der stationären Phase. Zuerst wird nun die DC-Auswertung in Kapitel 4.2.2.1 (S. 28), und danach die GC-Auswertung in Kapitel 4.2.2.2 (S. 30), dieser gesamt 133 Fraktionen erläutert.

Außerdem wurden zusätzlich noch andere isokratische Methoden erprobt. Beim HEMWat-System 26 NP war das Ergebnis gleich wie bei HEMWat-System 25 NP. Bei HEMWat-System 26 RP und HEMWat-System 28 NP sind alle Harzsäuren gemeinsam zu Beginn eluiert.

4.2.2.1. Fraktionsvergleich mittels DC

Da 112 Fraktionen der mobilen Phase aufzuklären waren, wurde zuerst nur jede vierte Fraktion mittels DC überprüft, um sich einen Überblick zu verschaffen. Der genaue Ablauf der DC-Analyse ist in Kapitel 3.2 (S. 7) beschrieben. Nach Derivatisierung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure konnte man unter UV₃₆₆ beobachten, dass die Harzsäuren in den Fraktionen 48-52 eluiert wurden (siehe Bild 14, S. 29). Daher wurde noch eine genauere DC Aufnahme zwischen Fraktion 44 und 60 erstellt. In Bild 15 (S. 29) sieht man nun, dass sich in den Fraktionen 45-57 die Harzsäuren befinden, mit insgesamt 6,59 mg Ausbeute, was 29,63 % der Gesamteinwaage entspricht. Außerdem ist in diesem Bild klar erkennbar, dass die Farbtöne der Harzsäurespots von Fraktion zu Fraktion variieren. Das Farbspektrum reicht von bläulich (Fraktion 45, 46 und 47) über blau-violett (Fraktion 48, 49 und 50) bis hin zu rot-violett (Fraktion 51) und rötlich (Fraktion 52-57). Es könnte zu diesen farblichen Veränderungen kommen, weil während der HPLC Methode unterschiedliche Harzsäuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten eluieren und sich auf die verschiedenen Fraktionen aufteilen. In vorangegangenen DC-Analysen ist es teilweise auch durch das unterschiedlich starke Aufheizen der DC Platte zu einer Variabilität der Farbtöne gekommen, vor allem wenn die Platte nicht gleichmäßig heiß geworden ist. Um zu evaluieren, wie sich die Harzsäuren in den Fraktionen verteilen, wurden diese mittels GC qualitativ überprüft (siehe Kapitel 4.2.2.2, S. 30).

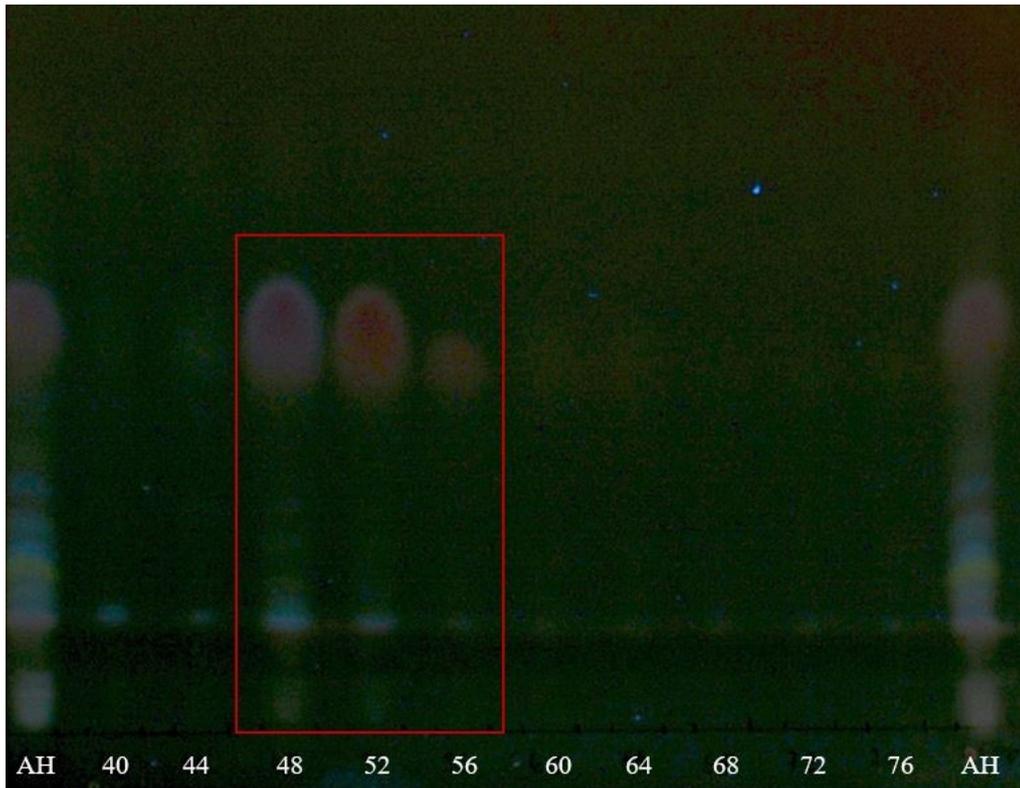


Bild 14: Fraktionsvergleich der Fraktionen 40-76 von HEMWat 25 NP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

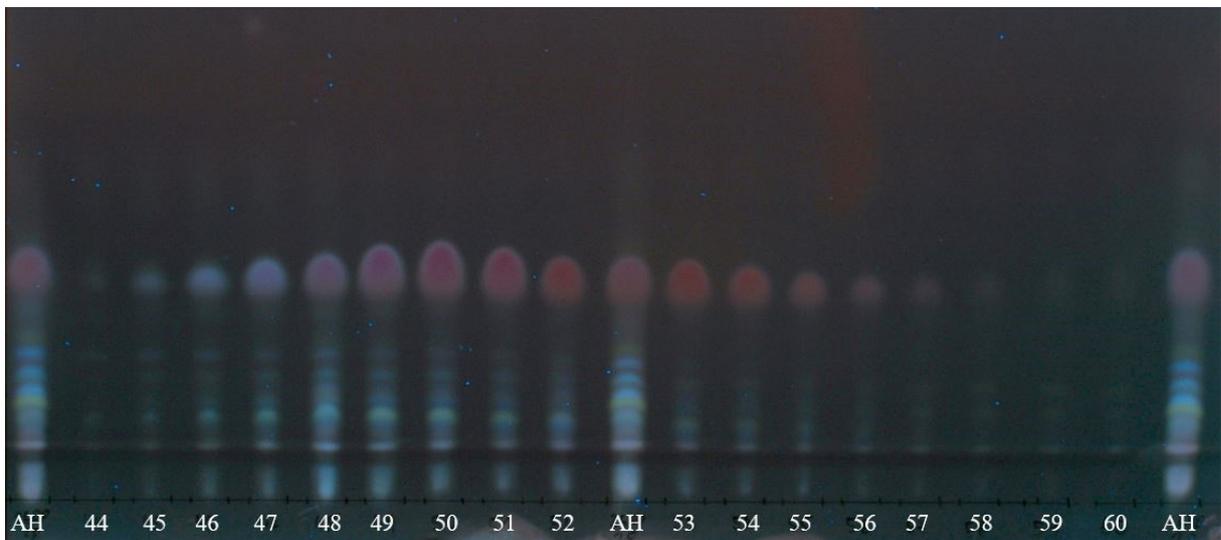


Bild 15: Fraktionsvergleich der Fraktionen 44-60 von HEMWat 25 NP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

Außerdem wurde am Schluss die stationäre Phase, also die Unterphase des HEMWat-Systems 25, während der Entleerung ebenfalls in Fraktionen aufgenommen. Da die Säule, mit der die stationäre Phase befüllt wurde, 22 ml fasst, wurde das Säulenvolumen plus eine Reserve gesammelt. Insgesamt waren es 22 Fraktionen mit jeweils 2 ml der stationären Phase, also

gesamt 44 ml. In der stationären Phase des HEMWat-Systems 25 NP befanden sich noch einige polare Verunreinigungen (siehe Bild 16, S. 30).

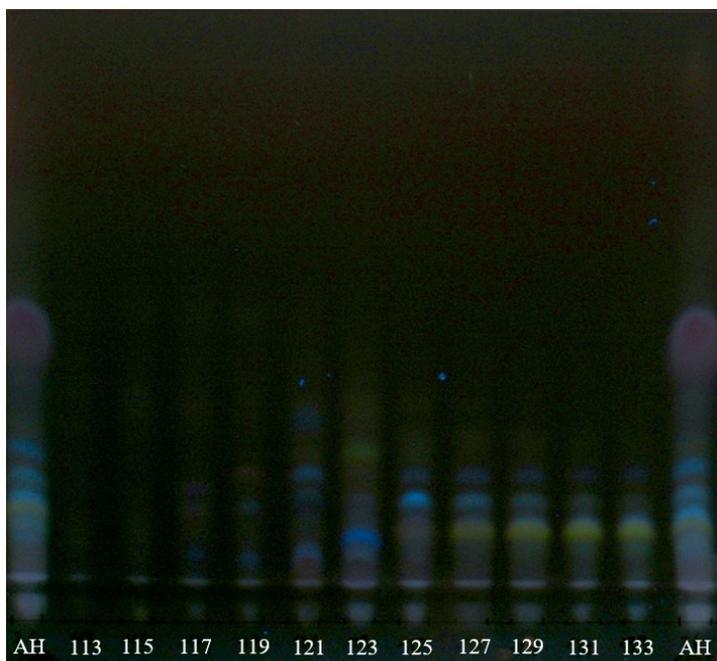


Bild 16: Analyse der stationären Phase des HEMWat-Systems 25 NP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

4.2.2.2. Fraktionsvergleich mittels GC

Wie in Kapitel 4.2.2.1 (S. 28) bereits erwähnt, wird in diesem Kapitel die gaschromatographische Aufklärung der Fraktionen, in denen die Harzsäuren nachgewiesen wurden (Fraktionen 44-58, siehe Bild 15, S. 29), beschrieben. Das Ziel war herauszufinden, ob sich unterschiedliche Peak-Verhältnisse der acht Harzsäurepeaks ergeben haben, oder ob sich die Harzsäuren während der Analyse mittels HPLC sogar in verschiedene Fraktionen aufgetrennt haben. In Kapitel 3.3 (S. 8) wurde die verwendete Apparatur und stationäre Phase genauer beschrieben. Es wurden die Fraktionen 46, 48, 50, 52, 54 und 56 überprüft (siehe Bild 15, S. 29). In Tabelle 15 (S. 30) sind die genauen Ausbeuten der Fraktionen angegeben.

Tabelle 15: Fraktionsausbeute in mg und % der HEMWat 25 NP Methode (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17)

Fraktion	Ausbeute in mg (%)
46	0,19 (0,8)
48	0,80 (3,6)
50	0,99 (4,4)
52	0,66 (3,0)
54	0,34 (1,5)
56	0,18 (0,8)

Nach Derivatisierung der Proben (siehe Kapitel 3.3.3, S. 13) wurden diese in den Gaschromatographen injiziert und vermessen. Anschließend wurden die einzeln erhaltenen Chromatogramme übereinandergelegt und mit dem Chromatogramm der VH (siehe Bild 3, S. 6) verglichen (siehe Bild 17, S. 31). Es ergeben sich klar sichtbare Unterschiede bei gewissen Peakflächen und Höhen. Bei Fraktion 46 dreht sich beispielsweise das Verhältnis von Peak 4 (Retentionszeit: ca. 31,5 Minuten) und Peak 3 um im Vergleich zur VH. Außerdem verschwindet der vierte Peak ab Fraktion 53 komplett. Bei den Fraktionen 50, 52 und 54 ist der 5. Peak (Retentionszeit: ca. 32,6 min) kaum mehr vorhanden. Der sechste Peak (Retentionszeit: ca. 34,3) wird bei den Fraktionen 50, 52 und 54 auch sehr klein und in Fraktion 56 ist er dann komplett verschwunden.

Alles in allem kann man sagen, dass sich die Peakflächen/Peakhöhen und somit die Konzentrationen der verschiedenen Harzsäuren je nach Fraktion verändern. Aufgrund dessen wurden nun in Kapitel 4.2.3. (S. 32) verschiedene Elutionsprogramme ausgearbeitet und ausgeführt, um die Trennleistung zu verfeinern, damit die Harzsäuren aufgetrennt und isoliert werden können.

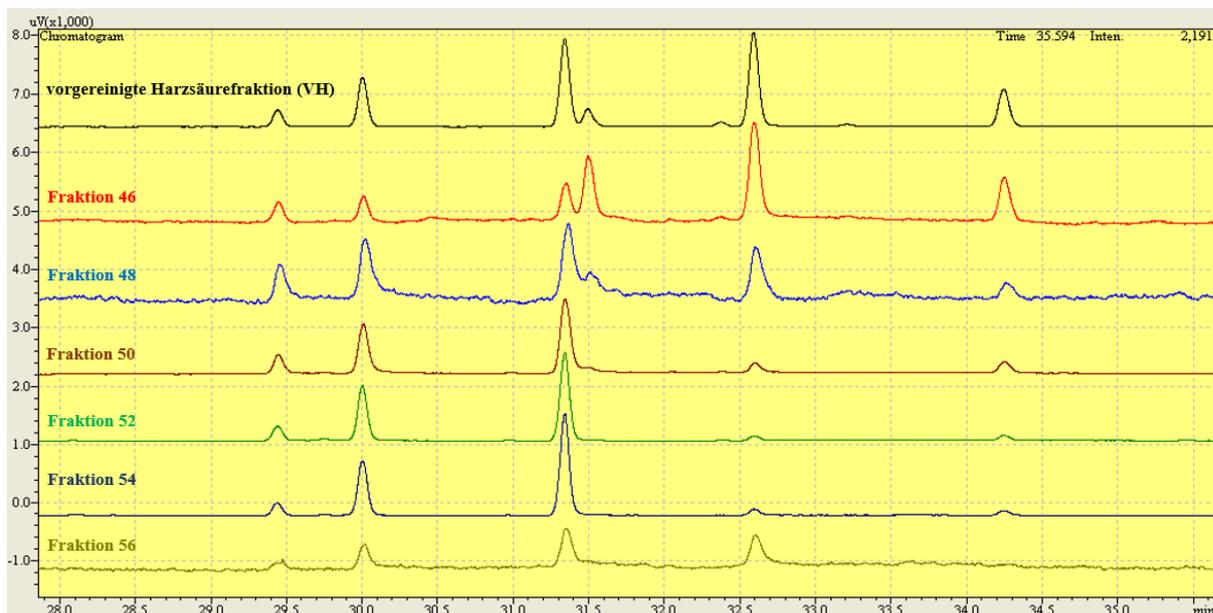


Bild 17: Vergleich einiger mittels der Methode HEMWat 25 NP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) gewonnenen Fraktionen (siehe Bild 15, S. 29) der vorgereinigten Harzsäurefraktion (VH, siehe Bild 3, S. 6) mittels GC-FID (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11)

4.2.3. Optimierung der HPLCCC Methode mit verschiedenen Elutionsprogrammen

Im Vergleich zu einer isokratischen HPLCCC Methode, wie in Kapitel 4.2.2 (S. 27), könnte ein Elutionsgradient die Trennleistung verbessern. Bei einem Elutionsgradient wird von einem HEMWat-System als stationäre Phase ausgegangen und dann schrittweise stärker polare bzw. weniger polare HEMWat-Systeme als mobile Phase durchgepumpt.

Das verwendete Gerät und der genaue Ablauf wurde in Kapitel 3.4 (S. 14) beschrieben. In diesem Kapitel wurden ausschließlich analytische HPLCCC Methoden durchgeführt.

HEMWat-System 28 OP als stationäre Phase

Bei diesen drei Methoden (siehe Tabelle 8, S. 19) wird die Oberphase des HEMWat-Systems 28 als stationäre Phase verwendet. Es wird im RP Modus gearbeitet, weil bei der isokratischen HEMWat 28 NP Methode alle Harzsäuren gleich zu Beginn ohne Trennung eluiert wurden. Im RP Modus sollten die Harzsäuren nun länger in der stationären Phase verweilen und dann nach und nach mit den unterschiedlich mobilen Phasen eluieren.

Zusätzlich sind in Tabelle 8 (S. 19) die verwendeten mobilen Phasen der unterschiedlichen Methoden dargelegt. Außerdem wurden für die beiden Methoden HW 28OP_22UP-27UP RP und HW 28OP_20UP-24UP K -Werte bestimmt, um zu überprüfen, ob sich die Harzsäuren in zwei unterschiedlich polaren HEMWat-Systemen so verteilen, dass ein HPLCCC Lauf überhaupt einen Sinn ergibt. In Tabelle 16 (S. 32) sind alle Verteilungskoeffizienten der Harzsäuren angegeben. Beim HEMWat-System OP28UP20 sind die K -Werte noch sehr hoch, was bedeutet, dass sich alle Harzsäuren in der Oberphase anreichern. Je apolarer die Unterphase wird, desto mehr Harzsäuren wandern von der Oberphase in die Unterphase, was sich durch die Annäherung des Verteilungskoeffizienten in Richtung $K=1$ ausdrückt. Daher erschienen diese beiden Elutionsprogramme sehr vielversprechend.

Tabelle 16: K -Werte der Harzsäuren von speziellen HEMWat-Systemen

Reversed Phase							
HEMWat-System		Peak 1	Peak 2	Peak 3+4	Peak 5	Peak 6	Peak 7
OP28UP20	OP HEMWat 28 UP HEMWat 20	23,95	18,89	16,89	8,10	13,74	0,00
OP28UP24	OP HEMWat 28 UP HEMWat 24	2,66	2,13	2,01	1,50	1,89	2,08
OP28UP26	OP HEMWat 28 UP HEMWat 26	1,46	1,26	1,36	0,88	1,33	1,53

Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass bei jeder dieser drei Methoden die Harzsäuren gleich beim Übergang von der ersten zur zweiten mobilen Phase ausgespült wurden. Die Harzsäuren waren immer in wenigen Fraktionen um die 60. Fraktion enthalten, was bedeutet, dass sie nach zirka 30 ml eluiert wurden, da pro Fraktion 0,5 ml gesammelt wurden. Zusätzlich war die Aufreinigung der Harzsäurefraktion bei weitem nicht so gut wie beim isokratischen HEMWat-System 25 NP (siehe Kapitel 4.2.2, S. 27).

Aufgrund dieser Erkenntnisse musste ein anderer Ansatz überlegt werden, um die Harzsäuren zu isolieren.

HEMWat-System 20 OP als stationäre Phase

Der letzte Versuch war die Oberphase des HEMWat-Systems 20 als stationäre Phase zu verwenden. Die Überlegung entstand durch einen Blick zurück auf die Auswertung der HEMWat Vortests mittels DC. Auf Bild 13 (S.26) ist zu erkennen, wie die Harzsäurebande in der Oberphase von HEMWat-System 20 stärker ausgeprägt ist als in der Unterphase. Wenn man nun diese Oberphase als stationäre Phase verwendet, und dann nach und nach Unterphasen mit steigendem apolaren Anteil als mobile Phasen durchpumpt, sollten die Harzsäuren langsam aus der stationären Phase herausgelöst und mit der mobilen Phase eluiert werden. Aufgrund dieses Elutionsprogramms (siehe Tabelle 8, S. 19) und der nur sehr geringfügigen Änderung der Polarität der mobilen Phasen könnte es dabei zu einer Auftrennung der Harzsäuren, beziehungsweise im besten Fall, zu einer Isolierung dieser kommen.

Weil die Ausführung einer HPLC Methode sehr aufwendig ist und vor allem die Auswertung sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, werden bei dieser Methode für jede mobile Phase nur zirka 30 Fraktionen à 0,5 ml gesammelt. Der untere Balken bei Bild 18 (S.34) und Bild 19 (S. 34) zeigt an, bis zu welcher Fraktion die jeweilige mobile Phase verwendet wurde. Gesamt werden 155 Fraktionen für dieses Elutionsprogramm aufgefangen. Die stationäre Phase wird nach Ende der Auftrennung in 24 Fraktionen zu je 2 ml gesammelt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels kommt es zur Analyse mittels Dünnschichtchromatographie (siehe Kapitel 3.2, S. 7). Die polaren Substanzen werden gleich zu Beginn mit den eher polaren mobilen Phasen HEMWat-System 20, 21, 22 und 23 eluiert (siehe Bild 18, S. 34). Durch HEMWat-System 24 kommt es zu keiner weiteren Elution (siehe Bild 19, S. 34 ab Fraktion 122) und die Harzsäuren verbleiben in der stationären Phase (siehe Bild 20, S. 35). Außerdem konnte in den Fraktionen 80-92 (siehe Bild 18, S.34 und Bild 19, S.34) eine noch unbekannt Substanz, die als eine schmale gelbe Bande angezeigt wird, mit einer Ausbeute von gesamt 0,25 mg isoliert werden.

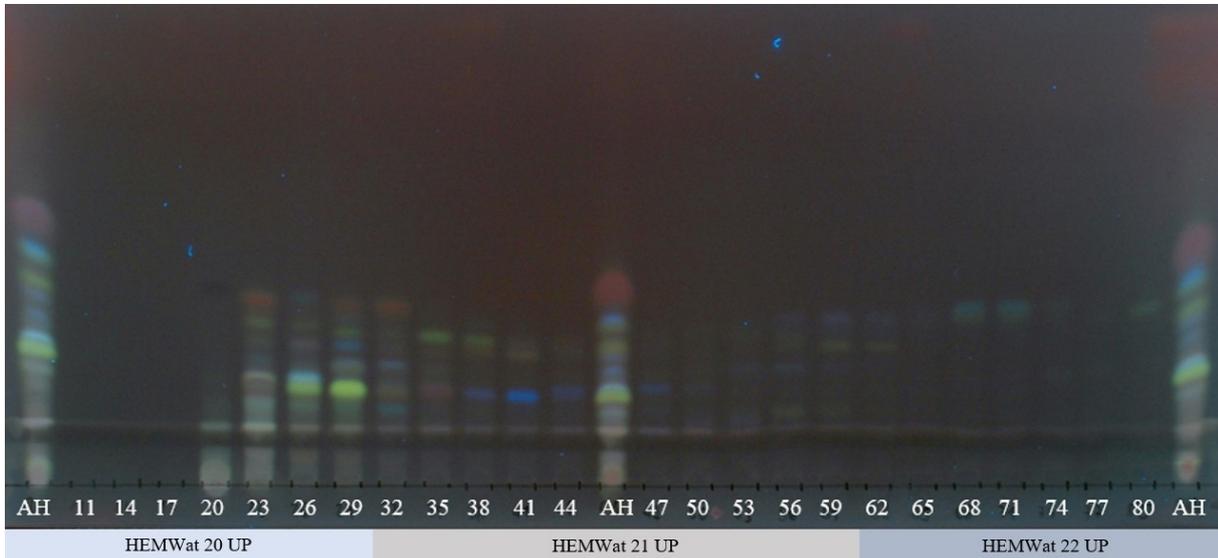


Bild 18: Fraktionsvergleich der Fraktionen 11-80 von der HPCCC Methode 20OP_20UP-24UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

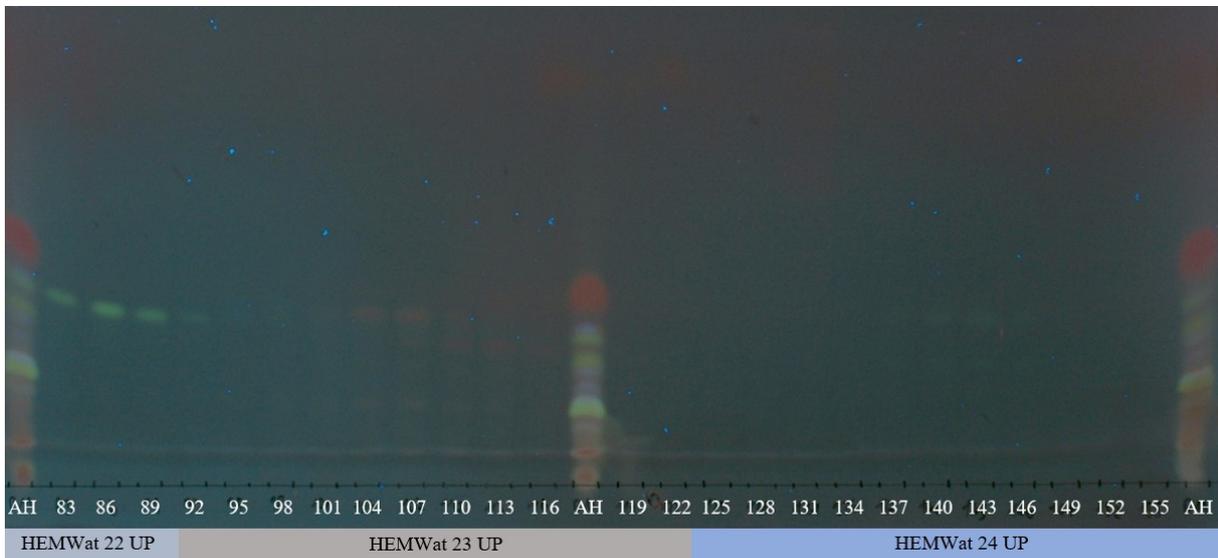


Bild 19: Fraktionsvergleich der Fraktionen 83-155 von der HPCCC Methode 20OP_20UP-24UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

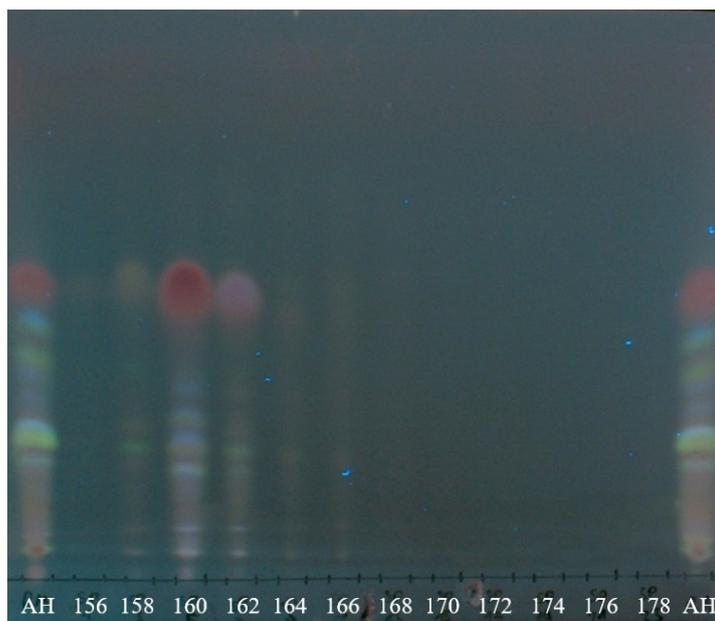


Bild 20: Fraktionsvergleich der Fraktionen 156-178 (stationäre Phase) von der HPCCC Methode 20OP_20UP-24UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

Weil die Harzsäuren in der stationären Phase zurückgehalten wurden und diese daher nicht durch verschieden polare mobile Phasen aufgetrennt werden konnten, wird in Kapitel 4.2.4 (S. 35) ein weiterer Optimierungsschritt beschrieben.

4.2.4. Elutionsprogramm 21OP_21UP-27UP RP

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, war die Elutionskraft der mobilen Phasen des HEMWat Elutionsprogramms 20OP_20UP-24UP RP zu schwach, um die Harzsäuren aus der stationären Phase zu lösen. Dies lässt sich wahrscheinlich auf zu polare mobile Phasen zurückführen. Indem man als stationäre Phase die Oberphase des HEMWat-Systems 21 und als mobile Phasen die Unterphasen der HEMWat-Systeme 21-27 verwendet (siehe Tabelle 6, S. 17) verschiebt man das Spektrum der verwendeten HEMWat-Systeme mehr in den apolaren Bereich. Dadurch sollte die Elutionsfähigkeit der mobilen Phasen steigen.

Die Methode 21OP_21UP-27UP RP wurde im präparativen Maßstab eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17). Zusätzlich kamen noch zwei weiterer Methoden zur Anwendung, bei denen andere Abstufungen der mobilen Phasen verwendet wurden (siehe Tabelle 9, S. 20). Das Ergebnis war jedoch bei allen drei Gradientensystemen vergleichbar, daher wird in diesem Kapitel nur die Methode 21OP_21UP-27UP RP beschrieben.

4.2.4.1. Fraktionsvergleich mittels DC

Zur Auswertung der verschiedenen Fraktionen wird zuerst wiederum mittels DC analysiert. Dafür werden bei diesem Elutionsprogramm 191 Fraktionen zu je 2,8 ml gesammelt, plus 15 Fraktionen zu je 10 ml, in denen sich die stationäre Phase befindet. Von diesen gesamt 206 Fraktionen hat man dann jede zweite Fraktion auf DC Platten aufgetragen. Zusätzlich wird als Vergleich die AH (siehe Bild 3, S. 6) aufgetragen. Nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz werden die Platten bei UV₃₆₆ ausgewertet (siehe Tabelle 1, S. 8).

Die Unterphase von HEMWat-System 21 wird bei dieser HPCCC Methode von Fraktion 1 bis 43 verwendet. Die zahlreich enthaltenen polaren Begleitsubstanzen der AH werden zuerst eluiert (siehe Bild 21, S. 36). Besonders im Bereich bis zur 40. Fraktion ergibt sich daher ein buntes Spektrum an Banden. Dieser „Vorlauf“ wurde vereinigt und ergab eine Ausbeute von 101,21 mg, was bei einer Einwaage von 201,36 mg AH 50,26% entspricht.

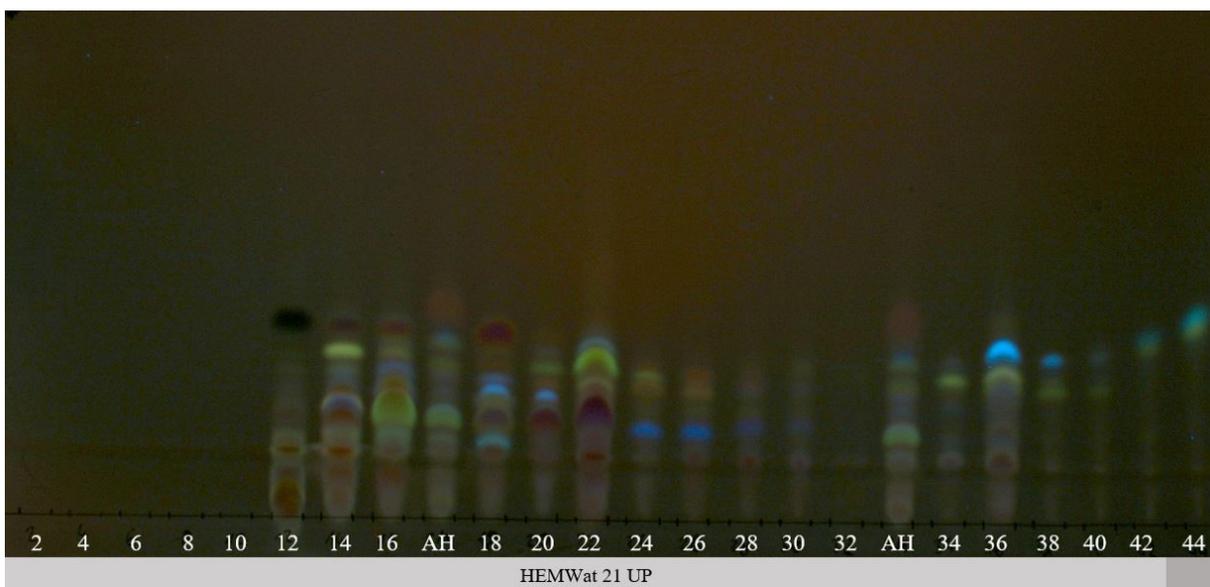


Bild 21: Fraktionsvergleich der Fraktionen 2-44 von der HPCCC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

Anschließend folgt die Unterphase des HEMWat-Systems 23 als mobile Phase, und zwar von der 44. bis zur 91. Fraktion (siehe Bild 21, S. 36 und Bild 22, S. 37). Der Balken unter den Bildern stellt immer die bei diesen Fraktionen verwendete mobile Phase dar. Diese HEMWat Unterphase löste verschiedene Substanzen aus der stationären Phase, welche auf der DC-Platte, wie in Tabelle 17 (S. 37) aufgelistet, detektiert werden konnten. Interessant sind vor allem die blaue Bande bei R_f 0,4 und die gelbe Bande bei R_f 0,4, da es sich eventuell um neu isolierte Reinsubstanzen handeln könnte (Berechnung von R_f siehe Kapitel 3.2, S. 7). Diese

zwei Substanzen, SGtg37 und SGtg38, werden in einer zukünftigen Arbeit mittels NMR-Analyse interpretiert.

Tabelle 17: Vereinigte Fraktionen die von HEMWat-System 23 UP eluiert wurden

Fraktionen	Bande + Rf-Wert	Ausbeute (Prozentsatz der AH Einwaage)
42-51 (SGtg37)	blaue Bande bei Rf = 0,4	2,06 mg (1,02%)
54-64 (SGtg38)	gelbe Bande bei Rf = 0,4	2,32 mg (1,15%)
66-70	<ul style="list-style-type: none"> • blaue Bande bei Rf= 0,4 • blaue Bande bei Rf= 0,4 	0,7 mg (0,35%)
74-90	Drei rote Banden bei Rf= 0,2, Rf= 0,3 und Rf= 0,4	4,46 mg (2,21%)

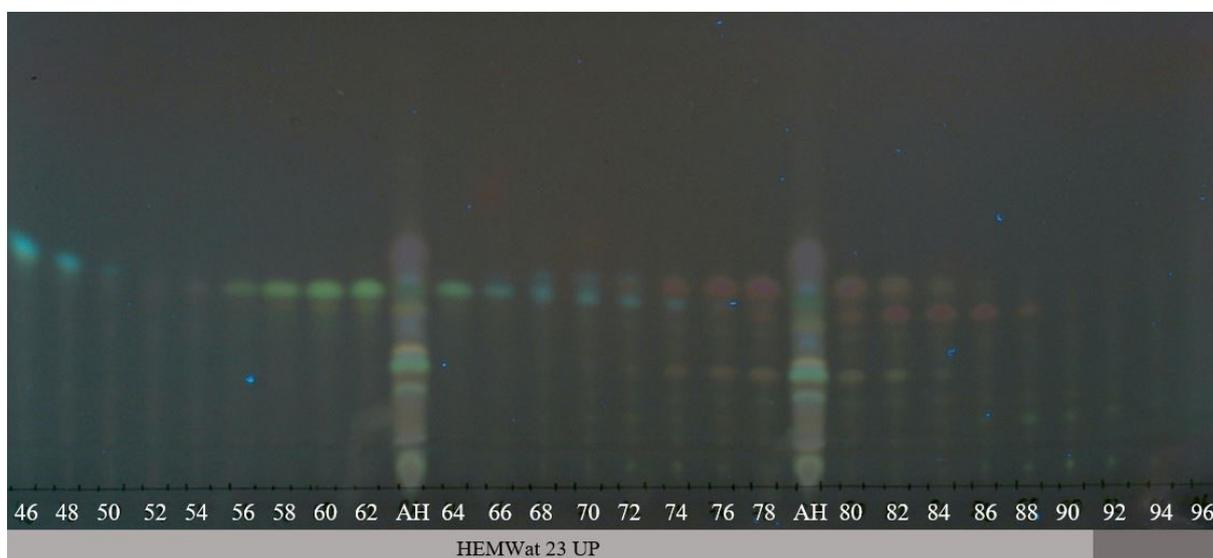


Bild 22: Fraktionsvergleich der Fraktionen 46-96 von der HPCCC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

Bei den Fraktionen 92-141 hat man als mobile Phase das HEMWat-System 25 UP eingesetzt. Auf Bild 23 (S. 38) sind zwei Banden (Rf 0,4) ersichtlich. Auffällig ist besonders die hellrote Bande bei Rf 0,4, die auch in der Mutterfraktion AH zu erkennen ist. Auf der DC Platte ist zu sehen, dass die Bande bis Fraktion 134 immer breiter wird und dann wieder abnimmt bzw. bei Fraktion 142 kaum mehr vorhanden ist. Ab Fraktion 144 folgt die Zunahme einer roten Bande, die ins Rot-Violette übergeht und zum Schluss wieder rot wird (siehe Bild 24, S. 39). Diese Substanzen, die diese rot-rotviolette Bande bilden, werden durch das HEMWat-System 27 UP ausgespült, welches ab Fraktion 142 und bis zum Schluss dieser Methode durch das System gepumpt wird. Jene Substanzen, die mit HEMWat-System 25 und 27 eluiert sind, werden in Tabelle 18 (S. 38) zusammengefasst.

Da sich in diesen Fraktionen (126-172) offensichtlich die Harzsäuren befinden, werden diese in Kapitel 4.2.4.2 (S. 40) genauer mit einem Gaschromatographen untersucht, um zu überprüfen, wie und ob sich das Harzsäuregemisch in den verschiedenen Fraktionen aufgetrennt hat.

Tabelle 18: Vereinigte Fraktionen die bei HEMWat-System 25 UP und 27 UP eluiert wurden

Fraktionen	Bande + Rf-Wert	Ausbeute (Prozentsatz der AH Einwaage)
104-118	Gelbe Bande bei Rf = 0,4	1,22 mg (0,6%)
126-140	Hellrote Bande bei Rf = 0,4	26,14 mg (12,98%)
144-172	Rote Bande, Rot-Violette Bande bei Rf = 0,4	56,89 mg (28,25%)



Bild 23: Fraktionsvergleich der Fraktionen 98-148 von der HPCCC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

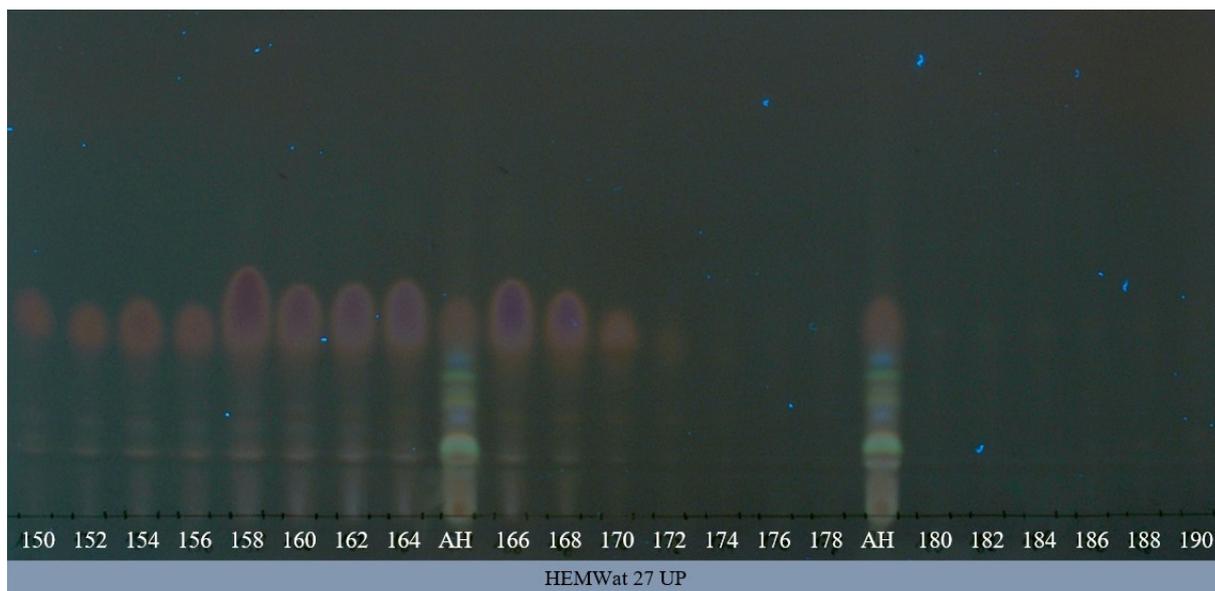


Bild 24: Fraktionsvergleich der Fraktionen 150-190 von der HPCCC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

Da sich in der stationären Phase noch Substanzen befinden können, die durch die mobilen Phasen nicht herausgelöst werden konnten, wird von dieser ebenfalls ein Fraktionsvergleich durchgeführt. Auf Bild 25 (S. 40) ist bei den Fraktionen 200-202 bei R_f 0,5, also knapp über der Harzsäurebande, ein leichter hellrosa Schatten zu erkennen. In Tabelle 19 (S. 39) ist zusätzlich die Ausbeute angegeben. Auf Grund der ähnlichen Laufstrecke und Farbe werden diese Fraktionen ebenfalls mittels GC überprüft (siehe Kapitel 4.2.4.2, S. 40).

Tabelle 19: Vereinigte Fraktionen der stationären Phase

Fraktionen	Bande + R_f -Wert	Ausbeute (Prozentsatz der AH Einwaage)
200-202	Hellrosa Bande bei $R_f = 0,5$	0,93 mg (0,46%)

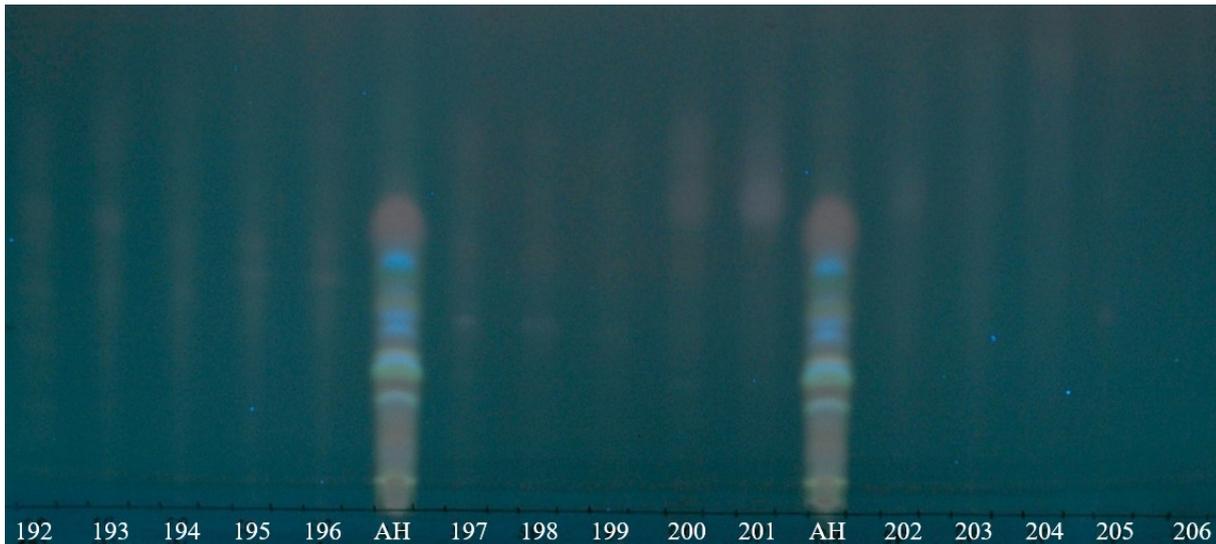


Bild 25: Fraktionsvergleich der Fraktionen 192-206 (stationäre Phase) von der HPCCC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

4.2.4.2. Fraktionsvergleich mittels GC

In diesem Kapitel werden ausgewählte Fraktionen in denen Harzsäuren mit der DC nachgewiesen werden konnten, mit einer GC Untersuchung analysiert.

In Bild 26 (S. 40) und Bild 27 (S. 41) sind jene Fraktionen mit einem roten Pfeil markiert, bei denen eine GC Analyse durchgeführt wurde. Die Liste der ausgewählten Fraktionen inklusive deren Auswaagen sind in Tabelle 20 (S.41) angegeben.

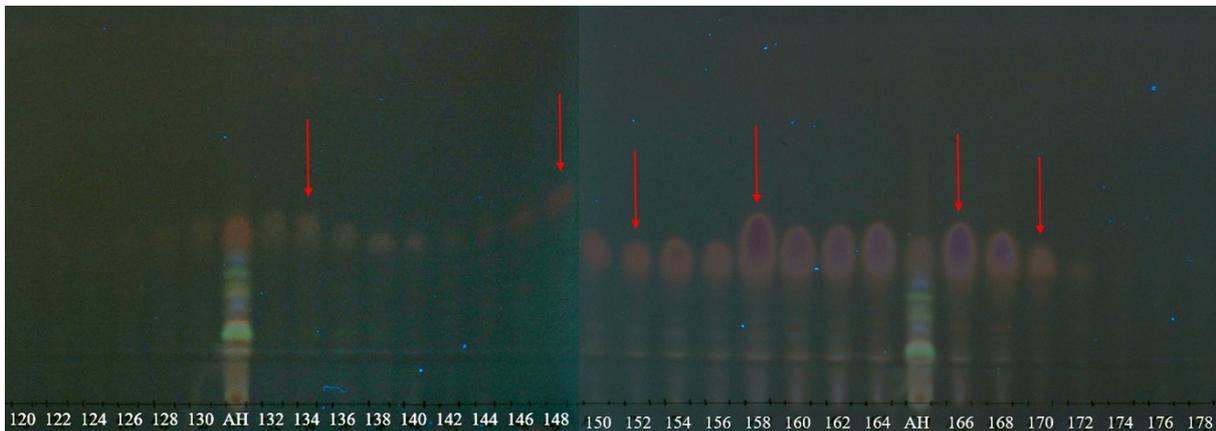


Bild 26: Fraktionsvergleich der HPCCC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) in denen die Harzsäuren enthalten sind mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

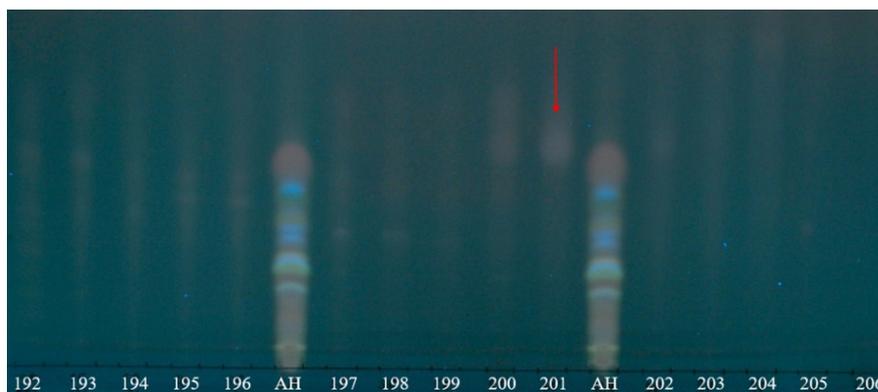


Bild 27: Fraktionsvergleich der HPLC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) in denen die Harzsäuren enthalten sind mittels DC (siehe Tabelle 1, S. 8)

Tabelle 20: Ausbeute der für die GC verwendeten Fraktionen

Fraktion	Ausbeute in mg
134	3,08
148	0,32
152	1,05
158	2,84
166	4,32
170	1,43
201	0,58

Für die GC Analyse werden ca. 0,5 mg der auszuwertenden Fraktionen eingewogen, vorbereitet, wie in Kapitel 3.3.3 (S. 13) beschrieben, und dann in den Gaschromatographen injiziert. Nach Erhalt der einzelnen Chromatogramme werden diese gemeinsam mit einem Chromatogramm der „Mutterfraktion“ AH (siehe Bild 3, S. 6) untereinandergelegt, damit sie besser vergleichbar sind (siehe Bild 28, S. 43).

Fraktion 134 sticht sofort ins Auge, da sie nur eine Harzsäure enthält. Die Retentionszeit dieser Harzsäure beträgt 37,4 min. Wenn man diese Retentionszeit mit der in Kapitel 4.1 (S. 22) beschriebenen Retentionszeit der DHAA vergleicht, ergeben sich nur sehr geringe Abweichungen. Daher kann man davon ausgehen, dass es sich um DHAA handelt. Zusätzlich wurde ein GC-Vergleich der Fraktionen 128, 132, 134 und 138 durchgeführt, um zu bestätigen, dass sich in allen Fraktionen, die mittels DC als hellroten Bande detektiert werden konnte, nur DHAA befindet (siehe Anhang Bild A 1, S. 62).

Weiters sind in den Chromatogrammen der Fraktion 148 und 152 zwei dominante Peaks zu erkennen, und zwar die Peaks der Sandarakopimarsäure und der Palustrinsäure. Bei Martin et al. (2006) wurde eine semi-präparative HPLC Methode beschrieben, bei der zwei Harzsäuren getrennt werden konnten. Es handelt sich dabei zwar um die Sandarakopimarsäure und die

Isopimarsäure, aber es könnte trotzdem zu einer Auftrennung der zwei Harzsäuren in Fraktion 148, 152 und den jeweils umliegenden Fraktionen führen. Das Gleiche gilt für die Fraktionen um die 170. Fraktion, bei denen hauptsächlich die Isopimarsäure, aber auch DHAA enthalten sind. Weitere Untersuchungen können zeigen, ob eine semi-präparative HPLC Methode für einer Trennung dieser zwei Harzsäuren geeignet wäre.

Die hellrosa Bande (siehe Bild 27, S. 41) der Fraktion 201 konnte mittels GC-Analyse einer Harzsäure zugeordnet werden, und zwar der Levopimarsäure mit einer minimalen Verunreinigung durch DHAA. Die Retentionszeit dieser isolierten Levopimarsäure beträgt 35,7 min, was der Retentionszeit der gekauften Reinsubstanz entspricht (siehe Kapitel 4.1, S. 22 und Anhang Bild A 2, S. 62).

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch diese HPCCC Methode zwei Harzsäuren, einerseits die DHAA (26,14 mg) und andererseits die Levopimarsäure (0,93 mg), isoliert werden konnten. Außerdem besteht eventuell die Möglichkeit Fraktionen, in denen hauptsächlich zwei Harzsäuren vorkommen, mit einer semi-präparativen HPLC Methode zu trennen (Martin et al., 2006). Zusätzlich wäre noch interessant, wie sich die Harzsäuren bei dieser HPCCC Methode in den verschiedenen Fraktionen verteilen, wenn man die VH verwendet, bei welcher die Levopimarsäure nicht mehr, DHAA und Palustrinsäure nur noch zu einem Teil enthalten sind (siehe Bild 12, S. 24).

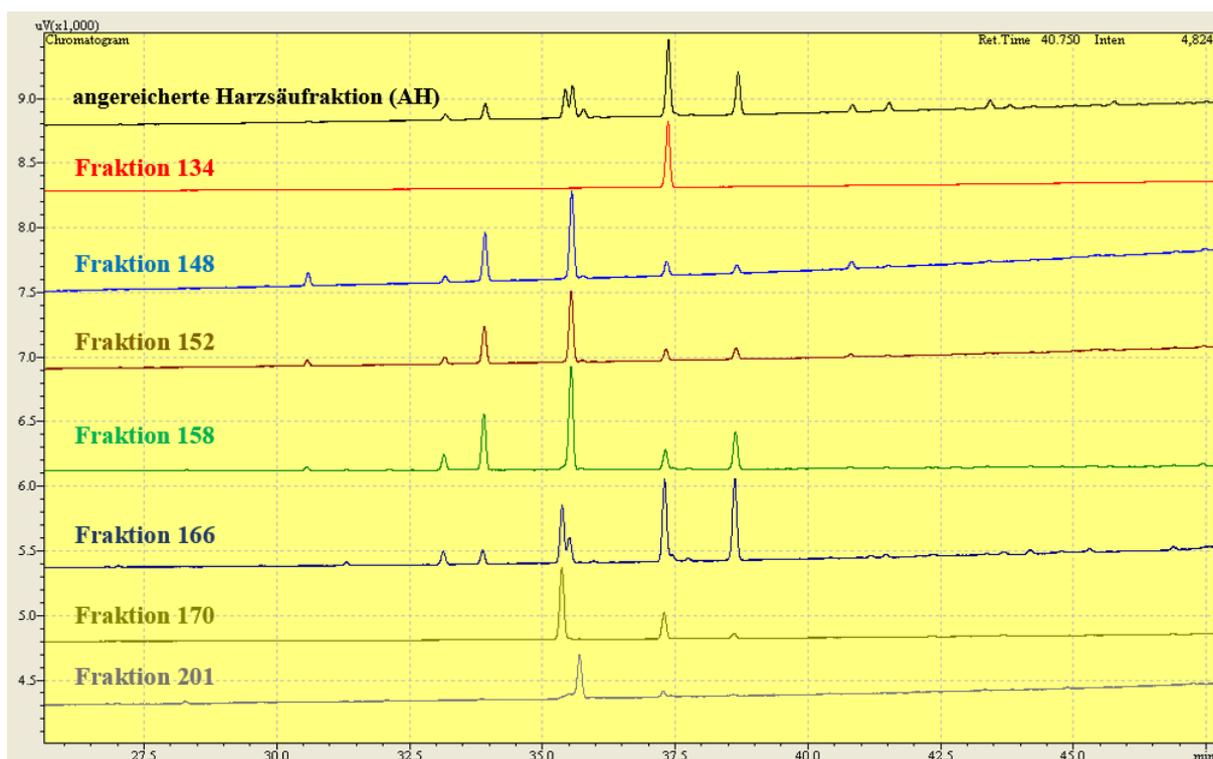


Bild 28: Vergleich der angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6) mit den Fraktionen 134, 148, 152, 158, 166, 170 und 201 von der HPLC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17) mittels GC-FID (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11)

4.3. Vergleich der gaschromatographischen Systeme

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden für die Analyse der Harzsäureproben zwei verschiedene Gaschromatographen und verschiedene stationäre Phasen verwendet, wie in Kapitel 3.3.1 (S. 11) und Kapitel 3.3.2 (S. 12) dargelegt. In diesem Kapitel werden nun die verschiedenen Instrumente verglichen und aufgezeigt, was sich dadurch für allgemeine Unterschiede und Probleme bei der Auswertung der Daten ergeben haben.

4.3.1. Vergleich der stationären Phasen

Es wurden vier verschiedene stationäre Phasen für die Auftrennung der AH (siehe Bild 3, S. 6) ausprobiert. Wobei drei dieser Säulen eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung aufweisen. Es handelt sich dabei um eine ZB-5 60m Säule, eine DB-1701 30m und 60 m Säule und eine ZB-WAX Säule. In Bild 29 (S. 45) sind nun die erhaltenen Chromatogramme untereinandergelegt. Die beste Trennleistung liefert die stationäre Phase mit der geringsten Polarität, die ZB-5 Säule, bei welcher sich acht Harzsäurepeaks ergeben. Vor allem die drei sehr knapp hintereinander eluierenden Säuren Isopimarsäure, Palustrinsäure und Levopimarsäure (Retentionszeit: 35.4-35.8 min) werden bei dieser Säule am schärfsten getrennt. Außerdem kam

eine DB-1701 Säule zum Einsatz, die sich von der Polarität im apolaren bis mittelpolaren Bereich befindet. Wie man auf Bild 29 (S. 45) sieht, fallen die Peaks der drei sehr knapp hintereinander eluierenden Säuren bei der 30 m Säule zu einem Peak mit einer „Schulter“ zusammen. Aus diesem Grund wurden bei dieser stationären Phase verschiedene Temperaturprogramme getestet, um eine bessere Trennleistung zu erreichen (siehe Tabelle 21, S. 46). Durch diese unterschiedlichen Methoden konnte aber keine ausreichend gute Trennung erzielt werden (siehe Anhang Bild A 3 S. 63), weshalb nur eine kleine Adaption zur Methode der ZB-5 Säule vorgenommen wurde (Temperaturprogramm 100280-2). Wie aber im Anhang auf Bild A 3 (S. 63) erkennbar ist, konnte durch Temperaturprogramm I und H die Trennung der Isopimarsäure, Palustrinsäure und Levopimarsäure angedeutet werden. Aus diesem Grund machte es sehr wohl Sinn eine doppelt so lange Säule anzuschaffen, bei der sich die Bodenzahl erhöht und die Trennung daher um ca. 40 % verbessert werden kann. Demzufolge gelang nach dem käuflichen Erwerb der DB-1701 60 m Säule der Durchbruch, und es konnte eine ähnliche Trennleistung wie bei der ZB-5 Säule erzielt werden. Einzig die Isopimarsäure und Palustrinsäure der drei knapp hintereinander eluierenden Harzsäuren werden nicht so scharf getrennt wie bei der ZB-5 Säule.

Bei der polaren ZB-WAX Säule fallen die acht Harzsäurepeaks zu zwei Peaks zusammen, weshalb sich diese Phase nicht für die Trennung der Harzsäuren eignet.

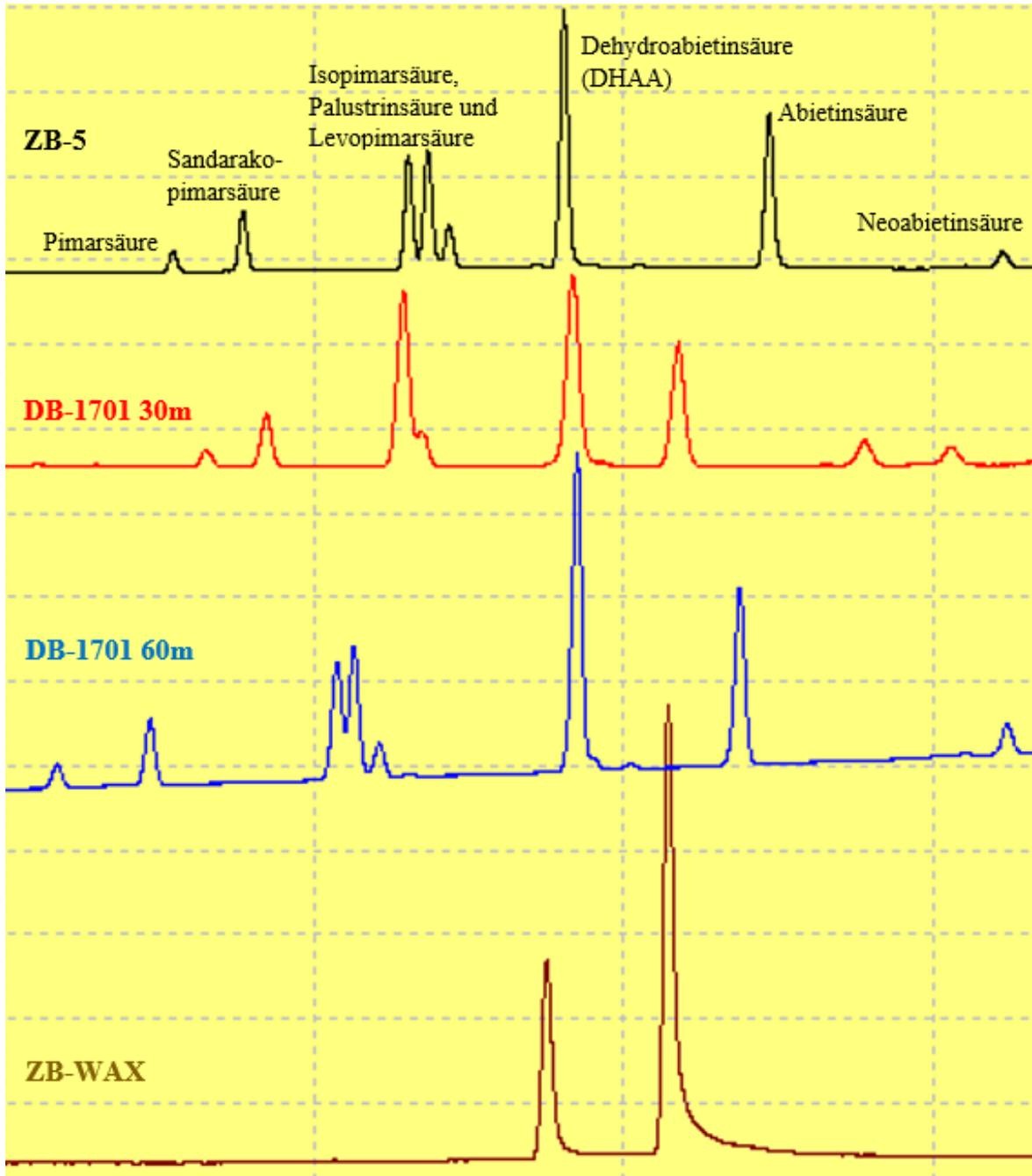


Bild 29: Vergleich der GC-FID-Auftrennung der angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6) mit unterschiedlichen stationären Phasen (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11)

Tabelle 21: Verschiedene Temperaturgradienten für die DB-1701 30m Säule

100250-2	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]	100280-2	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]
		100	1			100	1
	15	200			2	280	10
Zeit: 37,67 min		Fluss: 1,3 ml/min		Zeit: 57,67 min		Fluss: 2 ml/min	
100250-B	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]	100250-C	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]
		100	1			100	1
	10	200			1,5	250	10
Zeit: 46,00 min		Fluss: 2 ml/min		Zeit: 51,00 min		Fluss: 2 ml/min	
100250-D	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]	100250-E	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]
		100	1			100	1
	15	200			3	200	
Zeit: 117,67 min		Fluss: 2 ml/min		Zeit: 69,33 min		Fluss: 2 ml/min	
100250-F	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]	100250-G	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]
		100	1			100	1
	15	200			2	250	10
Zeit: 42,67 min		Fluss: 1 ml/min		Zeit: 42,67 min		Fluss: 0,5 ml/min	
100250-H	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]	100250-I	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]
		100	1			100	1
	3	200			0,5	250	10
Zeit: 94,33 min		Fluss: 1 ml/min		Zeit: 144,33 min		Fluss: 1 ml/min	
100250-J	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]	100250-K	Rate [°C/min]	Finale Temp [°C].	Halten [min]
		100	1			100	1
	3	200			1	250	10
Zeit: 94,33 min		Fluss: 0,7 ml/min		Zeit: 94,33 min		Fluss: 0,9 ml/min	

4.3.2. Apparativer Vergleich Shimadzu vs. Perkin Elmer

Im Zuge dieser und einer vorangegangenen Diplomarbeit (Aichner, 2020) wurden zwei verschiedene gaschromatographische Systeme für die Analyse der Harzsäuren eingesetzt. Für die GC Messungen in dieser Arbeit hat man vorzugsweise den Perkin Elmer Autosystem XL GC verwendet, da es bei Aichner (2020) mit dem Shimadzu GC-2010 System zu Verfälschungen von Messungen, auf Grund eines Carry-Over-Effektes gekommen ist, siehe Bild 30 (S. 47). Es waren lange Reinigungsschritte notwendig, damit nachfolgende Analysen nicht durch Harzsäuren aus vorangegangenen Messungen gestört werden. Dem gegenübergestellt konnte bei den Messungen mit dem Perkin Elmer-Gerät nie ein Carry-Over-Effekt beobachtet werden, siehe Bild 31 (S. 47). Bei allen durchgeführten Blank Messungen (Injektion von 1 µl Aceton) nach einer Harzsäure-Analyse, egal ob mit der DB-1701 30 m oder DB-1701 60m Säule, trat dieser Effekt nie auf.

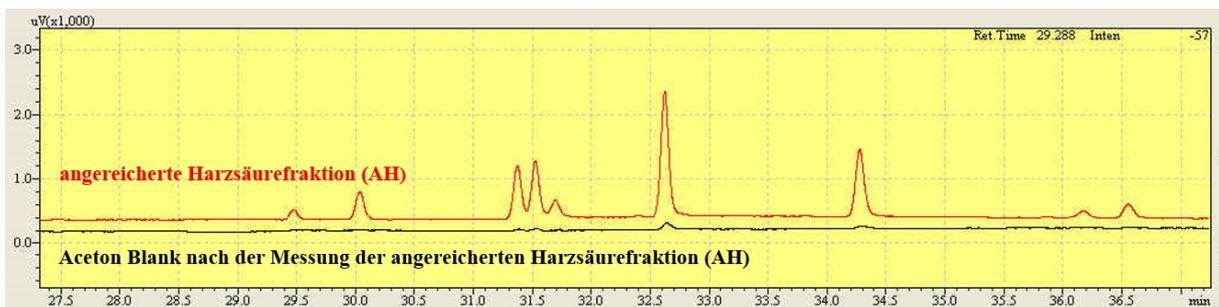


Bild 30: GC der angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6) mit anschließender Blank Kontrolle beim Shimadzu GC-2010 System (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11)

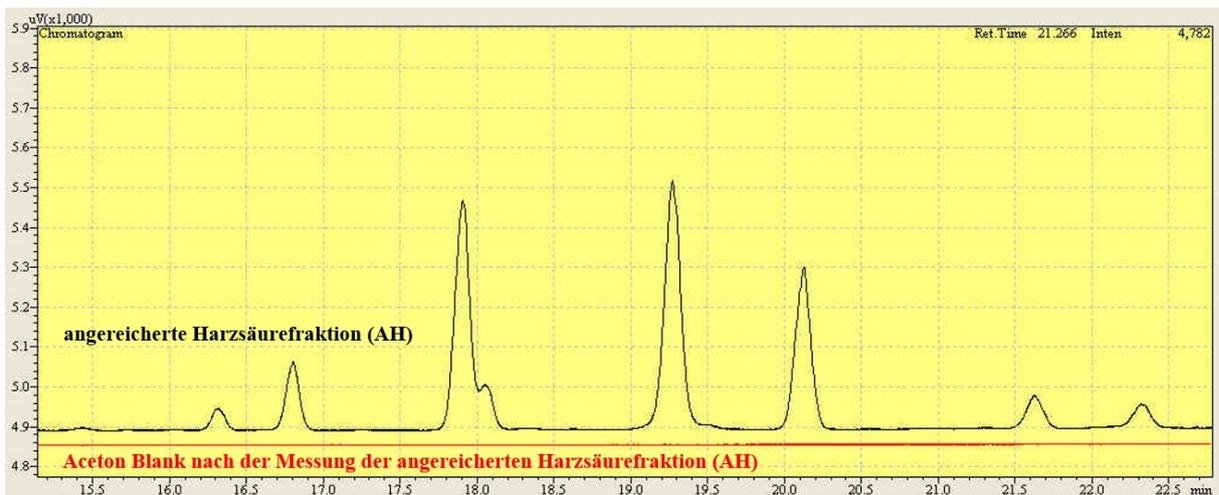


Bild 31: GC der angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6) mit anschließender Blank Kontrolle beim Perkin Elmer Autosystem XL System (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11)

Daher ist die Frage, was die Ursache für dieses Problem darstellt, weil die Kontamination auch noch nach Reinigung des Auto-Injektors, Austausch des Septums und nach manueller Injektion vorhanden war.

Eine weitere Vermutung war, dass der Altersunterschied dieser zwei Geräte ausschlaggebend sein könnte. Was bedeuten würde, dass LOD bzw. LOQ des Perkin Elmer Systems höher ist als beim Shimadzu System und daher dieser Carry-Over-Effekt beim älteren Gerät nicht messbar ist. In Kapitel 4.4.1 (S. 49) ist die Ermittlung dieser Parameter des Perkin Elmer Autosystem XL aufgezeigt. In Tabelle 22, S. 48 sind die eruierten Signal/Rausch-Verhältnisse (S/R) des Shimadzu GC-2010 dargestellt, mit den Daten aus den Messungen für die von Aichner (2017) erstellte Eichgerade.

Tabelle 22: S/R-Verhältnisse des Shimadzu GC-2010 Systems (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11)

DHAA in mg/ml	DHAA in mg/0,4 ml	DHAA Höhe	Mittelwert Rauschen Höhe	S/R-Verhältnis
0,0025	0,001	138,3	6,05571	23:1
0,025	0,01	206,7	6,05571	34:1
0,125	0,05	574,6	6,05571	95:1
0,25	0,1	1229,6	6,05571	203:1
1,25	0,5	3453,2	6,05571	570:1
2,5	1	10261	6,05571	1694:1
3,75	1,5	21249	6,05571	3509:1

Wenn man nun Tabelle 22 (S. 48) und Tabelle 25 (S. 51) vergleicht, wird ersichtlich, dass der Shimadzu 2010-GC in kleineren Konzentrationen messen kann und zwar um zirka das 4-fache unter denen des Perkin Elmer-Gerätes. Wobei anzumerken ist, dass es beim Shimadzu-Gerät massive Probleme mit der Reproduzierbarkeit bzw. Linearität der S/R-Verhältnisse gegeben hat.

Um das Ausmaß des Carry-Over-Effekts darzustellen, wird über mehrere Messungen die AUC eines Harzsäurepeaks mit der AUC des dazugehörigen „Ghostpeaks“ bei derselben Retentionszeit verglichen. In Tabelle 23 (S. 49) sieht man, dass ein „Ghostpeak“ bei einer Blank-Messung direkt nach der Harzsäure-Messung zirka 4-10 % des ursprünglichen Harzsäurepeaks ausmacht.

Unter Betrachtung dieser beiden Gesichtspunkte erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass der Perkin Elmer etwaige Verunreinigungen nie aufgezeichnet hätte. Außerdem konnte mit diesem Gaschromatographen eine lineare Eichgerade, siehe Kapitel 4.4.2 (S. 51), erstellt werden, bei welcher die Peakflächen nicht durch Kontamination aus vorigen Messungen beeinflusst wurden.

Eine weitere These war, dass durch die Apolarität der ZB-5 Säule die Harzsäuren auf der stationären Phase haften bleiben und diese bei den nächsten Messungen mitgerissen werden. Diese Vermutung konnte aber schnell widerlegt werden, da nach Einbau der DB-1701 60 m Säule im Shimadzu 2010-GC ebenfalls ein Carry-Over-Effekt zu beobachten war.

Daher kam man zu der Annahme, dass sich die Harzsäuren irgendwo im Gerät anreichern, z.B. beim Splitventil oder der Septumpülung, von dort nach und nach wieder in die Messungen einfließen und diese dadurch verfälschen.

Tabelle 23: AUC Vergleiche von Harzsäurepeaks und deren Ghostpeaks beim Shimadzu 2010 GC (siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11)

AUC Harzsäurepeaks	Retentionszeit Harzsäurepeak [min]	AUC Ghostpeak	Retentionszeit Ghostpeak [min]	Prozentsatz des Ghostpeaks zum ursprünglichen Harzsäurepeak
8535	32,6	644,5	32,6	7,55
3102,3	31,4	117,4	31,4	3,78
3237,9	31,5	133,6	31,5	4,13
5130,31	34,3	320,3	34,3	6,24
9719,3	32,6	1029,5	32,6	10,59
10688,4	32,6	757,1	32,6	7,08
9364,5	31,3	397,1	31,4	4,24
5055,4	30,0	273,9	30,0	5,42

4.4. Quantifizierung von Dehydroabietinsäure

Um einen Analyten quantifizieren zu können, müssen zuerst die Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) und die Quantifizierungsgrenze (LOQ, limit of quantification) bestimmt werden (siehe Kapitel 4.4.1, S. 49). Anschließend wird in Kapitel 4.4.2 (S. 51) eine Eichgerade bei unterschiedlichen DHAA Einwaagen erstellt und ein Standardkorrekturfaktor mit dem interner Standard Palmitinsäuremethylester berechnet.

4.4.1. LOD + LOQ

Die Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) und die Quantifizierungsgrenze (LOQ, limit of quantification) sind zwei wichtige Parameter zur Validierung einer analytischen Methode, um ein verlässliches Verfahren zu garantieren (Sanagi et al., 2009). Beim LOD wird die niedrigste Konzentration eines Analyten ermittelt, die gerade noch nachweisbar ist, aber nicht unbedingt quantifiziert werden kann. Beim LOQ wird jene niedrigste Konzentration eines Analyten ermittelt, die unter Einhaltung von Genauigkeit und Präzision quantifizierbar ist (ICH

Guidlines, 1994). Um diese Werte zu bestimmen, können verschiedene Methoden angewendet werden. Im Zuge dieser Diplomarbeit wird das Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio) errechnet. Für das LOD beträgt dieses Verhältnis 3:1 und für das LOQ 10:1. Der dafür verwendete Gaschromatograph Perkin Elmer Autosystem XL GC und die stationäre Phase sind in Kapitel 3.3 (S. 8) genauer beschrieben.

Es wurden 11 verschiedene Analysen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Aus diesen erhaltenen Chromatogrammen wurden dann jeweils 5-9 Rauschpeaks (noise) zufällig über die gesamte Messung ausgewählt, und deren Peakhöhen mit dem Lineal manuell ausgemessen (siehe Tabelle 24, S. 50).

Tabelle 24: Mit dem Lineal ausgemessene Peakhöhen des Rauschens aus elf verschiedenen GC-FID Messungen mit dem daraus errechneten Mittelwert; GC-FID System siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11

	Rauschen Peakhöhe:								
	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8	Peak 9
Messung 1:	0,0050	0,0070	0,0050	0,0017	0,0003	0,0030			
Messung 2:	0,0038	0,0066	0,0038	0,0010	0,0003	0,0003			
Messung 3:	0,0068	0,0020	0,0004	0,0003	0,0005	0,0080			
Messung 4:	0,0010	0,0060	0,0030	0,0012	0,0006	0,0014			
Messung 5:	0,0049	0,0064	0,0005	0,0022	0,0008	0,0009	0,0002	0,0015	
Messung 6:	0,0060	0,0060	0,0020	0,0003	0,0020	0,0009	0,0020	0,0028	
Messung 7:	0,0057	0,0028	0,0011	0,0004	0,0003	0,0006	0,0005	0,0003	0,0004
Messung 8:	0,0031	0,0040	0,0003	0,0004	0,0006	0,0005	0,0004	0,0019	0,0015
Messung 9:	0,0030	0,0023	0,0007	0,0002	0,0003	0,0004	0,0003	0,0005	0,0004
Messung 10:	0,0030	0,0032	0,0003	0,0003	0,0002				
Messung 11:	0,0021	0,0020	0,0007	0,0004	0,0003	0,0004	0,0006	0,0005	0,0004
Mittelwert der Rausch-Peakhöhe aus allen Messungen = 0,0019									

Aus diesen Rausch-Peakhöhen kann dann ein Mittelwert berechnet werden. Dieser Mittelwert wird nun mit den Peakhöhen von verschiedenen Konzentrationen des zu quantifizierenden Analyten, in unserem Fall DHAA (siehe Kapitel 4.4.2, S. 51), ins Verhältnis gesetzt (siehe Tabelle 25, S. 51). Daher ergibt sich ein LOD von 0,025 mg/ml (S/R 4:1) und ein LOQ von 0,0375 mg/ml (S/R 10:1).

Tabelle 25: Signal/Rausch-Verhältnisse unterschiedlicher DHAA-Konzentrationen zum Rauschen

DHAA in mg/ml	DHAA in mg/0,4 ml	DHAA Höhe	Mittelwert Rauschen Höhe	S/R-Verhältnis
0,025	0,01	0,008	0,0019	4:1
0,05	0,02	0,009	0,0019	5:1
0,075	0,03	0,038	0,0019	20:1
0,125	0,05	0,068	0,0019	36:1
0,25	0,1	0,12	0,0019	63:1
1,25	0,5	0,71	0,0019	374:1
2,5	1,0	1,4	0,0019	737:1
3,75	1,5	2,1	0,0019	1105:1

4.4.2. Eichgerade

Um DHAA zu quantifizieren, wird eine Eichgerade bei verschiedenen Einwaagen des Analyten erstellt. Wobei sich durch die erhaltenen Peakflächen ein linearer Bereich ergeben sollte. In einer vorherigen Diplomarbeit (Aichner, 2020) wurde mit Palmitinsäuremethylester ein passender interner Standard für DHAA gefunden. Von diesem internen Standard wurden immer 0,3 mg zu der jeweiligen Konzentration von DHAA zugegeben. Jede Probenkonzentration wird mit 200 µl Methyl-8-Reagenz derivatisiert und nach 30-minütiger Erhitzung bei 85° im Trockenschrank werden 200 µl Pyridin dazugegeben. Nach der Messung mittels GC werden die Peaks des internen Standards und der DHAA integriert und so die AUC bestimmt. Mit dem Standardkorrekturfaktor werden dann die Peakflächen im Verhältnis zur Einwaage miteinander verglichen. Mit nachstehender Formel kann dieser bestimmt werden.

$$\text{Standardkorrekturfaktor} = \frac{\text{Einwaage DHAA} * \text{AUC interner Standard}}{\text{AUC DHAA} * \text{Einwaage interner Standard}}$$

In Tabelle 26 (S. 52) sind nur Standardkorrekturfaktoren von jenen Konzentrationen fett geschrieben, die laut LOQ, siehe Kapitel 4.4.1 (S. 49), auch quantifizierbar sind. Diese Standardkorrekturfaktoren schwanken im unteren Konzentrationsbereich (0,01-0,03 mg/0,4 ml) recht stark, weshalb es bei diesen Einwaagen auch Abweichungen von der Linearität der erstellten Eichgerade gibt. Gründe dafür könnten sein, dass die Messung so nahe an die Quantifizierungsgrenze reicht und daher ungenau wird oder, dass bei diesen kleinen Analytkonzentrationen die Derivatisierung zu Verfälschungen führt. Weitere Quantifizierungen von anderen Harzsäuren werden darüber hoffentlich Aufschlüsse liefern.

Tabelle 26 (S. 52) zeigt, dass nur im gelb hinterlegten Konzentrationsbereich zwischen 0,05-1,5 mg/0,4 ml DHAA im linearen Bereich gearbeitet werden kann. Die dazugehörige grafische Darstellung ist in Bild 32 (S. 52) abgebildet.

Tabelle 26: Ermittlung des Standardkorrekturfaktors von DHAA mit Palmitinsäuremethylester als interner Standard

Einwaage DHAA in mg	Einwaage Standard in mg	AUC DHAA	AUC Standard	Standardkorrekturfaktor
0,01	0,3	36,1	1551,3	1,4324
0,02	0,3	50,2	1091,1	1,4490
0,03	0,3	216,9	3495,8	1,6117
0,05	0,3	329,9	2088,2	1,0550
0,1	0,3	645,7	1948,2	1,0057
0,5	0,3	4042,9	2025,7	0,8351
1	0,3	8012,2	1851,9	0,7705
1,5	0,3	12212,9	1841,3	0,7538
Mittelwert Standardkorrekturfaktor:				1,0687
Standardabweichung Standardkorrekturfaktor:				0,3382
relative Standardabweichung Standardkorrekturfaktor:				31,65%
Mittelwert Standardkorrekturfaktor:				0,8840
Standardabweichung Standardkorrekturfaktor:				0,1381
relative Standardabweichung Standardkorrekturfaktor:				15,62%

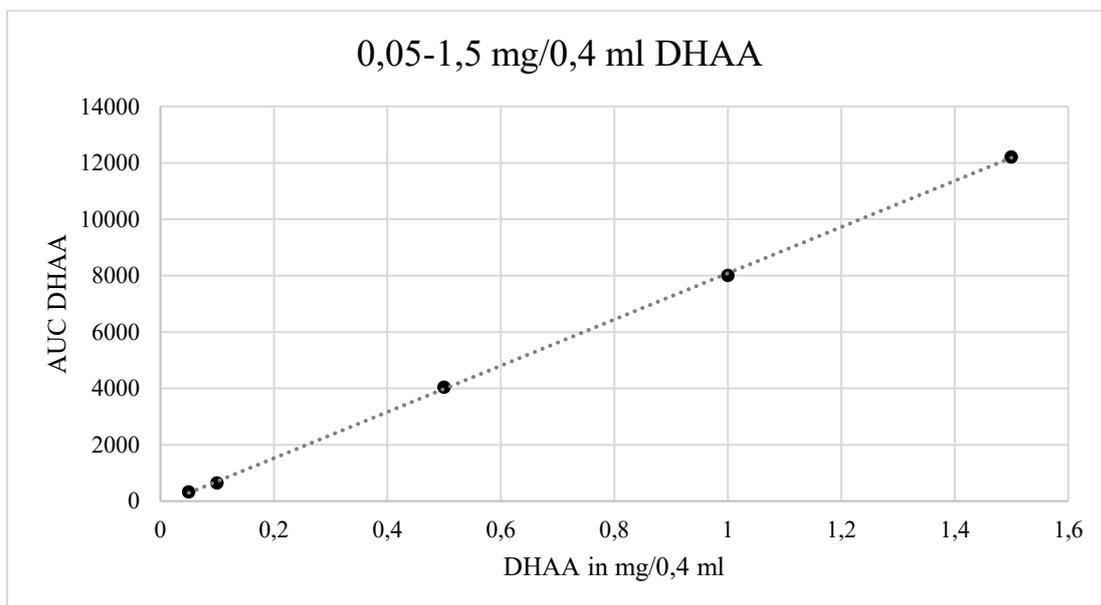


Bild 32: DHAA Eichgerade von den Konzentration 0,05 mg/0,4 ml, 0,1 mg/0,4 ml, 0,5 mg/0,4 ml, 1 mg/0,4 ml und 1,5 mg/0,4 ml

5. Diskussion und Schlussfolgerung/Ausblick

Harzsäuren sind die Hauptkomponenten des Fichtenfaulpechs, die wahrscheinlich entscheidend am wundheilenden Prozess dieses traditionellen Arzneimittels beteiligt sind. Daher sind die Quantifizierung und Isolierung dieser Diterpen-Säuren ein entscheidender Schritt hin zur Qualitätskontrolle solcher Balsame.

Weil diese Harzsäuren strukturell sehr ähnlich sind und andere chromatographische Methoden, wie Säulenchromatographie oder HPLC, nicht zu einer Trennung geführt haben, wurde für diese Diplomarbeit die HPCCC zur Isolierung der Harzsäuren herangezogen. Mit einem vierstufigen HPCCC-Elutionsprogramm gelang es, aus einer durch flüssig-flüssig Extraktion mit anschließender Ionenaustauschchromatographie erhaltenen angereicherten Harzsäurefraktion (AH, siehe Bild 3, S. 6), zwei Harzsäuren zu isolieren und zwar Dehydroabietinsäure (DHAA) und Levopimarsäure (siehe Bild 28, S. 43). Savluchinske-Feio et al. (2006) beschreiben eine Reihe von antimikrobiellen Effekte für DHAA, Derivate von DHAA und andere Harzsäuren, wie Abietinsäure und Isopimarsäure. Über Levopimarsäure ist noch keine Literatur vorhanden, in der eine Wirkung gegen pathogene Keime, die auch an Infektionen von Wunden beteiligt sind, beschrieben wird.

Außerdem war es mittels HPCCC gelungen, in mehreren Fraktionen zwei weitere Harzsäuren anzureichern, die man, wie bei Martin et al. (2006), eventuell mit einer semi-präparativen HPLC Methode auftrennen könnte. Zusätzlich wäre sehr interessant, wie sich die Harzsäuren in den Fraktionen verteilen, wenn man die vorgereinigte Harzsäurefraktion (VH, siehe Bild 3, S. 6) verwendet, da sich bei dieser die Peak-Verhältnisse zur AH unterscheiden (siehe Bild 12, S. 24).

Darüber hinaus konnten aus der AH noch zwei polare Begleitsubstanzen isoliert werden, SGtg37 und SGtg38. Weitere Untersuchungen müssen hier noch zeigen, um was für Substanzen es sich dabei handelt.

Da zur Auftrennung von Harzsäuregemischen mittels HPCCC keine Literatur vorhanden ist, musste eine geeignete HPCCC-Methode entwickelt werden. Während dieser Phase ergaben sich einige Probleme, die hier kurz dargelegt werden. Weil die Auftrennung mit Lösungsmittelgemischen durchgeführt wurde, die vermehrt apolare Anteile aufwiesen, ergaben sich oft Druckprobleme im Schlauchsystem der HPCCC, was zu instrumentellen Komplikationen führte. Durch Spülung des Systems vor jeder Methodendurchführung konnten diese Schwierigkeiten beseitigt werden. Außerdem war die Auswertung aufwendig, weil sehr

viele Fraktionen gesammelt wurden, die zuerst mittels DC und anschließend mittels GC untersucht werden mussten.

Zusätzlich kann noch angemerkt werden, dass sich diese HPCCC-Methode sehr gut zur Aufreinigung der AH eignet, um noch enthaltene polare Begleitsubstanzen zu entfernen.

In zukünftigen Arbeiten könnte dieses HPCCC-Elutionsprogramm auch verwendet werden, um sich anzuschauen, wie sich die Harzsäuren aus der NaHCO₃ Fraktion auftrennen lassen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung der Dehydroabietinsäure, welche schon zuvor mittels LPLC isoliert werden konnte (Göls). Es konnte mit dem Perkin Elmer Autosystem XL eine lineare Eichgerade im Bereich von 0,05-1,5 mg/0,4 ml bzw. 0,125-3,75 mg/ml generiert werden (siehe Bild 32, S. 52). Da es bei früheren Harzsäure-Messungen mit dem Shimadzu GC-2010 zu einem Carry-Over-Effekt kam, konnten Quantifizierungen nur mit langwierigen Spülprogrammen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die Methode auf beiden Geräten validiert, und man kam zu dem Schluss, dass der Carry-Over-Effekt bei den Harzsäure-Messungen ein gerätespezifisches Problem der Shimadzu-Anlage darstellt. Diese Harzsäuren aus vorangegangenen Messungen reichern sich wahrscheinlich irgendwo im Gerät an, zum Beispiel beim Splitventil, der Septumspülung oder am Säuleneingang. Es wird daher vorgeschlagen künftige Quantifizierungen von Harzsäuren mit der Perkin Elmer-Anlage durchzuführen.

6. Zusammenfassung/Abstract

Das Fichtenfaulpech wird seit vielen Jahren als traditionelles Arzneimittel zur Wundheilung eingesetzt. Dieses Exsudat, welches von der Gewöhnlich-Fichte (*Picea abies* (L.) H. KARST., Pinaceae) zum Schutz vor Pathogenen produziert wird, kann von der Austrittsstelle abgeschabt, mit Schweineschmalz oder Butter erhitzt, als Salbe topisch angewendet werden. Die Wirksamkeit gegen Mikroorganismen, die für Infektionen von Wunden verantwortlich sind, sowie die Unterstützung von wundheilungsfördernden Prozessen sind in der Literatur bereits beschrieben. Zusätzlich zeigten Studien an Patienten mit Ulcera und komplizierten Operationswunden das Potential dieser Zubereitungen.

Vor allem die Diterpen-Harzsäuren als Hauptkomponenten sind ein wichtiger Baustein dieser wundheilungsfördernden Mechanismen. Um einen Überblick über die pharmazeutische Qualität der eingesetzten pflanzlichen Produkte zu erlangen ist es wichtig, diese Harzsäuren zu isolieren und zu quantifizieren.

Das Ausgangssubstanzgemisch zur Erreichung dieser Ziele war eine angereicherte Harzsäurefraktion (AH), die über flüssig-flüssig Extraktion und Ionenaustauschchromatographie aus dem Fichtenfaulpech gewonnen worden war. Eine erste gaschromatographische Analyse dieser Fraktion zeigte das Vorhandensein von acht Harzsäuren. Durch käuflich erworbene Reinsubstanzen konnte dieses für die Messungen in dieser Arbeit verwendete Substanzgemisch mittels GC weitgehend charakterisiert werden. Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Harzsäuren dieser Fraktion zu isolieren.

Da die Substanzen strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind, ist es eine analytische Herausforderung, diese aufzutrennen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, mittels High Performance Counter Current Chromatography (HPLCCC) die beiden Harzsäuren Dehydroabietinsäure und Levopimarinsäure, sowie zwei weitere noch unbekannte Substanzen, SGtg37 und SGtg38, zu isolieren. Der entscheidende Trennerfolg wurde durch einen fein abgestuften Elutionsgradienten über mehrere Schritte hinweg erzielt. Dabei kamen vier mobile Phasen eines Lösungsmittelgemischs aus Hexan, Ethylacetat, Methanol und Wasser (HEMWat) zum Einsatz. Bei diesem im Umkehrphasenmodus ablaufenden Verfahren wurden stufenweise HEMWat-Systeme mit sinkender Polarität in das System geleitet. Durch diese Methode gelang außerdem die Abreicherung von polaren Begleitsubstanzen und Verunreinigungen.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit eine Validierung einer GC-Methode durchgeführt. Dabei kamen eine DB 1701 60 m Säule als stationäre Phase und ein zweistufiger Temperaturgradient zum Einsatz, bei dem der Säulenofen bis auf 280 °C aufgeheizt wurde. Detektiert wurde mit

einem Flammenionisationsdetektor. Die Proben wurden vor der Analyse einer Derivatisierung mittels Methylierung unterzogen. Dehydroabietinsäure stand in ausreichenden Mengen zur Verfügung und wurde für die Validierung herangezogen. Der ermittelte lineare Bereich lag für diese Substanz in einem sehr kleinen Konzentrationsbereich (0,05-1,5 mg/0,4 ml bzw. 0,125-3,75 mg/ml), das Limit of Detection (LOD) wurde mit 0,025 mg/ml (S/R 4:1) und das Limit of Quantification (LOQ) mit 0,0375 mg/ml (S/R 10:1) ermittelt.

Abstract

Norway spruce balm has been used as traditional medicine for many years to cure wounds. This exudate, which is produced by Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. KARST., Pinaceae), protect the tree against pathogens. It can be scrapped off the emersion point at the trunk. After heating with butter or lard the ointment can applied topically. The antimicrobial effect against microorganisms that are responsible for infections of wounds, as well as the support of wound healing processes has already been proven in studies. In addition, studies on patients with pressure ulcers and complicated surgical wounds have shown the potential of this formulations. Above all, the diterpene resin acids as the main components play an important role in the wound healing mechanisms that the Norway spruce balm trigger. To gain an overview of the pharmaceutical quality of these herbal products, it is fundamental to isolate and quantify these resin acids.

The substance mixture to achieve these goals was a resin acid fraction (AH), which was obtained from the balm via liquid-liquid separation and ion exchange chromatography. A first gas chromatographic analysis showed that this fraction contains eight resin acids. In this thesis the AH was widely characterized with commercially available resin acids via gas chromatography. The aim of this diploma thesis was to isolate the resin acids of this fraction.

Because the substances have a very similar structure, it is an analytical challenge to separate them. Within the frame of this diploma thesis it was possible to isolate two resin acids, dehydroabietic acid and levopimaric acid, as well as two yet unknown substances, SGtg37 and SGtg38, using high performance counter current chromatography. The decisive success of the separation was achieved through a gradient elution program over several steps. Four mobile phases of a solvent mixture of hexane, ethyl acetate, methanol and water (HEMWat) were used. In this reversed phase program HEMWats with decreasing polarity were added stepwise into the instrumentation. In addition, this method also enabled the depletion of polar accompanying substances and impurities.

Furthermore, a validation of a GC method was carried out. The stationary phase was a DB-1701 60 m column. A two-phase temperature program was used in which the column oven was heated up to 280 °C. A flame ionization detector was used for the detection. Derivatisation of the sample via methylation is necessary that the resin acids can be analysed via GC. Dehydroabietic acid was available in adequate quantities and was used for validation. The linear range determined for this substance was in a very small concentration range (0.05-1.5 mg/0.4 ml or 0.125-3.75 mg/ml), the limit of detection (LOD) was 0.025 mg/ml (S/N 4:1) and the limit of quantification (LOQ) was 0,0375 mg/ml.

7. Literaturverzeichnis

- Aichner, G. (2020). Quantifying resin acids in Norway spruce balm by gas chromatography – contributions to method optimization; Diplomarbeit, Division of Pharmacognosy, Universität Wien.
- Cammann, K. (2001). Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Friesen, J. B., & Pauli, G. F. (2005). G.U.E.S.S. - A generally useful estimate of solvent systems in CCC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28(17), 2777–2806. <https://doi.org/10.1080/10826070500225234>
- Fröstl, F. (2019). Ion exchange chromatography for the depletion of resin acids; Diplomarbeit, Division of Pharmacognosy, Universität Wien.
- Gey, M. H. (2015). Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen (3. Auflage). Springer Verlag.
- Göls, T. Dissertation in Vorbereitung: Universität Wien.
- Göls, T., Eichenauer, E., Langeder, J., Hoeller, F., Sykora, C., Tahir, A., Urban, E., Heiss, E. H., Saukel, J., & Glasl, S. (2020). Norway spruce balm: Phytochemical composition and ability to enhance re-epithelialization in vitro. *Planta Medica*, 86(15), 1080–1088. <https://doi.org/10.1055/a-1141-0921>
- Hamberger, B., Ohnishi, T., Hamberger, B., Séguin, A., & Bohlmann, J. (2011). Evolution of diterpene metabolism: Sitka spruce CYP720B4 catalyzes multiple oxidations in resin acid biosynthesis of conifer defense against insects. *Plant Physiology*, 157(4), 1677–1695. <https://doi.org/10.1104/pp.111.185843>
- Holmbom, T., Reunanen, M., & Fardim, P. (2008). Composition of callus resin of Norway spruce, Scots pine, European larch and Douglas fir. *Holzforschung*, 62(4), 417–422. <https://doi.org/10.1515/HF.2008.070>
- Huang, X. Y., Ignatova, S., Hewitson, P., & Di, D. L. (2016). An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 77, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.006>
- ICH Guidelines, E. (1994). ICH Topic Q2 - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *Prescrire International*, 20(121), 278.
- Ito, Y. (2005). Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 145–168. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.044>
- Ito, Y., & Bowman, R. L. (1970). Countercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition

- Chromatography without Solid Support. *Science*, 167(3916), 281–283.
<https://doi.org/10.1126/science.167.3916.281>
- Ito, Y., & Conway, W. (1984). Development of Chromatography. *Analytical Chemistry*, 56(4), 534A-554A.
- Ito, Y., Weinstein, M., Aoki, I., Harada, R., & Kimura, E. (1966). The Coil Planet Centrifuge. *Nature*, 212(5066), 985–987.
- Keeling, C. I., & Bohlmann, J. (2006). Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry*, 67(22), 2415–2423. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.019>
- Marston, A. (2007). Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2786–2798.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.08.004>
- Martin, A. M., Ferreira Queiroz, E., Marston, A., & Hostettmann, K. (2006). Labdane diterpenes from *Juniperus communis* L. berries. *Phytochemical Analysis*, 17(1), 32–35.
<https://doi.org/10.1002/pca.878>
- ÖAB. (2020). *Österreichisches Arzneibuch*. Verlag Österreich GmbH.
- Pauli, G. F., Pro, S. M., & Friesen, J. B. (2008). Countercurrent separation of natural products. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1489–1508.
<https://doi.org/10.1021/np800144q>
- Rautio, M., Sipponen, A., Lohi, J., Lounatmaa, K., Koukila-Kähkölä, P., & Laitinen, K. (2012). In vitro fungistatic effects of natural coniferous resin from Norway spruce (*Picea abies*). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(8), 1783–1789. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1502-9>
- Rautio, M., Sipponen, A., Peltola, R., Lohi, J., Jokinen, J. J., Papp, A., Carlson, P., & Sipponen, P. (2007). Antibacterial effects of home-made resin salve from Norway spruce (*Picea abies*). *Apmis*, 115(4), 335–340. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_548.x
- Sanagi, M. M., Ling, S. L., Nasir, Z., Hermawan, D., Wan Ibrahim, W. A., & Naim, A. A. (2009). Comparison of signal-to-noise, blank determination, and linear regression methods for the estimation of detection and quantification limits for volatile organic compounds by gas chromatography. *Journal of AOAC International*, 92(6), 1833–1838.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/92.6.1833>
- Savluchinske-Feio, S., Curto, M. J. M., Gigante, B., & Roseiro, J. C. (2006). Antimicrobial activity of resin acid derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(3), 430–436. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0517-0>

- Sipponen, A., Jokinen, J. J., Sipponen, P., Papp, A., Sarna, S., & Lohi, J. (2008). Beneficial effect of resin salve in treatment of severe pressure ulcers: A prospective, randomized and controlled multicentre trial. *British Journal of Dermatology*, *158*(5), 1055–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08461.x>
- Sipponen, Arno, Kuokkanen, O., Tiihonen, R., Kauppinen, H., & Jokinen, J. J. (2012). Natural coniferous resin salve used to treat complicated surgical wounds: Pilot clinical trial on healing and costs. *International Journal of Dermatology*, *51*(6), 726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05397.x>
- Sipponen, Arno, & Laitinen, K. (2011). Antimicrobial properties of natural coniferous rosin in the European Pharmacopoeia challenge test. *Apmis*, *119*(10), 720–724. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02791.x>
- Sipponen, Arno, Rautio, M., Jokinen, J., Laakso, T., Saranpaa, P., & Lohi, J. (2007). Resin-Salve from Norway Spruce - A Potential Method to Treat Infected Chronic Skin Ulcers? *Drug Metabolism Letters*, *1*(2), 143–145. <https://doi.org/10.2174/187231207780363598>
- Skalicka-Woźniak, K., & Garrard, I. (2014). Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: A comprehensive review with respect to the solvent systems employed. *Phytochemistry Reviews*, *13*(2), 547–572. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9348-2>
- Trapp, S., & Croteau, R. (2001). Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, *52*, 689–724.

8. Abkürzungsverzeichnis

AH	Angereicherte Harzsäurefraktion
AUC	area under the curve
C	Kohlenstoff
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHAA	Dehydroabietic acid, Dehydroabietinsäure
et al.	et alii (lat.)
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HCl	Salzsäure
HEMWat	h exane, e thyl acetate, m ethanol, w ater
HPCCC	high performance counter current chromatography, Hochleistungs-Gegenstromverteilungschromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
K	Verteilungskoeffizient
LOD	limit of detection, Nachweisgrenze
LOQ	limit of quantification, Quantifizierungsgrenze
LPLC	Low pressure liquid chromatography, Niederdruck-Flüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	nuclear magnetic resonanz, Kernspinresonanzspektroskopie
NP	‚normal phase‘ / Normalphase
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
OP	Oberphase
RP	‚reversed phase‘ / Umkehrphase
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
Rf	Retentionsfaktor
S/R	Signal/Rausch
UP	Unterphase
VH	Vorgereinigte Harzsäurefraktion

9. Anhang

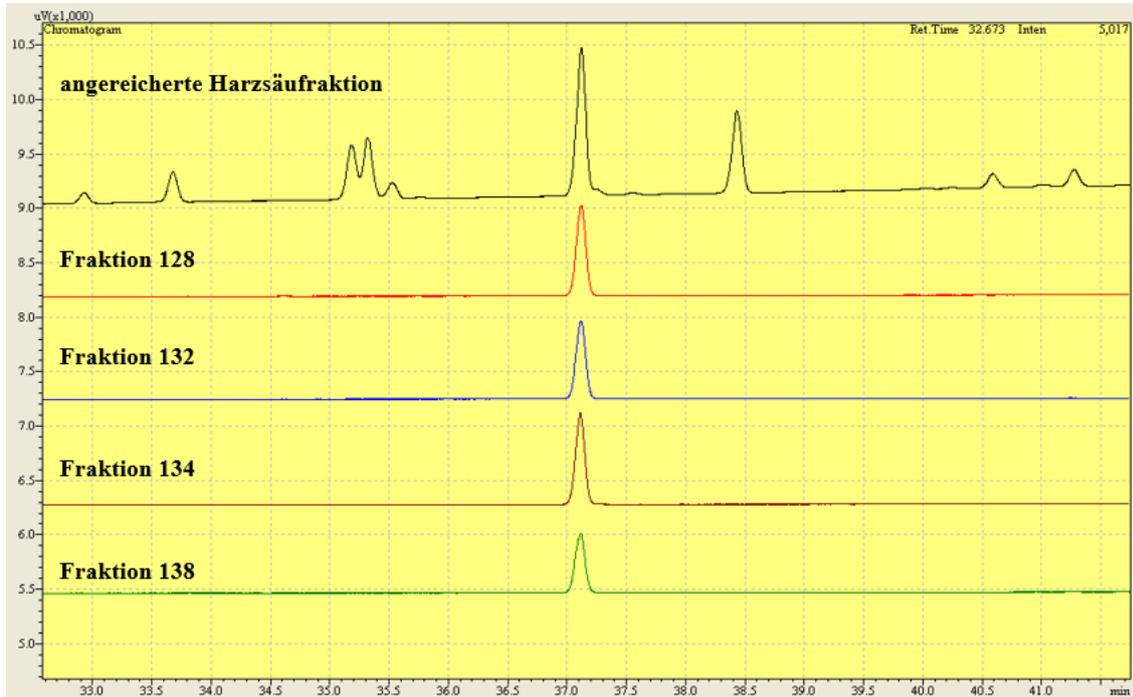


Bild A 1: GC-Fraktionsvergleich der hellroten DC-Bande der HPCCC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17 und Kapitel 4.2.4, S. 35); GC-FID siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11

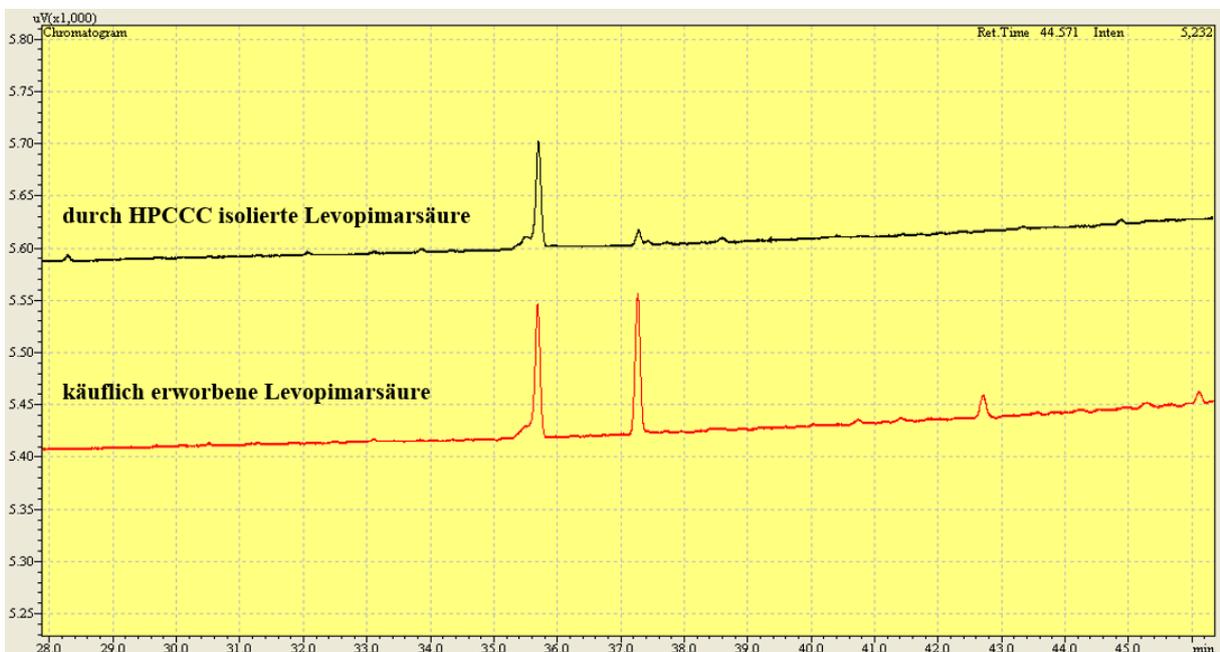


Bild A 2: GC-Chromatogrammvergleich der mit der HPCCC Methode 21OP_21UP-27UP RP (siehe Kapitel 3.4.2, S. 17 und Kapitel 4.2.4, S. 35) isolierten Levopimarsäure und der käuflich erworbenen Levopimarsäure; GC-FID siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11

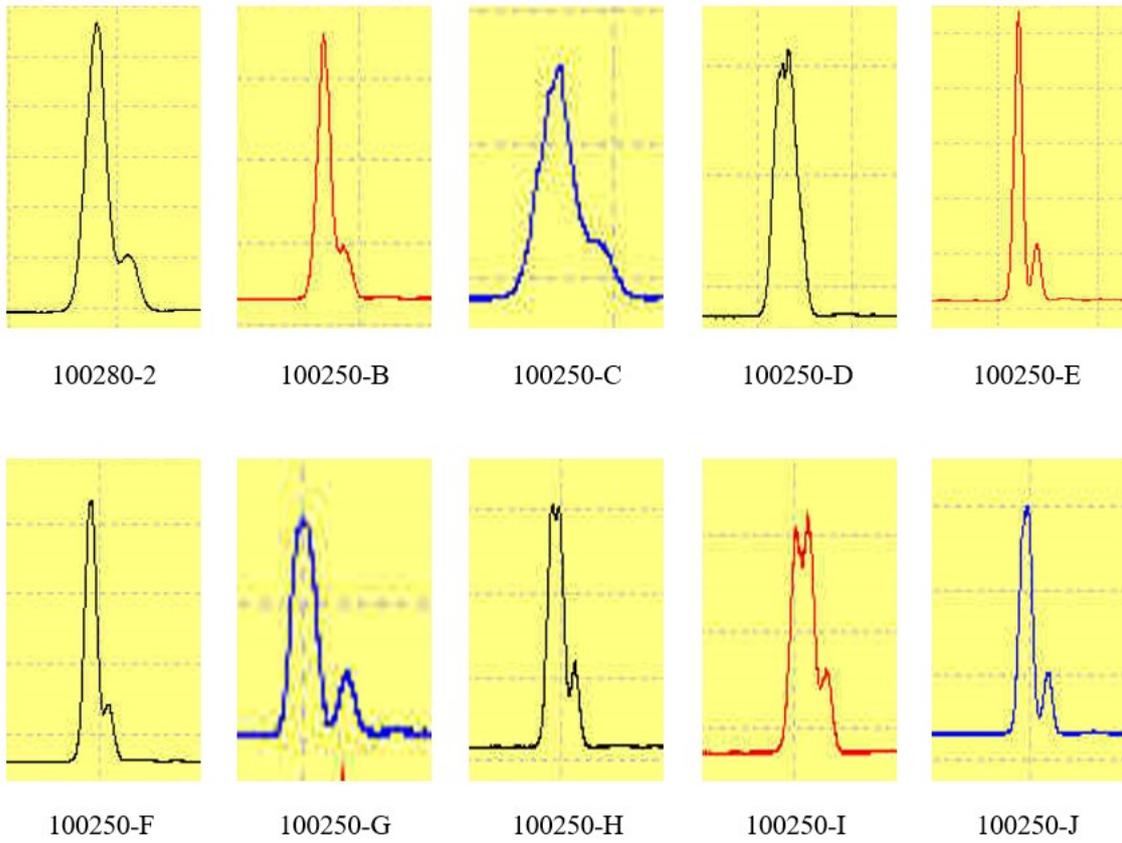


Bild A 3: Trennung des Doppelpeaks bei verschiedenen Temperaturprogrammen (siehe Tabelle 21, S. 46) mit der DB-1701 30 m Säule; GC-FID siehe Tabelle 2, S. 10 und Tabelle 3, S. 11