



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

## Chemische Untersuchung von *Passiflora incarnata* hinsichtlich Inhaltsstoffen mit Benzoflavonstruktur

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Walter Amberger
Matrikel-Nummer:	0201092
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuerin:	Fr. ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn
Wien, am	20. August 2008



## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung ich das Studium nicht in diesem Zeitraum hätte absolvieren können.

Weiters danke ich Fr. ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die nette Betreuung während der Diplomarbeit und ihre Hilfe bei Fragen und Problemen.

Zu guter Letzt auch noch ein großes Dankeschön an Fr. Dipl. Ing. Stanimira Krasteva für die vielen guten Tipps und die Hilfestellung beim praktischen Arbeiten.



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung .....	1
2. Material und Methoden .....	3
2.1. Pflanzenextrakte .....	3
2.2. Pflanzenmaterial .....	3
2.3. Dünnschichtchromatographie (DC).....	4
2.4. Säulenchromatographie (SC) .....	5
2.5. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) .....	6
3. Ergebnisse und Diskussion .....	7
3.1. Versuche zur Isolierung des „Benzoflavons“ .....	7
3.1.1. Vorversuche mit Trockenextrakten.....	7
3.1.2. Vergleich des Flavonoidspektrums von Drogen unterschied. Herkunft.....	8
3.1.3. Aufarbeitung von Hb. Passiflorae (Droge 1).....	9
3.1.3.1. Extraktion .....	9
3.1.3.2. SC 1 .....	11
3.1.4. Aufarbeitung von Hb. Passiflorae (Droge 2).....	14
3.1.4.1. Extraktion .....	14
3.1.4.2. SC 2 .....	16
3.1.5. Aufarbeitung von Hb. Passiflorae (Droge 3).....	18
3.1.5.1. Extraktion .....	18
3.1.5.2. SC 3 .....	20
3.1.6. DC - Vergleiche der Extrakte und Fraktionen .....	23
3.1.6.1. Vergleich des Flavonoidmusters .....	23
3.1.6.2. Vergleich der apolaren Inhaltsstoffe .....	24
3.1.6.3. Vergleich apolarer Extrakte und Fraktionen mit Cumarin.....	25

3.1.7. Fraktionierung des Petrolether – Extrakts von Droge 2 .....	26
3.1.7.1. SC 4 .....	27
3.1.7.2. DC Kontrolle von SC 4 .....	27
3.2. Gehaltsbestimmung der Flavonoide .....	31
3.2.1. Photometrische Gesamtgehaltsbestimmung .....	31
3.2.2. Gehaltsbestimmung der einzelnen Flavonoide mittels HPLC.....	33
3.2.2.1. Eichung des Systems.....	33
3.2.2.2. Berechnung der Korrekturfaktoren.....	35
3.2.2.3. Korrekturfaktoren der Einzelflavonoide.....	38
3.2.2.4. Berechnung der Einzelflavonoide .....	41
4. Zusammenfassung.....	43
5. Literaturverzeichnis .....	46





# 1. Einleitung und Problemstellung

Die Gattung *Passiflora* kommt in den warm – gemäßigten und tropischen Klimazonen von Mittel - und Südamerika vor, seltener in Asien, Australien und Afrika. Man baut sie vor allem wegen der essbaren Früchte und ihrer schönen Blüten an [1].

Abb.1: *Passiflora x belotti* (Hybride von *P. alata* und *P. caerulea*)



*Passiflora incarnata* wird schon lange therapeutisch eingesetzt, um nervöse Unruhe und Einschlafstörungen zu behandeln. Obwohl die Droge vor allem in Kombinationspräparaten viel in Verwendung ist und eine große Zahl an Inhaltsstoffen gefunden wurde, kennt man weder den Wirkmechanismus, noch weiß man, welche Substanz für die anxiolytische und sedative Wirkung verantwortlich ist [2].

Eine indische Arbeitsgruppe führte Untersuchungen an Extrakten von *Passiflora incarnata* durch, wobei eine der Untersuchungslösungen in vivo starke anxiolytische Wirkung zeigte. Diese Fraktion enthielt hauptsächlich zwei Komponenten, die auf der DC-Platte als blau bzw. türkis fluoreszierende Zonen im UV-Licht bei 366 nm sichtbar sein sollen.

Der aktive Pflanzeninhaltsstoff wurde als trisubstituiertes Benzoflavon beschrieben [2], die exakte Struktur der Verbindung jedoch aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Weiters wurde angegeben, dass diese Substanz in vivo an Mäusen deutliche Effekte hinsichtlich der Verminderung des Suchtverhaltens bei Abhängigkeit von Opiaten, Nikotin,  $\Delta^9$  – THC, Alkohol sowie Diazepam zeigte. Darüber hinaus soll das Benzoflavon ein starker Inhibitor der Aromatase sein [1].

Das Ziel der Diplomarbeit war, diesen Inhaltsstoff zu isolieren, damit seine Struktur mittels NMR aufgeklärt werden kann. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob er auch in Drogenmaterial, welches aus verschiedenen Anbaugebieten stammt, vorkommt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Pflanzenextrakte

Es standen zwei ethanolische Extrakte von Hb. Passiflorae (Extractum Passiflorae, FB4641763 und GE5629, Dr. Peithner KG Wien) zur Verfügung.

### 2.2. Pflanzenmaterial

Des Weiteren standen fünf Muster von Hb. Passiflorae conc. unterschiedlicher Herkunft für die Arbeit zur Verfügung:

Indien: Passiflora incarnata, NLM-D-05-030, cultivated in India, „Normal Chemotype“ (**Droge 1**)<sup>1</sup>

Italien: (1) Passiflora herba, CH.-B.: KL-5432, Analysennr.: 922073 (Dr. Peithner KG Wien) (**Droge 2**)

(2) Hb. Passiflorae cs., KLA60572 (Fa. Mag. Kottas, Wien)

Frankreich: Passionsblumenkraut geschnitten, Art.-Nr. 90402, Ch./Lot: 10194 (Fa. Galke, Gittelde/Harz) (**Droge 3**)

Australien: Passiflora incarnata, NLM-D-05-029, cultivated in Australia, Swertisin Chemotype<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Beide Muster wurden dankenswerter Weise von Hrn. Dr. H. Wohlmuth, Southern Cross University in Lismore, Australia, zur Verfügung gestellt.

## 2.3. Dünnschichtchromatographie (DC)

### DC - System für apolare Substanzen:

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Fertigplatten bzw. Folien Merck (20x20, 10x20)

Mobile Phase: System 1: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13+4+2+1)

System 2: Chloroform – Methanol – H<sub>2</sub>O (90+3,5+0,2)

System 3: Chloroform – Methanol – H<sub>2</sub>O (95+1,5+0,1)

Detektion: mittels UV-Licht bei 366 nm oder nach Besprühen mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Reagens

### DC – System für Flavonoide:

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Fertigplatten bzw. Folien Merck (20x20, 10x20)

Mobile Phase: System 4: Ethylacetat-konz. Ameisensäure-Eisessig-H<sub>2</sub>O (100+11+11+26)

Detektion: mit Naturstoffreagens A (1% in MeOH) und PEG 400 (5% in EtOH) unter UV<sub>366</sub>

## 2.4. Säulenchromatographie (SC)

### Säule 1-3 (Vacuum Liquid Chromatographie):

Füllhöhe: ca. 45 cm stationäre Phase

Säulendurchmesser: ca. 1,5 cm

Auftragsmenge: ca. 3 g Extrakt aufgezogen auf 9 g Kieselgel

Stationäre Phase: ICN Silica 60 A

Mobile Phase: Chloroform – Methanol Gemische, beginnend bei 100% CHCl<sub>3</sub>  
bis 100% MeOH

### Säule 4:

Füllhöhe: ca. 85 cm stationäre Phase

Säulendurchmesser: ca. 1 cm

Auftragsmenge: 500 mg Extrakt aufgezogen auf 1g Kieselgel

Stationäre Phase: ICN Silica 60 A

Mobile Phase: 1.) Chloroform – Methanol – H<sub>2</sub>O (95+1,5+0,1)  
2.) Chloroform – Methanol – H<sub>2</sub>O (80+10+1)  
3.) Chloroform – Methanol – H<sub>2</sub>O (65+30+6)

## 2.5. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Pumpe: LC – 10ADVP Shimadzu

Säule: LiChrospher 100 RP 18, 5 µm, 250 x 4 mm

Detektor: SPD – 10AVP Shimadzu UV – Vis - Detektor

Eluens: A: H<sub>2</sub>O mit 85%iger ortho – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH3 eingestellt

B: Acetonitril

Gradient:

Zeit	%B
0	15
20	25,5
21	100
25	100

Flussrate: 1,2 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Equilibrierungszeit: 10 min.

Referenzsubstanz: Kämpferol-7-O-neohesperosid (Fa. C. ROTH, Karlsruhe)

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Versuche zur Isolierung des „Benzoflavons“

##### 3.1.1. Vorversuche mit Trockenextrakten

In einem Vorversuch wurden zwei ethanolische Extrakte (siehe S.3) mittels DC auf das „Benzoflavon“ getestet.

Hierzu wurden 5 g beider Extrakte in der beschriebenen [2] Weise je 4x mit 10 ml 1-BuOH extrahiert, anschließend wurde mit Petrolether und Chloroform genauso verfahren und die Lösungen zur Trockene gebracht. Die verbliebenen Extraktmengen wurden ebenfalls getrocknet, je 4 mg der verschiedenen Fraktionen wurde in 200 µl 40% MeOH gelöst.

Es wurden 15 µl dieser Lösungen auf eine Kieselgel Fertigplatte aufgebracht und in System 1 (siehe S.4) entwickelt. Jedoch konnten im UV-Licht keine Zonen mit den beschriebenen R<sub>f</sub> - Werten von 0,65 bzw. 0,67 detektiert werden.

Da das „Benzoflavon“ auf diese Weise nicht angereichert werden konnte und von den Extrakten nur geringe Mengen zur Verfügung standen, wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

### 3.1.2. Vergleich des Flavonoidspektrums von Drogen unterschiedlicher Herkunft

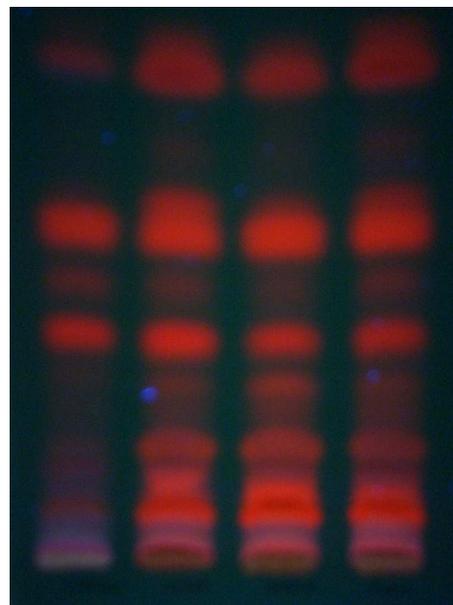
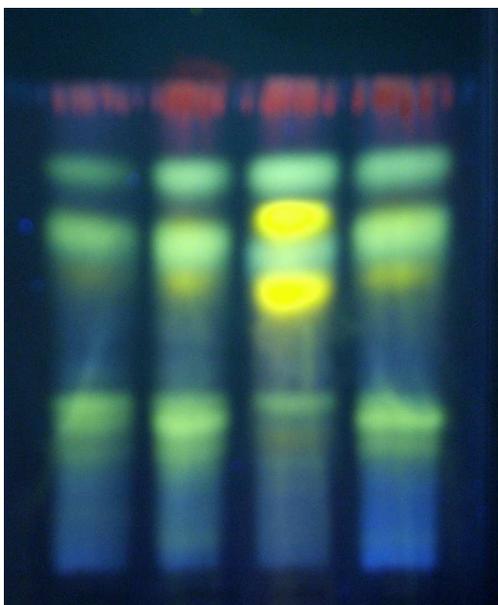
Für die Untersuchung standen fünf verschiedene Muster aus 4 Ländern (siehe S.3) zur Verfügung.

Je 0,5 g der Drogen wurden in der Reibschale zerkleinert, mit 5 ml MeOH versetzt und am Wasserbad bei 70 °C 15 min. lang extrahiert. Anschließend wurden 20 µl des jeweiligen Filtrats auf eine Kieselgel - Platte aufgetragen und diese im System 4 (siehe S.4) entwickelt (Abb.2). Damit wurde das Flavonoidmuster der Proben verglichen.

Der Rest des Filtrats wurde am Rotovapor eingeeengt und damit eine weitere DC in System 1 durchgeführt (Abb.3), um Aufschlüsse über das Vorhandensein des „Benzoflavons“ zu erhalten.

Abb.2: Flavonoidvergleich der vier Drogenmuster

Abb.3: Vergleich der apolaren Inhaltsstoffe der vier Drogenmuster



1      2      3      4

1      2      3      4

1... Indien
2... Italien (2), siehe S.3
3... Australien
4... Frankreich

In Abb.2 (siehe S.8) sieht man, dass sich das australische Muster durch die hohen Konzentrationen an Orientin, Isoorientin und Swertisin im Flavonoidkomplex deutlich von den anderen Proben unterschied. Abb.3 (siehe S.8) zeigt, dass man aufgrund des hohen Gehaltes an Chlorophyll und dessen intensiv roter Fluoreszenz keine Aussagen hinsichtlich des Vorliegens des „Benzoflavons“ in einem der Extrakte treffen konnte.

Da das „Benzoflavon“ aus indischer Droge isoliert worden war, entschied man sich in weiterer Folge, zuerst die indische Droge aufzuarbeiten.

### 3.1.3. Aufarbeitung von Hb. Passiflorae (Droge 1)

#### 3.1.3.1. Extraktion

Das sehr klein geschnittene Drogenmaterial wurde gesiebt (Sieb IV) und für die Extraktion verwendet. Dadurch wurde v.a. der Blattanteil des Materials extrahiert, da in diesem höhere Inhaltsstoffmengen vorhanden sind als im Stengel.

20 g Droge 1 (siehe S.3) wurden mit 100 ml Petrolether 20 min. lang bei 60 °C im Ultraschallbad extrahiert, nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert und die Extraktion 2x wiederholt, dann wurden die vereinigten Filtrate am Rotovapor eingedampft und der Trockenrückstand bestimmt.

Danach ging man mit 3x 100 ml Chloroform auf die gleiche Weise vor.

Schließlich wurde der Drogenrückstand 10x mit 100 ml Methanol wie zuvor extrahiert.

Tabelle 1: Menge der Extrakte aus Droge 1

	Trockenrückstand in g
Petrolether	0,41
Chloroform	0,47
Methanol	3,77

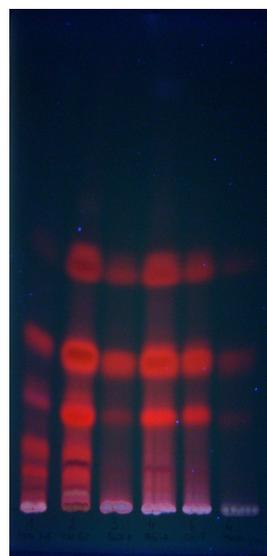
Der methanolische Auszug wurde entsprechend der Vorgangsweise in Lit. [2] 10 x mit je 5 ml 1-BuOH weiter extrahiert. Anschließend ging man mit Petrolether und Chloroform auf dieselbe Weise vor.

Tabelle 2: Mengen der Fraktionen aus dem Methanolextrakt

	Trockenrückstand in g
1 - BuOH	0,192
Petrolether	0,025
Chloroform	0,028
Rest MeOH	3,52

Alle erhaltenen Extrakte wurden mittels DC (System 1, siehe S.4) auf blau fluoreszierende Zonen mit  $R_f$  – Werten zwischen 0,65 und 0,67 überprüft. Da zwischen den intensiv rot fluoreszierenden Chlorophyllzonen jedoch keine solchen Banden sichtbar waren (Abb.4), sollte eine weitere Anreicherung wie bei Dhawan et al. [2] erfolgen.

Abb.4: DC der apolaren Inhaltsstoffe in den Fraktionen von Droge 1



1 2 3 4 5 6

- |  |
|--|
| <p>1... Petrolether Extrakt<br/>                 2... Chloroform Extrakt<br/>                 3... 1-Butanol Fraktion aus MeOH Extrakt<br/>                 4... Petrolether Fraktion aus MeOH Extrakt<br/>                 5... Chloroform Fraktion aus MeOH Extrakt<br/>                 6... gereinigtes MeOH Extrakt</p> |
|--|

### 3.1.3.2. SC 1

Daher folgte die weitere Fraktionierung des gereinigten MeOH Extrakts mittels Säulenchromatographie.

Dazu wurden 3,2 g des Methanol - Extrakts gelöst, auf 9 g Kieselgel für die SC aufgezogen und auf die Säule (22g Kieselgel als stationäre Phase, siehe S.5) aufgebracht.

Mit Lösungsmittelgemischen steigender Polarität wurde das MeOH Extrakt fraktioniert. Dabei wurde jeweils mit 3 x 80 ml des Gemisches eluiert.

Um die Elution zu beschleunigen, bediente man sich der Vacuum Liquid Chromatographie, wodurch die gesamte Elutionsdauer auf ca. 30% der Zeit, die eine Elution unter Normaldruck dauert, verkürzt werden konnte.

Abb.5: Säule 1



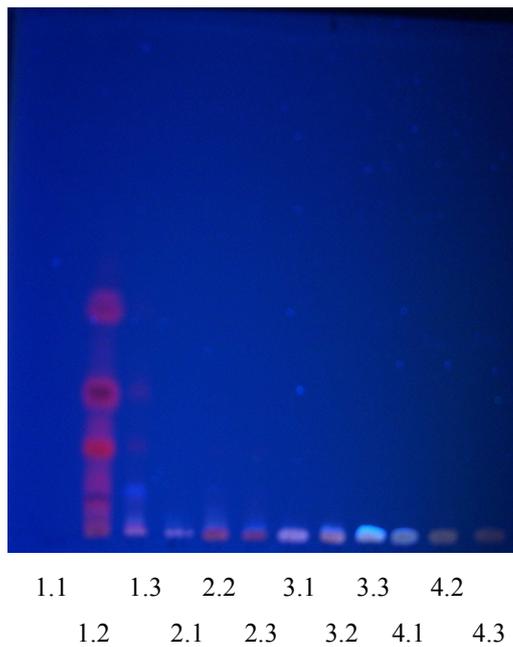
Tabelle 3: Fraktionen von SC 1

F	LM	Rückstand in mg	enthält
1.1		45,3	apolare Subst.
1.2	CHCl <sub>3</sub> 100%	59,9	apolare Subst.
1.3		7,8	apolare Subst.
2.1		4,5	apolare Subst.
2.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	40,9	apolare Subst.
2.3	95:5	20,8	apolare Subst.
3.1		18,5	apolare Subst.
3.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	44,6	apolare Subst.
3.3	90:10	49,2	apolare Subst.
4.1		44,3	Flavonoide
4.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	84,7	Flavonoide
4.3	85:15	70,9	Flavonoide
5.1		86,5	Flavonoide
5.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	115,5	Flavonoide
5.3	80:20	123,2	Flavonoide
6.1		127,8	Flavonoide
6.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	226,8	Flavonoide
6.3	70:30	231,6	Flavonoide
7.1		176,9	Flavonoide
7.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	454,3	Flavonoide
7.3	1:1	302,6	Flavonoide
8.1		147,2	Flavonoide
8.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	235,7	Flavonoide
8.3	20:80	98,7	Flavonoide
9.1		85,1	Flavonoide
9.2	MeOH	31,7	Flavonoide
9.3	100%	39,8	Flavonoide
10	Rest	195,3	Flavonoide

Dhawan [2] zufolge sollte in den Fraktionen, die mit dem Lösungsmittel – Gemisch CHCl<sub>3</sub> – MeOH 95:5 erhalten wurden, eine blaue und eine türkis fluoreszierende Zone bei R<sub>f</sub> 0,65 und 0,67 im DC System 1 (siehe S.4) zu sehen sein.

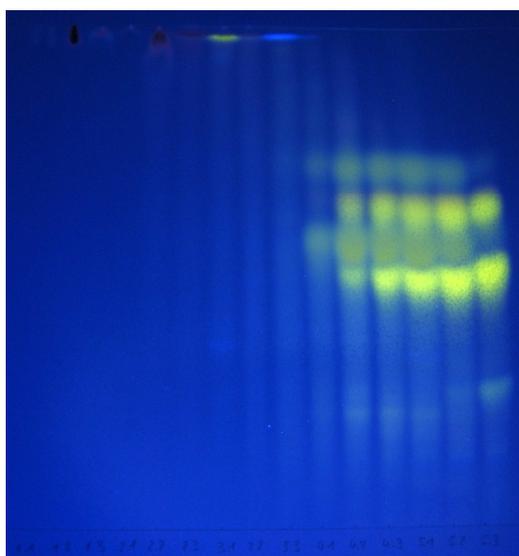
In den ersten 12 Fraktionen (1.1 – 4.3) mit den apolaren Substanzen waren diese Banden mittels DC nicht sichtbar (Abb.6, siehe S.13).

Abb.6: DC der Fraktionen 1.1-4.3 von SC 1 (DC - System 1)



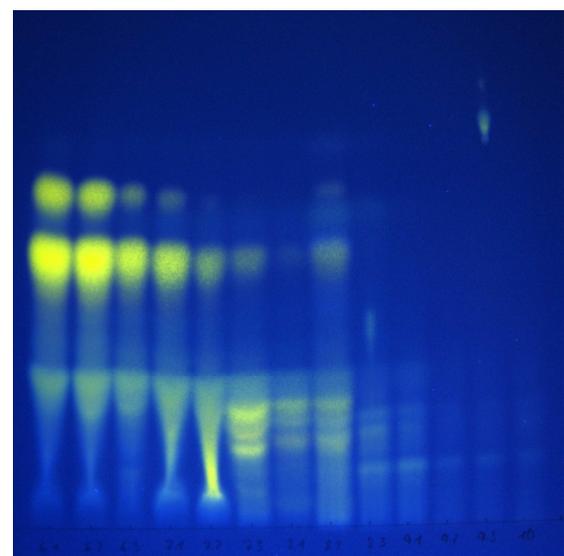
Um auch das Flavonoidmuster zu erfassen, wurden alle 28 Fraktionen im System 4 (siehe S.4) entwickelt und danach mit Naturstoffreagens/PEG 400 besprüht. Als Hauptkomponenten wurden Orientin (O), Isoorientin (IO) sowie Vitexin (V) und Isovitexin (IV) detektiert (Abb.7 + 8). Polare Komponenten wie Schaftosid oder Lucenin lagen in den Fraktionen 7.1 - 8.2 in mittlerer Konzentration vor.

Abb.7: DC der Fraktionen 1.1-5.3 von SC1 (DC – System 4)



1.1 1.3 2.2 3.1 3.3 4.2 5.1 5.3  
1.2 2.1 2.3 3.2 4.1 4.3 5.2

Abb.8: DC der Fraktionen 6.1-10 von SC 1 (DC – System 4)



6.1 6.3 7.2 8.1 8.3 9.2 10  
6.2 7.1 7.3 8.2 9.1 9.3

### 3.1.4. Aufarbeitung von Hb. Passiflorae (Droge 2)

#### 3.1.4.1. Extraktion

20 g der Droge italienischer Herkunft wurden pulverisiert (Sieb IV) und anschließend wie zuvor beschrieben (siehe S.9) extrahiert. Um Zeit zu sparen, führte man die Extraktion jeweils 2x mit 150 ml Petrolether und Chloroform bzw. 7x mit 200 ml MeOH durch.

Tabelle 4: Menge der Extrakte aus Droge 2

	Trockenrückstand in g
Petrolether	0,51
Chloroform	0,15
Methanol	2,95

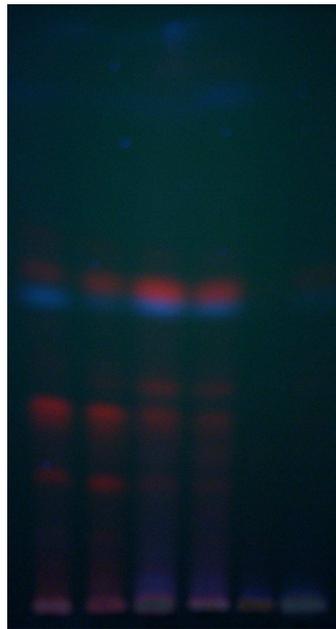
Die Fraktionierung des Methanol – Auszuges resultierte in folgenden Fraktionen:

Tabelle 5: Mengen der Fraktionen aus dem Methanolextakt

	Trockenrückstand in g
1 - BuOH	0,222
Petrolether	0,026
Chloroform	0,033
Rest MeOH	2,66

In der DC (Abb.9, siehe S. 15) konnte im UV-Licht (366 nm) ein blau fluoreszierender Fleck bei Rf ca. 0,50 (= Substanz X) detektiert werden.

Abb.9: DC der apolaren Inhaltsstoffe in den Fraktionen von Droge 2  
(DC – System 1)



1 2 3 4 5 6

- 1... Petrolether Extrakt
- 2... Chloroform Extrakt
- 3... 1-Butanol Fraktion aus MeOH Extrakt
- 4... Petrolether Fraktion aus MeOH Extrakt
- 5... Chloroform Fraktion aus MeOH Extrakt
- 6... gereinigtes MeOH Extrakt

### 3.1.4.2. SC 2

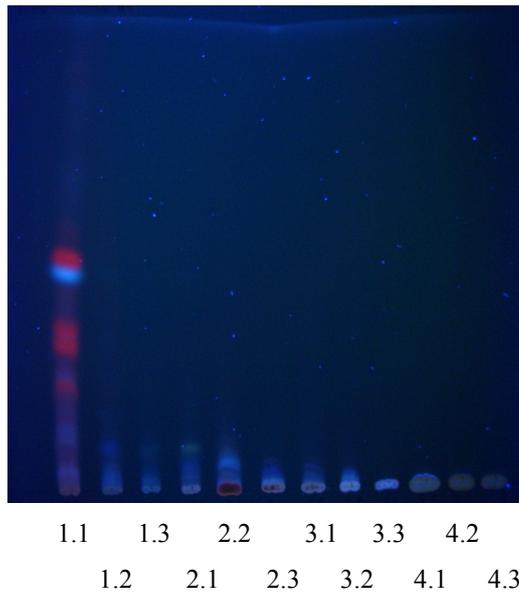
Das gereinigte Methanolextrakt wurde, wie auf S.11 beschrieben, ebenfalls mittels VLC an Kieselgel zur Trockensäulenchromatographie fraktioniert.

Tabelle 6: Fraktionen von SC 2

F	LM	Rückstand in mg	enthält
1.1		21,1	apolare Subst.
1.2	CHCl <sub>3</sub> 100%	10,1	apolare Subst.
1.3		3,3	apolare Subst.
2.1		4,8	apolare Subst.
2.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	26,9	apolare Subst.
2.3	95:5	18,3	apolare Subst.
3.1		22,0	apolare Subst.
3.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	43,7	apolare Subst.
3.3	90:10	30,5	apolare Subst.
4.1		26,3	Flavonoide
4.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	60,7	Flavonoide
4.3	85:15	60,3	Flavonoide
5.1		76,8	Flavonoide
5.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	72,9	Flavonoide
5.3	80:20	69,5	Flavonoide
6.1		89,0	Flavonoide
6.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	114,5	Flavonoide
6.3	70:30	80,5	Flavonoide
7.1		150,8	Flavonoide
7.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	315,5	Flavonoide
7.3	1:1	137,3	Flavonoide
8.1		139,3	Flavonoide
8.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	122,8	Flavonoide
8.3	20:80	63,0	Flavonoide
9.1		53,3	Flavonoide
9.2	MeOH	61,6	Flavonoide
9.3	100%	34,3	Flavonoide
10	Rest	140,8	Flavonoide

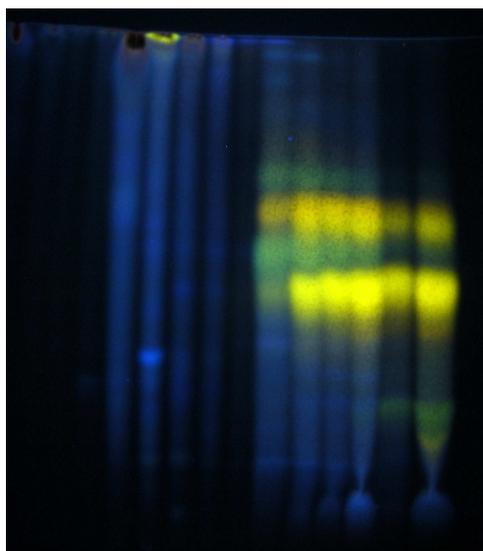
In Fraktion 1.1 der Säule (Abb.10, siehe S.17) wurde der blau fluoreszierende Fleck detektiert (R<sub>f</sub> 0,50; DC System 1, siehe S.4). In allen anderen Fraktionen war die Substanz nicht nachweisbar.

Abb.10: DC der Fraktionen 1.1-4.3 von SC 2 (DC - System 1)



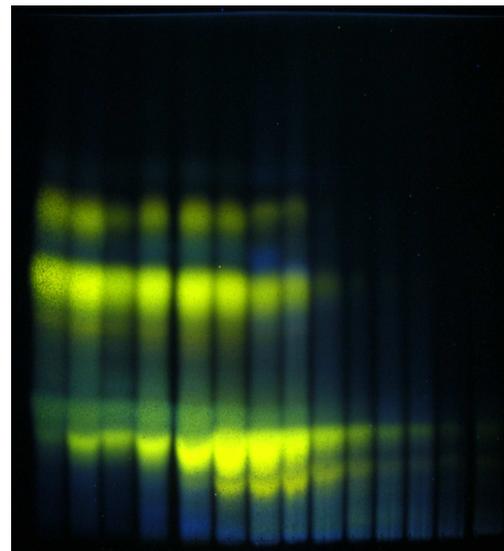
Auch für Droge 2 wurde das Flavonoidmuster mittels DC (Abb.11 + 12, System 4, siehe S.4) erfasst. Die Hauptinhaltsstoffe entsprachen denen von Droge 1. Allerdings enthielt Droge 2 höhere Mengen an polaren Glykosylen, vor allem des Luteolins, die in den Fraktionen 7.1 bis 8.3 angereichert worden waren.

Abb.11: DC der Fraktionen 1.1-5.3 von SC 2  
(DC – System 4)



1.1 1.3 2.2 3.1 3.3 4.2 5.1 5.3  
1.2 2.1 2.3 3.2 4.1 4.3 5.2

Abb.12: DC der Fraktionen 5.3-10 von SC 2  
(DC – System 4)



5.3 6.2 7.1 7.3 8.2 9.1 9.3  
6.1 6.3 7.2 8.1 8.3 9.2 10

V  
O  
IV  
IO

### 3.1.5. Aufarbeitung von Hb. Passiflorae (Droge 3)

#### 3.1.5.1. Extraktion

Bei der Droge französischer Herkunft wurde für die Vorextraktion und Fraktionierung des Methanolextraktes vorgegangen wie bei den anderen aus Indien und Italien (S.9 bzw. S.14) beschrieben.

Tabelle 7: Mengen der Extrakte aus Droge 3

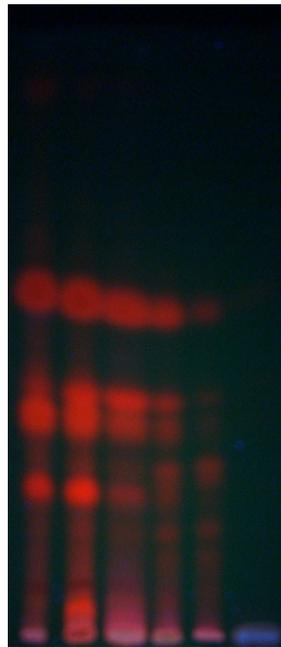
	Trockenrückstand in g
Petrolether	0,32
Chloroform	0,31
Methanol	4,84

Tabelle 8: Mengen der Fraktionen aus dem Methanolextrakt

	Trockenrückstand in g
1 - BuOH	0,217
Petrolether	0,093
Chloroform	0,021
Rest MeOH	4,50

In der DC, welche nach der Fraktionierung angefertigt wurde, konnten ausschließlich rote Chlorophyllzonen detektiert werden. Blau fluoreszierende Banden waren in keiner der Fraktionen erkennbar (siehe Abb. 13, S.19).

Abb.13: DC der apolaren Inhaltsstoffe in den Fraktionen von Droge 3  
(DC – System 1)



1 2 3 4 5 6

- 1... Petrolether Extrakt
- 2... Chloroform Extrakt
- 3... 1-Butanol Fraktion aus MeOH Extrakt
- 4... Petrolether Fraktion aus MeOH Extrakt
- 5... Chloroform Fraktion aus MeOH Extrakt
- 6... gereinigtes MeOH Extrakt

### 3.1.5.2. SC 3

Für die Fraktionierung mittels VLC wurden 3,6 g MeOH Extrakt auf 9 g KG aufgebracht und genauso fraktioniert wie auf S.11 beschrieben.

Tabelle 9: Fraktionen von SC 3

F	LM	Rückstand in mg	enthält
1.1		94,4	apolare Subst.
1.2	CHCl <sub>3</sub> 100%	9,8	apolare Subst.
1.3		5,8	apolare Subst.
2.1		6,9	apolare Subst.
2.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	23,5	apolare Subst.
2.3	95:5	13,4	apolare Subst.
3.1		34,4	apolare Subst.
3.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	47,2	apolare Subst.
3.3	90:10	43,9	apolare Subst.
4.1		41,9	Flavonoide
4.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	65,7	Flavonoide
4.3	85:15	39,2	Flavonoide
5.1		52,3	Flavonoide
5.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	75,8	Flavonoide
5.3	80:20	62,3	Flavonoide
6.1		102,5	Flavonoide
6.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	120,8	Flavonoide
6.3	70:30	128,9	Flavonoide
7.1		266,2	Flavonoide
7.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	341,1	Flavonoide
7.3	1:1	229,7	Flavonoide
8.1		349,2	Flavonoide
8.2	CHCl <sub>3</sub> - MeOH	313,9	Flavonoide
8.3	20:80	195,8	Flavonoide
9.1		282,5	Flavonoide
9.2	MeOH	163,1	Flavonoide
9.3	100%	112,9	Flavonoide
10	Rest	84,4	Flavonoide

Wie bei Droge 1, konnten auch in Droge 3 mittels DC keine blau/türkis fluoreszierenden Banden bei Rf 0,65 bzw. 0,67 detektiert werden (siehe Abb.14, S.21).

Abb.14: DC der Fraktionen 1.1-4.3 von SC 3 (DC – System 1)

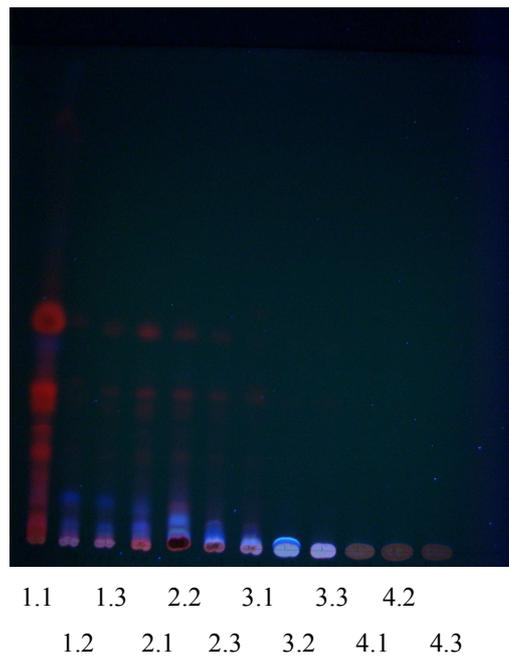


Abb.15: DC der Fraktionen 1.1-5-3 von SC 3  
(DC – System 4)

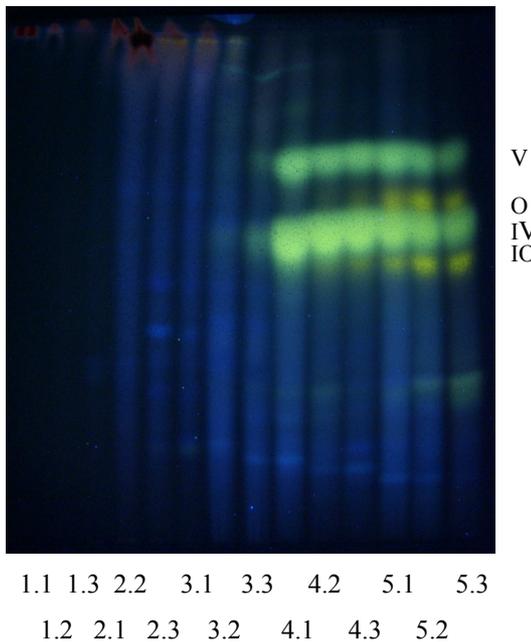
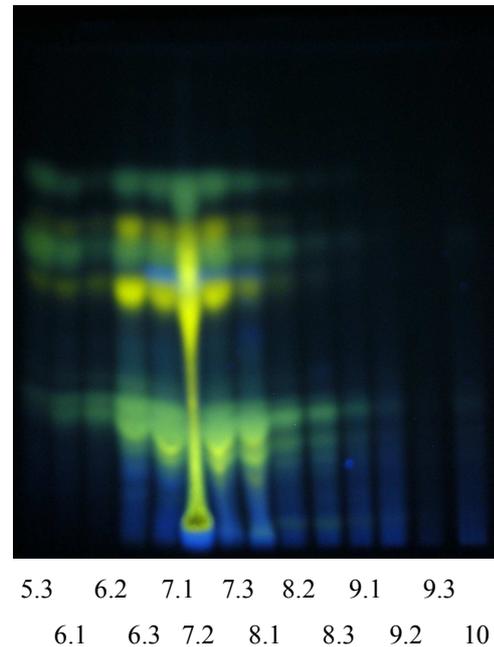


Abb.16: DC der Fraktionen 5.3-10 von SC 3  
(DC – System 4)



Im Gegensatz zu Droge 1 und 2 überwogen in Droge 3 Vitexin und Isovitexin sowie Glykosyle des Apigenins, die in den Fraktionen 6.3 bis 8.1 angereichert waren (Abb. 15+16).

Die Fraktionen der einzelnen Drogen, die das gleiche Flavonoidmuster zeigten, wurden zu Sammelfraktionen vereinigt, alle anderen Fraktionen wurden einzeln aufbewahrt.

Tabelle 10: Übersicht über kombinierte, flavonoidhaltige Fraktionen:

SF	Droge Nr.	Einzelfraktionen	Menge in g	enthält
1/1	1	4.2-5.2	0,275	Flavonoide
1/2	1	5.3-6.2	0,445	Flavonoide
1/3	1	6.3-7.2	0,798	Flavonoide
1/4	1	8.3-10	0,323	Flavonoide
2/1	2	4.2-5.1	0,175	Flavonoide
2/2	2	5.3-6.3	0,339	Flavonoide
2/3	2	7.1-8.1	0,718	Flavonoide
2/4	2	8.2-10	0,383	Flavonoide
3/1	3	4.1-4.3	0,134	Flavonoide
3/2	3	5.1-6.2	0,390	Flavonoide
3/3	3	6.3-7.2	0,580	Flavonoide
3/4	3	7.3/8.1	0,602	Flavonoide
3/5	3	8.2-10	1,079	Flavonoide

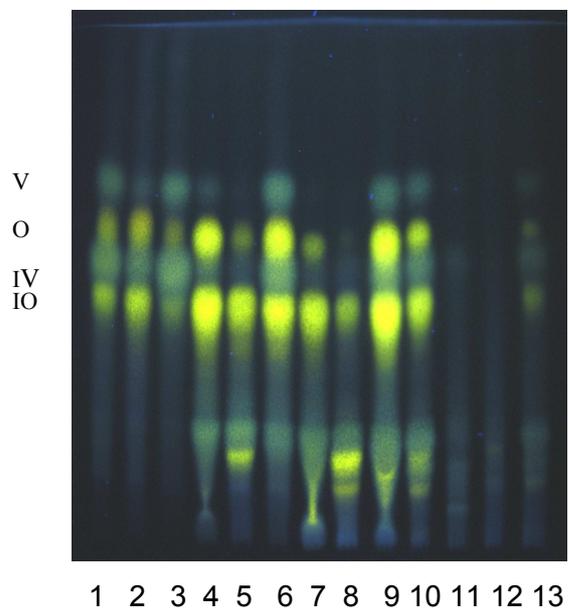
### 3.1.6. DC - Vergleiche der Extrakte und Fraktionen

Alle Sammelfractionen sowie die Extrakte und Fraktionen der Methanolextrakte wurden in den DC Systemen 1 und 4 (siehe S.4) miteinander verglichen.

#### 3.1.6.1. Vergleich des Flavonoidmusters

Die Flavonoide der drei Drogen waren in den Sammelfractionen 1/1 bis 3/5 von SC 1-3 angereichert worden.

Abb.17: DC der Sammelfractionen von SC 1-3 (Detektion in System 4, siehe S.4)

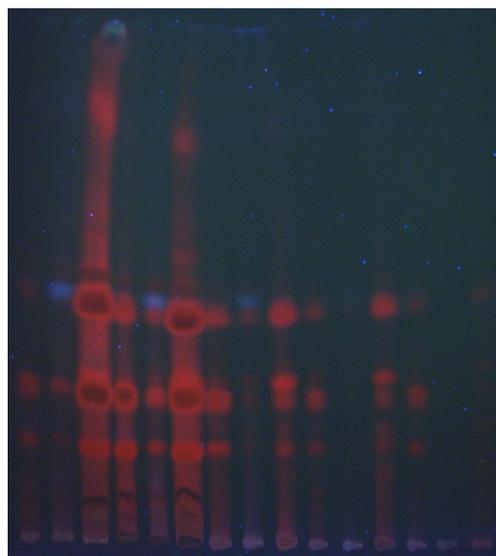


- 1... SF1/Droge 1
- 2... SF1/Droge 2
- 3... SF1/Droge 3
- 4... SF2/Droge 1
- 5... SF2/Droge 2
- 6... SF2/Droge 3
- 7... SF3/Droge 1
- 8... SF3/Droge 2
- 9... SF3/Droge 3
- 10... SF4/Droge 3
- 11... SF4/Droge 1
- 12... SF4/Droge 2
- 13... SF5/Droge 3

In Droge 1 war nur wenig Vitexin und Orientin in mittlerer Menge nachweisbar, während Isovitexin und Isoorientin die Hauptkomponenten darstellten. Polare Apigenin - diglycosyle waren in „SF 4 + 7“ in mittlerer Konzentration enthalten. In Droge 2 war Vitexin kaum nachweisbar, auch Isovitexin und Orientin lagen in niedriger Konzentration vor. Isoorientin war das dominierende Monoglycosid. Den Hauptanteil im Flavonoidmuster von Droge 2 bildeten Diglycosyle des Apigenins und Luteolins. Droge 3 zeigte hohe Konzentrationen von Isovitexin und vor allem Vitexin, Orientin und Isoorientin. Apigenin - diglycosyle waren in großer Menge in „SF 6,9,10“ enthalten.

### 3.1.6.2. Vergleich der apolaren Inhaltsstoffe

Abb.18: DC der apolaren Extrakte und Fraktionen aus den Methanol – Auszügen  
(DC – System 1)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

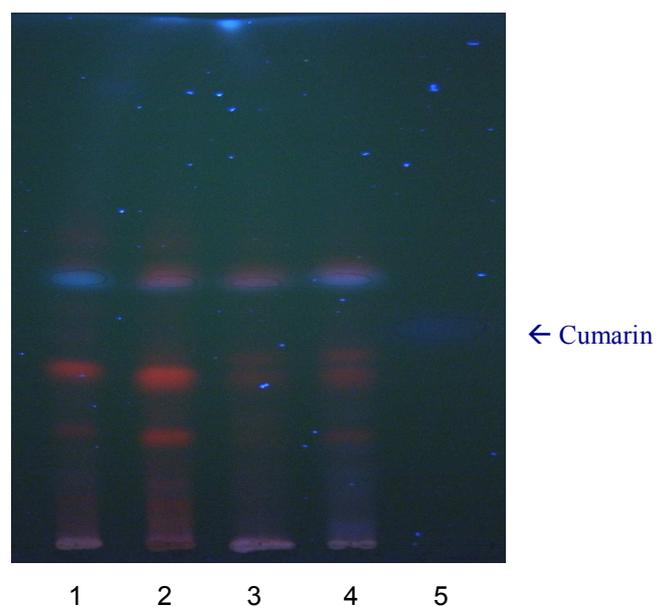
- 1... Petrolether Extrakt/Droge 1
- 2... Petrolether Extrakt/Droge 2
- 3... Petrolether Extrakt/Droge 3
- 4... Chloroform Extrakt/Droge 1
- 5... Chloroform Extrakt/Droge 2
- 6... Chloroform Extrakt/Droge 3
- 7... 1-BuOH Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 1
- 8... 1-BuOH Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 2
- 9... 1-BuOH Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 3
- 10... Petrolether Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 1
- 11... Petrolether Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 2
- 12... Petrolether Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 3
- 13... Chloroform Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 1
- 14... Chloroform Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 2
- 15... Chloroform Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 3

Man kann deutlich erkennen, dass Substanz X (Rf ca. 0,50) lediglich in Auszügen aus Droge Nr. 2 detektierbar war (Abb.18, siehe S.24). In allen untersuchten Fraktionen waren Chlorophylle als Hauptkomponenten erkennbar.

### 3.1.6.3. Vergleich apolarer Extrakte und Fraktionen mit Cumarin

Nun wurden alle Fraktionen, in denen Substanz X enthalten war, mit Cumarin (1mg/ml Methanol) als Vergleich im System 1 (siehe S.4) entwickelt, da in Hb. Passiflorae von einzelnen Autoren [4] größere Mengen an Cumarin beschrieben worden waren.

Abb.19: DC – Vergleich mit Cumarin



- |   |
|---|
| 1... Petrolether Extrakt/Droge 2              |
| 2... Chloroform Extrakt/Droge 2               |
| 3... 1-BuOH Fraktion aus MeOH Extrakt/Droge 2 |
| 4... Fraktion 1.1 von SC 2                    |
| 5... Cumarin                                  |

Man kann deutlich erkennen (Abb.19), dass es sich bei Substanz X (1-4, Rf ca. 0,50) nicht um Cumarin (Rf 0,40), sondern um eine etwas apolarere Verbindung handelt.

### 3.1.7. Fraktionierung des Petrolether – Extrakts von Droge 2

Wie in Abb.19 (siehe S.25) zu sehen ist, ließ sich Substanz X in DC - System 1 (siehe S.4) schlecht von ihren Begleitsubstanzen trennen. Um ein geeignetes Fließmittel für eine weitere Aufreinigung mittels SC zu ermitteln, wurden weitere DC – Systeme (Abb. 20 + 21, System 2 und 3, siehe S.4) getestet.

Abb.20: Vergleich mit Cumarin (System 2)

Abb.21: Vergleich mit Cumarin (System 3)



Für die Abtrennung von Substanz X erwies sich System 3 als besser geeignet.

Da vom Petrolether – Extrakt von Droge 2 500 mg vorhanden waren, entschied man, diese weiter zu fraktionieren, um Substanz X rein darzustellen und einer Strukturbestimmung mittels NMR zuführen zu können (Säule 4, mobile Phasen siehe S.5).

### 3.1.7.1. SC 4

Die Säule wurde zu 85 cm mit Kieselgel (siehe S.5) gefüllt. Das Petroletherextrakt wurde auf 1g KG aufgezogen und auf die stationäre Phase aufgebracht.

Als mobile Phase diente System 1 (siehe S.5). Die Tropfgeschwindigkeit wurde zuerst auf ca. 1 ml / 30 min. eingestellt, ab Fraktion 40 auf 3 ml / 30 min. gesteigert.

Um die Elution zu beschleunigen, wurde ab Fraktion 140 mit der mobilen Phase 2 und ab Fraktion 410 mit der mobilen Phase 3 (siehe S.5) eluiert.

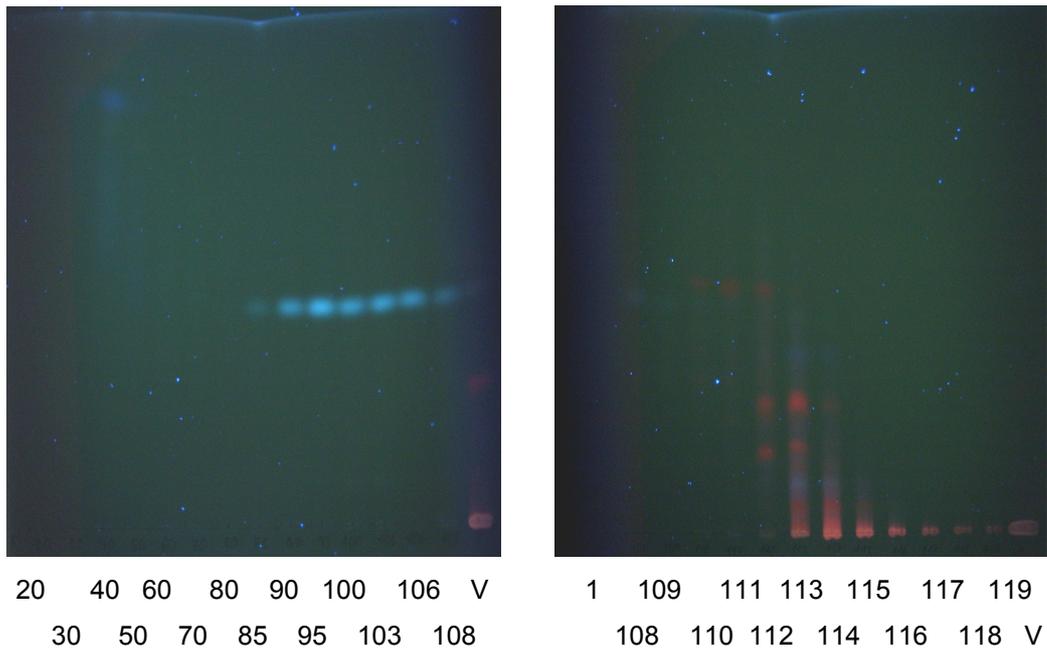
Jede 10. Fraktion, ab Fraktion 80 jede 5. Fraktion und ab Fraktion 108 jede 3. Fraktion, wurde mittels DC in den Systemen 1 und 3 (siehe S.4) kontrolliert. Die Fraktionen 108-119 wurden einzeln getestet.

Insgesamt wurden 747 Fraktionen gesammelt und bei gleichen Inhaltsstoffmustern nach Detektion mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu Sammelfraktionen vereinigt.

### 3.1.7.2. DC Kontrolle von SC 4

In den Fraktionen 40 und 60 war bei Rf 0,83 eine blau fluoreszierende Zone zu erkennen, die Fraktionen 85 – 100 zeigten Substanz X ohne fluoreszierende Begleitstoffe (Abb.22 + 23, siehe S.28).

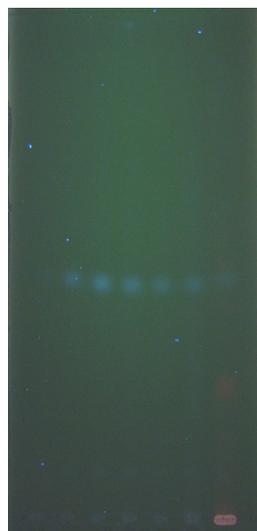
Abb.22 +23: DC von Einzelfraktionen von SC 4 (System 1, siehe S.4)



Um nicht fluoreszierende Komponenten der Fraktionen zu erfassen, erfolgte zusätzlich die Detektion mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Abb.24 + 25).

Abb.24: DC von Sammelfractionen mit Substanz X

Abb.25: DC mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



1 2 3 4 5 6 7



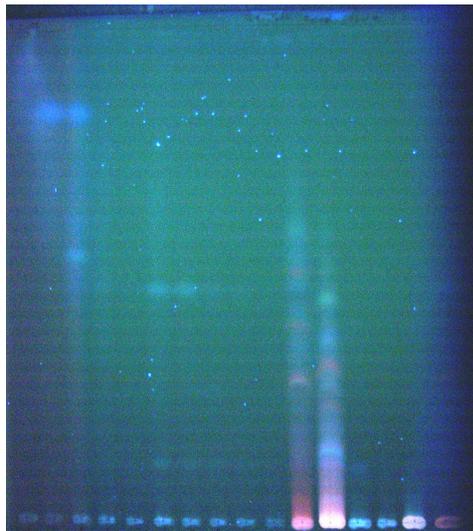
1 2 3 4 5 6 7

1... SF 84-88  
2... SF 89-95  
3... SF 96-99  
4... SF 100-103  
5... SF 104/105  
6... SF 106-108  
7... Vergleich

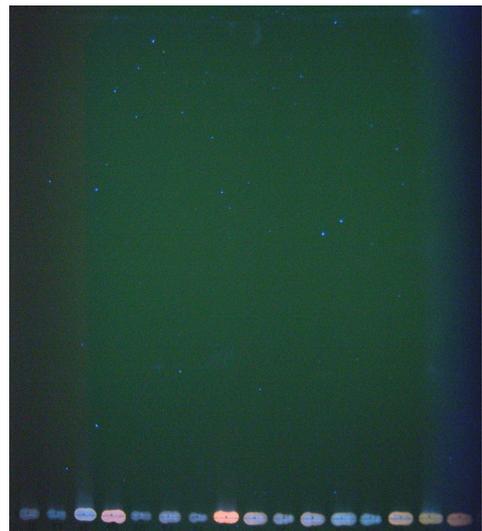
In jeder Fraktion, die Substanz X enthielt, war eine violett gefärbte Substanz bei  $R_f$  von 0,22 erkennbar sowie ein relativ hoher Anteil von Komponenten, die nicht vom Start eluiert wurden (Abb.25, siehe S.28).

Da von den Fraktionen mit Substanz X lediglich 10 mg vorhanden waren, war eine weitere Reinigung nicht möglich.

Abb.26 und 27: DC der Sammelfraktionen von SC 4 (System 1, siehe S.4)

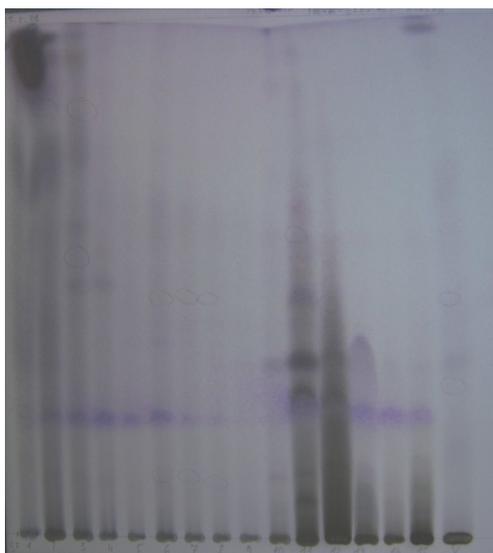


1 3 5 7 9 11 13 15  
2 4 6 8 10 12 14 V

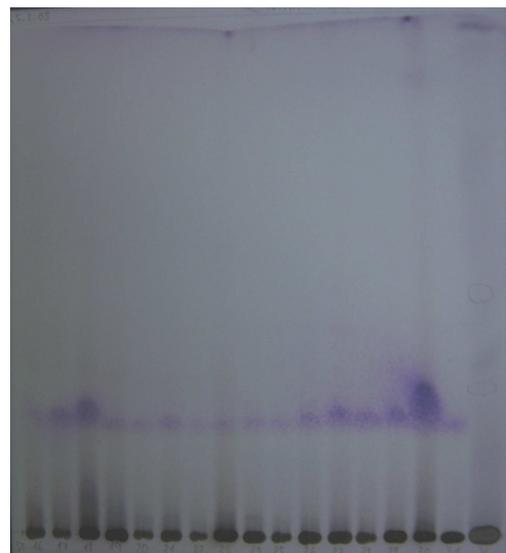


16 18 20 22 24 26 28 30  
17 19 21 23 25 27 29 31

Abb.28 und 29: DC der Sammelfraktionen von SC 4 (Anisaldehyd/ $H_2SO_4$ )



1 3 5 7 9 11 13 15  
2 4 6 8 10 12 14 V



16 18 20 22 24 26 28 30 V  
17 19 21 23 25 27 29 31

Die Fraktionen mit Substanz X wurden farblich hervorgehoben.

Tabelle 11: Sammelfraktionen von SC 4

SF	enthält	Menge in mg
1	1-20	45,2
2	21-40	12,3
3	41-60	7,8
4	61-83	4,6
5	84-88	2,3
6	89-95	2,0
7	96-99	1,3
8	100-103	1,3
9	104/105	0,9
10	106-108	2,2
11	109-112	30,9
12	113-119	50,0
13	120-149	23,5
14	150-169	8,2
15	170-179	21,1
16	180-205	8,1
17	206-229	5,1
18	230-236 + 242-250	7,7
19	237-241	11,8
20	251-254	2,4
21	255-265	4,4
22	266/267	1,2
23	268-274	25,1
24	275-285	4,9
25	286-294	2,7
26	295-310	4,0
27	311-344	6,5
28	345-364	3,1
29	365-409	11,3
30	410-590 + 601-747	37,2
31	591-600	6,8
Rest	ab 747	24,6

## 3.2. Gehaltsbestimmung der Flavonoide

Um die Qualität der verwendeten Drogen besser charakterisieren zu können, wurde der Flavonoidkomplex quantitativ und qualitativ mittels HPLC und Spektrophotometrie untersucht.

### 3.2.1. Photometrische Gesamtgehaltsbestimmung

Die Bestimmung erfolgte gemäß der Vorschrift der Pharm. Eur.

Dazu versetzte man jeweils 0,2 g pulverisierte Droge mit 40 ml 60% igem EtOH und erhitzte die Mischung unter Rückflußkühlung bei 60 °C auf dem Wasserbad. Nach Abkühlen und Filtrieren wiederholte man die Extraktion mit 40 ml 60% igem Ethanol für weitere 10 Minuten. Nach Erkalten wurden die beiden Lösungen in einen 100 ml Messkolben filtriert und mit 60% igem Ethanol aufgefüllt.

#### Untersuchungslösungen:

5,00 ml der jeweiligen Stammlösung wurden zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 10,00 ml einer Mischung von MeOH und 99% iger Essigsäure (10+100) aufgenommen.

Nach Zusatz von 10 ml einer Lösung bestehend aus Borsäure (25g/l) und Oxalsäure (20g/l) in wasserfreier Ameisensäure, wurde mit wasserfreier Essigsäure zu 25,00 ml verdünnt.

#### Kompensationslösungen:

Die Herstellung erfolgte analog der Untersuchungslösung, jedoch setzte man statt Borsäure/Oxalsäure Lösung 10 ml wasserfreier Ameisensäure zu.

Die Absorption der Untersuchungslösung wurde 30 min. später bei 401 nm gegen die Kompensationslösung gemessen. Der Prozentgehalt an Flavonoiden wurde als Vitexin berechnet, wobei eine spezifische Absorption von 628 für Vitexin zugrunde gelegt wurde.

Formel:

$$\% = \frac{A \times 100}{\epsilon \times EW \times 0,2} \quad \epsilon = 628 \text{ (spezifische Absorption)}$$

Tabelle 12: Gesamtflavonoidgehalt von Droge 1-3

Droge	EW in g	Absorption	%
1	0,2000	0,2971	1,18
2	0,2012	0,4610	1,82
3	0,2011	0,5701	2,26

%... Prozent Flavonoide  
 A... Absorption  
 EW... Einwaage

Die Gesamtflavonoidbestimmung zeigte, dass Droge 3 (Herkunft Frankreich) die höchste Flavonoidkonzentration enthielt, die Droge indischen Ursprungs die niedrigste. Mit einem Gesamtflavonoidgehalt von 1,18% entsprach das indische Muster auch nicht dem geforderten Mindestgehalt des Europäischen Arzneibuches von 1,5 % an Flavonoiden.

### 3.2.2. Gehaltsbestimmung der einzelnen Flavonoide mittels HPLC

Mittels HPLC sollte festgestellt werden, wie sich die drei untersuchten Drogen in Bezug auf die Menge ihrer einzelnen Flavonoide unterscheiden.

#### 3.2.2.1. Eichung des Systems

Für die Quantifizierung wurde das HPLC – System für Isovitexin und Isoorientin mit Kämpferol-7-O-neohesperidosid als Standard geeicht. Dazu mussten Stammlösungen hergestellt werden:

Tabelle 13: Stammlösungen für die Eichung

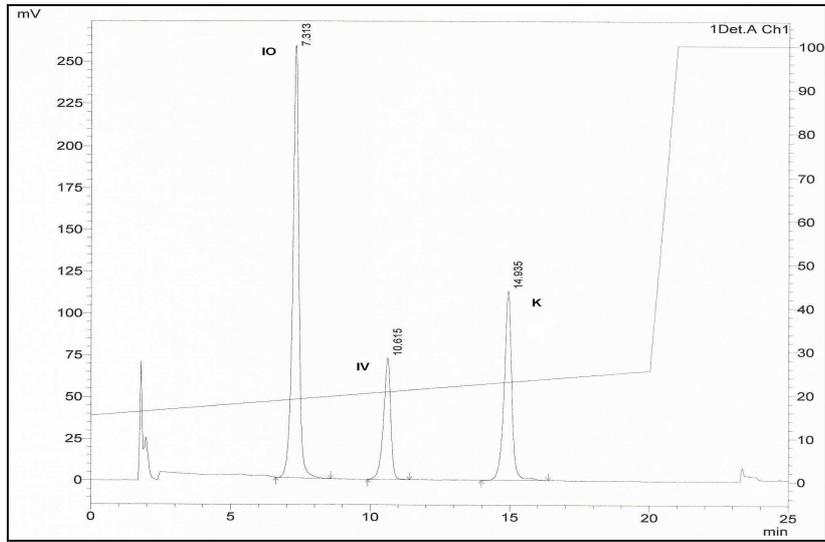
	<b>EW in mg</b>	<b>gelöst in</b>
<b>IV</b>	0,60	2 ml MeOH
<b>IO</b>	0,60	2 ml MeOH
<b>Kämpf. neohesp.</b>	0,61	2 ml MeOH

Es wurden Eichlösungen angefertigt, mit denen die Eichgeraden und die Korrekturfaktoren für Isovitexin und Isoorientin ermittelt wurden.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Eichlösungen

<b>IV</b>	<b>IO</b>	<b>Kämpf.neoh.</b>	<b>entspricht</b>
100	300	200	<b>EL1</b>
200	200	200	<b>EL2</b>
300	100	200	<b>EL3</b>

Abb.30: Beispielchromatogramm Eichlösung 1A



IO... Isoorientin  
IV... Isovitexin  
K... Kämpferol-neohesperidosid (Standard)

### 3.2.2.2. Berechnung der Korrekturfaktoren

Formel:

$$\% = \frac{mg_{fl} \times ar_{St}}{mg_{St} \times ar_{fl}}$$

$cf_{fl}$ ... Korrekturfaktor Flavonoid  
 $mg_{fl}$ ... Einwaage Flavonoid in mg  
 $mg_{St}$ ... Einwaage interner Standard in mg  
 $ar_{St}$ ... Fläche interner Standard  
 $ar_{fl}$ ... Fläche des Flavonoids

Tabelle 15: Korrekturfaktor Isoorientin

Korrekturfaktor für Isoorientin:			
EL	1	2	3
KF a	0,7641	0,7141	0,6972
KF b	0,7977	0,7451	0,6844
Stabw		0,0428	
VK		5,8370	
<b>MW</b>		<b>0,7336</b>	

EL =	Eichlösung
KF =	Korrekturfaktor
Stabw =	Standardabweichung
VK =	Variationskoeffizient
MW =	Mittelwert

Tabelle 16: Korrekturfaktor Isoviteixin

Korrekturfaktor für Isoviteixin:			
EL	1	2	3
KF a	0,8183	0,8920	0,8176
KF b	0,8121	0,8976	0,8207
Stabw		0,0402	
VK		4,7684	
<b>MW</b>		<b>0,8431</b>	

Mit Hilfe der ermittelten Werte wurden die Eichgeraden erstellt.

Für die Erstellung der Geraden wurde der Mittelwert aus beiden HPLC Messungen gebildet.

Abb.31: Eichgerade Isoorientin

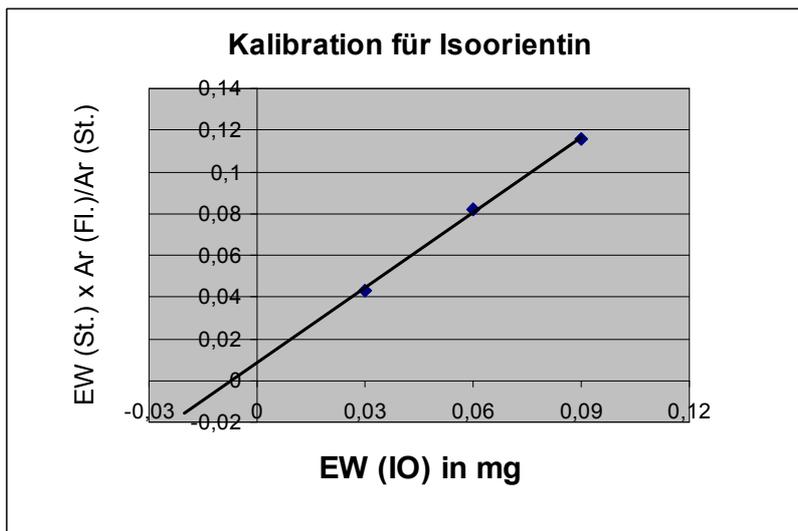
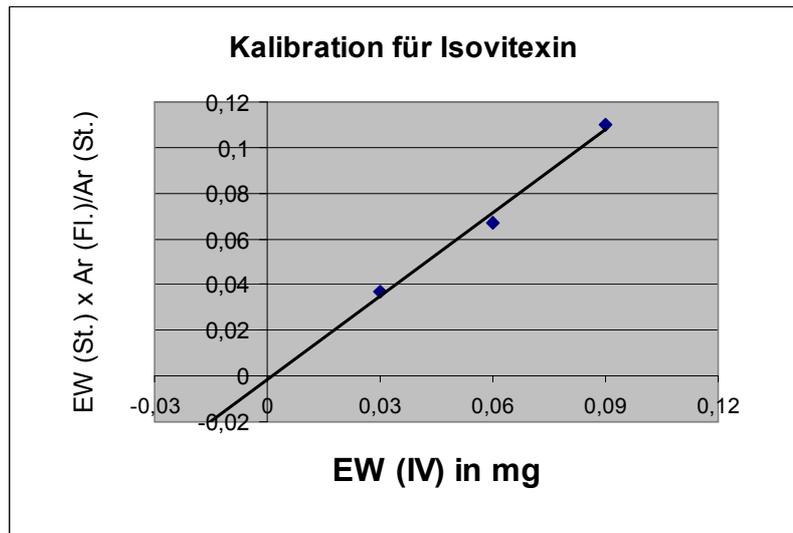


Abb.32: Eichgerade Isovitexin



Die für Isoorientin und Isovitexin erstellten Eichgeraden sind linear und verlaufen annähernd durch den Nullpunkt (Abb.31 + 32, siehe S.36 ff.). Damit konnten sie für die Quantifizierung der Flavonoide herangezogen werden.

### 3.2.2.3. Korrekturfaktoren der Einzelflavonoide

Um den exakten Prozentanteil aller detektierten Einzelflavonoide zu berechnen, wurden die Korrekturfaktoren dieser Komponenten aus dem Molekulargewicht des Flavonoids sowie den Korrekturfaktoren von Isoorientin und / oder Isovitexin ermittelt [3].

Formel:

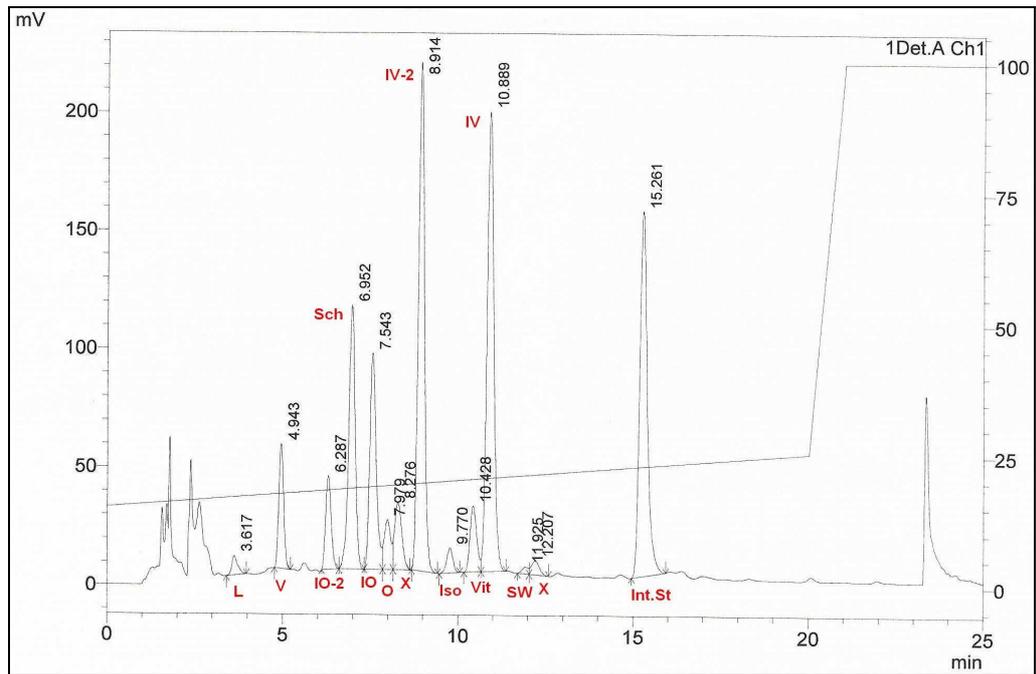
$$\text{KF Flavonoid} = \frac{\text{MG Flav.} \times \text{KF IO(IV)}}{\text{MG IO(IV)}}$$

Tabelle 19: ermittelte Korrekturfaktoren der einzelnen Flavonoide

	MG der Flavonoide	KF	verwendeter KF
Lucenin	610	0,9989	IO
Vicenin	594	1,1593	IV
IO-2"-gl.	610	0,9989	IO
Schaftosid	564	1,1007	IV
IO	448	0,7336	IO
Orientin	448	0,7336	IO
IV-2"-gl.	594	1,1593	IV
Isoscoparin	624	1,1180	(IO+IV)/2
Vitexin	432	0,8431	IV
IV	432	0,8431	IV
Swertisin	446	0,8704	IV

In den HPLC Chromatogrammen aller 3 untersuchten Drogen konnten deutliche quantitative Unterschiede der Einzelkomponenten festgestellt werden (siehe Abb.33-35, S.39 ff.).

Abb.33: HPLC - Chromatogramm Droge 1



Abkürzungen:

- L... Lucenin
- V... Vicenin
- IO-2... Isoorientin-2"-glucosid
- Sch... Schaftosid
- IO... Isoorientin
- O... Orientin
- X... Peak nicht verwendet
- IV-2... Isovitexin-2"-glucosid
- Iso... Isoscoparin
- Vit... Vitexin
- IV... Isovitexin
- SW... Swertisin
- Int. St. ... interner Standard (Kämpferol-neohesperosid)

Abb.34: HPLC - Chromatogramm Droge 2

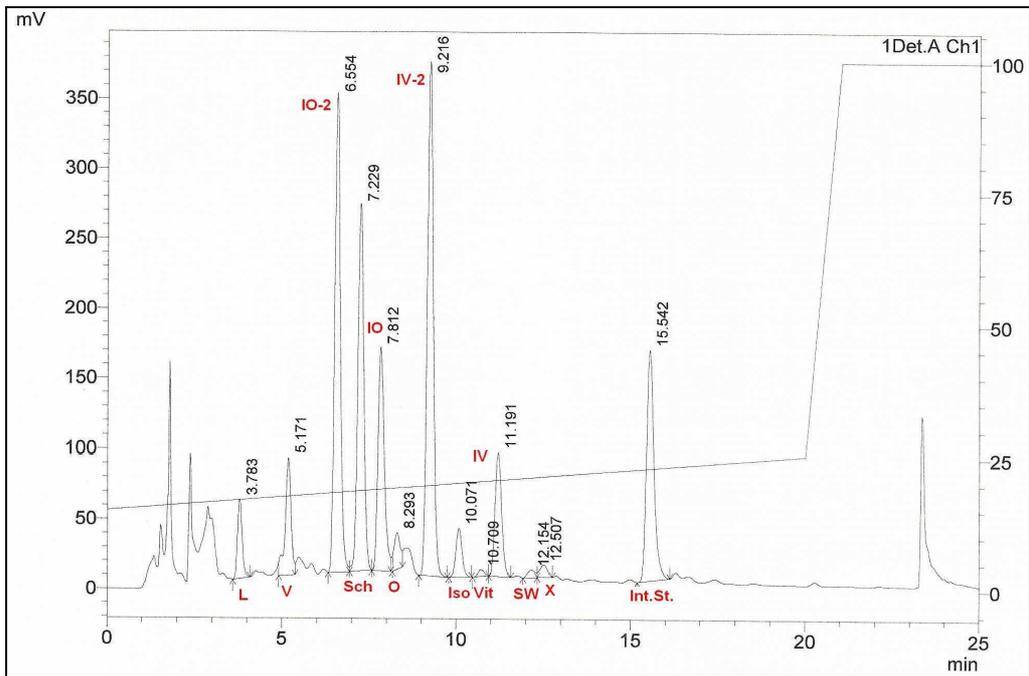
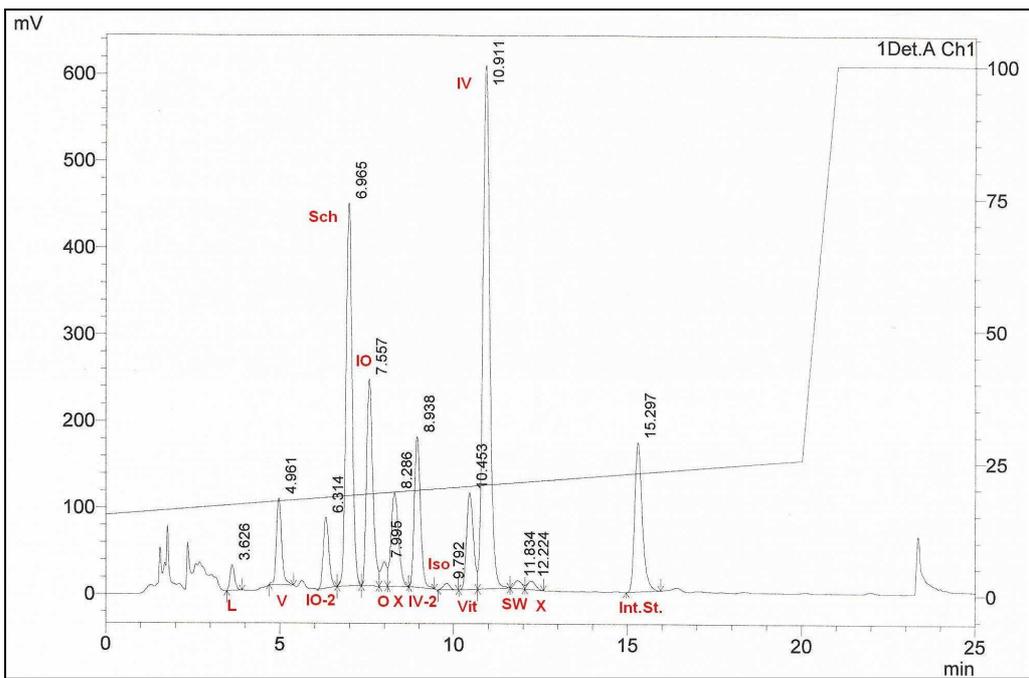


Abb.35: HPLC - Chromatogramm Droge 3



### 3.2.2.4. Berechnung der Einzelflavonoide

Formel:

$$\% = \frac{\text{mg}_{\text{St}} \times \text{Peakfl.}_{\text{Flav.}} \times 100 \times \text{KF}}{\text{Peakfl.}_{\text{Standard}} \times \text{mg}_{\text{Droge}}}$$

Tabelle 18: % der Einzelflavonoide in Droge 1-3

Einzelflavonoide	Droge 1	Droge 2	Droge 3
	%	%	%
Lucenin	0,009	0,051	0,024
Vicenin	0,059	0,11	0,111
IO-2"-gl.	0,044	0,372	0,083
Schaftosid	0,157	0,331	0,538
IO	0,087	0,142	0,200
Orientin	0,021	0,023	0,023
IV-2"-gl.	0,304	0,500	0,225
Isoscoparin	0,015	0,047	0,010
Vitexin	0,032	0,005	0,118
IV	0,223	0,096	0,641
Swertisin	0,003	0,007	0,011
Gesamtgehalt	0,95	1,68	1,98

Droge 1 wies signifikant geringere Konzentrationen von einzelnen Flavonoiden im Flavonoidkomplex auf als die Drogen 2 und 3 (Tabelle 18).

Hauptinhaltsstoffe waren Schaftosid, Isovitexin sowie Isovitexin - 2" - glucosid.

Droge 2 enthielt vor allem die 2"- Glucoside von Isoorientin und Isovitexin sowie Schaftosid, während in Droge 3 neben Schaftosid besonders Isovitexin überwog.

Im Vergleich der drei Drogen fiel auf, dass Schaftosid und IV-2"- glucosid immer unter den Hauptkomponenten zu finden waren. Die im Vergleich zu den anderen Mustern sehr hohen Konzentrationen von IV-2"- glucosid und IO-2"- glucosid in Droge 2 waren überraschend, da diese Droge bereits einige Jahre im Department für Pharmakognosie gelagert worden war. Offensichtlich war es während der Lagerung nicht zu einem Abbau der Diglycoside gekommen.

In Droge 3 aus dem Erntejahr 2006 war das Flavonoidmuster deutlich zugunsten der Monoglycosyle IV und IO verschoben.

Im DC - Vergleich der Sammelfractionen (Abb.17, siehe S.23) waren in Droge 3 die höchsten Konzentrationen von Vitexin und Isovitexin detektiert worden, was durch die HPLC - Messung bestätigt werden konnte. Orientin kam in allen drei

Drogen im gleichen Ausmaß vor, was anhand des DC - Vergleiches nicht zu vermuten war.

Der Gesamtgehalt aus der HPLC - Messung korrelierte mit den Ergebnissen der spektrophotometrischen Bestimmung (Tabelle 12, siehe S.32). Allerdings waren mit der spektrophotometrischen Bestimmung offensichtlich noch kleine Mengen von mittels HPLC nicht bestimmten Flavonoiden erfasst worden. Da laut Pharm. Eur. bei Hb. Passiflorae ein Mindestgehalt von 1,5% an Flavonoiden gefordert wird, entsprach Droge 1 nicht diesem Qualitätskriterium.

## 4. Zusammenfassung

Extrakte aus *Passiflora incarnata* werden vielfach als Anxiolytika und Sedativa eingesetzt. Trotz pharmakologischer Untersuchungen weiß man bis heute nicht, welcher der Inhaltsstoffe für die Wirksamkeit verantwortlich ist.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, ein nicht näher definiertes „Benzoflavin“, das als Wirkstoff beschrieben worden war [2], in ausreichender Menge zu isolieren, um seine Struktur mittels NMR Untersuchungen aufklären zu können.

Dazu wurden drei Drogen unterschiedlicher Herkunft auf dieselbe Weise wie beschrieben [2] extrahiert und die gewonnenen Methanolextrakte einer Fraktionierung mittels Vacuum Liquid Chromatographie unterzogen.

In DC - Vergleichen der einzelnen Fraktionen, Sammelfraktionen und Extrakte konnten die beschriebenen [2] blau bzw. türkis fluoreszierenden Banden ( $R_f$  0,65 bzw. 0,67) nicht detektiert werden.

Da von 2 der 3 Muster nicht ausreichend Drogenmaterial zur Verfügung stand, konnte eine Extraktion im größeren Maßstab nicht durchgeführt werden. Die Resultate dieser Versuche machten aber deutlich, dass die Komponenten in verschiedenen Mustern offensichtlich in so geringer Konzentration vorhanden sind, dass sie nicht alleine für die Wirkung verantwortlich sein können.

In Droge 2 (italienisches Pflanzenmaterial) wurde eine Substanz mit  $R_f$  ca. 0,50 detektiert, die in ihrer Fluoreszenz dem „Benzoflavin“ entsprach (= Substanz X). Durch einen DC - Vergleich wurde nachgewiesen, dass es sich bei Substanz X nicht um Cumarin handelt und X etwas apolarer als Cumarin ist.

Um Substanz X anzureichern und die Struktur mittels NMR Untersuchung aufklären zu können, wurde das Petrolether Extrakt von Droge 2, (500 mg), einer Fraktionierung durch Säulenchromatographie unterzogen.

Es konnten 10 mg der Substanz angereichert werden, diese waren aber mit einer im UV-Licht nicht fluoreszierenden und nach Besprühen mit Anisaldehyd/ $H_2SO_4$  – Reagens violett gefärbten Verbindung stark verunreinigt.

Eine Extraktion einer größeren Menge an Pflanzenmaterial wäre notwendig, um mehr Ausgangsmaterial für eine Reindarstellung von Substanz X zur Verfügung zu haben.

Die Qualität der im Rahmen der Diplomarbeit verwendeten Muster von *Passiflorae herba* wurde durch die spektrophotometrische Bestimmung des Flavonoidgesamtgehalts entsprechend dem Europäischen Arzneibuch überprüft.

In Droge 1 (indische Herkunft) wurden mit 1,18% die niedrigsten und in Droge 3 (Herkunft Frankreich) mit 2,26% die höchsten Konzentrationen an Flavonoiden nachgewiesen.

Die Gehaltsbestimmung der Einzelflavonoide mittels HPLC korrelierte mit den Ergebnissen der spektrophotometrischen Untersuchung.

In Droge 1, die aufgrund des niedrigen Gesamtflavonoidgehaltes nicht den Anforderungen des Arzneibuchs entsprach, dominierten IV und IV-2"- glucosid, in Droge 2 vor allem IV- und IO-2"- glucosid, in Droge 3 Schaftosid und IV.



## 5. Literaturverzeichnis

[1] Dhawan K., Dhawan S., Sharma A. (2004) Passiflora: a review update. Journal of Ethnopharmacology 94, 1-23

[2] Dhawan K., Kumar S., Sharma A. (2001) Anti-anxiety studies on extracts of Passiflora incarnata Linneaus. Journal of Ethnopharmacology 78, 165-170

[3] Rahman K.J.H. (1997) Characterisation and quantification of flavonoids in Herba Passiflorae. Dissertation Universität Wien, 133-140

[4] Koch H., Steinegger E. (1980) Planta Med 39: 210-211

## Lebenslauf

Name: Walter Andreas Amberger  
Adresse: Gileckgasse 12  
3100 St. Pölten  
geboren am: 8. Oktober 1982  
Eltern: Walter und Regina Amberger  
Bildungsweg: von 1989 – 1993 Besuch der Volksschule  
ab 1993 Besuch des BG/BRG St. Pölten (neusprachlicher  
Zweig)  
Matura im Juni 2001  
Studium der Pharmazie an der Universität Wien seit  
Oktober 2002