



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Phytochemische Untersuchungen am Baumfarn *Metaxya rostrata*

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Barbara Merkinger
Studienrichtung /Studienzweig
(lt. Studienblatt): Pharmazie
Betreuerin / Betreuer: ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Wien, im Juni 2010

Danksagung

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

Frau ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn danke ich für die Bereitstellung des Themas und die unkomplizierte Betreuung während der gesamten Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Mag. Kerstin Kainz für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft bei allen Fragen.

Besonders danke ich meiner Familie, die mich während des Studiums nicht nur in finanzieller Hinsicht immer unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Material und Methoden	3
2.1	Material	3
2.1.1	Extrakte einer vorangegangenen Dissertation	3
2.1.2	Blattmaterial	3
2.2	Accelerated Solvent Extraction (ASE)	3
2.3	Säulenchromatographie (SC)	4
2.4	Vacuum Liquid Chromatography (VLC)	4
2.5	Dünnschichtchromatographie (DC)	5
2.5.1	Stationäre und mobile Phasen	5
2.5.2	Detektionsmethoden	6
2.5.2.1	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AASS)	6
2.5.2.2	Naturstoffreagenz A und PEG 400 (NR/PEG)	6
2.6	NMR-Spektroskopie	6
3	Ergebnisse	7
3.1	Aufarbeitung des Dichlormethanextrakts des Rhizoms	7
3.1.1	SC 1	7
3.1.2	Dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgewählter Sammelfractionen	11
3.1.2.1	Sterole und Fettsäuren	11
3.1.2.2	Caryophyllen	13
3.1.2.3	Flavonoide	13
3.1.3	SC 2	14
3.2	Herstellung des Dichlormethanextrakts der Blätter	16
3.3	Aufarbeitung des Dichlormethanextrakts der Blätter	18
3.3.1	SC 3 (VLC)	18
3.3.2	Dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgewählter Sammelfractionen	22

3.3.2.1	β-Carotin.....	22
3.3.2.2	β-Sitosterol	23
3.3.2.3	SF 1, SF 2, SF 3 von SC 3 und SF 1 von SC 1	24
3.3.3	SC 4.....	26
3.3.4	Aufarbeitung der SF 20 von SC 3.....	28
3.3.4.1	Fraktionierung der SF 20 von SC 3	28
3.3.4.2	SC 5.....	30
3.4	NMR-Spektroskopie.....	32
4	Diskussion der Ergebnisse.....	37
5	Zusammenfassung	39
6	Summary	40
7	Abkürzungsverzeichnis	41
8	Abbildungsverzeichnis	42
9	Tabellenverzeichnis.....	43
10	Literaturverzeichnis.....	44
	Curriculum vitae	47
	Anhang	49

1 Einleitung und Problemstellung

Der Baumfarn *Metaxya rostrata* (Kunth C. Presl) aus der Familie der Metaxiaceae ist in Flachlandregenwäldern Mittelamerikas und Teilen des nordwestlichen Südamerikas beheimatet. In Costa Rica wird *Metaxya rostrata* ethnomedizinisch als Arzneipflanze zur Behandlung von Ulcera und Geschwüren des Magen-Darm-Trakts eingesetzt. Die dabei verwendete Arzneiform ist eine wässrige Suspension des getrockneten Rhizoms [1].

Abbildung 1: *Metaxya rostrata* (Kunth C. Presl) [3]



Metaxya rostrata wurde aufgrund der ethnomedizinischen Verwendung einer bioassay-geleiteten Untersuchung zur Isolierung von Komponenten mit zytotoxischem Potential gegenüber Kolonkrebsezelllinien unterzogen. Bisher konnte das Vorliegen zweier zytotoxischer, trimerer Proanthocyanidine, nämlich Aesculitannin B und Cinnamtannin B-1, sowie von Sterolen, phenolischen Komponenten und Sacchariden im Rhizom gezeigt werden [1]. Da nur wenig phytochemisches Wissen über diese Pflanze existiert, ist aber auch die Fraktionierung von Extrakten bzw. die Isolierung von Reinsubstanzen mit geringer oder fehlender zytotoxischer Wirkung von Interesse.

Im Rahmen vorangegangener Dissertationen [2,3] wurde das Pflanzenmaterial in Rhizom, Seitenwurzeln und Blätter unterteilt und mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität, nämlich Wasser, Methanol, Ethylacetat und Dichlormethan, extrahiert, um ein möglichst breites Inhaltsstoffspektrum zu untersuchen.

Abbildung 2: Pflanzenmaterial von *Metaxya rostrata*

links: Rhizom, Mitte: Seitenwurzeln, rechts: Blätter [3]



Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation [3] hergestellten Dichlormethanextrakt des Rhizoms und einen zum Teil aus einer vorangegangenen Dissertation [3] stammenden, zum Teil neu hergestellten Dichlormethanextrakt der Blätter, mittels Säulenchromatographie bzw. Vacuum Liquid Chromatography zu fraktionieren und gegebenenfalls Reinsubstanzen zu isolieren, deren Strukturen mittels NMR-Spektroskopie geklärt werden sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Extrakte einer vorangegangenen Dissertation

Es wurde ein Dichlormethanextrakt des Rhizoms, der im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation [3] hergestellt worden war, fraktioniert. Ein Dichlormethanextrakt der Blätter, der ebenfalls im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation [3] hergestellt worden war, wurde mit einem neu hergestellten Dichlormethanextrakt der Blätter vereinigt.

2.1.2 Blattmaterial

Es stand 1 kg getrocknete Blätter von *Metaxya rostrata* zur Verfügung, das 2008 in der Umgebung von La Gamba in Costa Rica gesammelt worden war.

2.2 Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Die Extraktion des getrockneten, pulverisierten Blattmaterials erfolgte mit einem ASE 200 – Accelerated Solvent Extractor (Dionex). Für die Extraktion wurde folgende Methode verwendet:

Tabelle 1: Methode der Accelerated Solvent Extraction

heat	5 min
static	2 min
flush	10 %
purge	60
pressure	150 bar
temperature	40 °C

Jede Zelle durchlief drei Extraktionszyklen. Als Extraktionsmittel diente Dichlormethan.

2.3 Säulenchromatographie (SC)

Der Dichlormethanextrakt des Rhizoms wurde mittels Säulenchromatographie fraktioniert. Ausgewählte Fraktionen dieses Extrakts sowie des fraktionierten Dichlormethanextrakts der Blätter wurden mittels Säulenchromatographie aufgetrennt, um enthaltene Verbindungen aufzureinigen.

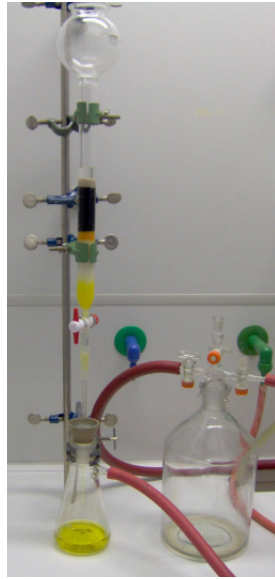
Als stationäre Phasen wurden Kieselgel 60 oder Sephadex[®] LH-20 verwendet, als mobile Phasen dienten verschiedene Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische. Die verwendeten stationären und mobilen Phasen sind in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

Es wurde jede zehnte bzw. fünfte Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht. Entsprechend der Zusammensetzung wurden die Fraktionen zu Sammelfractionen vereinigt.

2.4 Vacuum Liquid Chromatography (VLC)

Die säulenchromatographische Trennung wird durch Anlegen eines Vakuums an die Säule beschleunigt.

Der Dichlormethanextrakt der Blätter wurde mittels Vacuum Liquid Chromatography fraktioniert. Der Extrakt wurde in Chloroform gelöst und mit der vierfachen Menge an Kieselgel aufgeschlämmt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der auf das Kieselgel aufgezogene Extrakt trocken auf die mit achtfacher Menge Kieselgel (bezogen auf den Extrakt) befüllte Säule aufgebracht.

Abbildung 3: Vacuum Liquid Chromatography

Als stationäre Phase diente ICN Silica TSC, 60A. Als Fließmittel wurden anfangs Petrolether-Chloroform-Gemische, in weiterer Folge Chloroform-Methanol-Gemische steigender Polarität verwendet.

2.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

2.5.1 Stationäre und mobile Phasen

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)
Schichtdicke 0,25 mm

mobile Phasen:

- A: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (10 : 4 : 1)
- B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)
- C: Chloroform – Methanol – Wasser (90 : 3,5 : 0,2)
- D: Chloroform – Methanol – Wasser (85 : 8 : 0,5)
- E: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton
(13 : 4 : 2 : 1)
- F: Petrolether – Toluol – Ethylacetat (13 : 4 : 2)
- G: Petrolether – Toluol – Ethylacetat (13 : 2 : 1)
+ 1 Tropfen Trifluoressigsäure
- H: Petrolether – Chloroform (8 : 2)
- I: Petrolether

2.5.2 Detektionsmethoden

2.5.2.1 Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (AASS)

Es werden 85 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure vorsichtig gemischt und abkühlen gelassen. Danach werden 0,5 ml Anisaldehyd zugesetzt. Nach Besprühen der DC-Platten wird im Trockenschrank 5-10 min auf 100 °C erhitzt. Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht [4]. AASS wird als allgemeines Detektionsreagens verwendet. Es färben sich unter anderem Sterole, Terpene und Zucker.

2.5.2.2 Naturstoffreagenz A und PEG 400 (NR/PEG)

Die DC-Platten werden nacheinander mit 1%iger methanolischer Naturstoffreagenz-A-Lösung (=Diphenylboryloxyethylamin) und 5%iger ethanolischer Polyethylenglykol-400-Lösung besprüht. Die Auswertung erfolgt unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm [4]. Mit NR/PEG werden Phenole bzw. Phenolcarbonsäuren erfasst.

2.6 NMR-Spektroskopie

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

Messfrequenz: 600,13 MHz für ^1H -NMR bzw. 150,92 MHz für ^{13}C -NMR

Messtemperatur: 298 K

Lösungsmittel: CDCl_3

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

3 Ergebnisse

3.1 Aufarbeitung des Dichlormethanextrakts des Rhizoms

3.1.1 SC 1

Aus einer vorangegangenen Dissertation [3] standen 1,1 g Dichlormethanextrakt des Rhizoms (DCME R) zur Verfügung. Dieser Extrakt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 aufgetrennt.

Durchmesser: 3 cm

Füllhöhe: 92 cm

stationäre Phase: Kieselgel 60

mobile Phase: Gradientenelution mit Chloroform-Methanol-Wasser-Gemischen (siehe Tab. 2)

Auftragsmenge: 1,1 g DCME R aufgezogen auf 2 g Kieselgel

Tabelle 2: Fließmittelgemische der SC 1

Fraktionen	Zusammensetzung der mobilen Phase in Teilen		
	CHCl ₃	MeOH	H ₂ O
1 bis 305	95	1,5	0,1
306 bis 515	85	8	0,5
Nachlauf	70	22	3,5

Es wurden 515 Fraktionen zu je ca. 10 ml/30 min gesammelt.

Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt (siehe Tab. 3, Seite 8).

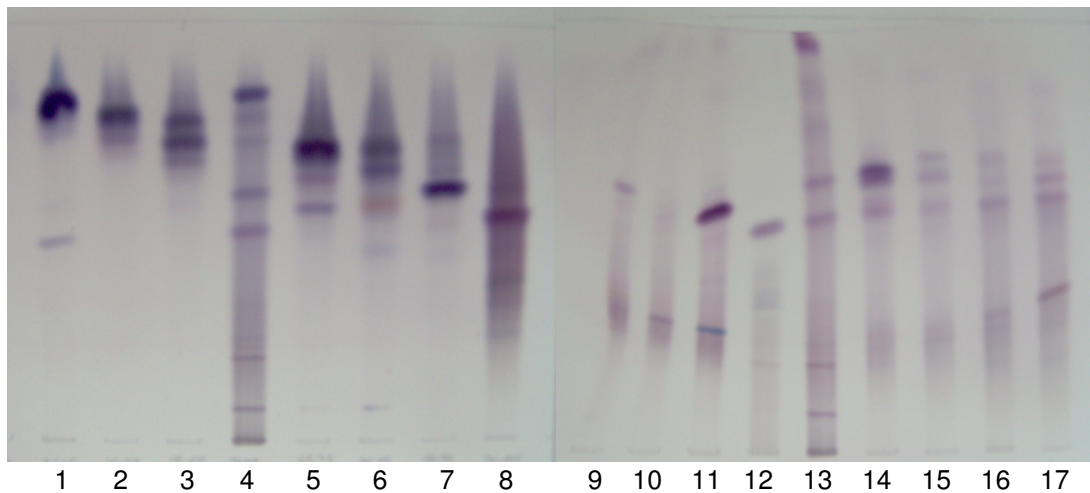
Tabelle 3: Sammelfractionen der SC 1

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)
1	1 – 45	95,8
2	46 – 55	31,0
3	56 – 65	27,8
4	66 – 75	13,1
5	76 – 85	11,2
6	86 – 95	22,2
7	96 – 105	285,1
8	106 – 135	76,1
9	136 – 145	17,2
10	146 – 155	58,7
11	156 – 205	102,1
12	206 – 225	13,3
13	226 – 245	11,9
14	246 – 255	7,7
15	256 – 275	13,1
16	276 – 345	41,1
17	346 – 425	45,8
18	426 – 445	45,9
19	446 – 455	15,8
20	456 – 465	10,3
21	466 – 485	13,7
22	486 – 515	22,0
23	Nachlauf	119,1

Von diesen Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 4 bis 7, Seiten 9 und 10).

Abbildung 4: DC der SF der SC 1, Detektion mit AASS, Teil 1

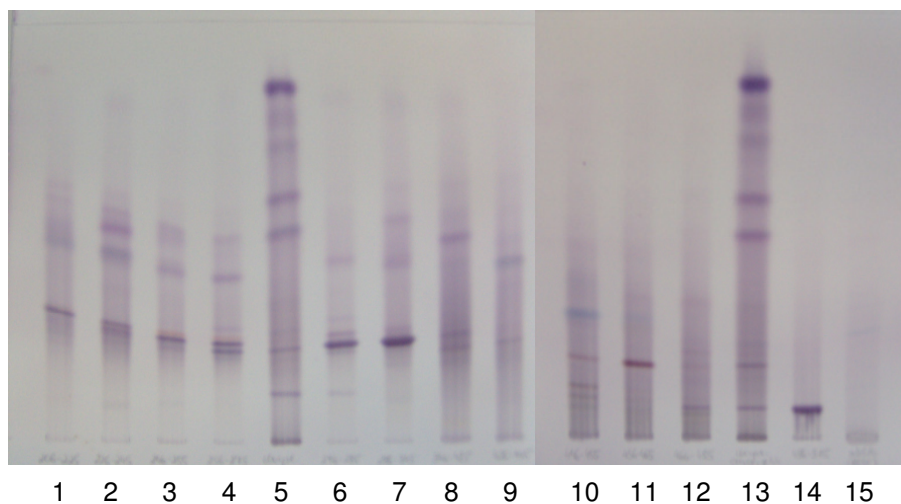
stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase A: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (10 : 4 : 1)



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	SF 1	7	SF 6	13	DCME R
2	SF 2	8	SF 7	14	SF 10
3	SF 3	9	SF 8a (106-125)	15	SF 11a (156-175)
4	DCME R	10	SF 8b (126-135)	16	SF 11b (176-185)
5	SF 4	11	SF 9	17	SF 11c (186-205)
6	SF 5	12	β-Sitosterol		

Abbildung 5: DC der SF der SC 1, Detektion mit AASS, Teil 2

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase A: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (10 : 4 : 1)

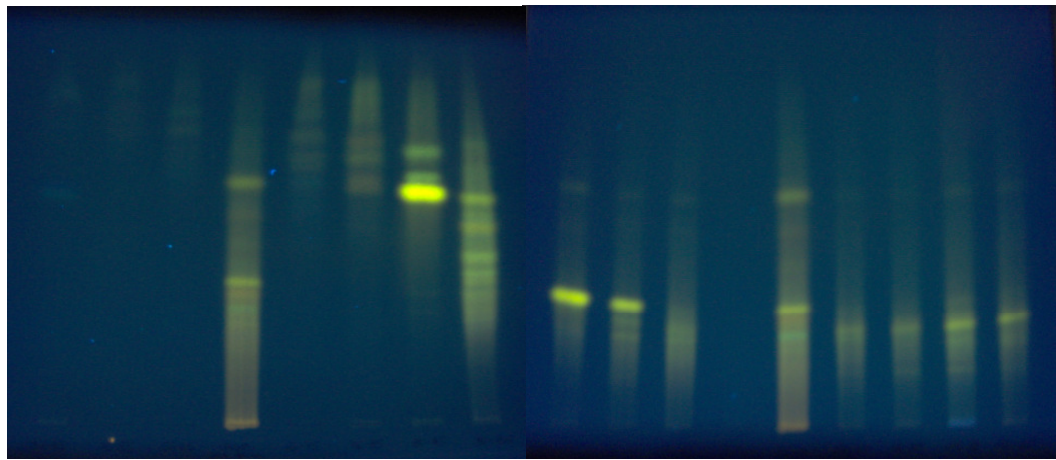


Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	SF 12	6	SF 16a (276-285)	11	SF 20
2	SF 13	7	SF 16b (286-345)	12	SF 21
3	SF 14	8	SF 17	13	DCME R
4	SF 15	9	SF 18	14	SF 22
5	DCME R	10	SF 19	15	SF 23

3 Ergebnisse

Abbildung 6: DC der SF der SC 1, Detektion mit NR/PEG, Teil 1

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase A: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (10 : 4 : 1)

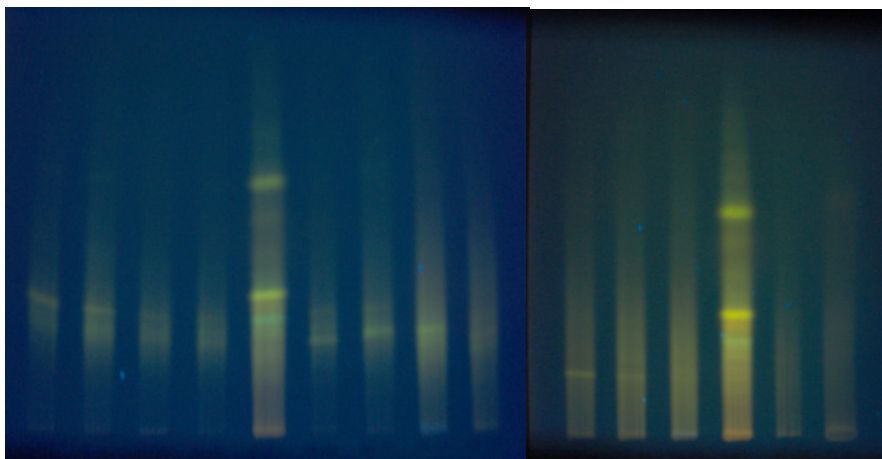


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	SF 1	7	SF 6	13	DCME R
2	SF 2	8	SF 7	14	SF 10
3	SF 3	9	SF 8a (106-125)	15	SF 11a (156-175)
4	DCME R	10	SF 8b (126-135)	16	SF 11b (176-185)
5	SF 4	11	SF 9	17	SF 11c (186-205)
6	SF 5	12	β-Sitosterol		

Abbildung 7: DC der SF der SC 1, Detektion mit NR/PEG, Teil 2

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase A: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (10 : 4 : 1)



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

Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	SF 12	6	SF 16a (276-285)	11	SF 20
2	SF 13	7	SF 16b (286-345)	12	SF 21
3	SF 14	8	SF 17	13	DCME R
4	SF 15	9	SF 18	14	SF 22
5	DCME R	10	SF 19	15	SF 23

Bei der Detektion mit AASS zeigte sich, dass in allen Sammelfractionen terpenoide Verbindungen enthalten waren, die sich violett färbten. Den Hauptanteil enthielten die Sammelfractionen 1 bis 7, in denen Verbindungen mit Rf-Werten zwischen 0,90 und 0,50 detektiert wurden.

Bei der Detektion mit NR/PEG war zu erkennen, dass phenolische Komponenten ab SF 5 eluiert worden waren. Auffällig waren die ausgeprägten Hauptkomponenten in SF 6 bei Rf ca. 0,60 und in SF 8 bei Rf ca. 0,35, deren Banden bereits im unfraktionierten Extrakt sichtbar gewesen waren. Die übrigen Sammelfractionen enthielten eher diffus anfärbbare Gemische.

Aufgrund der vorhandenen Mengen und des Vorliegens deutlicher Hauptkomponenten schien eine weitere Auftrennung der SF 1 mit dem Ziel der Isolierung der mit AASS violetten Komponente bei Rf ca. 0,83, der SF 6 mit dem Ziel der Isolierung der mit NR/PEG gelb fluoreszierenden bzw. mit AASS violetten Komponente bei Rf ca. 0,60 und der SF 8 mit dem Ziel der Isolierung der mit NR/PEG gelb fluoreszierenden Komponente bei Rf ca. 0,35 zielführend.

3.1.2 Dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgewählter Sammelfractionen

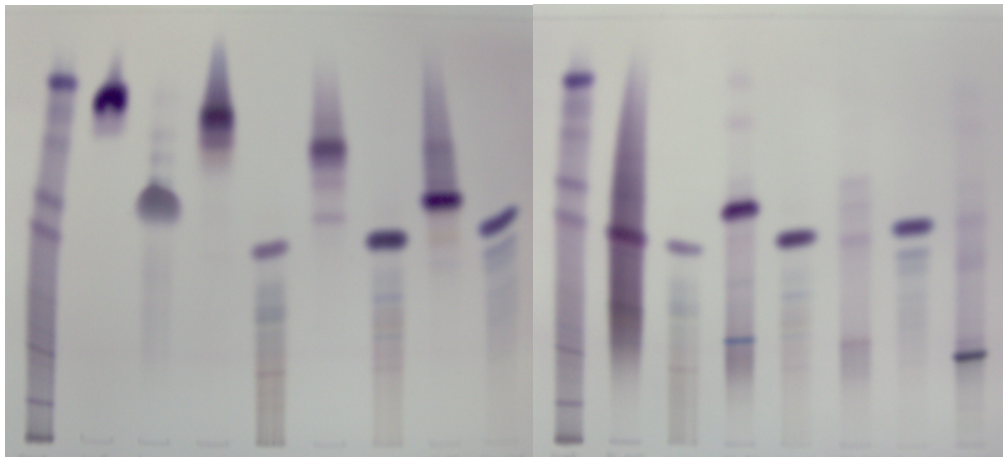
3.1.2.1 Sterole und Fettsäuren

Da das Vorliegen von Sterolen im Rhizom von *Metaxya rostrata* bereits gezeigt worden war [2] und auch aufgrund der Färbung mit AASS vermutet werden konnte, dass einige Sammelfractionen Sterole oder Fettsäuren enthielten, wurden mehrere Sammelfractionen zum Vergleich mit Sterolen und Fettsäuren herangezogen (siehe Abb. 8 und 9, Seite 12).

3 Ergebnisse

Abbildung 8: DC-Vergleich ausgewählter SF der SC 1 mit Sterolen und Ölsäure

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase A: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (10 : 4 : 1)
Detektion mit AASS

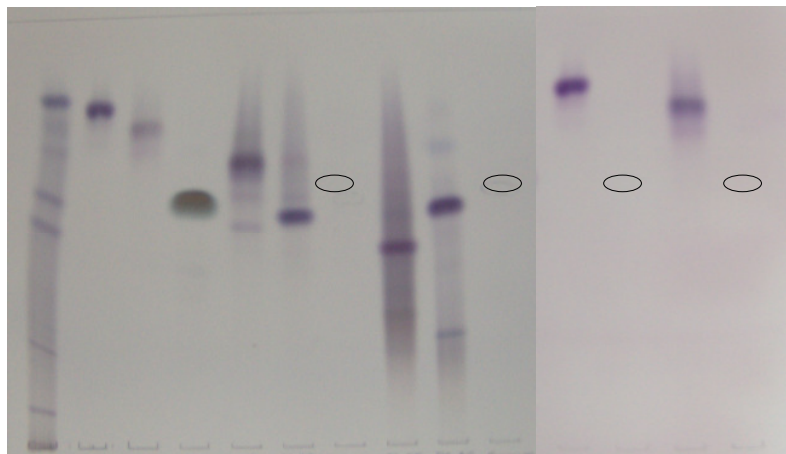


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	DCME R	7	Stigmasterol	13	SF 9
2	SF 1	8	SF 6	14	Stigmasterol
3	Ölsäure	9	Fucosterol	15	SF 11
4	SF 2	10	DCME R	16	Fucosterol
5	β-Sitosterol	11	SF 7	17	SF 16
6	SF 4	12	β-Sitosterol		

Abbildung 9: DC-Vergleich ausgewählter SF der SC 1 mit Fettsäuren

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase A: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (10 : 4 : 1)
Detektion mit AASS



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

Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	DCME R	6	SF 6	11	SF 1
2	SF 1	7	Behensäure	12	Stearinsäure
3	SF 2	8	SF 7	13	SF 2
4	Linolsäure	9	SF 9	14	Laurinsäure
5	SF 4	10	Arachinsäure		

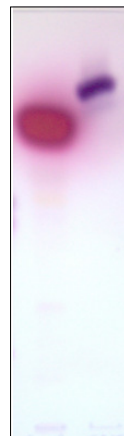
Mit Ausnahme von SF 7, deren Hauptkomponente im verwendeten DC-System einen identischen Rf-Wert wie β -Sitosterol aufwies, konnte für alle ausgewählten Sammelfractionen ausgeschlossen werden, dass es sich bei den jeweiligen Hauptkomponenten um eine der Vergleichssubstanzen handelte.

3.1.2.2 Caryophyllen

Um einen Vergleich mit einem niedermolekularen Terpen zu haben, wurde als Referenz auch das Sesquiterpen Caryophyllen herangezogen (siehe Abb. 10).

Abbildung 10: DC-Vergleich von SF 1 von SC 1 mit Caryophyllen

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase C: Chloroform – Methanol – Wasser (90 : 3,5 : 0,2)
Detektion mit AASS



1 2

Bahn	aufgetragene Substanz
1	Caryophyllen
2	SF 1

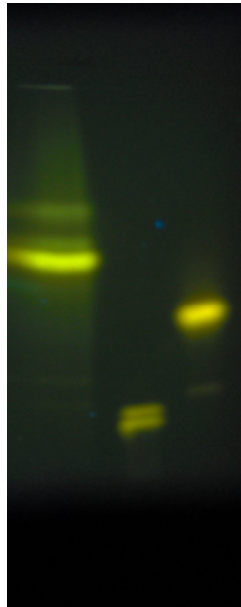
3.1.2.3 Flavonoide

Bei der Detektion mit Naturstoffreagenz A und PEG zeigte SF 6 von SC 1 eine Hauptkomponente bei Rf ca. 0,60 mit gelber Fluoreszenz. Deshalb wurde vermutet, dass es sich um ein Flavonoid handeln könnte. Als Vergleichs-

substanzen wurden apolare Flavonoide verwendet, da diese in der Polarität der apolaren Komponente entsprachen (siehe Abb. 11).

Abbildung 11: DC-Vergleich von SF 6 von SC 1 mit apolaren Flavonoiden

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase A: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (10 : 4 : 1)
Detektion mit NR/PEG



1 2 3

Bahn	aufgetragene Substanz
1	SF 6
2	3-Methylkämpferol und 3,3'-Dimethylquercetin
3	3,7,3',4'-Tetramethylquercetin

Der Vergleich ließ erkennen, dass die Komponente noch apolarer als die verwendeten apolaren Flavonoide war, was eventuell auf zusätzliche Methylierungen hinweisen könnte.

3.1.3 SC 2

Die bei Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens violette Hauptkomponente in SF 1 von SC 1 bei Rf ca. 0,83 hatte keiner Vergleichssubstanz entsprochen (siehe Kap. 3.1.2.1 und 3.1.2.2, Seiten 11 bis 13) und

schien nur einen geringen Anteil störender Begleitstoffe zu enthalten. Deshalb sollte diese Komponente mittels Säulenchromatographie isoliert werden.

Durchmesser: 1 cm

Füllhöhe: 67 cm

stationäre Phase: Kieselgel 60

mobile Phase: Chloroform – Methanol – Wasser (95 : 1,5 : 0,1)

Auftragsmenge: 90 mg SF 1 von SC 1 aufgezogen auf 190 mg Kieselgel

Es wurden 19 Fraktionen zu ca. 3 ml/30 min gesammelt. Entsprechend ihrer Zusammensetzung wurden die Fraktionen zu Sammelfraktionen vereinigt:

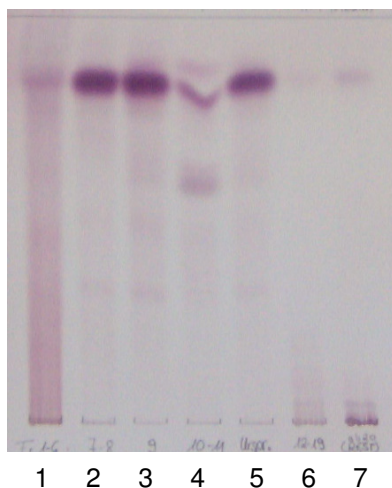
Tabelle 4: Sammelfraktionen der SC 2

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-6	2,0
2	7-8	29,2
3	9	41,7
4	10-11	5,4
5	12-19	1,5
6	Nachlauf	0,9

Von diesen Sammelfraktionen wurde ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt (siehe Abb. 12, Seite 16):

Abbildung 12: DC der Sammelfractionen der SC 2

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
 mobile Phase G: Petrolether – Toluol – Ethylacetat (13 : 2 : 1)
 + 1 Tropfen Trifluoressigsäure
 Detektion mit AASS



Bahn	aufgetragene Substanz	Bahn	aufgetragene Substanz
1	SF 1	5	SF 1 (SC 1)
2	SF 2	6	SF 5
3	SF 3	7	SF 6
4	SF 4		

In SF 2 konnte die gewünschte Komponente angereichert werden und lag nahezu frei von Begleitstoffen vor.

3.2 Herstellung des Dichlormethanextrakts der Blätter

Aus einer vorangegangenen Dissertation [3] standen 2,6 g Dichlormethanextrakt der Blätter (DCME B/a) zur Verfügung. Da dies aber für eine Auftrennung zu wenig erschien, da der Extrakt in erster Linie Chlorophylle enthielt, wurde neues Blattmaterial extrahiert.

1 kg getrocknete Blätter von *Metaxya rostrata* wurden pulverisiert und anschließend mittels Accelerated Solvent Extraction mit Dichlormethan extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Auf diese Weise konnten 35,4 g Dichlormethanextrakt der Blätter (DCME B/n) gewonnen werden.

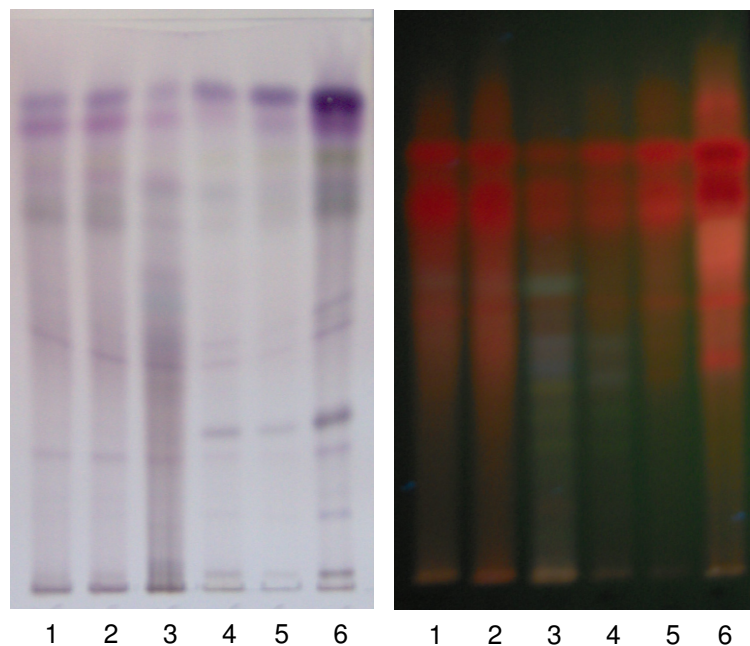
Beide Extrakte enthielten hauptsächlich Chlorophylle, die vor der Fraktionierung abgetrennt werden sollten:

Die Extrakte wurden pro Gramm in 100 ml Dichlormethan gelöst und mit der gleichen Menge einer Mischung aus Methanol und Wasser (1+1) versetzt, wobei zwei Phasen entstanden. Dichlormethan wurde unter vermindertem Druck entfernt, wodurch Chlorophyll ausfiel und über einen Faltenfilter abfiltriert werden konnte. Anschließend wurde Methanol unter vermindertem Druck entfernt und die Wasserphase zur Vermeidung thermischer Belastung lyophilisiert.

Die Chlorophyllabtrennung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft (Chlorophylle zeigen bei Detektion mit NR/PEG rote Fluoreszenz):

Abbildung 13: DC der Chlorophyllabtrennung

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)
links: Detektion mit AASS, rechts: Detektion mit NR/PEG



Bahn	aufgetragene Substanz
1	DCME B/a, vor Abtrennung
2	„Chlorophyll“ aus DCME B/a
3	DCME B/a, nach Abtrennung
4	DCME B/n, nach Abtrennung
5	„Chlorophyll“ aus DCME B/n
6	DCME B/n, vor Abtrennung

Abbildung 13 (siehe Seite 17) zeigt, dass Chlorophyll abgereichert und andere Komponenten angereichert werden konnten, trotzdem waren in beiden aufgereinigten Extrakten noch Chlorophyllanteile enthalten. Außerdem zeigten violette Zonen mit hohen Rf-Werten, dass apolare, terpenoide Inhaltsstoffe gemeinsam mit Chlorophyll abgetrennt wurden. Nach der Chlorophyllabtrennung standen von DCME B/a 0,2 g, von DCME B/n 2,0 g zur Verfügung. Beim dünnenschichtchromatographischen Vergleich fiel auf, dass bei der Detektion mit Naturstoffreagenz A und PEG in DCME B/a bei Rf ca. 0,52 eine ausgeprägte, türkis fluoreszierende Bande zu sehen war, die in DCME B/n fehlte. Da diese Bande in diesem Extrakt aber schon von der Herstellung an vorhanden gewesen war und die beiden Extrakte in ihrer Zusammensetzung ansonsten sehr ähnlich waren, wurden die beiden Extrakte vereinigt (DCME B).

3.3 Aufarbeitung des Dichlormethanextrakts der Blätter

Der aufgereinigte Dichlormethanextrakt der Blätter (DCME B) wurde mittels Vacuum Liquid Chromatography fraktioniert.

3.3.1 SC 3 (VLC)

Durchmesser: 2 cm

Füllhöhe: 15 cm

stationäre Phase: ICN Silica TSC, 60 A

mobile Phasen: In Abhängigkeit der Färbung der Fraktionen wurde die Zusammensetzung der mobilen Phase schrittweise polarer (siehe Tab. 5, Seite 19).

Auftragsmenge: 2,2 g DCME B aufgezogen auf 8,8 g Kieselgel

Tabelle 5: Mobile Phasen der VLC

mobile Phase	Zusammensetzung	Volumen (ml)	erhaltene Fraktionen
1	PE	100	1
2	PE – CHCl ₃ (90 + 10)	100	2
3	PE – CHCl ₃ (100 + 15)	1650	3 - 12
4	PE – CHCl ₃ (80 + 20)	1000	13 – 18
5	PE – CHCl ₃ (75 + 25)	700	19 – 21
6	PE – CHCl ₃ (65 + 35)	300	22
7	PE – CHCl ₃ (60 + 40)	400	23
8	PE – CHCl ₃ (50 + 50)	200	24
9	PE – CHCl ₃ (40 + 60)	600	25, 26
10	PE – CHCl ₃ (30 + 70)	300	27
11	PE – CHCl ₃ (20 + 80)	400	28
12	PE – CHCl ₃ (10 + 90)	700	29 – 31
13	CHCl ₃	400	32, 33
14	CHCl ₃ – MeOH (90 + 10)	500	34 – 37
15	CHCl ₃ – MeOH (80 + 20)	200	38, 39
16	CHCl ₃ – MeOH (50 + 50)	300	40, 41
17	MeOH	400	42 – 44

Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle wurden die erhaltenen Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt (siehe Tab. 6, Seite 20).

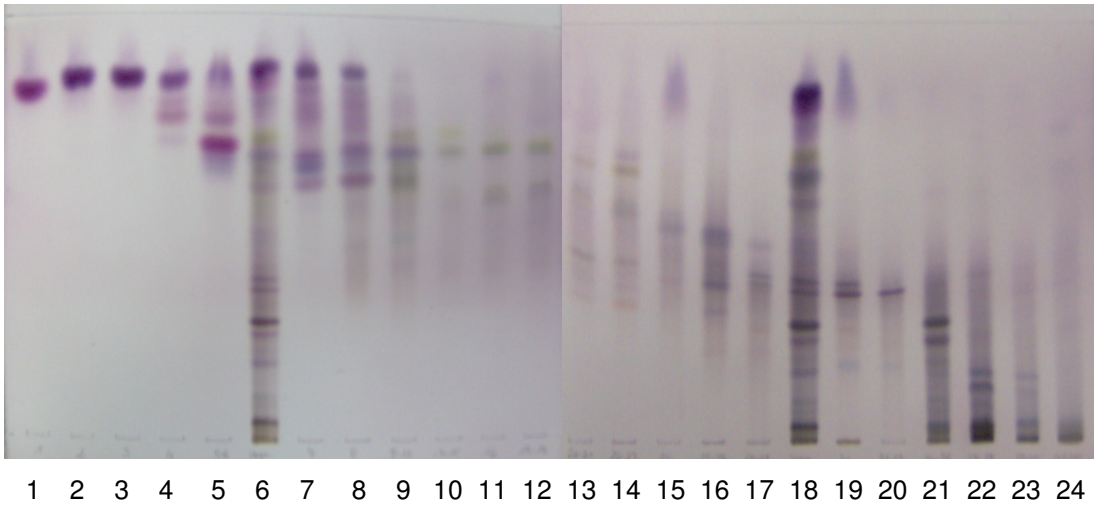
Tabelle 6: Sammelfractionen der SC 3

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)
1	1	58,9
2	2	91,5
3	3	65,3
4	4	14,3
5	5-6	16,4
6	7	44,8
7	8	117,5
8	9-12	195,6
9	13-15	41,1
10	16	25,8
11	17-19	37,6
12	20-21	30,6
13	22-23	91,9
14	24	22,2
15	25-27	102,8
16	28-29	71,1
17	30	30,9
18	31-33	53,5
19	34-36	676,8
20	37-38	156,3
21	39-40	103,9
22	41-44	145,7

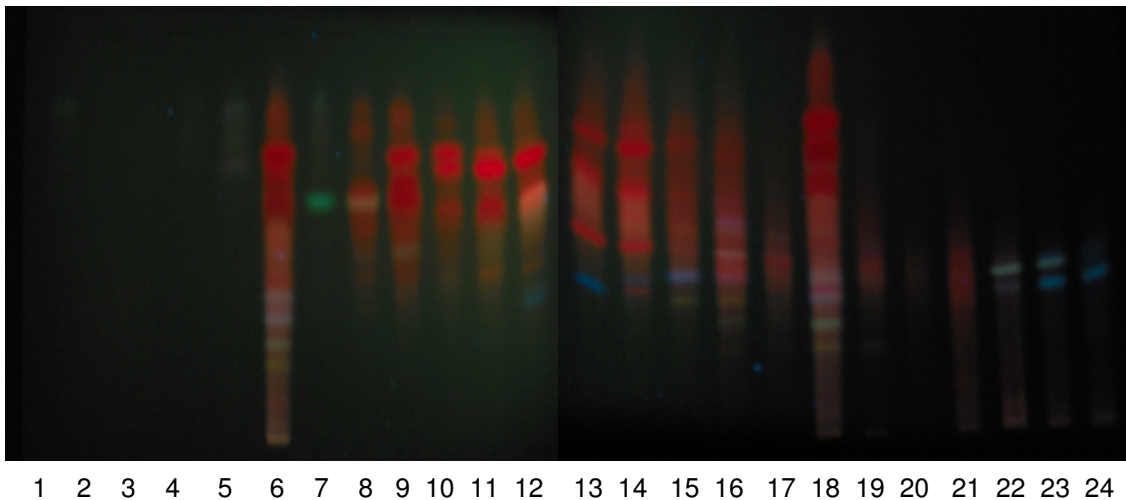
Von den Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 14 und 15, Seite 21):

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

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)

**Abbildung 15: DC der SF der SC 3, Detektion mit NR/PEG**

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	SF 1	9	SF 8	17	SF 16
2	SF 2	10	SF 9	18	DCME B
3	SF 3	11	SF 10	19	SF 17
4	SF 4	12	SF 11	20	SF 18
5	SF 5	13	SF 12	21	SF 19
6	DCME B	14	SF 13	22	SF 20
7	SF 6	15	SF 14	23	SF 21
8	SF 7	16	SF 15	24	SF 22

Die Detektion mit AASS zeigte, dass in den Sammelfractionen 1 bis 7 sowie in den Sammelfractionen 17 bis 20 violett gefärbte, terpenoide Verbindungen enthalten waren.

Bei der Detektion mit NR/PEG war zu erkennen, dass in den Sammelfractionen 7 bis 15 große Mengen Chlorophyll enthalten waren. SF 6 war frei von Chlorophyll und zeigte eine ausgeprägte, grün fluoreszierende Bande bei Rf ca. 0,56. Auch in den Sammelfractionen 20 bis 22 war kein Chlorophyll enthalten. Auffällig waren hier die blau fluoreszierenden Komponenten bei Rf ca. 0,38 und Rf ca. 0,33.

Die Sammelfractionen 1, 2 und 3 schienen jeweils eine Substanz in reiner Form zu enthalten.

Aufgrund der vorhandenen Mengen und des Vorliegens deutlicher Hauptkomponenten erschien eine weitere Auftrennung der SF 6+7 mit dem Ziel der Isolierung der mit NR/PEG grün fluoreszierenden Komponente bei Rf ca. 0,56, der SF 18 mit dem Ziel der Isolierung der mit AASS violetten Komponente bei Rf ca. 0,35, der SF 19 mit dem Ziel der Isolierung der mit AASS violetten bis grauen Komponenten bei Rf ca. 0,25, und der SF 20, 21 und 22 mit dem Ziel der Isolierung der mit NR/PEG blau fluoreszierenden Komponenten bei Rf ca. 0,38 bzw. Rf ca. 0,33 zielführend.

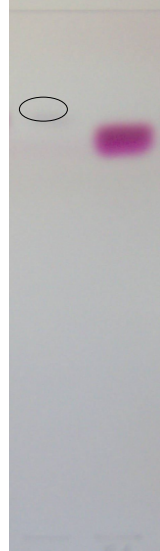
3.3.2 Dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgewählter Sammelfractionen

3.3.2.1 β -Carotin

Da SF 1 von SC 3 intensiv orange gefärbt und relativ apolar war, wurde vermutet, dass es sich um ein Carotinoid handeln könnte. Der dünnschichtchromatographische Vergleich mit β -Carotin konnte diese Vermutung aber nicht bestätigen (siehe Abb. 16, Seite 23).

Abbildung 16: DC-Vergleich der SF 1 von SC 3 mit β -Carotin

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase D: Chloroform – Methanol – Wasser (85 : 8 : 0,5)
Detektion mit AASS



β -Carotin SF 1

3.3.2.2 β -Sitosterol

SF 18 und SF 19 von SC 3 enthielten Komponenten, die aufgrund ihrer Färbung bei der Detektion mit AASS das Vorliegen von Sterolen vermuten ließen. Der Vergleich zeigte aber, dass die enthaltenen Hauptkomponenten polarer waren als β -Sitosterol (siehe Abb. 17, Seite 24).

Abbildung 17: DC-Vergleich von SF 18 und SF 19 von SC 3 mit β -Sitosterol

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)
Detektion mit AASS



1 2 3

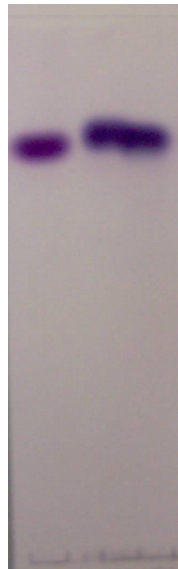
Bahn	aufgetragene Substanz
1	SF 18
2	β -Sitosterol
3	SF 19

3.3.2.3 SF 1, SF 2, SF 3 von SC 3 und SF 1 von SC 1

Durch Verwendung verschiedener mobiler Phasen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Komponenten der SF 1, 2 und 3 von SC 3 sowie der Komponente in SF 1 von SC 1 um verschiedene Substanzen handelte (siehe Abb. 18 und 19, Seite 25).

Abbildung 18: DC-Vergleich der SF 1, 2 und 3 von SC 3

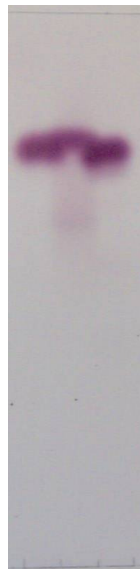
stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase E: Petrolether – Toluol – Ethylacetat – Aceton (13 : 4 : 2 : 1)
Detektion mit AASS



SF 1 2 3

Abbildung 19: DC-Vergleich der SF 2 und 3 von SC 3 und der SF 1 von SC 1

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase F: Petrolether – Toluol – Ethylacetat (13 : 4 : 2)
Detektion mit AASS



1 2 3

Bahn	aufgetragene Substanz
1	SF 2 (SC 3)
2	SF 1 (SC 1)
3	SF 3 (SC 3)

3.3.3 SC 4

Ziel dieser Fraktionierung war es, aus den SF 6 und 7 von SC 3 die bei der Detektion mit Naturstoffreagenz A und PEG grün fluoreszierende Komponente bei Rf ca. 0,56 zu isolieren.

SF 6 und SF 7 wurden vereinigt und mittels Säulenchromatographie fraktioniert:

Durchmesser: 1 cm

Füllhöhe: 82 cm

stationäre Phase: Kieselgel 60

mobile Phase: Chloroform – Methanol – Wasser (98 : 2 : 10)

Auftragsmenge: 158 mg SF 6+7 von SC 3 aufgezogen auf 200 mg Kieselgel

Es wurden 68 Fraktionen zu ca. 3 ml/30min gesammelt. Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung wurden folgende Sammelfraktionen hergestellt:

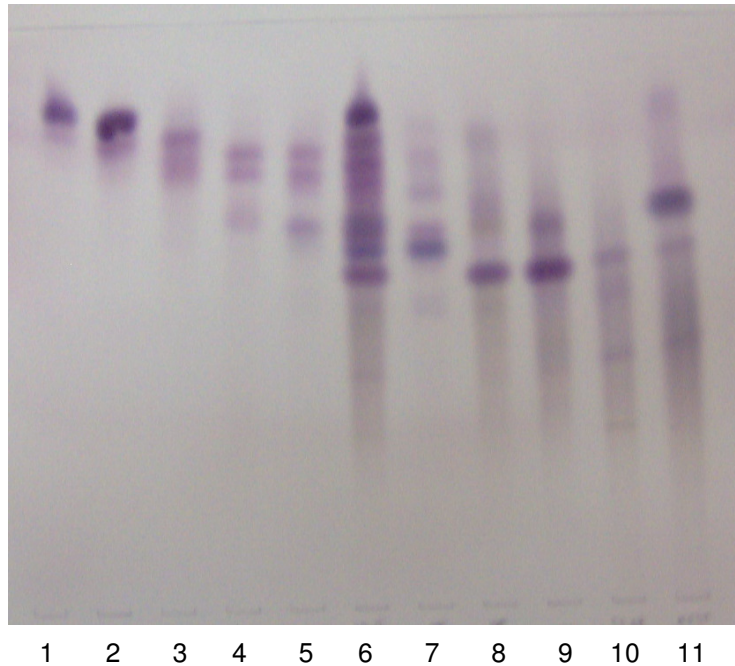
Tabelle 7: Sammelfraktionen der SC 4

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-12	10,1
2	13-17	20,6
3	18-37	9,3
4	38-42	4,5
5	43-47	9,5
6	48-54	13,9
7	55	25,8
8	56	13,4
9	57-68	5,6
10	Nachlauf	24,6

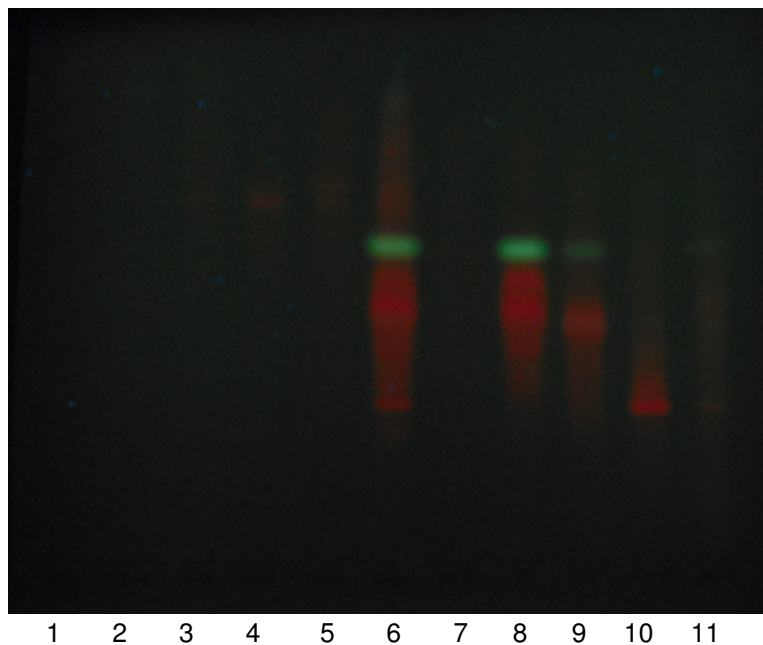
Von den Sammelfraktionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 20 und 21, Seite 27):

Abbildung 20: DC der SF der SC 4, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)

**Abbildung 21: DC der SF der SC 4, Detektion mit NR/PEG**

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	SF 1	5	SF 5	9	SF 8
2	SF 2	6	SF 6+7 (SC 3)	10	SF 9
3	SF 3	7	SF 6	11	SF 10
4	SF 4	8	SF 7		

Die grün fluoreszierende Komponente konnte vor allem in Sammelfraktion 7 angereichert werden. Sie lag aber nicht frei von Chlorophyll und anderen störenden Begleitstoffen vor. Eine weitere Aufreinigung schien aufgrund der geringen Menge der Fraktion nicht zielführend.

3.3.4 Aufarbeitung der SF 20 von SC 3

Ziel der Aufarbeitung war die Isolierung der bei Detektion mit NR/PEG hellblau fluoreszierenden Komponente bei R_f ca. 0,38. Vor der Auftrennung mittels Säulenchromatographie sollten die vor allem bei Detektion mit AASS aber auch bei Detektion mit NR/PEG sichtbaren, polaren Begleitsubstanzen abgetrennt werden.

3.3.4.1 Fraktionierung der SF 20 von SC 3

SF 20 wurde mit 10 ml Petrolether 15 min im Ultraschallbad extrahiert. Es wurde zentrifugiert und der Überstand zur Trockene gebracht.

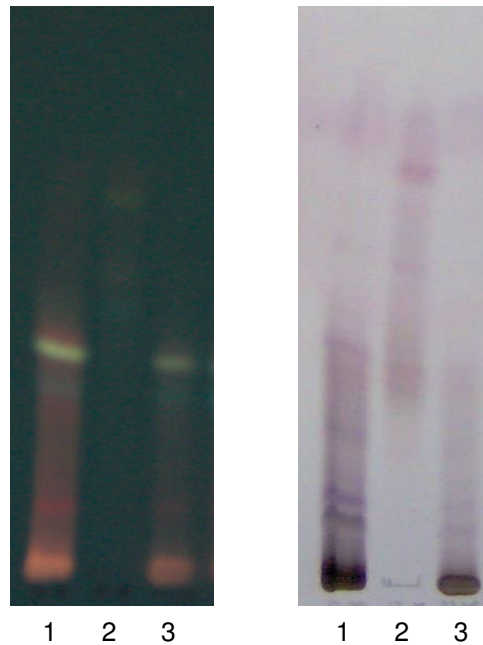
Tabelle 8: Extraktion der SF 20 von SC 3 mit Petrolether

Fraktion	Menge (mg)
SF 20 (SC 3)	156,3
Petrolether-Auszug	1,4
Rückstand nach PE-Extraktion	149,7

Bei der Überprüfung des Petrolether-Auszugs mittels DC (siehe Abb. 22, Seite 29) wurde festgestellt, dass die gewünschte Komponente nicht in den Petrolether-Auszug übergegangen war und deshalb nicht von den polaren Begleitsubstanzen getrennt worden war. Da aber zu erkennen war, dass geringe Mengen apolarer Begleitstoffe im Petrolether-Auszug enthalten waren, wurde nur der Rückstand der Petrolether-Extraktion zur weiteren Aufarbeitung herangezogen.

Abbildung 22: DCs der Petrolether-Extraktion der SF 20 von SC 3

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
 mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)
 links: Detektion mit NR/PEG; rechts: Detektion mit AASS



Bahn	aufgetragene Substanz
1	SF 20 (SC 3)
2	PE-Auszug
3	Rückstand der PE-Extraktion

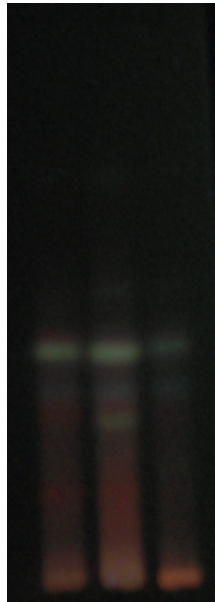
Dieser Rückstand wurde mit 10 ml 1-Butanol 15 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde zentrifugiert und der Überstand zur Trockene gebracht. Sowohl der Butanol-Auszug als auch der Rückstand nach der Butanol-Extraktion wurden dünnschichtchromatographisch überprüft (siehe Abb. 23, Seite 30).

Tabelle 9: Butanol-Extraktion des Rückstands nach Petrolether-Extraktion

Fraktion	Menge (mg)
Rückstand nach PE-Extraktion	149,7
Butanol-Extrakt	107,4
Rückstand nach Butanol-Extraktion	19,1

Abbildung 23: DC der Butanol-Extraktion des Rückstands der Petrolether-Extraktion

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)
Detektion mit NR/PEG



1 2 3

Bahn	aufgetragene Substanz
1	Rückstand nach PE-Extraktion
2	Butanol-Extrakt (SF 20/Bu)
3	Rückstand nach Butanol-Extraktion

Abbildung 23 zeigt, dass die hellblau fluoreszierende Substanz in der Butanolfraktion angereichert war und ein Teil der polaren Begleitstoffe nicht in 1-Butanol in Lösung ging und so abgetrennt werden konnte.

3.3.4.2 SC 5

Der Butanol-Extrakt (SF 20/Bu) wurde nun mittels Säulenchromatographie (SC 5) fraktioniert. Eine Trennung aufgrund der Polarität, wie sie an Kieselgel erfolgt, schien hier nicht zielführend, da sich einige Begleitstoffe in den R_f-Werten kaum von der hellblau fluoreszierenden Substanz unterschieden. Deshalb wurde Sephadex[®] LH-20, an dem eine Trennung aufgrund der Molekülgröße stattfindet, als stationäre Phase gewählt.

Durchmesser: 1,5 cm

Füllhöhe: 30 cm

stationäre Phase: Sephadex[®] LH-20

mobile Phase: Aceton

Auftragsmenge: 105 mg SF 20/Bu

Es wurden 350 Fraktionen zu ca. 3 ml/30 min gesammelt. Nach dünn-schichtchromatographischer Überprüfung wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu Sammelfraktionen vereinigt:

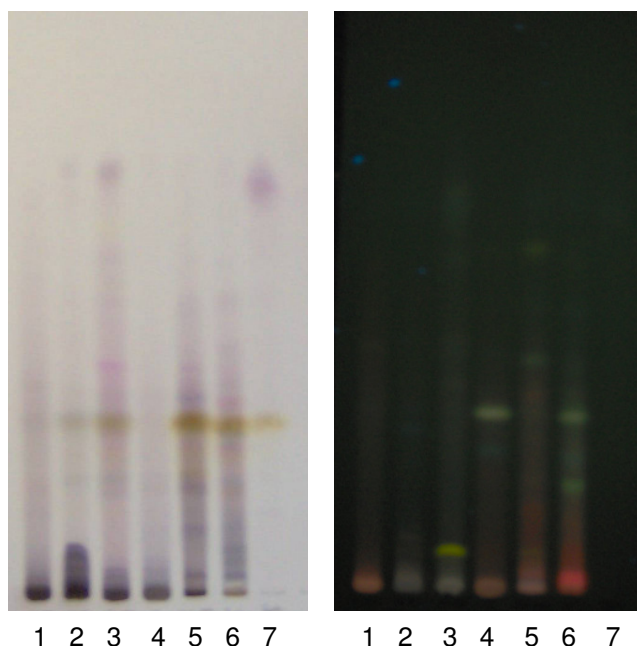
Tabelle 10: Sammelfraktionen der SC 5

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-10	23,9
2	11-33	27,0
3	34-200	20,0
4	201-330	17,1
5	331-350	15,9
6	Nachlauf	1,1

Von den Sammelfraktionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 24, Seite 32):

Abbildung 24: DCs der SF der SC 5

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten
 mobile Phase B: Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 : 4 : 1)
 links: Detektion mit AASS, rechts: Detektion mit NR/PEG



Bahn	aufgetragene Substanz	Bahn	aufgetragene Substanz
1	SF 1	5	SF 4
2	SF 2	6	SF 5
3	SF 3	7	SF 6
4	SF 20/Bu		

Abbildung 24 lässt erkennen, dass die gewünschte Komponente in SF 5 enthalten war. Aufgrund der geringen Menge und des Vorliegens eines hohen Anteils polarer Begleitstoffe, wurde nicht versucht, diese Substanz rein darzustellen.

3.4 NMR-Spektroskopie

Die Strukturen jener Komponenten, die in den jeweiligen Sammelfractionen in reiner Form vorzuliegen schienen, sollten mittels NMR-Spektroskopie geklärt werden.

Durch Verwendung eines apolareren Fließmittelgemisches konnte allerdings gezeigt werden, dass es sich bei den Komponenten der Sammelfractionen SF 2 und 3 von SC 3 und SF 2 von SC 2 jeweils um Gemische mehrerer Substanzen handelte (siehe Abb. 25)¹, weshalb auch keine Strukturklärung mittels NMR möglich war.

Abbildung 25: DC der SF 2 und SF 3 von SC 3 und SF 2 von SC 2 mit mobiler Phase H

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase H: Petrolether – Chloroform (8 : 2)
Detektion mit AASS



1 2 3

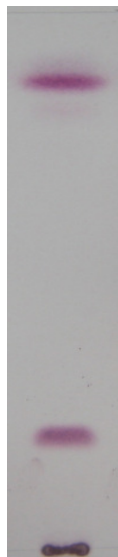
Bahn	aufgetragene Substanz
1	SF 2 (SC 3)
2	SF 3 (SC 3)
3	SF 2 (SC 2)

SF 1 von SC 3 konnte unter Verwendung eines apolareren Fließmittels ebenfalls in zwei Hauptkomponenten getrennt werden (siehe Abb. 26, Seite 34)¹.

¹ Ich danke Teresa Pemmer für die Anfertigung der DCs in Abb. 25 und 26.

Abbildung 26: DC der SF 1 von SC 3 mit mobiler Phase I

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatte
mobile Phase I: Petrolether
Detektion mit AASS



SF 1

Mittels NMR-Spektroskopie konnten die Triterpene Squalen (BM-A) und Fern-9(11)-en (BM-B) als Komponenten der Sammelfraktion SF 1 von SC 3 (BM) identifiziert werden². Die Substanzen lagen im Gemisch im Verhältnis 1:1,1 vor. Die Verschiebungen der Substanzen im ¹³C-NMR korrelierten ausgezeichnet mit den Literaturdaten (siehe Tab. 11 und 12, Seiten 35 und 36) [5, 6, 7, 8, 9].

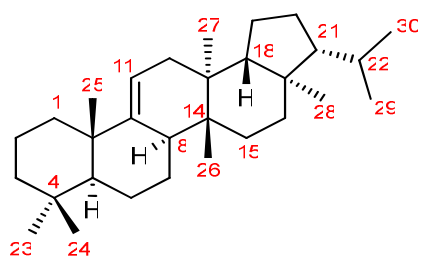
Fern-9(11)-en wurde erstmals 1963 aus Blättern von *Dryopteris crassirhizoma* isoliert [10] und kommt beispielsweise innerhalb der Ordnung der Baumfarne auch in Vertretern der Gattungen *Cyathea* [11, 12] und *Plagiogyria* [13] vor. Weiters wurde das Vorkommen von Fern-9(11)-en unter anderem in Vertretern der Gattungen *Adiantum* [8, 14], *Nephrolepis* [15, 16] und *Polypodium* [17, 18] nachgewiesen.

² Mein Dank gilt auch Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für Organische Chemie der Universität Wien, für die Durchführung der NMR-Messungen.

Tabelle 11: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Squalen (BM-A)

		^1H	J(H,H)	^{13}C	^{13}C Lit.
1	CH ₃	1.683	t 1.3 / t 1.3	25.69	25.7
2	C	---		131.23	131.1
3	CH	5.100	t 7.0 / q 1.4 / q 1.4	124.40	124.6
4	CH ₂	2.066	m	26.76	26.8
5	CH ₂	1.977	m	(a) 39.72	39.9
6	C	---		134.88	134.9
7	CH	5.121	t 6.9 / t 1.2 / q 1.4	124.26	124.4
8	CH ₂	2.083	m	26.65	26.9
9	CH ₂	1.991	m	(a) 39.75	39.9
10	C	---		135.09	134.7
11	CH	5.152	m	124.29	124.4
12	CH ₂	2.019	m	28.27	28.4
13	CH ₃	1.602	m	17.67	17.6
14	CH ₃	1.605	m	15.99	16.0
15	CH ₃	1.609	m	16.03	16.0

(a) austauschbar

Tabelle 12: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Fern-9(11)-en (BM-B)


		^1H	J(H,H)	^{13}C	^{13}C Lit.
1	CH ₂	1.89 1.15	dddd 1.7; 3.3; 3.3; 13.2 ddd 3.8, 13.2, 13.2	41.47	41.49
2	CH ₂	1.54 1.43	m m	19.54	19.56
3	CH ₂	1.37 1.11	m ddd 3.6; 13.2; 13.2	42.40	42.43
4	C	---		33.62	33.64
5	CH	1.27	dd 12.3; 7.3	44.84	44.88
6	CH ₂	1.73 1.56	dddd 7.3; 9.8; 9.9; 13.4 m	19.50	19.53
7	CH ₂	1.60 1.32	m m	17.87	17.90
8	CH	2.07	m	39.95	39.98
9	C	---		151.65	151.68
10	C	---		38.03	38.05
11	CH	5.290	ddd 5.3; 2.3; 2.3	115.59	115.60
12	CH ₂	1.62 1.53	m m	36.75	36.78
13	C	---		36.71	36.74
14	C	---		37.66	37.69
15	CH ₂	1.42 1.30	m m	29.26	29.28
16	CH ₂	1.66 1.41	dd 12.2; 2.6 m	36.17	36.19
17	C	---		42.94	42.97
18	CH	1.56	m	51.99	52.02
19	CH ₂	1.33	m	20.13	20.15
20	CH ₂	1.83 1.21	dddd 9.3; 13.5; 8.8; 5.3 m	28.22	28.23
21	CH	0.98	m	59.65	59.68
22	CH	1.46	m	30.78	30.80
23	CH ₃	0.850	s	32.79	32.80
24	CH ₃	0.892	s	21.67	21.68
25	CH ₃	1.056	d 0.8	25.04	25.06
26	CH ₃	0.824	d 1.0	15.82	15.84
27	CH ₃	0.737	s	15.42	15.43
28	CH ₃	0.762	s	13.97	14.00
29	CH ₃	0.895	d 6.5	22.12	22.14

4 Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war, sowohl einen Dichlormethanextrakt des Rhizoms als auch einen Dichlormethanextrakt der Blätter von *Metaxya rostrata* zu fraktionieren und gegebenenfalls Reinsubstanzen zu isolieren.

Der Dichlormethanextrakt des Rhizoms wurde mittels Säulenchromatographie (SC 1) an Kieselgel aufgetrennt (siehe Kap. 3.1.1). Mittels DC-Vergleich wurden ausgewählte Sammelfractionen auf das Vorliegen von Sterolen, Fettsäuren, apolaren Flavonoiden und Caryophyllen untersucht (siehe Kap. 3.1.2). Der DC-Vergleich deutete auf das Vorliegen von β -Sitosterol in SF 7 hin. Das Vorliegen aller anderen Vergleichssubstanzen konnte für alle untersuchten Sammelfractionen mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Sammelfraction SF 1 von SC 1 wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (SC 2) weiter aufgetrennt (siehe Kap. 3.1.3), um die bei Detektion mit AASS violette Komponente bei R_f ca. 0,83 anzureichern. Es resultierte eine Sammelfraction (SF 2 von SC 2), in der diese Komponente nahezu frei von Begleitstoffen vorlag.

Ein Dichlormethanextrakt der Blätter, der durch die Vereinigung eines im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation [3] hergestellten Extraktes der Blätter und eines mittels Accelerated Solvent Extraction hergestellten Extraktes der Blätter gebildet wurde, wurde einer Chlorophyllabtrennung unterzogen (siehe Kap. 3.2) und in der Folge mittels Vacuum Liquid Chromatography (SC 3) fraktioniert (siehe Kap. 3.3.1).

Ausgewählte Sammelfractionen wurden mittels DC mit β -Carotin und β -Sitosterol verglichen. Diese Substanzen entsprachen aber keiner der Hauptkomponenten der untersuchten Sammelfractionen (siehe Kap. 3.3.2).

Die Sammelfractionen SF 1, 2 und 3 von SC 3 schienen jeweils eine Substanz in reiner Form zu enthalten. Durch Verwendung verschiedener mobiler Phasen konnte mittels DC gezeigt werden, dass es sich bei diesen Komponenten jedoch um Gemische verschiedener Substanzen mit sehr ähnlichen

chemischen und physikalischen Eigenschaften handelte (siehe Kap. 3.3.2.3 und Kap. 3.4).

In weiterer Folge wurden SF 6 und 7 von SC 3 vereinigt und mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (SC 4) aufgetrennt (siehe Kap. 3.3.3), um die bei Detektion mit NR/PEG grün fluoreszierende Komponente bei R_f ca. 0,56 anzureichern. Diese Komponente konnte in resultierenden Sammelfractionen angereichert werden, eine vollständige Abtrennung störender Begleitstoffe war jedoch im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht möglich.

Die Sammelfraction SF 20 von SC 3 wurde mit dem Ziel der Isolierung der bei Detektion mit NR/PEG hellblau fluoreszierenden Komponente einer Petroleum- und einer 1-Butanol-Extraktion unterzogen und danach mittels Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH-20 (SC 5) aufgetrennt (siehe Kap. 3.3.4). Eine weitere Aufreinigung der Komponente aus der Sammelfraction, in der sie angereichert werden konnte, schien aufgrund der geringen Menge und des Vorliegens vieler Begleitstoffe nicht zielführend.

Mittels NMR-Spektroskopie konnten in SF 1 von SC 3 Squalen und Fern-9(11)-en als Komponenten identifiziert werden. Die Verschiebungen beider Substanzen korrelierten ausgezeichnet mit den Literaturdaten [5, 6, 7, 8, 9].

5 Zusammenfassung

Wässrige Suspensionen des getrockneten Rhizoms des Baumfarns *Metaxya rostrata* finden in der Ethnomedizin Costa Ricas bei Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts, wie Ulcera oder Geschwüren, Anwendung [1].

Da nur wenig phytochemisches Wissen über diese Pflanze existiert, war das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit, einen Dichlormethanextrakt des Rhizoms und einen Dichlormethanextrakt der Blätter zu fraktionieren und Reinsubstanzen zu isolieren, deren Strukturen mittels NMR-Spektroskopie geklärt werden sollten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Extrakte mittels Säulenchromatographie bzw. Vacuum Liquid Chromatography fraktioniert. Ausgewählte Sammelfractionen wurden mittels DC mit Referenzsubstanzen verglichen. Einige dieser Sammelfractionen wurden einem weiteren Trennschritt unterzogen.

Dabei konnten vier Sammelfractionen (SF 1, SF 2, SF 3 von SC 3 und SF 2 von SC 2) gewonnen werden, die unter Verwendung der beschriebenen mobilen Phasen jeweils eine Substanz in reiner Form zu enthalten schienen. In detaillierten dünnschichtchromatographischen Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass es sich jeweils um Gemische mehrerer Substanzen handelte.

Für die Komponenten der Sammelfractionen SF 2 und SF 3 von SC 3 und SF 2 von SC 2 war daher keine Strukturklärung mittels NMR-Spektroskopie möglich. In Sammelfraction SF 1 von SC 3, die aus zwei Hauptkomponenten bestand, konnten die Triterpene Squalen und Fern-9(11)-en mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden.

6 Summary

Suspensions of the dried rhizome of the tree fern *Metaxya rostrata* in water are used in Costa Rican ethnic medicine in intestinal diseases such as ulcers or tumors [1].

As only little phytochemical knowledge exists about this plant, the objective of this diploma thesis was to fractionate a dichloromethane extract of the rhizome and a dichloromethane extract of the leaves and to isolate pure components for structure elucidation by NMR spectroscopy.

Within the scope of this thesis both extracts were fractionated using column chromatography or alternatively vacuum liquid chromatography. Selected fractions were compared with reference substances by TLC. Some of these fractions were subjected to a further separation step.

In this process four fractions (SF 1, SF 2, SF 3 von SC 3 und SF 2 von SC 2) could be obtained that seemed to contain one pure substance each when using the described mobile phases. By further detailed TLC-studies was shown, that each fraction contained a mixture of several components.

Thus, the clarification of the structures was not possible for the components of the fractions SF 2 and SF 3 of SC 3 and SF 2 of SC 2. In fraction SF 1 of SC 3, which consisted of two main substances, the triterpenes squalene and fern-9(11)-ene could be identified by NMR spectroscopy.

7 Abkürzungsverzeichnis

AASS	Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens
Abb.	Abbildung
ASE	accelerated solvent extraction
BuOH	Butanol
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CHCl ₃	Chloroform
DC	Dünnschichtchromatographie
DCME B	Dichlormethanextrakt der Blätter
DCME R	Dichlormethanextrakt des Rhizoms
H ₂ O	Wasser
Kap.	Kapitel
MeOH	Methanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NR	Naturstoffreagenz A
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
R _f	Retentionsfaktor
SC	Säulenchromatographie
SF	Sammelfraktion
Tab.	Tabelle
TLC	thin layer chromatography
VLC	vacuum liquid chromatography

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Metaxya rostrata</i> (Kunth C. Presl) [3].....	1
Abbildung 2: Pflanzenmaterial von <i>Metaxya rostrata</i>	2
Abbildung 3: Vacuum Liquid Chromatography.....	5
Abbildung 4: DC der SF der SC 1, Detektion mit AASS, Teil 1.....	9
Abbildung 5: DC der SF der SC 1, Detektion mit AASS, Teil 2.....	9
Abbildung 6: DC der SF der SC 1, Detektion mit NR/PEG, Teil 1	10
Abbildung 7: DC der SF der SC 1, Detektion mit NR/PEG, Teil 2	10
Abbildung 8: DC-Vergleich ausgewählter SF der SC 1 mit Sterolen und Ölsäure.....	12
Abbildung 9: DC-Vergleich ausgewählter SF der SC 1 mit Fettsäuren	12
Abbildung 10: DC-Vergleich von SF 1 von SC 1 mit Caryophyllen.....	13
Abbildung 11: DC-Vergleich von SF 6 von SC 1 mit apolaren Flavonoiden	14
Abbildung 12: DC der Sammelfractionen der SC 2.....	16
Abbildung 13: DC der Chlorophyllabtrennung.....	17
Abbildung 14: DC der SF der SC 3, Detektion mit AASS	21
Abbildung 15: DC der SF der SC 3, Detektion mit NR/PEG	21
Abbildung 16: DC-Vergleich der SF 1 von SC 3 mit β -Carotin	23
Abbildung 17: DC-Vergleich von SF 18 und SF 19 von SC 3 mit β -Sitosterol.....	24
Abbildung 18: DC-Vergleich der SF 1, 2 und 3 von SC 3	25
Abbildung 19: DC-Vergleich der SF 2 und 3 von SC 3 und der SF 1 von SC 1	25
Abbildung 20: DC der SF der SC 4, Detektion mit AASS	27
Abbildung 21: DC der SF der SC 4, Detektion mit NR/PEG	27
Abbildung 22: DCs der Petrolether-Extraktion der SF 20 von SC 3	29
Abbildung 23: DC der Butanol-Extraktion des Rückstands der Petrolether-Extraktion.....	30
Abbildung 24: DCs der SF der SC 5	32
Abbildung 25: DC der SF 2 und SF 3 von SC 3 und SF 2 von SC 2 mit mobiler Phase H....	33
Abbildung 26: DC der SF 1 von SC 3 mit mobiler Phase I.....	34

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Methode der Accelerated Solvent Extraction.....	3
Tabelle 2: Fließmittelgemische der SC 1.....	7
Tabelle 3: Sammelfractionen der SC 1.....	8
Tabelle 4: Sammelfractionen der SC 2.....	15
Tabelle 5: Mobile Phasen der VLC.....	19
Tabelle 6: Sammelfractionen der SC 3.....	20
Tabelle 7: Sammelfractionen der SC 4.....	26
Tabelle 8: Extraktion der SF 20 von SC 3 mit Petrolether.....	28
Tabelle 9: Butanol-Extraktion des Rückstands nach Petrolether-Extraktion.....	29
Tabelle 10: Sammelfractionen der SC 5.....	31
Tabelle 11: ¹ H- und ¹³ C-NMR-Daten von Squalen (BM-A).....	35
Tabelle 12: ¹ H- und ¹³ C-NMR-Daten von Fern-9(11)-en (BM-B).....	36

10 Literaturverzeichnis

- [1] Virtbauer J, Krenn L, Kählig H, Hübner A, Donath O, Marian B. Chemical and pharmacological investigations of *Metaxya rostrata*. Zeitschrift für Naturforschung, 2008, 63c: 469-475.
- [2] Virtbauer J. Bioassay-guided chemische Untersuchungen von tropischen Arzneipflanzen. Dissertation, Universität Wien, 2007
- [3] Kainz K. Dissertation, Universität Wien, in Vorbereitung
- [4] Wagner H, Blatt S, Zgainski EM. Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Springer-Verlag Berlin, 1983
- [5] Shiojima K, Arai Y, Masada K, Kamada T, Ageta H. Fern Constituents: Polypodatetraenes, Novel Bicyclic Triterpenoids, Isolated from Polypodiaceous and Aspidiaceous Plants. Tetrahedron Lett. 1983, 51, 5733-5736
- [6] Barrero AF, Herrador MM, Quilez del Moral JF, Arteaga P, Arteaga JF, Piedra M, Sanchez EM. Reductive Coupling of Terpenic Allylic Halides Catalyzed by Cp_2TiCl : A Short and Efficient Asymmetric Synthesis of Onocerane Triterpenes. Org. Lett., 2005, 7, 2301-2304
- [7] Ageta H, Shiojima K, Arai Y, Suzuki H, Kiyotani T. NMR Spectra of Triterpenoids. II. Hopenes and Migrated Hopenes. Chem. Pharm. Bull., 1994, 42, 39-44
- [8] Shiojima K, Sasaki Y, Ageta H. Fern Constituents: Triterpenoids Isolated from the Leaves of *Adiantum pedatum*. 23-Hydroxyfernene, Glaucanol A and Filicenoic Acid. Chem. Pharm. Bull., 1993, 41, 268-271
- [9] Wilkins AL, Bird PW, Jager PM. Carbon-13 NMR Study of Some Triterpene Hydrocarbons of the Hopane Group. Magn. Reson. Chem., 1987, 25, 503-507
- [10] Ageta, Hiroyuki; Iwata, Kenji; Natori, Shinsaku. A fern constituent, a triterpenoid hydrocarbon of a new type. Tetrahedron Letters, 1963, 22, 1447-50
- [11] Arai, Yoko; Hirohara, Masayoshi; Matsuhira, Motoko; Toyosaki, Kyoko; Ageta, Hiroyuki. Fern constituents: triterpenoids isolated from leaflets of *Cyathea lepifera*. Chem. Pharm. Bull., 1995, 43(11), 1849-52

- [12] Arai, Yoko; Koide, Nakako; Ohki, Fumie; Ageta, Hiroyuki; Yang, Ling Ling; Yen, Kun Ying. Fern constituents: triterpenoids isolated from leaflets of *Cyathea spinulosa*. Chem. Pharm. Bull., 1994, 42(2), 228-32
- [13] Murakami, Takao; Tanaka, Nobutoshi; Noguchi, Tadashi; Saiki, Yasuhisa; Chen, Chiu Ming. Chemical and chemotaxonomic studies of pterophytes. L. Chemical studies on constituents of *Plagiogyria matsumureana* Makino. Chem. Pharm. Bull., 1984, 32(5), 1815-21
- [14] Shiojima, Kenji; Ageta, Hiroyuki. Fern constituents: triterpenoids isolated from the leaves of *Adiantum edgeworthii*. Structures of 19 α -hydroxyadiantone and fern-9(11)-en-25-oic acid. Chem. Pharm. Bull., 1994, 42(1), 45-7
- [15] Liang, Zhiyuan; Yang, Xiaosheng; Zhu, Haiyan; Hao, Xiaojiang. Chemical constituents of *Nephrolepis cordifolia*. Guangxi Zhiwu, 2008, 28(3), 420-421, 378
- [16] Tieh, Jien-Heh J; Chang, Teh-Chou. The chemical constituents of *Nephrolepis auriculata* (L.) trimen. Journal of the Chinese Chemical Society (Taipei, Taiwan), 1980, 27(3), 113-17
- [17] Horvath AR; De Szocs J; Alvarado F; Grant D JW. Triterpenes from rhizomes of *Polypodium leucotomos*. Phytochemistry, 1975, 14(7), 1641
- [18] Anderson C; Fuller F; Epstein WW. Nonpolar pentacyclic triterpenes of the medicinal fern *Polypodium subpetiolatum*. Journal of Natural Products, 1979, 42(2), 168-73

Curriculum vitae

Name: Barbara Merkinger
Geburtsdatum und -ort: 12. August 1987, Krems a. d. Donau
Staatsangehörigkeit: Österreich
Eltern: Alfred Merkinger
Monika Merkinger

Ausbildung

1993 – 1997 Volksschule Mautern a. d. Donau
1997 – 2005 BG/BRG Rechte Kremszeile,
Krems a. d. Donau
Schulzweig Gymnasium
Juni 2005 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg
Oktober 2005 Beginn des Studiums der Pharmazie an der
Universität Wien
Oktober 2009 – Jänner 2010 Praktische Arbeit der Diplomarbeit am
Department für Pharmakognosie der
Universität Wien

Praktika

Juli 2008 Apotheke „Zur Mutter Gottes“, Traismauer
Juli 2009 Mohren-Apotheke, Krems a. d. Donau

Anhang

Abbildung 1: $^1\text{H-NMR}$ von BM in CDCl_3

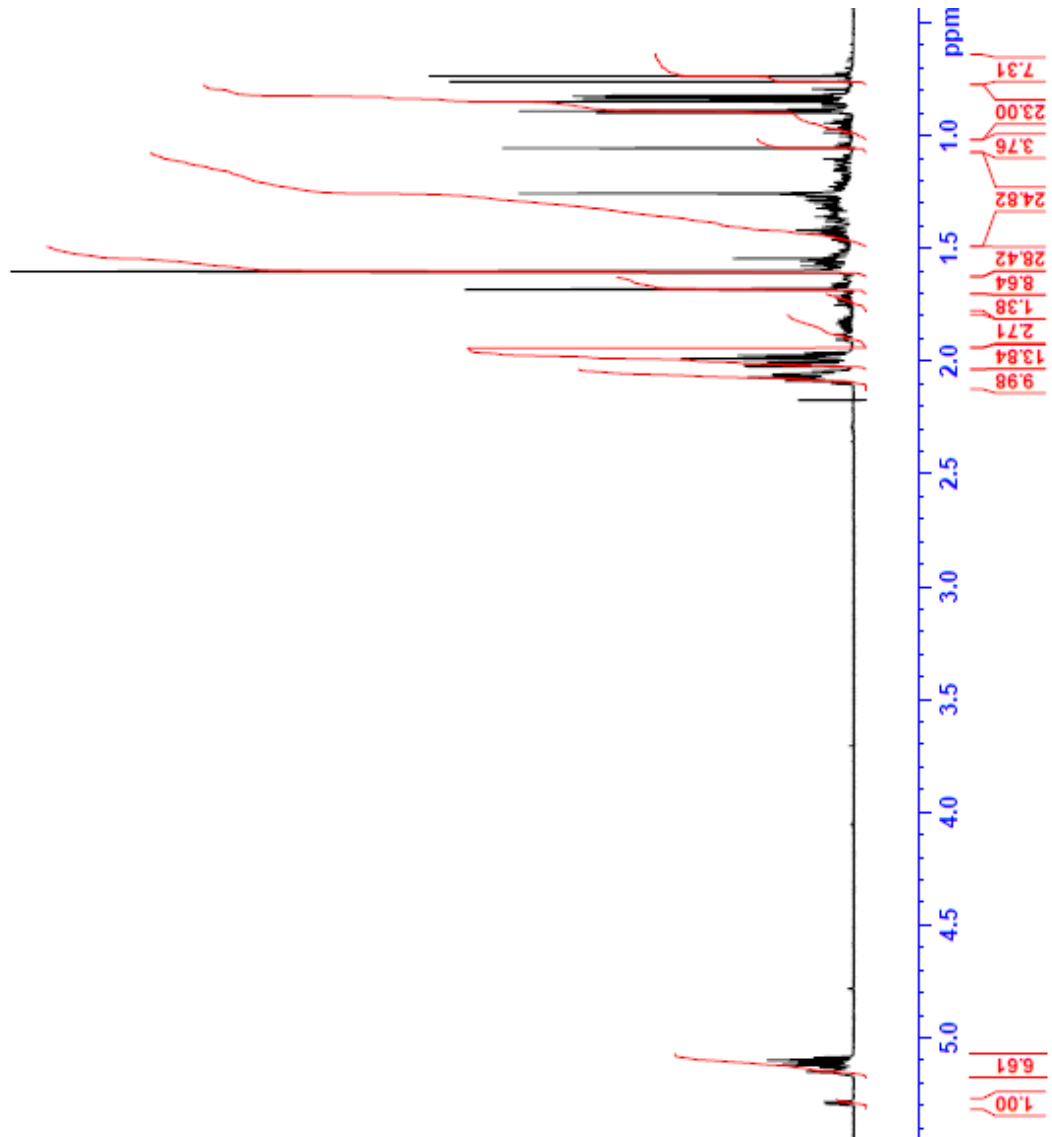


Abbildung 2: ^{13}C -NMR von BM in CDCl_3

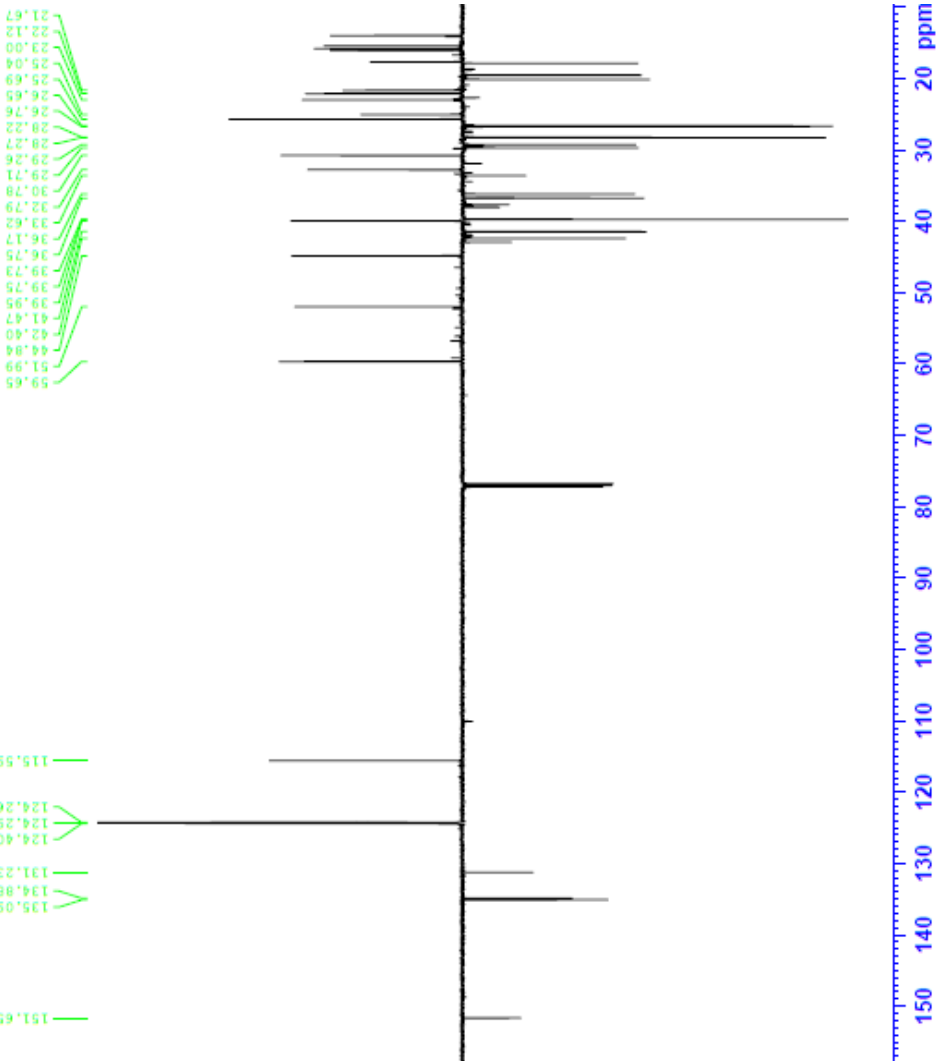


Abbildung 3: HMBC-Spektrum von BM in CDCl_3

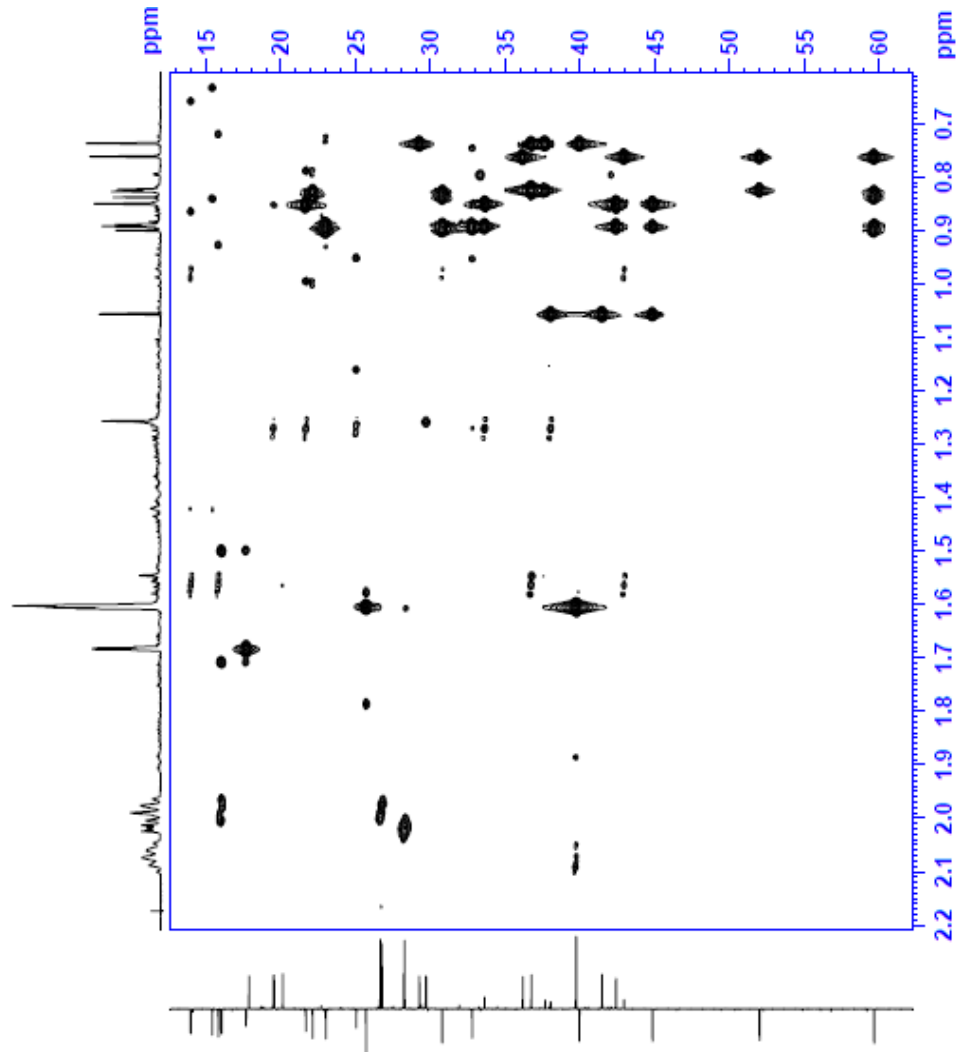


Abbildung 4: HSQC-Spektrum von BM in CDCl₃

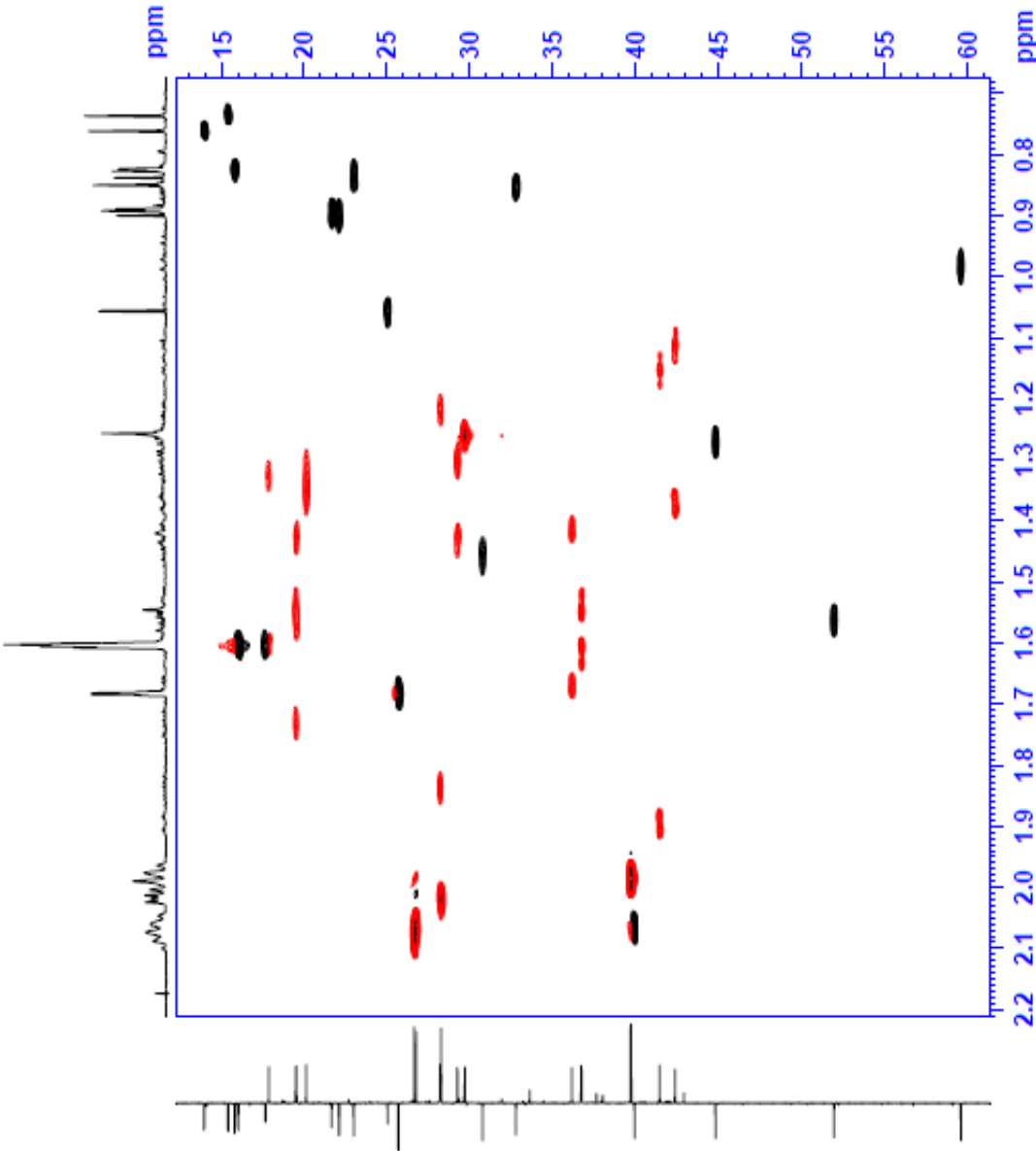


Abbildung 5: COSY-Spektrum von BM in CDCl_3

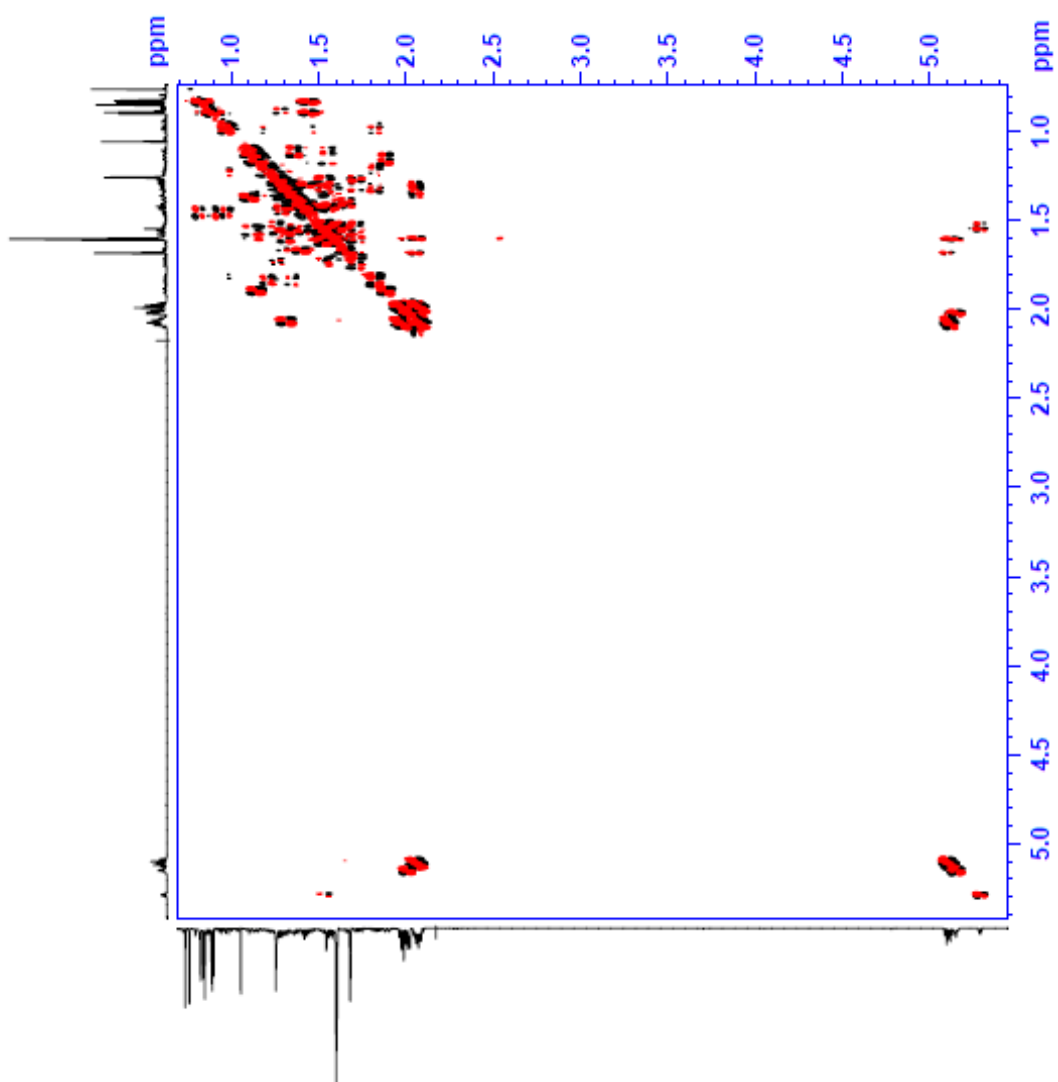


Abbildung 6: TOCSY-Spektrum von BM in CDCl₃

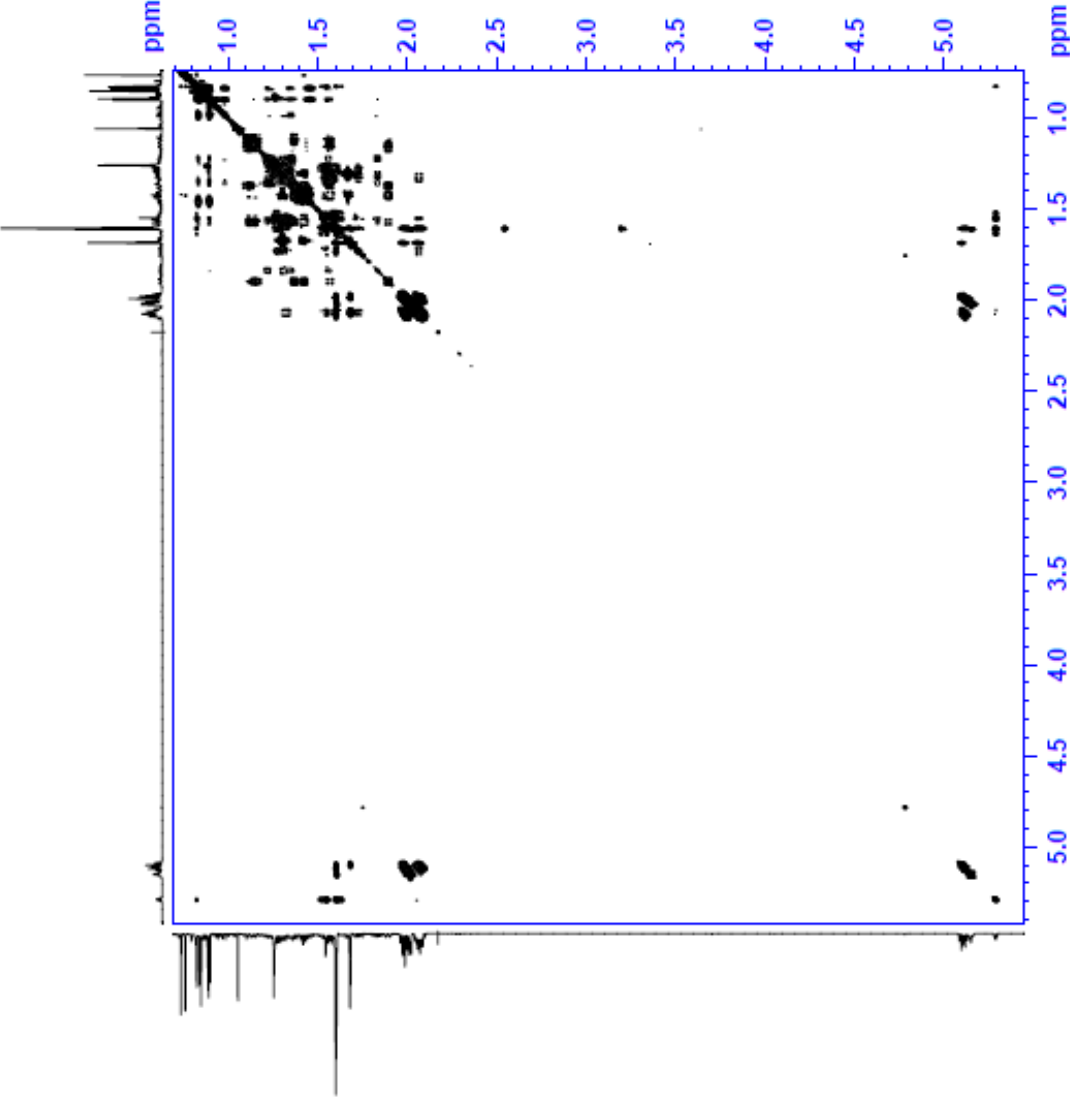


Abbildung 7: NOESY-Spektrum von BM in CDCl_3

