



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Phytochemische Untersuchungen der Nebenwurzeln von
Metaxya rostrata

Verfasserin

Teresa Pemmer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu verfassen und für ihre hilfsbereite und unkomplizierte Betreuung während der gesamten Arbeit.

Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch, Vorstand des Departments für Pharmakognosie, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zur Durchführung der praktischen Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Mag. Kerstin Kainz, die mir stets mit wertvollen Tipps und einem offenen Ohr und viel Geduld zur Seite gestanden ist.

Ich möchte mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Departments für Pharmakognosie bedanken, mit deren Hilfe mir ein angenehmes und reibungsloses Arbeiten ermöglicht wurde.

Besonders danke ich meiner Mutter und meinen Großeltern die mich während des gesamten Studiums nicht nur in finanzieller Hinsicht immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
2	Material und Methoden.....	3
2.1	Material.....	3
2.2	Methoden.....	3
2.2.1	Extraktion.....	3
2.2.2	Säulenchromatographie (SC).....	4
2.2.3	Dünnschichtchromatographie (DC).....	4
2.2.3.1	Stationäre und mobile Phasen.....	4
2.2.3.2	Detektionsverfahren.....	5
2.2.4	NMR- Spektroskopie.....	5
3.	Ergebnisse.....	6
3.1.	Aufarbeitung des Ethylacetatextraktes der Nebenwurzeln.....	6
3.1.1	SC 1.....	6
3.1.2	Dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgewählter Sammelfractionen von SC 1.....	11
3.1.2.1	DC – Vergleich mit Zuckern.....	11
3.1.2.2	DC – Vergleich mit Phenolcarbonsäuren.....	13
3.1.2.3	DC – Vergleich mit Flavonoiden.....	15
3.1.2.4	DC – Vergleich mit trimeren Proanthocyanidinen.....	18
3.1.2.5	DC – Vergleich mit den Methylencyclopropanglucosiden KK1 und KK5.....	19
3.1.3	Fraktionierung der Sammelfraktion 10 von SC 1.....	20
3.1.3.1	SC 2.....	20
3.1.3.2	SC 3.....	24
3.1.3.3	SC 4.....	26
3.1.4	Fraktionierung der Sammelfraktion 19 von SC 1 (= SC 5).....	28
3.2	Strukturaufklärung mittels NMR Spektroskopie.....	32
4.	Diskussion der Ergebnisse.....	37
5.	Zusammenfassung.....	39
6.	Summay.....	40
	Literaturverzeichnis.....	I
	Abbildungsverzeichnis.....	II

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Curriculum Vitae.....	V
Anhang	VII

1 Einleitung und Problemstellung

Metaxya rostrata (C. Presl) ist ein immergrüner Baumfarn, der zur Familie der Metaxiaceae zählt. Innerhalb dieser Familie wurden bis jetzt nur zwei Arten beschrieben, *Metaxya rostrata* (C. Presl) und *Metaxya lanosa* (A. R. Sm. & H. Tuomisto). Beide sind in den Flachlandregenwäldern Mittelamerikas und des nördlichen Südamerikas beheimatet. So auch in Costa Rica, wo *Metaxya rostrata* ethnomedizinisch als Arzneipflanze eingesetzt wird. Einheimische Heiler verwenden das Rhizom zur Behandlung von Ulcera und Geschwüren des Magen-Darm-Trakts. Die Droge wird gepulvert als wässrige Suspension oral verabreicht [1].

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



Da es zu den Wirkstoffen dieser Pflanze keine Informationen gab, wurde sie einer aktivitätsgeleiteten Untersuchung zur Isolierung von zytotoxisch gegenüber Kolonkrebzelllinien wirkenden Komponenten unterzogen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden bisher zwei zytotoxische, trimere Proanthocyanidine isoliert, Aesculitannin B und Cinnamitannin B-1. Weiters konnte das Vorliegen von

1. Einleitung und Problemstellung

Sterolen, phenolischen Komponenten und Zuckern, wie Glucose und Fructose, gezeigt werden [1].

Im Rahmen vorangegangener Dissertationen [2,3] wurden weitere phytochemische Untersuchungen durchgeführt. Neben dem Rhizom wurden auch die Nebenwurzeln und die Blätter mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Um ein breites Inhaltsstoffspektrum abzudecken, wurden Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität eingesetzt. Im Zuge dieser Arbeiten wurden zwei Methylencyclopropanglucoside isoliert [3]. Weiters konnte das Vorliegen zweier Triterpene, Squalen und Fern-9(11)-en, in den Blättern des Baumfarnes nachgewiesen werden [4].

**Abbildung 2: Pflanzenmaterial von *Metaxya rostrata*
links: Rhizom, Mitte: Nebenwurzeln, rechts: Blätter [2]**



Da in diesen Arbeiten in den Nebenwurzeln ein sehr komplexes Inhaltsstoffspektrum nachgewiesen werden konnte, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Ethylacetatextrakt und ein Methanolextrakt der Nebenwurzeln hergestellt werden, obwohl deren zytotoxisches Potential in Voruntersuchungen geringer war. Ziel war es, die Inhaltsstoffe des Ethylacetatextraktes mittels Säulenchromatographie zu fraktionieren und Reinsubstanzen zu isolieren, deren Struktur mittels NMR – Spektroskopie identifiziert werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Es standen 1 kg getrocknete und pulverisierte Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata* für die Extraktion zur Verfügung. Das Wurzelmaterial stammt aus Costa Rica und wurde 2008 in der Umgebung von La Gamba gesammelt und getrocknet. Nach der sorgfältigen Trennung von Rhizom und Nebenwurzeln wurde die Droge pulverisiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion

Für die Extraktion wurde 1 kg getrocknetes, pulverisiertes Pflanzenmaterial in Portionen zu je 100 g jeweils mit 900 ml Extraktionsmittel für eine Stunde im Ultraschallbad bei 40°C extrahiert und anschließend über eine Nutsche filtriert. Dieser Vorgang wurde jeweils 4-mal wiederholt. Die Extraktionslösungen wurden unter vermindertem Druck am Rotavapor zur Trockene eingengt.

Als Extraktionsmittel wurde zum einen Ethylacetat und zum anderen Methanol verwendet. Die mit Ethylacetat extrahierte Droge wurde getrocknet und in gleicher Weise mit Methanol extrahiert. Die Extraktionen ergaben 5,1 g Ethylacetatextrakt und 9 g Methanolextrakt.

Abbildung 3: Extraktion mittels Ultraschallbad



2. Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der erhaltene Ethylacetatextrakt genauer untersucht.

Die Fraktionierung des Methanolextraktes soll im Zuge einer weiteren Arbeit durchgeführt werden, da diese im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

2.2.2 Säulenchromatographie (SC)

Der Ethylacetatextrakt der Nebenwurzeln wurde mittels Säulenchromatographie aufgetrennt. Um die enthaltenen Substanzen aufzureinigen, wurden ausgewählte Fraktionen weiter fraktioniert. Im Laufe dieser Arbeit wurden als stationäre Phasen entweder Kieselgel 60 Korngröße 0,063-0,200 mm (Merk) oder Sephadex® LH-20 (Sigma) verwendet. Als mobile Phasen standen verschiedene Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische zur Verfügung, auf die in den einzelnen Kapiteln näher eingegangen wird.

Um Sammelfractionen zu bilden, wurde jede fünfte bzw. jede zehnte Fraktion dünn-schichtchromatographisch untersucht und die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung vereinigt.

2.2.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

2.2.3.1 Stationäre und mobile Phasen

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Merck)
Schichtdicke 0,25 mm
Größe 5x10, 10x10, 10x20, 20x20 cm

mobile Phasen: A: Ethylacetat - Ameisensäure - Methanol - Wasser (70 + 8 + 4 + 4)
B: Toluol - Ethylformiat - Ameisensäure (5 + 4 + 1)
C: Ethylacetat - Ameisensäure - Methanol - Wasser (70 + 8 + 8 + 11)
D: Toluol - Ethylformiat - Ameisensäure (10 + 4 + 1)
E: Dichlormethan - Ameisensäure - Ethylformiat (30 + 5 + 30)
F: Toluol - Ethylformiat - Ameisensäure (30 + 30 + 5)

2.2.3.2 Detektionsverfahren

Anisaldehyd - Schwefelsäure - Reagens (AASS)

5 ml Schwefelsäure werden vorsichtig unter Kühlung zu einer Mischung aus 85 ml Methanol und 10 ml Eisessig hinzugefügt. Nach kurzem Überkühlen werden 0,5 ml Anisaldehyd zugesetzt. Nach Besprühen der DC – Platten mit diesem Reagens, werden diese für 10 - 15 min im Trockenschrank bei 100°C erhitzt. Anschließend wird bei Tageslicht ausgewertet [5].

Naturstoffreagenz A und Polyethylenglycol 400 (NA/PEG)

Die DC - Platten werden nacheinander mit einer 1% igen methanolischen Naturstoffreagenz - A- Lösung (= Diphenylboryloxyethylamin) und einer 5% igen ethanolischen Polyethylenglycol 400 - Lösung besprüht. Nach Trocknung an der Luft werden die Platten unter UV - Licht mit der Wellenlänge 366 nm ausgewertet [5].

2.2.4 NMR - Spektroskopie ¹

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

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

Messtemperatur: 298 K

Lösungsmittel: Methanol - d₄

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

¹ Ich danke Herrn Ass. Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für Organische Chemie der Universität Wien, für die Durchführung der NMR. Analysen.

3. Ergebnisse

Aus den Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata* wurden ein Ethylacetatextrakt und ein Methanolextrakt hergestellt (siehe 2.2.1, Seite 3). Der Ethylacetatextrakt wurde zur weiteren Aufarbeitung herangezogen.

3.1. Aufarbeitung des Ethylacetatextraktes der Nebenwurzeln

Nach der Extraktion des Drogenmaterials standen 5 g Ethylacetatextrakt der Nebenwurzeln (E-NW) zur Verfügung. Zur Vorfraktionierung wurde eine Säulenchromatographie an Sephadex® LH 20 durchgeführt.

3.1.1 SC 1

In der DC wurden mobile Phasen unterschiedlicher Polarität getestet, um das geeignetste Fließmittel zur Auftrennung des Extraktes zu ermitteln. Danach wurde der Extrakt mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH 20 wie folgt aufgetrennt.

Säule 1

Durchmesser : 3 cm

Füllhöhe: 90 cm

stationäre Phase : Sephadex® LH 20

mobile Phase: Gradientenelution mit

Ethylacetat - Methanol - Gemischen

(siehe Tab.1, Seite 7)

Auftragsmenge: 5 g E-NW gelöst in Ethylacetat/Methanol (9+1)

Abbildung 4: Säule 1



Tabelle 1: Fließmittelgemische von SC 1

Fraktionen	Zusammensetzung der mobilen Phase in Teilen	
	EtAc	MeOH
1 bis 135	90	10
136 bis 165	80	20
166 bis 255	75	25
256 bis 295	70	30
296 bis 485	65	35
486 bis 540	60	40
541 bis 675	20	80
676 bis 710	15	85
711 bis 745	10	90
746 bis 795	5	95
Nachlauf	0	100

Es wurden 795 Fraktionen zu je ca. 10 ml/ 40 min gesammelt.

Um die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung zu Sammelfraktionen zu vereinigen, wurden sie dünnschichtchromatographisch überprüft. In Tabelle 2 (siehe Seite 8) sind die Sammelfraktionen aufgelistet.

3. Ergebnisse

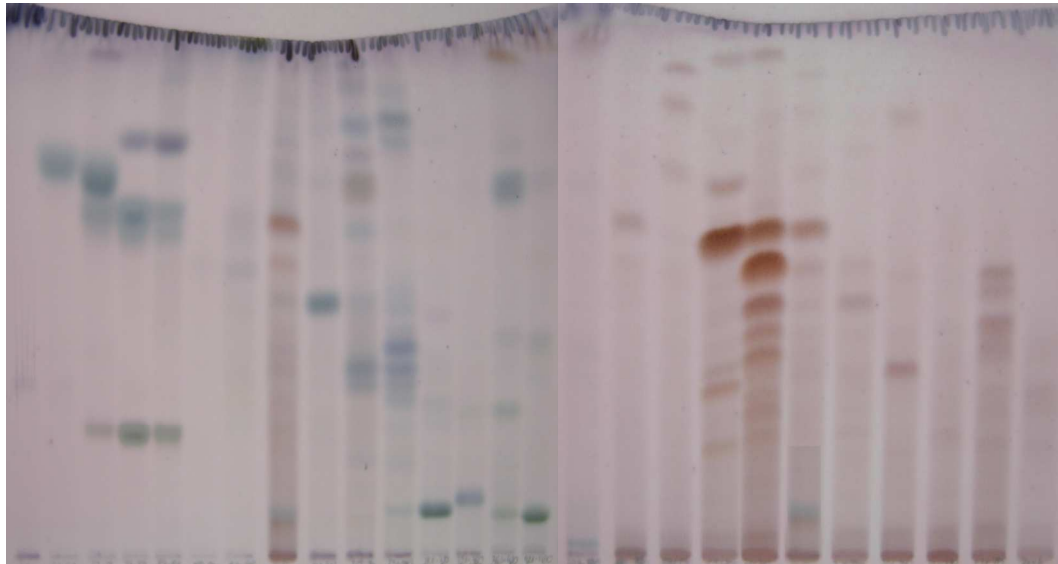
Tabelle 2: Sammelfractionen von SC 1

Sammelfraktion	Einzelfractionen	Menge (mg)	Bearbeitung & DC-Vergleich
1	1-40	560,0	
2	41-61	62,5	
3	62-72	85,0	
4	73-83	67,5	
5	84-101	30,0	
6	102-120	44,3	
7	121-170	100,0	DC / Seite 13
8	171-211	105,0	
9	212-230	72,6	
10	231-280	340,0	SC 3 / Seite 24
11	281-320	123,0	DC / Seite 11
12	321-360	55,3	DC / Seite 11
13	361-420	109,1	
14	421-480	55,0	
15	481-540	31,3	
16	541-670	663,0	DC / Seite 15
17	671-690	175,0	
18	691-700	318,0	DC / Seite 18
19	701-710	190,0	SC 4 / Seite 26
20	711-730	132,0	
21	731-750	57,0	
22	751-770	103,0	
23	771-795	150,0	
24	Nachlauf	200,0	

Nach Vereinigung der Sammelfractionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt. Es wurden verschiedene DC-Systeme verwendet, um einen möglichst großen Polaritätsbereich zu analysieren (siehe Abb. 5 bis 7, Seite 9 und 10).

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

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 20 cm)
mobile Phase: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 4 + 4)



SF: 1 2 3 4 5 6 7 V 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 V 20 21 22 23 R

V...Vergleich E-NW

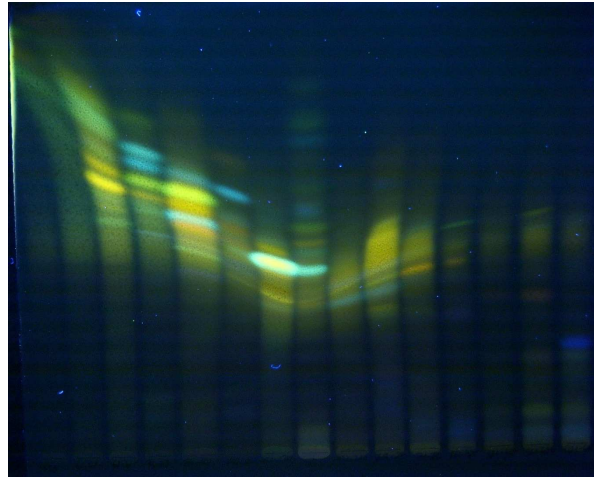
R...Nachlauf

Bei der Detektion mit NA/PEG mussten zwei Fließmittel unterschiedlicher Polarität verwendet werden, da im System A (EtAc-MeOH-Ameisensäure-H₂O) die apolaren Substanzen, die in SF 1 bis 14 enthalten waren, mit der Fließmittelfront eluierten (siehe Abb. 6 und 7, Seite 10).

3. Ergebnisse

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

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 20 cm)
mobile Phase : Toluol – Ethylformiat – Ameisensäure (5 + 4 + 1)



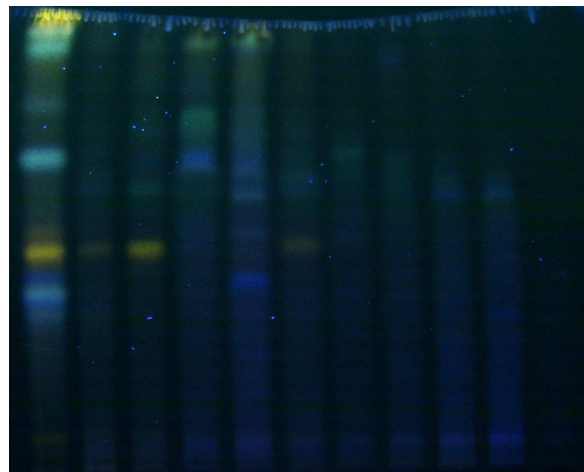
SF: 1 2 3 4 5 6 7 V 8 9 10 11 12 13 14

V...Vergleich E-NW

R...Nachlauf

Abbildung 7: DC der SF der SC 1, Detektion mit NA/PEG

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 20cm)
mobile Phase : Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 4 + 4)



SF: 15 16 17 18 19 V 20 21 22 23 R

V...Vergleich E-NW

R...Nachlauf

Sowohl bei der Detektion mit AASS, als auch bei der mit NA/PEG zeigte sich, dass die Fraktionen teilweise sehr komplex zusammengesetzt waren.

In den Sammelfractionen 11 und 12 bei Detektion mit AASS wurden blaue bzw. grüne Banden bei Rf ca. 0,1 detektiert, bei denen die Vermutung nahe lag, dass es sich um Zucker handeln könnte.

Bei der Detektion mit NA/PEG war zu erkennen, dass in fast allen Fractionen phenolische Komponenten enthalten waren.

In Sammelfraction 7 war die phenolische Hauptkomponente des Extraktes bei Rf ca. 0,5 mit auffällig blauer Fluoreszenz angereichert. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um Kaffeesäure oder Chlorogensäure handelt, da das Vorliegen dieser beiden Phenolcarbonsäuren in *Metaxya rostrata* bereits bestätigt worden war [1].

Neben dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen mit Vergleichssubstanzen (siehe Kapitel 3.1.2, Seite 11) wurden, aufgrund der Menge der Fraction und des Vorhandenseins deutlicher Hauptkomponenten, Sammelfraction 10 zur Isolierung der Banden bei Rf ca. 0,35 und Rf ca. 0,4 bei Detektion mit AASS und Sammelfraction 19 zur Isolierung der Bande bei Rf ca. 0,55 bei Detektion mit AASS für die weitere Aufarbeitung herangezogen.

3.1.2 Dünnschichtchromatographische Vergleiche ausgewählter Sammelfractionen von SC 1

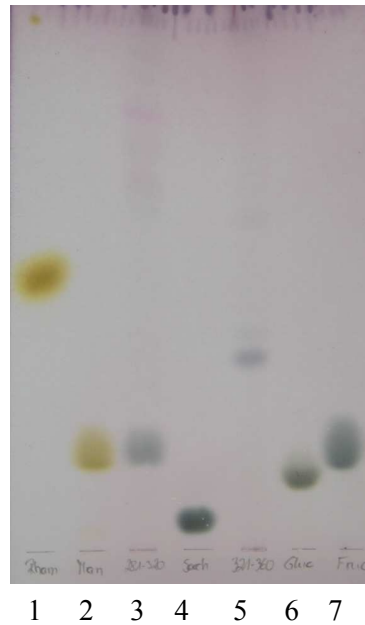
3.1.2.1 DC – Vergleich mit Zuckern

Das Vorliegen von Zuckern im Rhizom von *Metaxya rostrata* war bereits gezeigt worden [1]. Aufgrund der Färbung mit AASS und der Rf Werte mehrerer Banden konnte davon ausgegangen werden, dass einige Sammelfractionen Zucker enthielten. Daher wurden mittels DC die Sammelfractionen 11 und 12 mit Zuckern verglichen. Aufgrund der Färbung mit AASS und der unterschiedlichen Rf Werte konnten bis auf Fructose alle Zucker ausgeschlossen werden (siehe Abb. 8, Seite 12).

3. Ergebnisse

Abbildung 8: DC - Vergleich von SF 11 mit Zuckern, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 10 cm)
mobile Phase : Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 8 + 11)
2-mal entwickelt



Bahn	Substanz	Bahn	Substanz
1	Rhamnose	5	SF 12
2	Mannose	6	Glucose
3	SF 11	7	Fructose
4	Saccharose		

Mit SF 11 und Fructose wurde deshalb eine DC angefertigt, auf der deutlich zu erkennen war, dass es sich bei der Bande bei Rf ca. 0,15 um Fructose handelt (siehe Abb. 9, Seite 13).

Abbildung 9: Fructose und SF. 11, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 5 cm)
mobile Phase : Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 8 + 11)
2-mal entwickelt



SF 11 Fructose

Das Vorliegen von Fructose wurde somit bestätigt.

3.1.2.2 DC – Vergleich mit Phenolcarbonsäuren

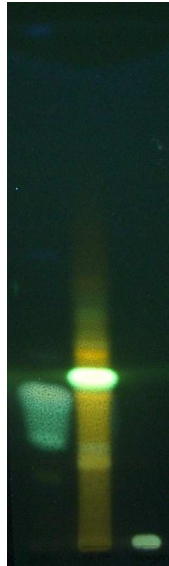
Aufgrund der hellblau fluoreszierenden Färbung der Bande bei Rf ca. 0,5 in SF 7 bei Detektion mit NA/PEG (siehe Abb. 6, Seite 10), wurde ein Vergleich mit Kaffeesäure und Chlorogensäure vorgenommen (siehe Abb. 10, Seite 14).

Beide Phenolcarbonsäuren waren bereits im Rhizom von *Metaxya rostrata* nachgewiesen worden [1].

3. Ergebnisse

**Abbildung 10: DC - Vergleich von SF 7 mit Phenolcarbonsäuren,
Detektion mit NA/PEG**

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 5 cm)
mobile Phase : Toluol - Ethylformiat - Ameisensäure (10 + 4 + 1)



1 2 3

Bahn	Substanz
1	Kaffeensäure
2	SF 7
3	Chlorogensäure

Da die Kaffeensäure einen niedrigeren R_f Wert (R_f ca. 0,28) als die Hauptkomponente von SF 7 (R_f ca. 0,3) aufwies und die Chlorogensäure noch polarer ist und nicht vom Start eluiert wurde, konnten beide Substanzen ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Menge und der Zusammensetzung von SF 7, wäre eine weitere Auftrennung für die Charakterisierung der Substanz möglich. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht durchführbar.

3.1.2.3 DC – Vergleich mit Flavonoiden

Sammelfraktion 16 von SC 1 zeigte bei der Detektion mit NA/PEG eine Hauptkomponente bei Rf ca. 0,52 mit gelber Fluoreszenz.

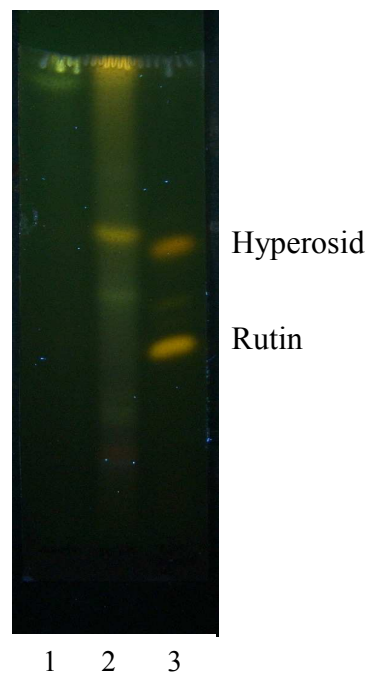
Es wurde vermutet, dass es sich dabei um ein Flavonoid handeln könnte. Die Färbung deutete auf ein Flavanol mit Quercetinstruktur hin.

Als Vergleichssubstanzen wurden daher Quercetin, Rutin und Hyperosid ausgewählt (siehe Abb. 11).

Abbildung 11: DC – Vergleich von SF 16 mit Flavonoiden, Detektion: NA/PEG

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 5 cm)

mobile Phase : Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 8 + 11)



1 2 3

Bahn	Substanz
1	Quercetin
2	SF 16
3	Rutin/Hyperosid

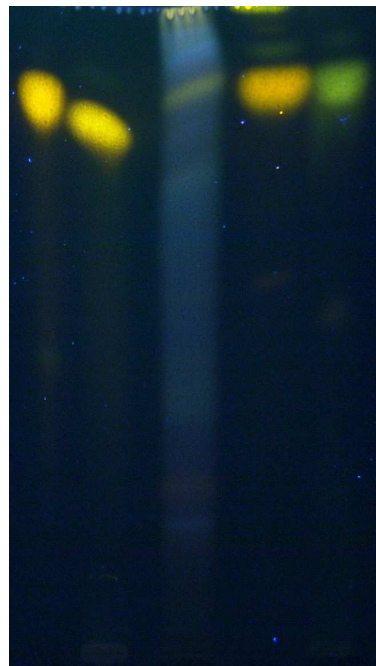
Da diese 3 Substanzen weder in Farbe, noch in Polarität der gesuchten Komponente entsprachen, wurde ein weiterer Vergleich mit Verbindungen, deren Polarität zwischen der von Quercetin und Rutin liegt, durchgeführt.

3. Ergebnisse

Dabei handelte es sich um die Substanzen Luteolin-7O-glucosid, Orientin, Isoquercitrin und Luteolin-4'O-glucosid (siehe Abb. 12).

Abbildung 12: DC – Vergleich von SF 16 mit Flavonoiden, Detektion: NA/PEG

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 10 cm)
mobile Phase : Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 8 + 11)



1 2 3 4 5

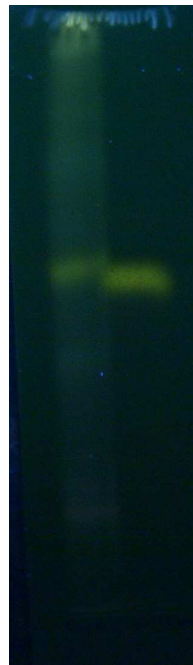
Bahn	Substanz
1	Luteolin-7O-glucosid
2	Orientin
3	SF 16
4	Isoquercitrin
5	Luteolin-4'O-glucosid

Luteolin-7O-glucosid, Orientin und Isoquercitrin konnten aufgrund ihrer orangen Farbe und ihrer R_f-Werte ausgeschlossen werden.

Bei Luteolin-4'O-glucosid konnte erst ein weiterer dünnschichtchromatographischer Vergleich (siehe Abb. 13, Seite 17) sicherstellen, dass es sich bei der gesuchten Komponente um eine etwas apolarere Verbindung als Luteolin-4'O-glucosid handelt.

**Abbildung 13: DC – Vergleich von SF 16 mit Luteolin-4'-O-glucosid ,
Detektion: NA/PEG**

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 10 cm)
mobile Phase : Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 4 + 4)



1 2

Bahn	Substanz
1	SF 16
2	Luteolin-4'O-glucosid

Aufgrund der vorhandenen Menge von ca. 0,6 g von SF 16 und des Auftretens derselben gelb fluoreszierenden Bande in weiteren Sammelfractionen, könnte eine weitere Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie zur Isolierung und Identifizierung dieser Komponente vorgenommen werden. Dies war aber im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht durchführbar.

3.1.2.4 DC – Vergleich mit trimeren Proanthocyanidinen

In einer vorangegangenen Dissertation [2] wurden bereits die zytotoxisch wirkenden, trimeren Proanthocyanidine Aesculitannin B und Cinnamitannin B-1 als Gemisch (= JV1) aus dem Rhizom von *Metaxya rostrata* isoliert und identifiziert. Aufgrund der rötlichen Färbung bei der Detektion mit AASS war es nahe liegend, dass diese beiden Verbindungen in einer der Sammelfractionen vorliegen. Der dünnschichtchromatographische Vergleich mit ausgewählten Sammelfractionen ergab, dass dieses Proanthocyanidin - Gemisch in SF 16, SF 18 und SF 19 enthalten war und im verwendeten Fließmittel bei Rf ca. 0,85 (siehe Abb. 14) detektiert wurde.

Da diese Komponenten bereits bekannt sind, war es von größerem Interesse, die stärker orangerot gefärbte Komponente mit Rf ca. 0,83 aus SF 19 zu isolieren. (siehe Kapitel 3.1.4 Seite 28 ff)

Abbildung 14: DC – Vergleich von SF 16 – SF 19 mit JV1, Detektion: AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 10 cm)
mobile Phase : Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 8 + 11)



SF: 16 17 JV1 18 19

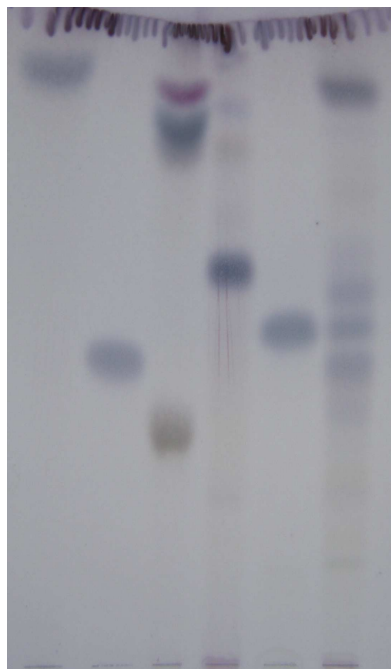
3.1.2.5 DC – Vergleich mit den Methylencyclopropanglucosiden KK1 und KK5

In einer weiteren Arbeit [3] wurden die zwei Methylencyclopropanglucoside, (2E)-2-(6-hydroxyhexyliden)cyclopropyl- β -glucopyranosid (KK1) und (6E)-6 [2-(β -glucopyranosyloxy)cyclopropyliden]hexansäure (KK5) identifiziert.

Um herauszufinden, ob diese beiden Substanzen ebenfalls im Ethylacetatextrakt der Nebenwurzeln enthalten waren, wurde auch hier ein dünnschichtchromatographischer Vergleich durchgeführt (siehe Abb. 15).

Abbildung 15: DC – Vergleich von SF 2, 4, 8, 10 mit KK1 und KK5, Detektion: AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 10 cm)
mobile Phase : Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 4 + 4)



1 2 3 4 5 6

Bahn	Substanz
1	SF 2
2	KK1
3	SF 4
4	SF 8
5	KK5
6	SF 10

3. Ergebnisse

Wie der Vergleich zeigte, waren die beiden Methylencyclopropanglucoside in SF 10 bei Rf ca. 0,45 (KK1) und bei Rf ca. 0,51 (KK5) enthalten.

Daher lag das Hauptaugenmerk der weiteren Untersuchung auf der Isolierung der noch nicht identifizierten dunkelblau gefärbten Bande bei Rf ca. 0,88 aus SF 10 (siehe Kapitel 3.1.3).

3.1.3 Fraktionierung der Sammelfraktion 10 von SC 1

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2.5 (siehe Seite 19) erwähnt, lagen in SF 10 von SC 1 KK1 und KK5 vor. Weiters war aber eine deutliche Bande bei Rf ca. 0,88 zu erkennen. Da der Polaritätsunterschied zwischen diesen Substanzen groß war, konnte eine Auftrennung an Kieselgel 60 erfolgen. SF 10 wurde in Methanol – wassergesättigtem Ethylacetat (9+1) gelöst und auf 0,5 g Kieselgel aufgezogen.

3.1.3.1 SC 2

Säule 2:

Durchmesser : 1,5 cm

Füllhöhe: 85 cm

stationäre Phase: Kieselgel 60

mobile Phase: Gradientenelution mit wassergesättigtem Ethylacetat – Methanol
(siehe Tab.3)

Auftragsmenge: 340 mg SF 10 von SC 1

Tabelle 3: Fließmittelgemische von SC 2

Fraktionen	Zusammensetzung der mobilen Phase in Teilen	
	wasserges. EtAc	MeOH
1 bis 240	90	10
241 bis 380	80	20
381 bis 430	70	30
431 bis 540	65	35
541 bis 580	60	40
581 bis 590	50	50
Nachlauf	0	100

Es wurden Fraktionen zu je ca. 5 ml/h gesammelt. Entsprechend ihrer Zusammensetzung wurden die Fraktionen zu Sammelfraktionen vereinigt.

Tabelle 4: Sammelfraktionen von SC 2

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-50	2,4
2	51-60	3,0
3	61-90	9,1
4	91-120	6,9
5	121-141	4,9
6	142-151	7,5
7	152-164	10,3
8	165-177	3,0
9	178-210	11,7
10	211-228	4,5
11	229-290	18,6
12	291-302	3,0
13	303-340	9,5
14	341-380	6,6
15	381-400	3,3
16	401-430	13,6
17	431-450	4,2
18	451-490	12,1
19	491-580	18,3
20	Nachlauf	120,0

Von diesen Sammelfraktionen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 16, Seite 22). Die Sammelfraktionen von SC 2 waren mengenmäßig relativ klein, da der Großteil der getrennten Fraktion offensichtlich aus nicht mit AASS anfärbbaren Begleitstoffen bestand, die in der DC nicht vom Start eluiert wurden. Da das Augenmerk auf der blauen Bande bei Rf ca. 0,88 lag (siehe Abb. 15, Seite 19), wurde nur mit AASS detektiert.

3. Ergebnisse

Abbildung 16: DC der Sammelfractionen der SC 2, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 20 cm)
mobile Phase: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 8 + 11)



SF: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 V

V...SF 10 (SC 1)

R...Nachlauf



10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 R V

V...SF 10 (SC 1)

R...Nachlauf

In SF 13 konnte eine relativ reine Komponente mit R_f ca. 0,97 angereichert werden, die aufgrund der vorliegenden Menge von ca. 9 mg zur weiteren Auftrennung herangezogen werden konnte.

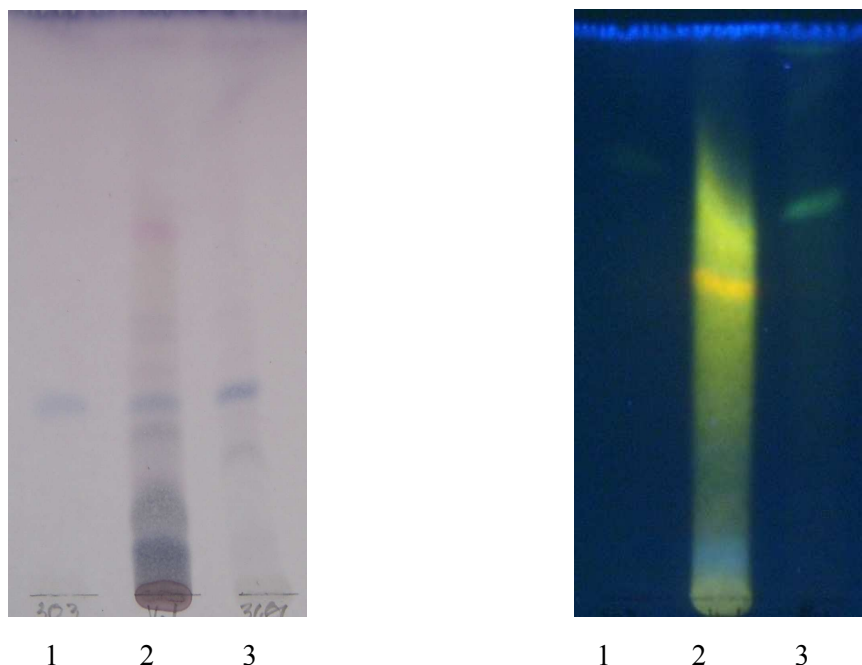
Um zu überprüfen, dass keine weiteren Banden mit der Fließmittelfront eluierten, wurde SF 13 vor der weiteren Fraktionierung mit einem Fließmittel niedrigerer Polarität dünnschichtchromatographisch untersucht. Außerdem wurde das Dünnschichtchromatogramm mit NA/PEG detektiert, um eventuelle phenolische Begleitstoffe auszuschließen (siehe Abb. 17).

Weiters konnte in SF 7 eine dunkelviolette Bande bei R_f ca. 0,5 angereichert werden. Da in dieser Fraktion mehrere Begleitstoffe erkennbar waren und nur eine geringe Menge vorhanden war, wurde von einer weiteren Aufreinigung abgesehen.

Durch SC 2 konnten KK5 in SF 16 und SF 17 bzw. KK1 in SF 10 angereichert werden.

Abbildung 17: DC - Überprüfung von SF 13 auf Reinheit, Detektion: AASS und NA/PEG

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (10 x 5 cm)
mobile Phase: Dichlormethan - Ameisensäure - Ethylformiat (30 + 5 + 30)



Bahn	Substanz
1	SF 13
2	SF 10 (SC 1)
3	SF 14

3. Ergebnisse

Die DC – Überprüfung zeigte, dass keine phenolischen Verunreinigungen in SF 13 vorlagen und daher die hellblaue Bande bei Rf ca. 0,97 (siehe Abb. 16, Seite 22) nahezu rein vorlag. Daher wurde SF 13 von SC 2 weiter aufgereinigt (siehe 3.1.3.2).

3.1.3.2 SC 3

Das Ziel dieser Fraktionierung war es, aus SF 13 von SC 2 die bei Detektion mit AASS blau gefärbte Komponente bei Rf ca. 0,97 zu isolieren.

Um eventuelle Verunreinigungen abzutrennen, wurde eine Auftrennung aufgrund der Molekülgröße an Sephadex® LH 20 vorgenommen.

Säule 3:

Durchmesser: 1 cm

Füllhöhe: 20 cm

stationäre Phase: Sephadex® LH 20

mobile Phase: Methanol

Auftragsmenge: 9 mg

Es wurden 26 Fraktionen zu je 1 ml/5 min gesammelt.

Nach dünnenschichtchromatographischer Überprüfung wurden folgende Sammelfraktionen hergestellt.

Abbildung 18: Säule 3



Tabelle 5: Sammelfraktionen von SC 3

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-9	2,5
2	10	0,82
3	11	0,66
4	12	0,76
5	13	1,53
6	14-19	0,97
7	20-26	1,66

Von diesen Sammelfractionen wurde ebenfalls ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt (siehe Abb. 19).

Abbildung 19: DC der Sammelfractionen der SC 3, Detektion mit AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 10 cm)
mobile Phase: Dichlormethan - Ameisensäure - Ethylformiat (30 + 5 + 30)



V...SF 13 (SC 2)

Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, lag die gewünschte Komponente in SF 6 angereichert vor.

Aufgrund der geringen Menge war eine Analyse mittels NMR – Spektroskopie nicht möglich.

3. Ergebnisse

3.1.3.3 SC 4

Im Rahmen dieser Fraktionierung wurde die in einer vorangegangenen Arbeit bereits identifizierte Substanz KK5 nachisoliert, um sie für weitere toxikologische Untersuchungen an Kolonkrebszelllinien nutzen zu können. Dazu wurden SF 16 und SF 17 von SC 2 (siehe Abb. 16, Seite 22) vereinigt, in Methanol gelöst und ebenfalls an Sephadex® LH 20 aufgetrennt

Säule 4:

Durchmesser: 0,5 cm

Füllhöhe: 25 cm

stationäre Phase: Sephadex® LH 20

mobile Phase: Methanol

Auftragsmenge: 17 mg

Es wurden 34 Fraktionen zu je 1 ml/5 min gesammelt. Die entsprechenden Fraktionen wurden wieder zu Sammelfraktionen vereinigt.

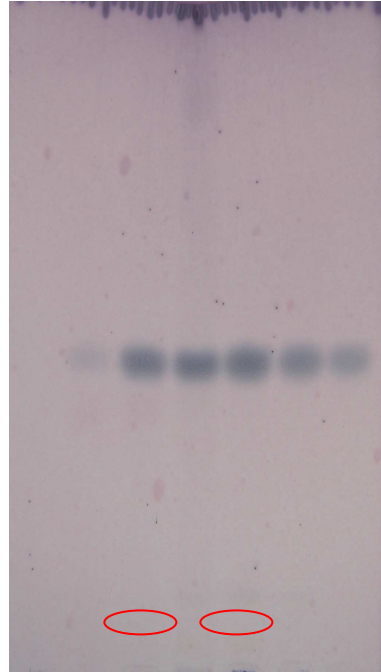
Tabelle 6: Sammelfraktionen von SC 4

Sammelfraktion	Einzelfraktionen	Menge (mg)
1	1-11	1,4
2	12-18	2,0
3	19	1,0
4	20-21	2,0
5	22	1,0
6	23-27	6,8
7	28-34	1,6

Von diesen Sammelfraktionen wurde wiederum ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt, um festzustellen, in welcher dieser Fraktionen KK5 angereichert und rein vorlag (siehe Abb. 20, Seite 27).

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

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 10 cm)
mobile Phase: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 4 + 4)



SF: 1 2 3 V 4 5 6

V...SF 16+17 (SC 2)

KK5 lag in SF 5 und 6 rein vor. Diese SF wurden für weiter toxikologische Untersuchungen herangezogen.

In SF 3 und 4 waren minimale Verunreinigungen am Start zu erkennen.

3. Ergebnisse

3.1.4 Fraktionierung der Sammelfraktion 19 von SC 1 (= SC 5)

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2.4 (siehe Seite 18) erwähnt, wurde in SF 19 von SC 1 das Proanthocyanidin – Gemisch Aesculitannin B und Cinnamitannin B-1 mittels DC – Vergleich identifiziert. Ziel dieser Fraktionierung war es, die unbekannte Bande bei Rf ca. 0,83 (siehe Abb. 14, Seite 18) zu isolieren.

Säule 5:

Durchmesser : 1,5 cm

Füllhöhe: 70 cm

stationäre Phase: Sephadex® LH 20

mobile Phase: Gradientenelution mit Methanol – Wasser Gemischen sinkender Polarität

Auftragsmenge: 190 mg SF 19 von SC 1, gelöst in MeOH/H₂O (5+5)

Tabelle 7: : Fließmittelgemische von SC 5

Fraktionen	Zusammensetzung der mobilen Phase in Teilen	
	MeOH	H ₂ O
1 bis 70	50	50
71 bis 120	55	45
121 bis 140	60	40
141 bis 220	70	30
221 bis 380	75	25
381 bis 410	80	20
411 bis 450	85	15
451 bis 470	90	10
Nachlauf	100	0

Es wurden Fraktionen zu je 6ml/h gesammelt.

Durch dünn-schichtchromatographische Überprüfung wurden die Fraktionen wie folgt zu Sammelfraktionen vereinigt.

Tabelle 8: Sammelfraktionen von SC 5

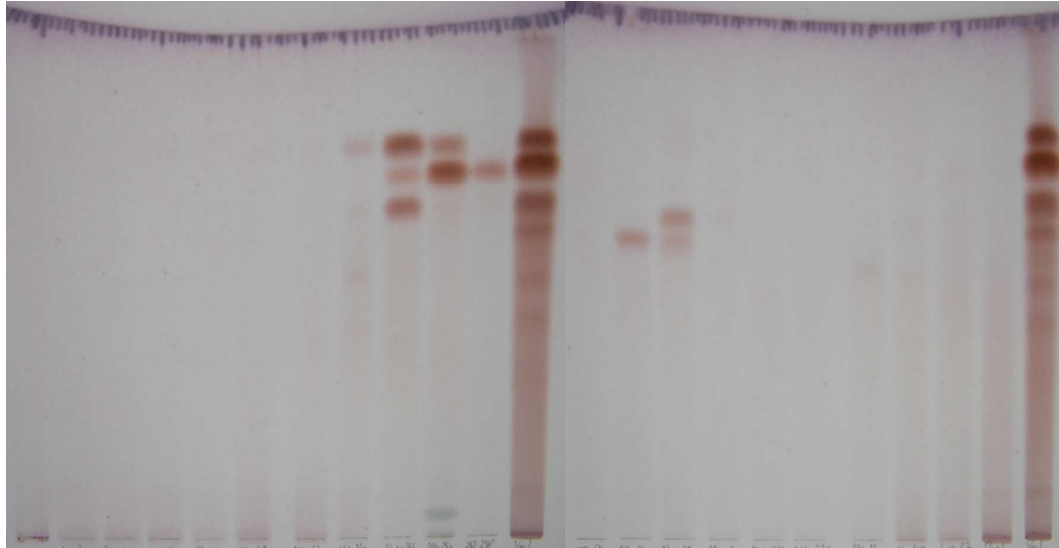
Sammelfraktion	Einzelaktionen	Menge (mg)
1	1-40	5,0
2	41-70	0,8
3	71-100	0,4
4	101-122	1,2
5	123-142	1,5
6	143-219	3,7
7	220-230	3,9
8	231-240	7,3
9	241-243	21,7
10	244-251	53,8
11	252-258	7,5
12	259-263	4,1
13	264-270	4,8
14	271-280	11,0
15	281-300	8,0
16	301-310	5,6
17	311-330	6,0
18	331-340	1,4
19	341-410	15,1
20	411-470	10,0
21	Nachlauf	10,0

Auch hier wurden zur Überprüfung der Sammelfraktionen Dünnschichtchromatogramme angefertigt (siehe Abb. 21, Seite 30). Da die rote Bande in SF 19 von SC 1 bei R_f ca. 0,83 bei Detektion AASS von Interesse war (siehe Abb. 14, Seite 18), wurde auf die Detektion mit NA/PEG verzichtet.

3. Ergebnisse

Abbildung 21: DC der Sammelfractionen der SC 5, Detektion: AASS

stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 20 cm)
mobile Phase: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 8 + 11)



SF: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 V 12 13 14 15 16 17 18 19 20 R V

V...SF 19 (SC 1)

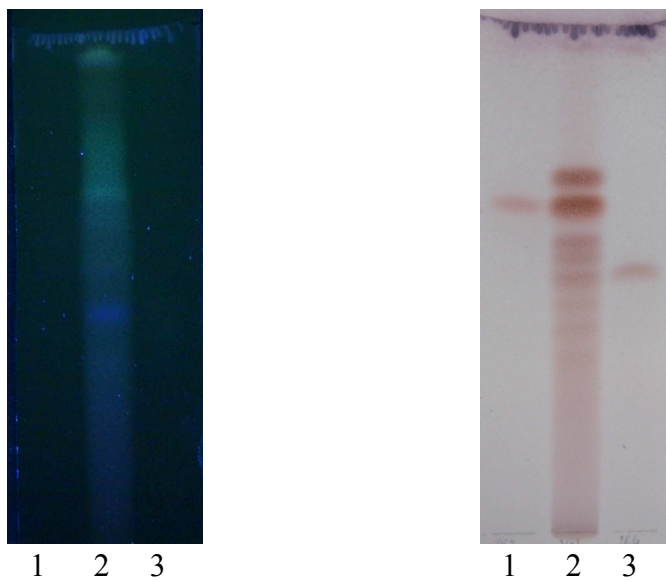
R...Nachlauf

Da als Fließmittel in der SC 5 ein Gemisch aus Methanol und Wasser verwendet worden war, wurden die Fraktionen nach Entfernung des Methanols unter vermindertem Druck mittels Lyophilisation zur Trockene gebracht.

Wie in Abbildung 22 (siehe Seite 31) zu erkennen ist, lagen sowohl die Komponente bei Rf ca. 0,7 in SF 11 als auch die Komponente bei Rf ca. 0,57 in SF 13 in chromatographisch einheitlicher Form vor. Um die Reinheit noch genauer zu überprüfen, wurde ein zusätzliches Dünnschichtchromatogramm mit NA/PEG angefertigt (siehe Abb. 22, Seite 31).

Abbildung 22: DC Kontrolle auf Reinheit von SF 11 und SF 13 von SC 5,**Detektion: AASS und NA/PEG**stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (20 x 5 cm)

mobile Phase: Ethylacetat – Ameisensäure – Methanol – Wasser (70 + 8 + 8 + 11)



Bahn	Substanz
1	SF 11
2	SF 19 (SC 1)
3	SF 13

Da beide Substanzen rein vorlagen und auch die Mengen ausreichend waren, wurden beide mittels NMR – Spektroskopie identifiziert (siehe Kapitel 3.2, Seite 32)

3.2 Strukturaufklärung mittels NMR - Spektroskopie

Die rein gewonnen Komponenten aus dem Ethylacetatextrakt der Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata* sollten mittels NMR- Spektroskopie identifiziert werden. Bei SF 6 von SC 3 war aufgrund der geringen Menge eine Charakterisierung nicht möglich. Bei den SF 11 und SF 13 von SC 5 hingegen war genug Substanz für eine Analyse vorhanden².

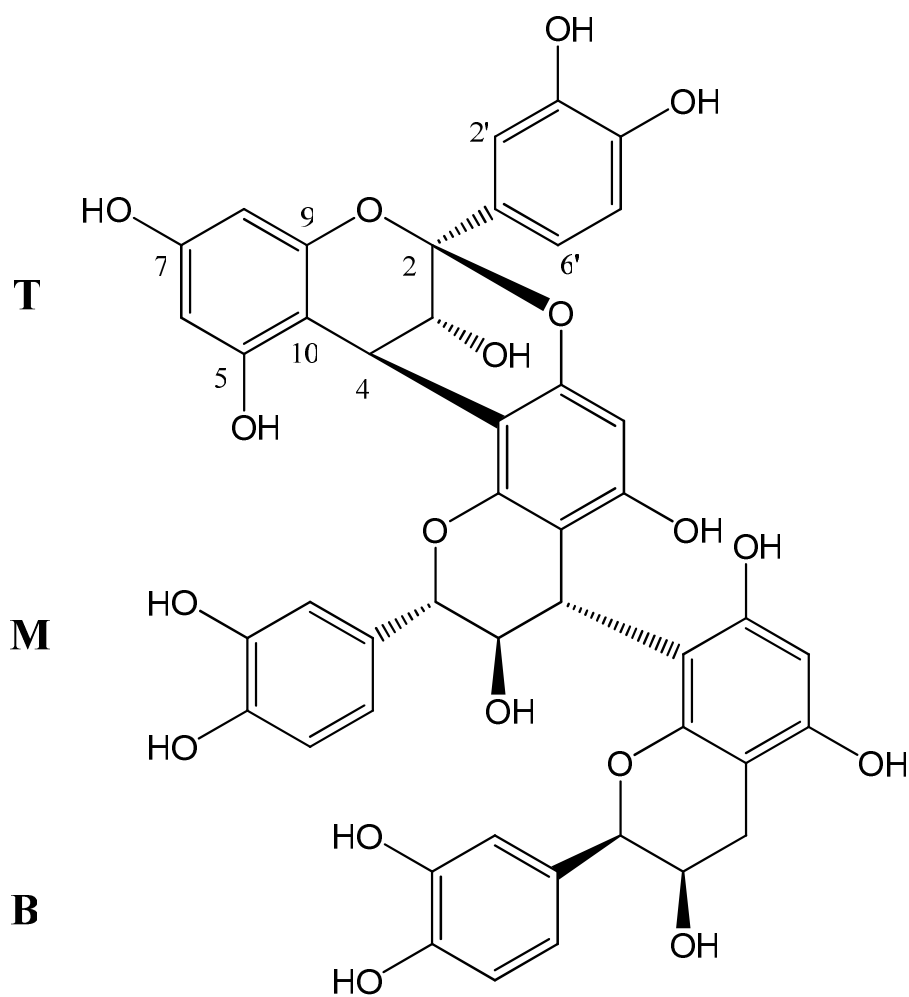
Bei SF 11 handelt es sich um Aesculitannin B, das bereits im Rhizom von *Metaxya rostrata* nachgewiesen worden war [1]. Die Verschiebungen der ¹H- und ¹³C-Atome im NMR korrelieren sehr gut mit den Daten aus der Literatur (siehe Tab. 9, Seite 34) [7].

Aesculitannin B war erstmals in *Aesculus hippocastanum* nachgewiesen worden[6]. Weiters kommt es in *Parameria laevigata*, *Machilus philippinensis* und *Lindera strychnifolia* vor [7, 8, 9]

Bei SF 13 handelt es sich um Proanthocyanidin A2. Auch hier sind die Verschiebungen im NMR gut mit denen aus der Literatur vergleichbar (siehe Tab. 10, Seite 36) [7, 10, 11]. Dieses Proanthocyanidin ist ebenfalls in *Aesculus hippocastanum* und *Parameria laevigata* beschrieben [6, 7]. Weiters wurde das Vorkommen von Proanthocyanidin A2 unter anderem in *Ecdysanthera utilis*, *Litchi chinensis* und in der Schale der Früchte von *Arachis hypogaea* nachgewiesen [10, 12, 13].

² Ich danke Herrn Ass. Prof. Mag. Dr. Hanspeter Kählig, Institut für Organische Chemie der Universität Wien, für die Durchführung der NMR Analysen.

Abbildung 23: Aesculitannin B

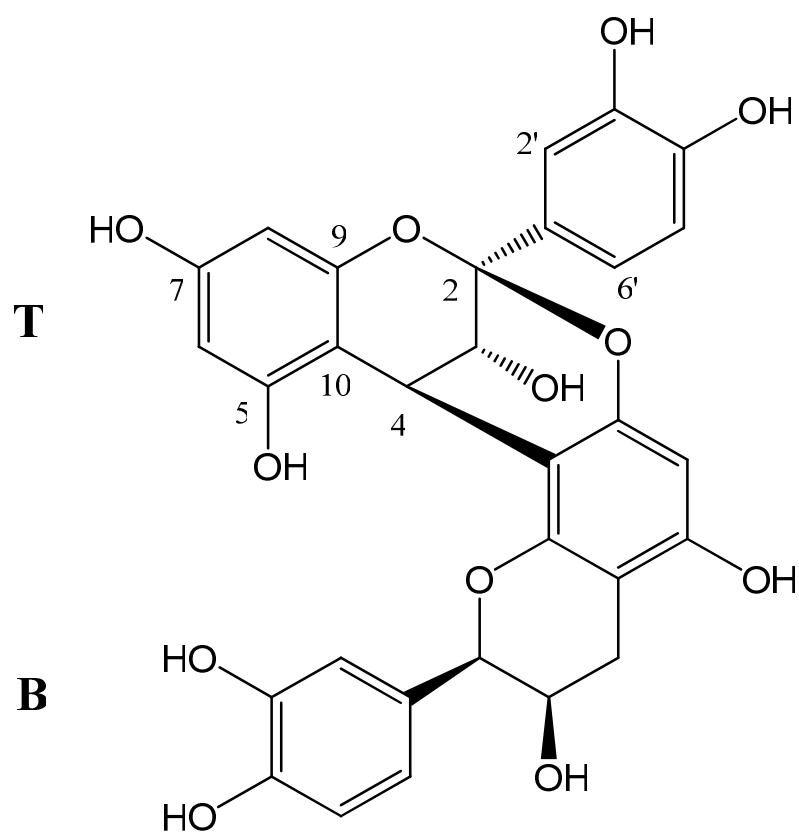


3. Ergebnisse

Tabelle 9: ¹H- und ¹³C- NMR Daten von Aesculitannin B

		¹ H(ppm)	¹ H Lit.[7]	J _{H,H}	J _{H,H} long range	¹³ C	¹³ C Lit.[7]
Top							
2	C					100,13	100,11
3	CH	3,311	3,31	3,5		67,07	67,05
4	CH	3,945	3,95	3,5	0,5/0,5	28,94	28,91
5	C					156,54	156,49
6	CH	5,845	5,85	2,4		97,85	97,86
7	C					158,00	157,95
8	CH	5,995	6,00	2,4	0,5	96,47	96,48
9	C					153,97	153,93
10	C					104,08	104,06
1'	C					132,27	132,24
2'	CH	7,011	7,02	2,2		115,70	115,68
3'	C					145,54	145,21
4'	C					146,68	145,50
5'	CH	6,798	6,83	8,3		115,66	115,98
6'	CH	6,848	6,86	8,3/2,2		119,27	119,82
Middle							
2	CH	4,615	4,62	9,6		84,53	84,48
3	CH	4,562	4,57	9,6/8,8		73,90	73,87
4	CH	4,512	4,51	8,8		39,07	39,04
5	C					155,42	155,37
6	CH	5,793	5,80	2,4	0,5	97,20	97,21
7	C					151,22	151,20
8	C					106,86	106,86
9	C					152,25	152,21
10	C					108,98	108,93
1'	C					131,09	131,06
2'	CH	7,193	7,20	2,0		116,53	116,52
3'	C					146,72	146,10
4'	C					146,14	146,68
5'	CH	6,897	6,90	8,2		116,33	116,34
6'	CH	7,145	7,15	8,2/2,0		121,14	121,14
Bottom							
2	CH	4,366	4,73	1,0	0,6/0,5/0,5	79,63	81,77
3	CH	4,069	4,07	4,8/1,6/1,0		67,66	66,97
4	CH ₂	2,774	2,77	17,1/1,6	0,5	30,12	29,89
		2,871	2,87	17,1/4,8	0,5		
5	C					156,22	156,19
6	CH	6,076	6,08			96,50	96,57
7	C					156,23	156,16
8	C					108,62	108,55
9	C					155,29	155,26
10	C					100,92	100,97
1'	C					132,96	132,92
2'	CH	6,982	6,98	2,1	0,5	115,27	115,27
3'	C					145,90	145,87
4'	C					145,25	146,65
5'	CH	6,832	6,80	8,2	0,6	115,96	115,68
6'	CH	6,883	6,88	8,2/2,1		119,27	119,26

Abbildung 24: Proanthocyanidin A2



3. Ergebnisse

Tabelle 10: ^1H - und ^{13}C - NMR Daten von Proanthocyanidin A2

		^1H (ppm)	^1H Lit.[7]	$J_{\text{H,H}}$	$J_{\text{H,H}}$ long range	^{13}C	^{13}C Lit.[7]
Top							
2	C					99,89	100,19
3	CH	4,059	4,06	3,4		67,74	68,07
4	CH	4,412	4,41	3,4	0,4/0,3	28,97	29,26
5	C					n.a.	157,00
6	CH	6,008	6,01	2,3		97,99	98,33
7	C					n.a.	158,12
8	CH	6,071	6,07	2,3	0,4	96,31	96,65
9	C					153,99	154,24
10	C					103,94	104,28
1'	C					n.a.	132,46
2'	CH	7,137	7,14	2,2		115,41	115,68
3'	C					n.a.	145,65
4'	C					n.a.	146,76
5'	CH	6,810	6,81	8,4		115,47	116,06
6'	CH	7,021	7,02	8,4/2,2		119,74	119,79
Bottom							
2	CH	4,932	4,92	1,0	0,8/0,5/0,4/0,6	81,46	81,77
3	CH	4,246	4,24	4,8/2,7/1,0		66,72	66,97
4	CH ₂	2,951	2,95	17,0/4,8	0,5	29,61	29,89
		2,765	2,76	17,0/2,7	0,8		
5	C					n.a.	156,59
6	CH	6,095	6,10		0,3	96,11	96,53
7	C					152,10	152,29
8	C					107,05	107,23
9	C					151,91	152,12
10	C					102,10	102,45
1'	C					130,91	131,19
2'	CH	7,155	7,15	2,1	0,4	115,58	115,96
3'	C					n.a.	145,99
4'	C					n.a.	146,30
5'	CH	6,815	6,81	8,2	0,6	115,49	115,64
6'	CH	6,986	6,98	8,2/2,1		120,06	120,40

4. Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit lag die Aufgabenstellung bei der Fraktionierung eines Ethylacetatextraktes der Nebenwurzeln aus *Metaxya rostrata* mit dem Ziel, Reinsubstanzen zu isolieren und zu identifizieren.

Das durch Extraktion im Ultraschall hergestellte Ethylacetatextrakt der Nebenwurzeln wurde mittels Säulenchromatographie (SC 1) an Sephadex® LH 20 aufgetrennt (siehe Kapitel 3.1.1, Seite 6).

Ausgewählte Sammelfractionen wurden mit Hilfe von DC – Vergleichen auf das Vorliegen von Zuckern, Phenolcarbonsäuren, Flavonoiden und trimeren Proanthocyanidinen untersucht (siehe Kapitel 3.1.2, Seite 11).

In Sammelfraction 11 von SC 1 wurde das Vorliegen von Fructose nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1.2.1, Seite 11). Weiters deuteten die DC – Vergleiche darauf hin, dass in den Sammelfractionen 16, 18 und 19 von SC 1 Polyphenole wie Cinnamitannin B -1 und Aesculitannin B enthalten waren (siehe Kapitel 3.1.2.4, Seite 18).

Sammelfraction 10 von SC 1 wurde weiter an einer Kieselgel – Säule (SC 2) aufgetrennt, um die bei Detektion mit AASS dunkelblaue Bande bei Rf ca. 0,88 aufzureinigen. Es konnte eine Sammelfraction angereichert werden, die nur kleine Anteile von Begleitkomponenten aufwies. Um die gewünschte Komponente rein darzustellen, wurde Sammelfraction 13 von SC 2 mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH 20 (SC 3) aufgereinigt (siehe Kapitel 3.1.3.1, Seite 20). Es resultierte eine Reinsubstanz, deren Menge für die Strukturaufklärung mittels NMR – Spektroskopie allerdings zu gering war.

Weiters wurde Sammelfraction 19 von SC 1 für eine Fraktionierung herangezogen, wobei die Bande bei Rf ca. 0,55, die nach Detektion mit AASS orange gefärbt war, isoliert werden sollte. Dafür wurde Sammelfraction 19 von SC 1 mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH 20 (SC 5) aufgetrennt (siehe Kapitel 3.1.4., Seite 28). Daraus resultierten zwei Sammelfractionen, SF 11 und SF 13, in denen jeweils eine Komponente rein vorlag. Diese Substanzen konnten mit Hilfe der NMR – Spektroskopie identifiziert werden. Bei SF 11 handelt es sich um Aesculitannin B und bei SF 13 um Proanthocyanidin A2.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Aufarbeitung weiterer Sammelfractionen von SC 1 war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Aber aufgrund der vorhandenen Menge könnte man die Sammelfractionen 7 und 16+17 von SC 1 für die weitere Isolierung von Rein-
substanzen heranziehen. In SF 7 von SC 1 ist die hellblau fluoreszierende Bande bei Rf ca. 0,5 bei Detektion mit NA/PEG von Interesse und in SF 16+17 von SC 1 die gelb fluoreszierende Bande bei Rf ca. 0,52 bei Detektion mit NA/ PEG.

5. Zusammenfassung

Von den einheimischen Heilern Costa Ricas wird die wässrige Suspension des getrockneten Rhizoms des Baumfarns *Metaxya rostrata* zur Behandlung von Magen – Darm – Erkrankungen, wie Ulcera und Geschwüren, eingesetzt [1].

Bisher gab es nur wenig phytochemisches Wissen über diese Pflanze. Deshalb war das Ziel dieser Diplomarbeit, ein Ethylacetatextrakt der Nebenwurzeln zu fraktionieren und Reinsubstanzen zu isolieren.

Diese sollten mittels NMR – Spektroskopie in ihrer Struktur aufgeklärt werden.

Im Laufe dieser Arbeit wurde ein Ethylacetatextrakt der Nebenwurzeln von *Metaxya rostrata* hergestellt. Anschließend wurde das Extrakt mittels Säulenchromatographie fraktioniert. Einzelne Sammelfractionen wurden mit Referenzsubstanzen mittels DC verglichen. Dabei konnte das Vorliegen von Fructose in SF 11 von SC 1 nachgewiesen werden, sowie von KK1 in SF 10 von SC 1 bzw. in SF 10 von SC 2, KK5 in SF 10 von SC 1 bzw. in SF 16 + 17 von SC 2 und Cinnamitannin B-1 und Aesculitannin B in SF 16, 18 + 19 von SC 1

Andere Sammelfractionen wurden zur weiteren Auftrennung herangezogen. Dabei konnten 3 Sammelfractionen gewonnen werden (SF 13 von SC 3, SF 11 und SF 13 von SC 5), in denen Einzelkomponenten rein vorlagen. Die Menge von SF 13 von SC 2 war für eine Strukturaufklärung mittels NMR – Spektroskopie zu gering.

Die Substanzen in SF 11 und SF 13 von SC 5 waren in ausreichender Menge vorhanden. Mittels NMR – Spektroskopie wurde die Komponente in SF 11 als Aesculitannin B und die Komponente in SF 13 als Proanthocyanidin A2 identifiziert.

Somit wurde sowohl Proanthocyanidin A2 als auch Aesculitannin B, das bereits als Gemisch mit Cinnamitannin B-1 in dieser Pflanze identifiziert worden war, erstmals rein aus *Metaxya rostrata* isoliert.

6. Summay

Traditional healers in Costa Rica use a suspension of the dried rhizome of *Metaxya rostrata*, a tree fern, in water for the treatment of intestinal diseases such as ulcers and tumours [1].

So far there has been hardly any phytochemical research of this plant. The object of this diploma thesis was the fractionation of an ethylacetate extract of the rootlets and to isolate pure compounds for structure elucidation by NMR spectroscopy.

Within the scope of this thesis the rootlets of *Metaxya rostrata* were extracted by sonication. The extract was fractionated using column chromatography. Selected fractions were compared to reference substances by TLC. As a result, the existence of fructose in SF 11 of SC 1 was proved, as well as KK1 in SF 10 of SC 1 or in SF 10 of SC 2, KK5 in SF 10 of SC 1 or in SF 16 + 17 of SC 2 and cinnamitannin B-1 and aesculitannin B in SF 16, 18 + 19 of SC 1.

Other fractions were selected for further separation steps. During this investigation three fractions (SF 13 of SC 2, SF 11 and SF 13 of SC 5) were obtained containing a pure substance, each. The quantity of fraction SF 13 of SC 2 was too small for further analysis by NMR spectroscopy.

In fraction SF 11 and SF 13 of SC 5 the compounds were identified as aesculitannin B and proanthocyanidin A2, respectively. This is the first prove of proanthocyanidin A2 in *Metaxya rostrata*.

Literaturverzeichnis

- [1] Virtbauer J, Krenn L, Kählig H, Hüfner A, Donath O, Marian B. (2008) Chemical and pharmacological investigations of *Metaxya rostrata*, Z. Naturforsch., 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] Merkinger B. Phytochemische Untersuchungen am Baumfarn *Metaxya rostrata*, Diplomarbeit, Universität Wien, 2010
- [5] Wagner H, Blatt S, Zgainski EM. Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer-Verlag Berlin, 1983
- [6] Morimoto S, Nonaka G, Nishioka I. (1987) Tannins and Related Compounds. 49. Aesculitannins, Novel Proanthocyanidins with Doubly-Bonded Structures from *Aesculus hippocastanum* L., Chem. Pharm. Bull. 35, 4717-4729
- [7] Kamiya K, Watanabe C, Endang H, Umar M, Satake T. (2001) Studies on the Constituents of Bark of *Parameria laevigata* Moldenke, Chem. Pharm. Bull. 49, 551-557
- [8] Lin H-C, Lee S.-S. (2010) Proanthocyanidins from the Leaves of *Machilus philippinensis*, J. Nat. Prod. 73, 1375-1380
- [9] Kobayashi W, Miyase T, Sano M, Umehara , Warashina T, Noguchi H. (2002) Prolyl Endopeptidase Inhibitors from the Roots of *Lindera strychnifolia* F. VILL, Biol. Pharm. Bull. 25, 1049-1052
- [10] Lou H, Yamazaki Y, Sasaki T, Uchida M, Tanaka H, Oka S. (1999) A-type proanthocyanidins from peanut skins, Phytochemistry 51, 297-308
- [11] Vivas N, Glories Y. (1996) A Complete Structural and Conformational Investigation of Proanthocyanidin A2 Dimer, Tetrahedron Lett. 37, 2015-2018
- [12] Lin L-C, Kuo Y-C, Chou C-J. (2002) Immunomodulatory Proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*, J. Nat. Prod. 65, 505-508
- [13] Xinya X, Haihui X, Wang , Xiaoyi W. (2010) A-Type Proanthocyanidins from Lychee Seeds and Their Antioxidant and Antiviral Activities, J. Agric. Food Chem. 58, 11667-11672

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Metaxya rostrata</i> (Kunth C. Presl).....	1
Abbildung 2: Pflanzenmaterial von <i>Metaxya rostrata</i>	2
Abbildung 3: Extraktion mittels Ultraschallbad.....	3
Abbildung 4: Säule 1	6
Abbildung 5: DC der SF der SC 1, Detektion mit AASS	9
Abbildung 6: DC der SF der SC 1, Detektion mit NA/PEG	10
Abbildung 7: DC der SF der SC 1, Detektion mit NA/PEG	10
Abbildung 8: DC - Vergleich von SF 11 mit Zuckern, Detektion mit AASS.....	12
Abbildung 9: Fructose und SF. 11, Detektion mit AASS	13
Abbildung 10: DC - Vergleich von SF 7 mit Phenolcarbonsäuren,.....	14
Abbildung 11: DC – Vergleich von SF 16 mit Flavonoiden, Detektion: NA/PEG ...	15
Abbildung 12: DC – Vergleich von SF 16 mit Flavonoiden, Detektion: NA/PEG ...	16
Abbildung 13: DC – Vergleich von SF 16 mit Luteolin-4'-O-glucosid ,	17
Abbildung 14: DC – Vergleich von SF 16 – SF 19 mit JV1, Detektion: AASS.....	18
Abbildung 15: DC – Vergleich von SF 2, 4, 8, 10 mit KK1 und KK5, Detektion: AASS.....	19
Abbildung 16: DC der Sammelfractionen der SC 2, Detektion mit AASS	22
Abbildung 17: DC - Überprüfung von SF 13 auf Reinheit,.....	23
Abbildung 18: Säule 3	24
Abbildung 19: DC der Sammelfractionen der SC 3, Detektion mit AASS	25
Abbildung 20: DC der Sammelfractionen der SC 4, Detektion mit AASS	27
Abbildung 21: DC der Sammelfractionen der SC 5, Detektion: AASS	30
Abbildung 22: DC Kontrolle auf Reinheit von SF 11 und SF 13 von SC 5,	31
Abbildung 23: Aesculitannin B.....	33
Abbildung 24: Proanthocyanidin A2.....	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fließmittelgemische von SC 1	7
Tabelle 2: Sammelfractionen von SC 1	8
Tabelle 3: Fließmittelgemische von SC 2	20
Tabelle 4: Sammelfractionen von SC 2	21
Tabelle 5: Sammelfractionen von SC 3	24
Tabelle 6: Sammelfractionen von SC 4	26
Tabelle 7: : Fließmittelgemische von SC 5	28
Tabelle 8: Sammelfractionen von SC 5	29
Tabelle 9: ¹ H- und ¹³ C- NMR Daten von Aesculitannin B	34
Tabelle 10: ¹ H- und ¹³ C- NMR Daten von Proanthocyanidin A2.....	36

Curriculum Vitae

Name: Teresa Pemmer
Geburtsdatum und -ort: 13. Mai 1985, St. Pölten
Staatsangehörigkeit: Österreich
Eltern: Mag. Ilse Pemmer

Ausbildung

1991 – 1995 Volksschule Furth bei Göttweig
1995 – 2003 BG/BRG Piaristengasse, Krems an der Donau
Schulzweig Gymnasium
Juni 2003 Matura
Oktober 2003 Beginn des Studiums der Pharmazie an der Universität Wien
März - Juli 2010 Praktische Arbeit der Diplomarbeit am Department für
Pharmakognosie der Universität Wien

Praktika

August 2007/ 2008/ 2009: Apotheke „Zum Engel“, Stein an der Donau
Juli und August 2010: Apotheke „Zum Engel“, Stein an der Donau

Anhang

Abbildung 1: HMBC Spektrum von Aesculitannin B in MeOH

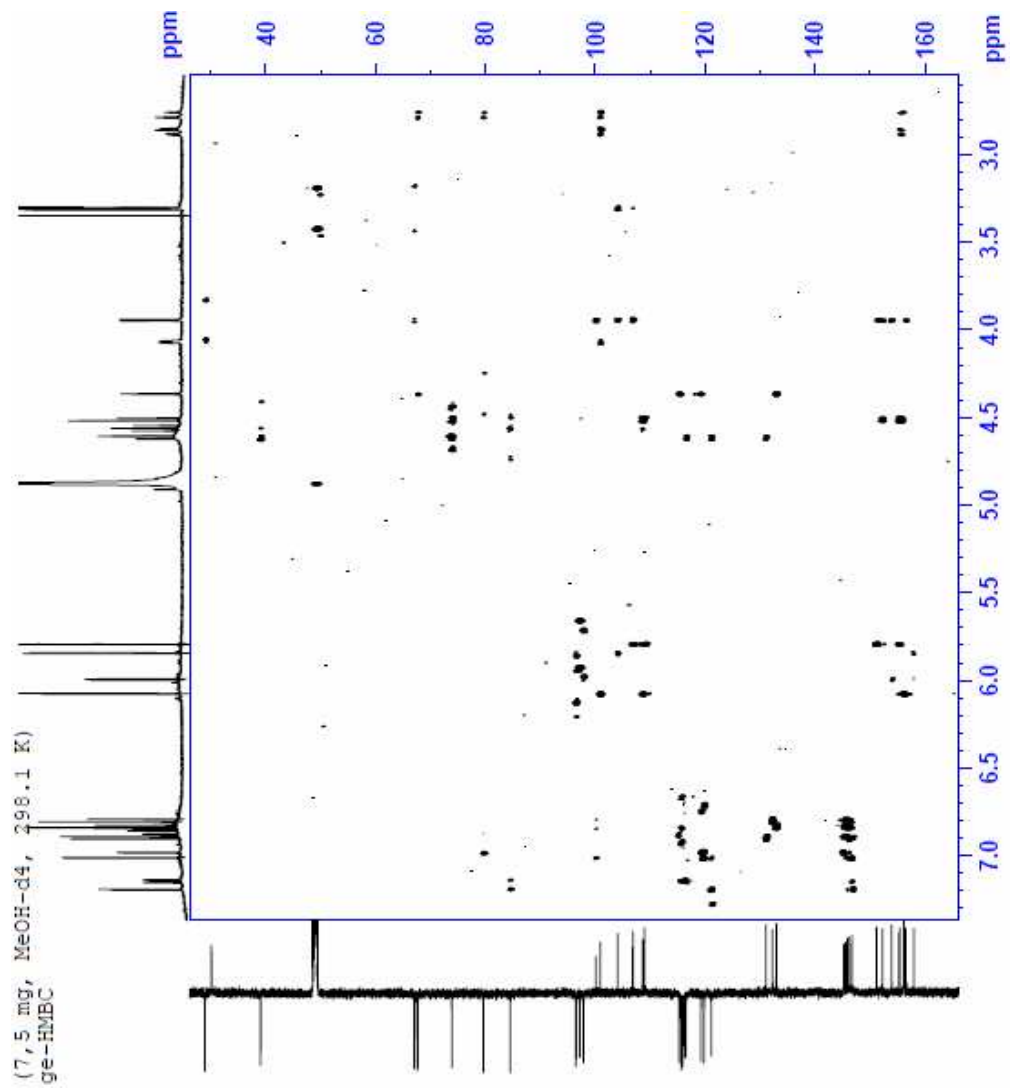


Abbildung 2: ¹H-NMR von Aesculitannin B in MeOH

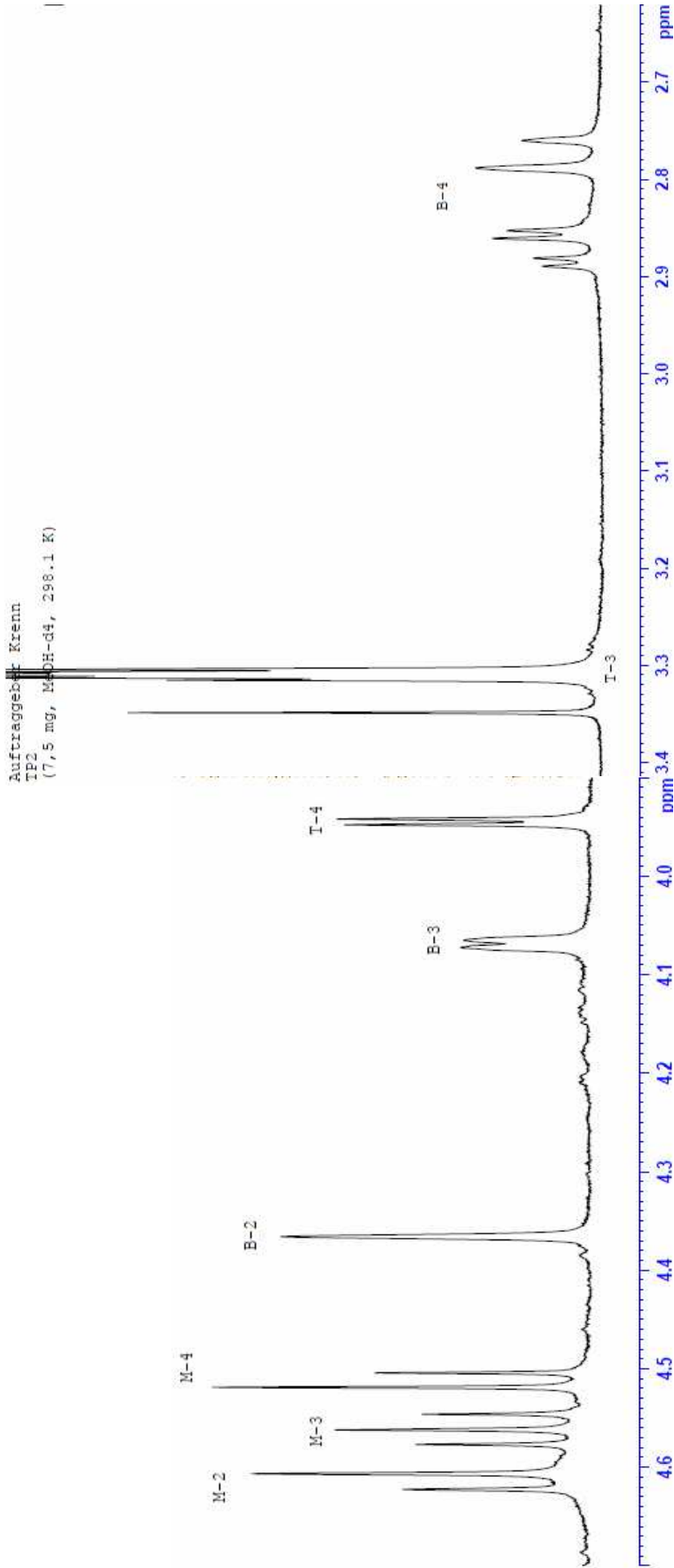


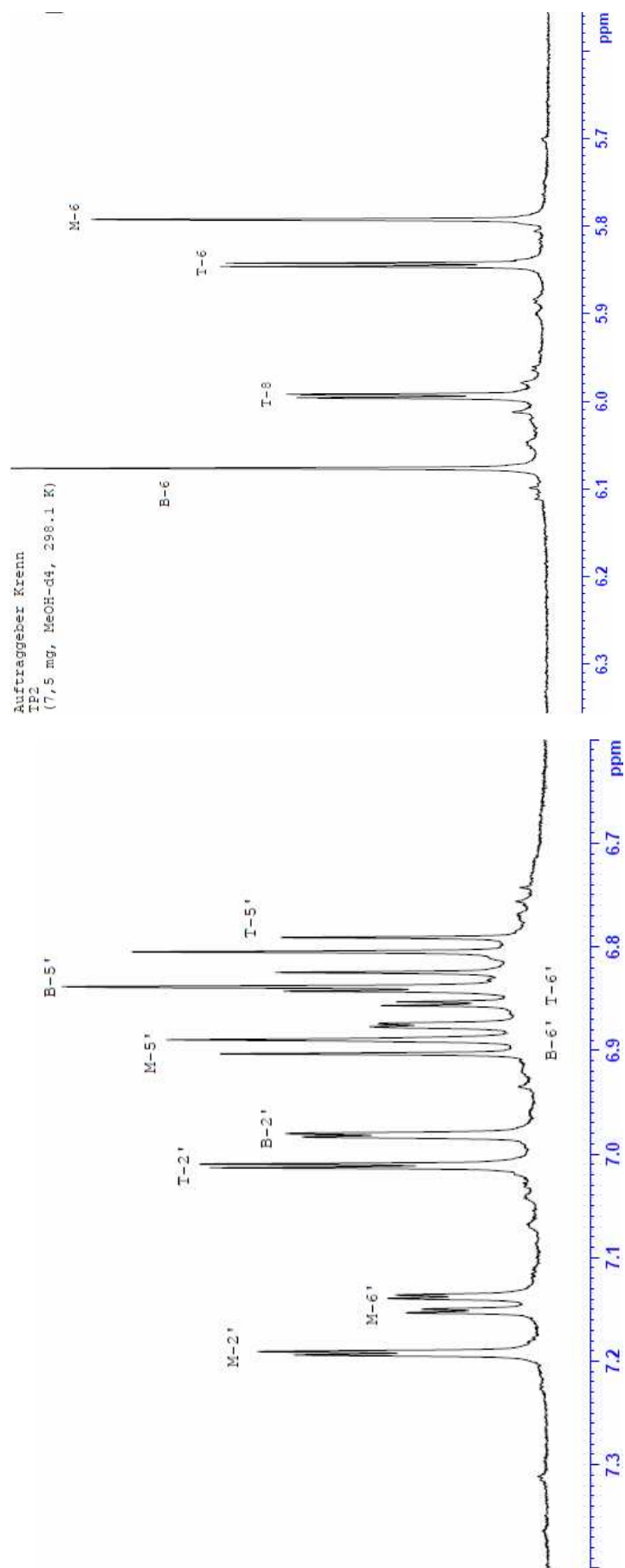
Abbildung 3: $^1\text{H-NMR}$ von Aesculitannin B in MeOH

Abbildung 4: ¹³C-NMR von Aesculitannin B in MeOH

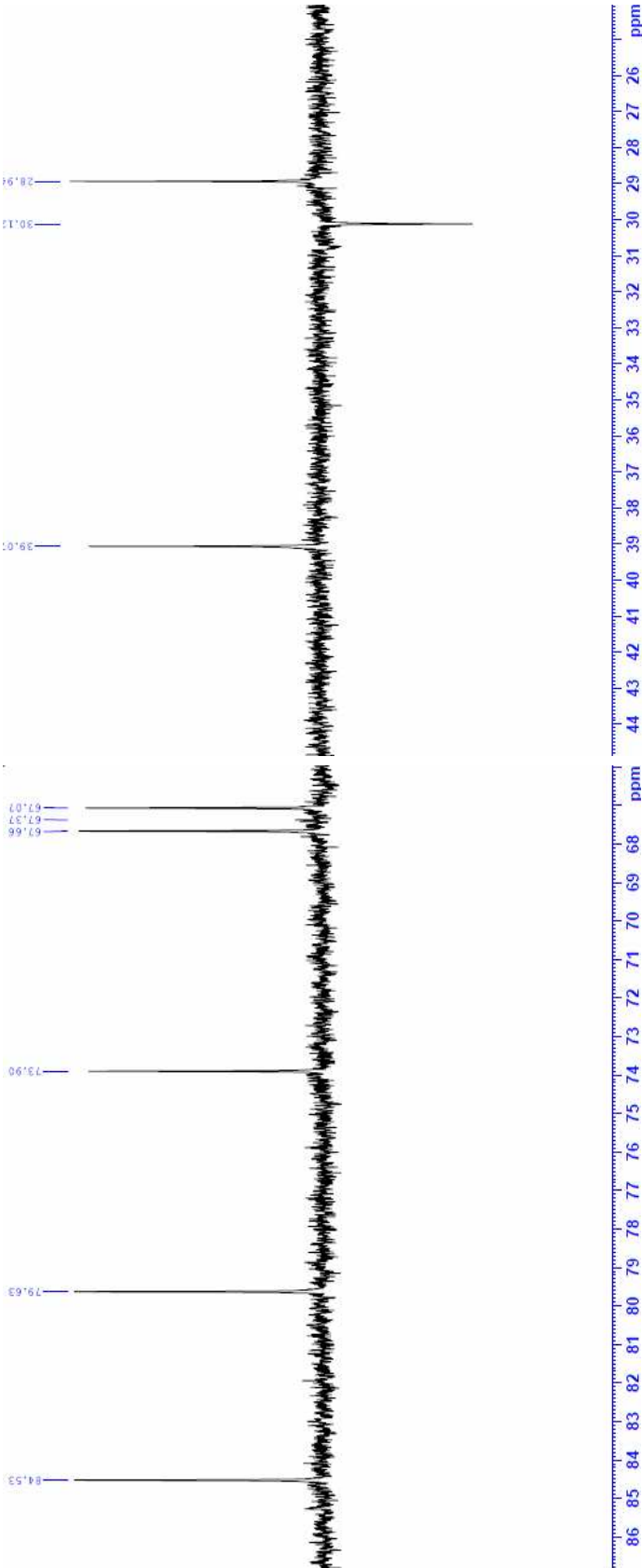


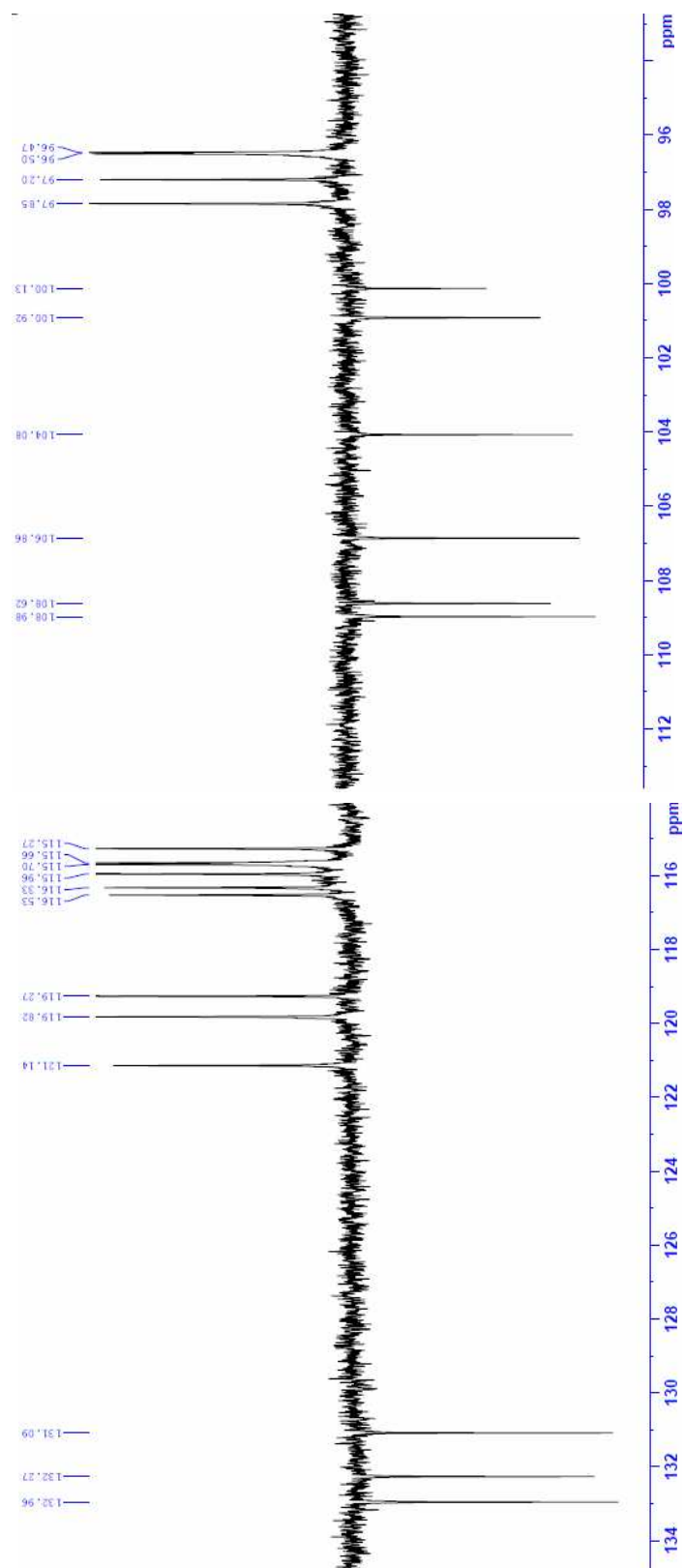
Abbildung 5: ^{13}C -NMR von Aesculitannin B in MeOH

Abbildung 6: ^{13}C -NMR von Aesculitannin B in MeOH

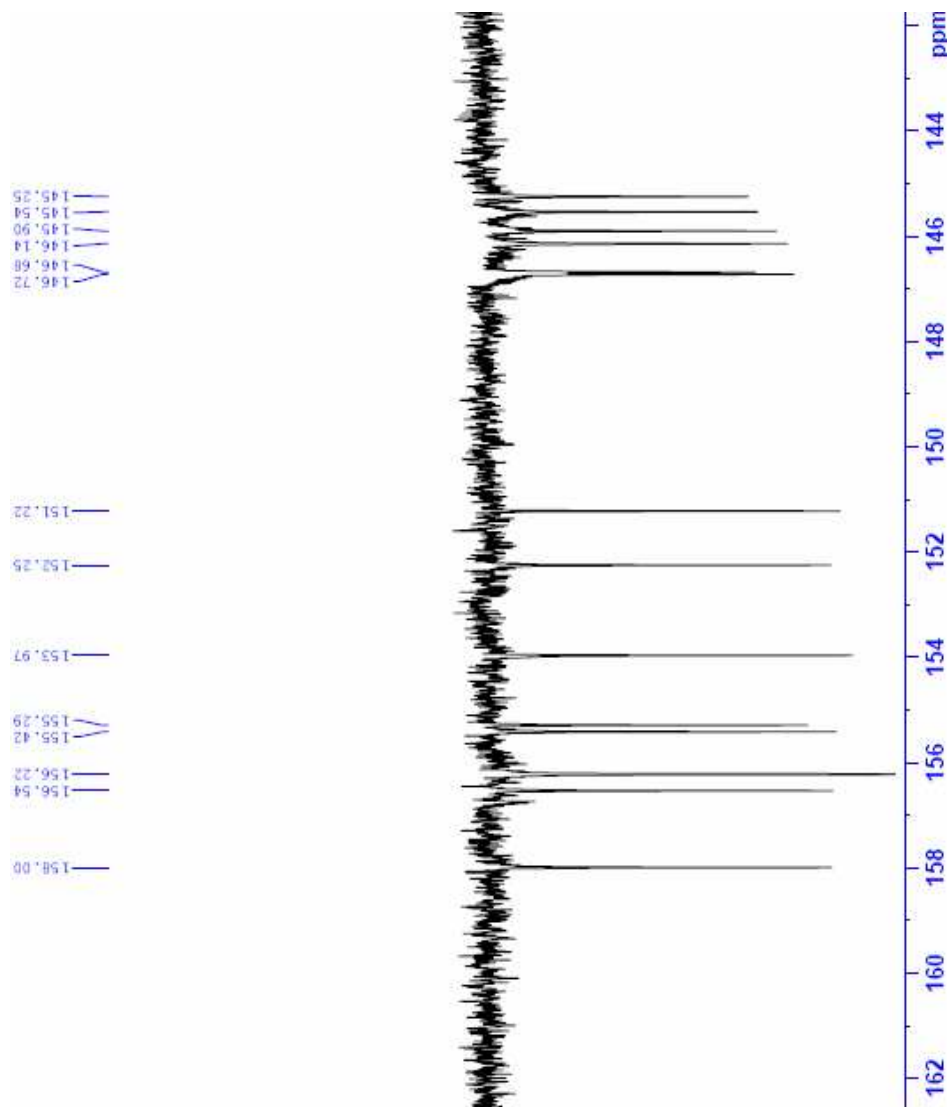


Abbildung 7: HSQG Spektrum von Aesculitannin B in MeOH

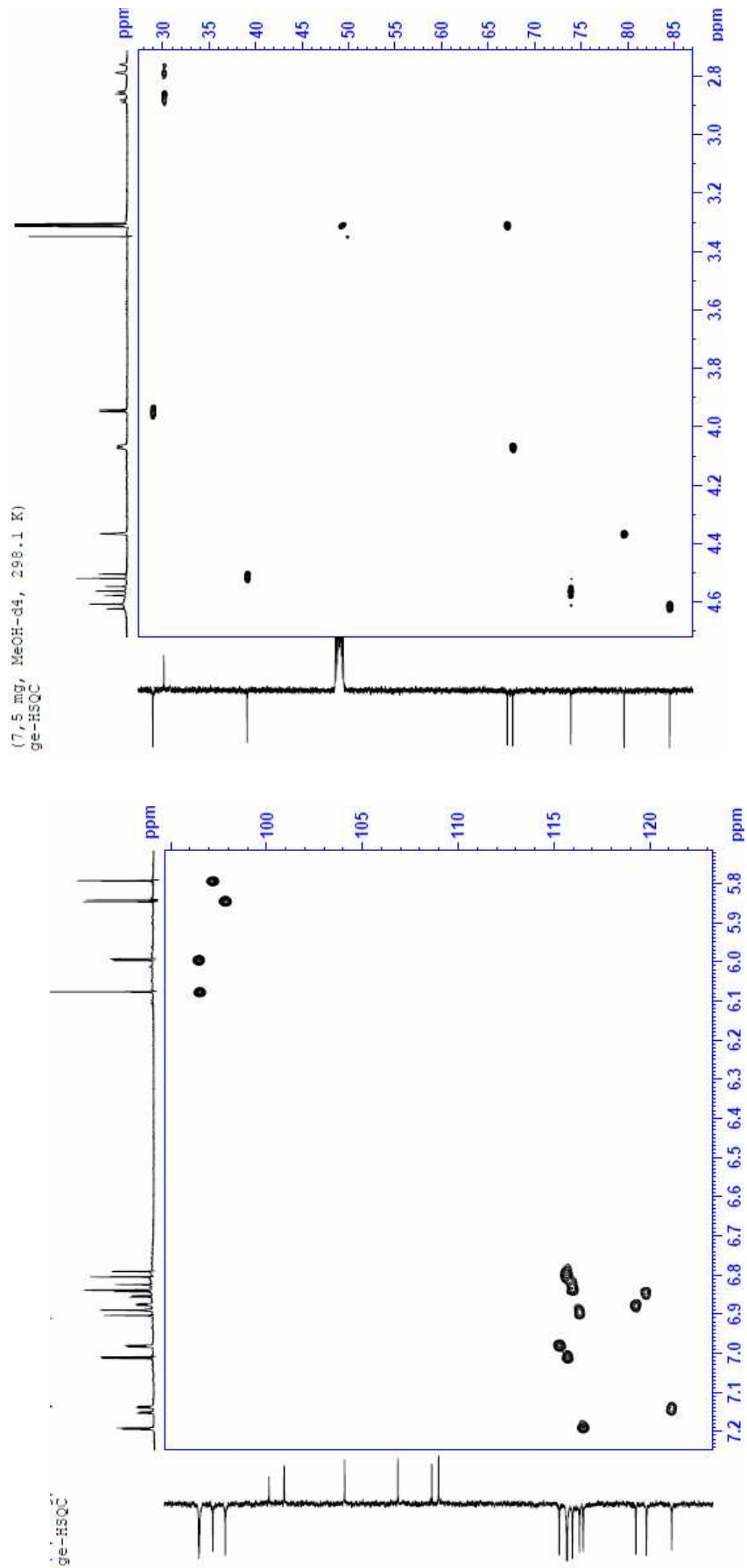


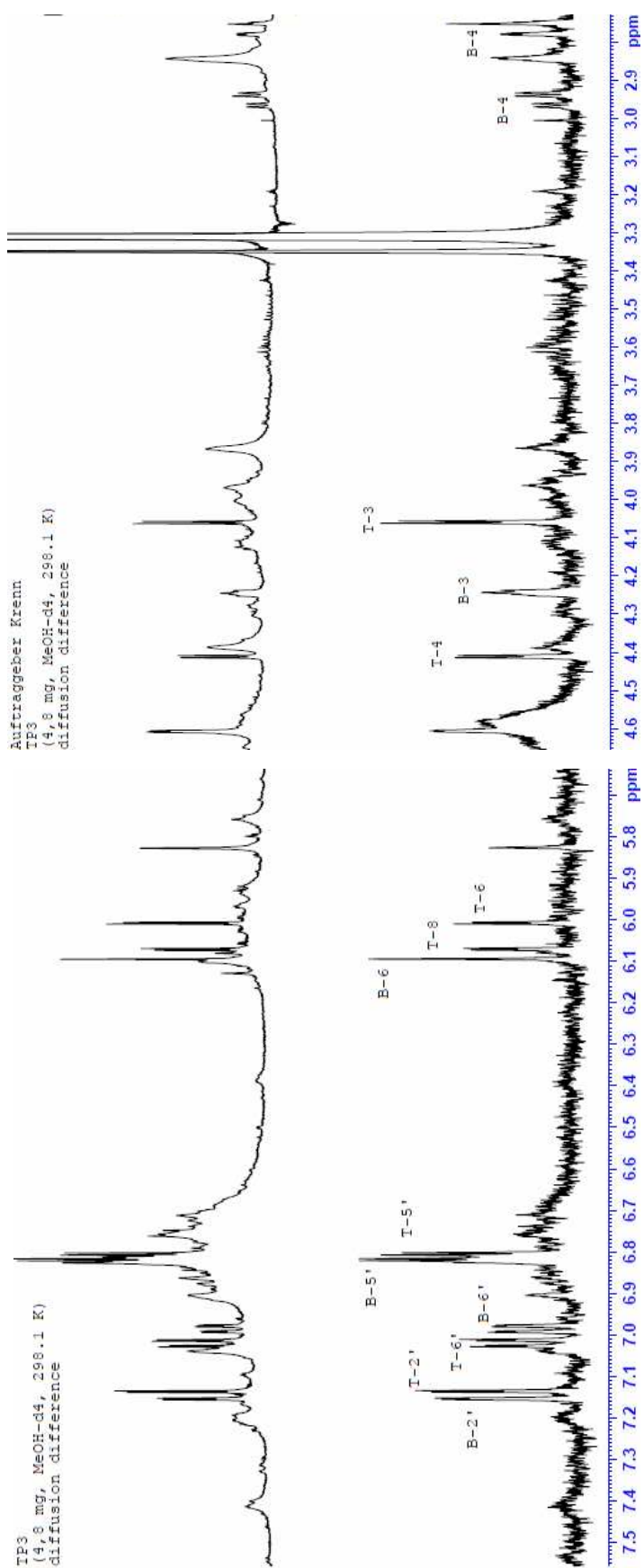
Abbildung 8: ^1H diff.-NMR von Proanthocyanidin A2 in MeOH

Abbildung 9: ^1H homo.-NMR von Proanthocyanidin A2 in MeOH