Qualitative und quantitative Untersuchung von tumorpromovierenden Diterpenestern aus homöopathischen Urtinkturen sowie Extrakten augewählter Euphorbiaceen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Pharm. Joscha Kummer
aus Bad Harzburg

2016

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2011 bis März 2016 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Matthias F. Melzig
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Philipp Heretsch

Disputation am: 15.06.2016

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. M. F. Melzig bedanken, der mir diese Arbeit ermöglicht hat. Außerdem danke ich ihm für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung und die vielen anregenden Diskussionen.

Aus der Arbeitsgruppe danke ich vor allem Frau Görick für die weitreichende Unterstützung sowie die vielen fachlichen Diskussionen und auch allen anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die gemeinsame Zeit.

Ein großer Dank geht auch nach Warschau an Dr. Anna K. Kiss, Dr. Sebastian Garnica und die gesamte Arbeitsgruppe für die Gastfreundschaft und die Zurverfügungstellung ihrer Labore sowie der LCMS-Anlage für meine Untersuchungen.

Bei Dr. Andreas Springer aus der MS Core Facility bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Analysen dort an der LCMS.

Frau Dr. Annette Kietzmann und den von mir betreuten Studenten für die vielen gemeinsamen Stunden im organisch-chemisch präparativen Praktikum.

Den beiden Firmen Deutsche Homöopathie-Union und Dr. Reckwege & Co danke ich für die Zurverfügungstellung der Urtinkturen und des Drogenmaterials für meine Arbeit.

Den von mir betreuten Wahlpflichtstudenten danke ich für deren Hilfe bei der Arbeit zur Methodenoptimierung mittels SPE und DC.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Vater, der mir durch seinen fachlich kompetenten Rat immer zur Seite stand. Meiner Mutter danke ich für die liebevolle Unterstützung während der Entstehungszeit dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Ina für ihre große Hilfe bei der Übersetzung und dem Auffinden von Rechtschreib- und Formulierungsfehlern sowie ihre Unterstützung seit Beginn meines Studiums.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung I

Abkürzungsverzeichnis V

1 Einleitung 1

1.1 Diterpenester . . . 1
1.2 Euphorbiaceae JUSS. . . . 3
1.2.1 *Croton tiglium* L. - Krotonölbaum . . . 4
1.2.2 *Jatropha curcas* L. - Purgiernuss . . . 7
1.2.3 *Euphorbia cyparissias* L. - Zypressenwolfsmilch . . . 9
1.3 Homöopathische Urtinkturen . . . 12
1.4 Zielsetzung . . . 13

2 Material 14

2.1 Untersuchungsmaterial . . . 14
2.1.1 Urtinkturen . . . 14
2.1.2 Samendrogen . . . 15
2.2 Verbrauchsmaterialien . . . 16
2.3 Chemikalien und Substanzen . . . 17
2.3.1 Allgemein . . . 17
2.3.2 Referenzsubstanzen . . . 18
2.3.3 Enzymatische Hydrolyse . . . 18
2.3.4 Alkalische Hydrolyse . . . 18
2.4 Geräte . . . 19
2.4.1 HPLC . . . 19
2.4.2 HPLC-MS . . . 19
2.4.3 HPLC Säulen . . . 20
2.4.4 SPE Kartuschen . . . 20
2.4.5 Sonstige Geräte . . . 21

3 Methoden 22

3.1 Theoretische Grundlagen . . . 22
3.1.1 HPLC in der Phytoanalytik . . . 22
3.1.2 HPLC-MS-Kopplung . . . 23
3.1.3 HPLC Methodenentwicklung . . . 24
3.1.4 HPLC Quantifizierung . . . 25
3.2 Enzymatische Esterhydrolyse von Phorbolestern aus Croton Urtinktur . . . 26
3.2.1 Methode . . . 26

3.2.2 Durchführung . . . 26
3.2.3 Immobilisierung . . . 27
3.3 Quantitative Bestimmung von Phorbolestern aus Croton Urtinktur als TPA-Äquivalente durch alkalische Esterhydrolyse . . . 28
3.3.1 Methode . . . 28
3.3.2 Durchführung . . . 29
3.3.3 Kalibrierung . . . 29
3.4 Quantitative Bestimmung von Phorbolestern aus Jatropha Urtinktur als TPA-Äquivalente mittels HPLC-UV . . . 30
3.4.1 Methode . . . 30
3.4.2 Durchführung . . . 31
3.4.3 Kalibrierung . . . 31
3.5 Qualitative Untersuchung mittels UHPLC-DAD-CAD-MS/MS . . . 32
3.5.1 Croton Urtinktur . . . 33
3.5.2 Euphorbia Urtinktur . . . 33
3.6 Qualitative Untersuchung mittels UHPLC-MS/MS . . . 35
3.6.1 Hydrolyseprodukte aus Croton Urtinktur und TPA . . . 35
3.6.2 Jatropha Urtinktur . . . 36
3.7 Extraktherstellung aus Croton und Jatropha Samen . . . 37
3.8 Qualitativer Vergleich von Urtinkturen und Extrakten aus Crotonsamen mittels HPLC-UV . . . 37
3.9 Festphasenextraktion . . . 38
3.10 Dünnschichtchromatographie . . . 39
3.11 Statistische Verfahren . . . 40

4 Ergebnisse und Diskussion 42
4.1 Dünnschichtchromatographie . . . 42
4.2 Festphasenextraktion . . . 43
4.3 Enzymatische Hydrolyse von Phorbolestern aus Croton Urtinktur . . . 46
4.4 Alkalische Hydrolyse von Phorbolestern aus Croton Urtinktur . . . 52
4.4.1 Qualitative Untersuchung der Hydrolyseprodukte mittels UHPLC-MS/MS . . . 53
4.5 Quantitative Bestimmung von Phorbolestern aus Croton Urtinktur . . . 56
4.5.1 Validierung . . . 57
4.5.2 Ergebnisse . . . 62
4.5.3 Diskussion . . . 63
4.6 Quantitative Bestimmung von Phorbolestern aus Jatropha Urtinktur . . . 65
4.6.1 Validierung . . . 65
4.6.2 Ergebnisse . . . 69

4.6.3 Diskussion 69
4.7 Qualitative Untersuchung der Urtinkturen mittels UHPLC-MS/MS 71
4.7.1 Croton Urtinktur 71
4.7.2 Euphorbia Urtinktur 88
4.7.3 Jatropha Urtinktur 92
4.8 Qualitativer Vergleich von Urtinkturen und Extrakten aus Crotonsamen mittels HPLC-UV 96

Zusammenfassung **101**

Summary **103**

Literatur **105**

Abbildungsverzeichnis **111**

Tabellenverzeichnis **112**

Publikationsverzeichnis **113**

Lebenslauf **114**

Eidesstattliche Erklärung **115**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
rpm	Umdrehungen pro Minute
ACN	Acetonitril
CAD	Charged aerosol detection
CUT	Croton tiglium Urtinktur
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DHU	Deutsche Homöopathie-Union (Karlsruhe)
Dr. R.	Dr. Reckeweg & Co (Bensheim)
EC	Endcapped
EUT	Euphorbia cyparissias Urtinktur
ESI	Electrospray Ionization
HAB	Homöopathisches Arzneibuch
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICH	International Conference on Harmonisation
JUT	Jatropha curcas Urtinktur
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanz
p.a.	pro analysi - zur Analyse
PKC	Proteinkinase C
RIP	Ribosome inactivating Protein
RSD	relative Standardabweichung/ Variationskoeffizient
RP	reversed phase - Umkehrphase
SD	Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraction - Festphasenextraktion
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Chromatogram
TOF	Time-of-flight - Flugzeitmassenspektrometer
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-O-acetat
t_R	Retentionszeit
TR	Trockenrückstand
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
UV	Ultraviolettstrahlung
$\overline{x}$	Mittelwert

Das Dezimaltrennzeichen ist das Komma.

In der Arbeit wurden aus Gründen der besseren Lesbarkeit Zeichen zur Kennzeichnung von Warennamen weggelassen. Das bedeutet nicht, dass diese Warennamen frei von Rechtsansprüchen Dritter sind.

1 Einleitung

Durch die Aufnahme der Homöopathika in das Europäische Arzneibuch wird für viele zum Teil bedenkliche Stoffe aus diesen Präparationen eine neue Betrachtungsweise fällig. In dieser Arbeit gilt besonderes Augenmerk den Diterpenester aus ausgewählten Euphorbiaceen, die bekanntermaßen tumorpromovierend und hautreizend sind. Diese Stoffe gilt es aus den homöopathischen Zubereitungen möglichst auszuschließen, wofür eine hinreichend genaue Gehaltsbestimmung für die Ausgangsmaterialien entwickelt werden muss.

1.1 Diterpenester

Diterpene sind aus 20 Kohlenstoffatomen (C_{20}-Körper) bestehende Naturstoffe. Es sind circa 3000 Diterpene mit einer Vielzahl verschiedener Ringskelette bekannt, die man in die 2 Hauptgruppen der makrozyklischen und zyklischen Diterpene unterteilt. Gebildet werden sie durch Verknüpfung von vier Isopreneinheiten über das Geranylgeranyldiphosphat. Durch Ringmodifikationen sowie Umlagerung von Methylgruppen entstehen dann die unterschiedlichen Grundgerüste. Hierbei unterscheidet man die Typen der makrozyklischen Diterpengerüste: Taxan, Cembrankation, Casben, Tiglian (Phorbolester), Daphnan und Ingenan (Ingenolester) sowie die Typen der zyklischen Diterpene: Labdan, Abietan, Pimaran, Kauran und Gibberellan (Hänsel & Sticher, 2007).

Die Ester bestimmter Diterpenalkohole gelten als starke Tumorpromotoren, das sind Stoffe, die selbst keine DNA-Veränderung auslösen, aber die Proliferation von Tumorzellen fördern. Bekannte exogene Tumorpromotoren sind unter anderem Diterpenester, Dioxine, DDT, Phenobarbital, Teerprodukte des Tabakrauchs und Inhaltsstoffe des Steinkohleteers. Die in dieser Arbeit untersuchten Diterpenester vom Ingenol- und Phorbol-Typ sind starke Aktivatoren der Proteinkinase C (PKC). Durch eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem natürlichen PKC Aktivator 1,2-Diacylglycerol kommt es durch sie zu einer Induktion des Enzyms. PKC steuert in der Signaltransduktion durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten die Aktivität nachgeschalteter Enzyme und Faktoren. Diacylglycerol als der natürliche Aktivator geht aus der Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat durch die Phospholipase C hervor (Thews *et al.*, 2007).

Der Angriff erfolgt an Zinkfingerproteinen des Rezeptors für das 1,2-Diacylglycerol (C_{1b}-Domäne), was durch den langsameren Abbau der Phorboleser zu einer andauernden Stimulation der Proteinkinase-C führt. Dadurch fördern sie die Pomotionsphase und zum Teil auch die Propagierungsphase der Karzinogenese.

Verwendung findet heute TPA, der wichtigste Vertreter dieser Stoffklasse, in der Forschung z.B. in der Zellkultur, wo er durch seine Eigenschaft der PKC-Induktion als Reagenz zur Zelldifferenzierung eingesetzt wird. Außerdem sind die makrozyklischen Diter-

pene potentielle Leitsubstanzen zur Entwicklung von Wirkstoffen, welche die Resistenz von Tumoren gegen Zytostatika abschwächen können (Teuscher & Lindequist, 2010).

Seit November 2012 ist ein antiproliferativ aktiver Diterpenester aus einer Euphorbiacee, der Gartenwolfsmilch (*Euphorbia peplus* L.) als Arzneistoff in Europa zugelassen. Das Ingenolmebutat (Ingenol-3-angelat) wird unter dem Handelsnamen Picato in der topischen Therapie der nicht-hyperkeratotischen, nicht-hypertrophen aktinischen Keratosen bei Erwachsenen eingesetzt. Die aktinische Keratose gilt als Präkanzerose für ein entstehendes Plattenepithelkarzinom, das Metastasen bilden kann (Viegener, 2012; EMA, 2012).

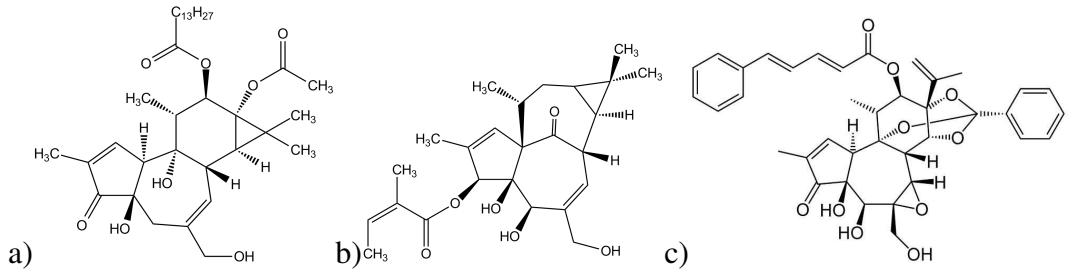


Abbildung 1: Beispiele für Diterpenester von unterschiedlichen Grundtypen aus Euphorbiaceen:

a) Tiglian-Typ: TPA aus *Croton tiglium* L. (adipogen.com)
b) Ingenan-Typ: Ingenolmelbutat aus *Euphorbia peplus* L. (adipogen.com)
c) Daphnan-Typ: Mezerein aus *Daphne mezereum* L. (prostor-ad.cz)

Es gibt in den Euphorbiaceen viele unterschiedliche tumorpromovierende Diterpenester, wobei die Grundalkohole immer unterschiedlich modifizierte Derivate der makrozyklischen Diterpentypen Tiglian, Ingenan und Daphnan sind. Die verknüpften Säurekomponenten sind dabei sehr vielfältig und es können kurz- bis langkettige sowie verzweigte Carbonsäuren enthalten sein. Einige Diterpenester wie die Jatrophafaktoren tragen eine Diesterbrücke über einen stark verzweigten Säurerest.

Die Diterpenester der unterschiedlichen Euphorbiaceen unterscheiden zum Teil bachtlich in ihrem kọkarzinogenen Wirkungsbild. Dies kann an dem Angriff an verschiedenen Isoenzymen der PKC oder ab der Beeinflussung von anderen Rezeptoren wie z.B. Chimaerine liegen, die nicht zu der PKC-Familie gehören.

Schaut man sich die Phorbolester an, so sind zwei Strukturvoraussetzungen für eine tumorpromovierende Wirkung zu benennen. Zum einen muss die hydrophile Wechselwirkung mit dem Rezeptor über die freie OH-Gruppe an der Position 20 erfolgen, was erklärt warum die 12,13,20-Phorboltrieser nur sehr schwach aktiv sind. Zum anderen wird die Wirkstärke durch die hydrophoben Gruppen der Säurereste an den Positionen 12 und 13 beeinflusst, welche in ihren Kettenlängen stark variieren (Bertolini *et al.*, 2003; Teuscher & Lindequist, 2010).

1.2 Euphorbiaceae Juss.

Aktuell umfasst die Familie der Wolfsmilchgewächse (Euphorbiaceae) eine Vielfalt von 229 Gattungen und 6511 unterschiedlichen Arten und stellt damit eine der größten Familien der bedecktsamigen Pflanzen dar (theplantlist.org, 2015). Die erste Beschreibung der Familie erfolgte als „Euphorbiae“ durch de Jussieu (1789). Der deutsche Name Wolfsmilchgewächse geht wahrscheinlich auf den beißenden Geschmack des häufig enthaltenen Latex zurück, der bei Verletzung der Pflanze austritt. Dabei enthalten längst nicht alle Arten Milchsaft. Der Latex mit den darin häufig enthaltenen Proteinen, Diterpenestern und dem Triterpengemisch Euphorbon dient vermutlich dem Fraßschutz gegen Tiere und Insekten, da viele Euphorbiaceen in trockenen Regionen wachsen. Von den in Mitteleuropa vorkommenden 40 Gattungen sind alle zu den Giftpflanzen zu zählen (botanikus.de, 2015).

Tabelle 1: Systematische Einordnung der Euphorbiaceen nach Strasburger *et al.* (2008)

Einordnung	Latein	Deutsch
Abteilung:	Tracheophyta	Gefäßpflanzen
Klasse:	Magnoliopsida	Bedecktsamer
Ordnung:	Malpighiales	Malpighienartige
Familie:	Euphorbiaceae	Wolfsmichgewächse
Unterfamilien:	Acalyphoideae	
	Crotonoideae	
	Euphorbioideae	

Die Familie der Euphorbiaceen unterteilt sich in drei Unterfamilien und hat einen sehr vielfältigen Habitus, wobei es sukkulente und nicht-sukkulente Arten gibt. Es gibt neben Bäumen und großen Sträuchern auch zahlreiche krautige Pflanzen, wobei es dabei ein-, zwei- und mehrjährige Vertreter gibt. Manchmal ist bei den Euphorbiaceen die Photosynthesefunktion in den Stängeln lokalisiert, so dass es auch einige kaktusartige Gewächse gibt. Der Artenreichtum dieser Pflanzenfamilie wird auch in ihrer Variabilität deutlich, so dass keine allgemeine Beschreibung gegeben werden kann (Watson & Dallwitz, 1992).

Pharmazeutisch werden unterschiedliche Bestandteile der Pflanzen genutzt. So werden etwa aus Rizinussamen fette Öle gewonnen und die Maniokwurzel wird als Stärkequelle genutzt. Euphorbium wird aus dem Milchsaft von *Euphorbia resinifera* O. BERG oder ähnlichen Arten gewonnen und in homöopathischen Mitteln bei Erkältungskrankheiten sowie als Bestandteil von Nasensprays angewendet (Hager *et al.*, 2007; Heel, 2016).

Tabelle 2: Eine Auswahl von pharmazeutisch relevanten Euphorbiaceen

Latein	Deutsch
Croton tiglium L.	Krotonölbaum
Jatropha curcas L.	Purgiernuss
Euphorbia cyparissias L.	Zypressenwolfsmilch
Ricinus cummunis L.	Wunderbaum
Euphorbia peplus L.	Gartenwolfsmilch
Euphorbia resinifera O. BERG	Maghrebinische Säulenwolfsmilch
Hevea brasiliensis MÜLL.-ARG.	Kautschukbaum
Manihot esculenta CRANTZ	Maniok

Diese Arbeit befasst sich aufgrund den darin enthaltenen Diterpenestern speziell mit den Urtinkturen der drei Euphorbiaceen *Croton tiglium* L., *Jatropha curcas* L. und *Euphorbia cyparissias* L., welche im Folgenden näher vorgestellt werden.

1.2.1 *Croton tiglium* L. - Krotonölbaum

Beschreibung

Der Krotonölbaum ist ein im tropischen Asien beheimateter immergrüner bis zu 8 Meter großer Strauch oder kleiner Baum. Die elliptischen Blätter sind etwa 10 cm lang und 5 cm breit. Sie sitzen auf dünnen etwa 10 cm langen Stielen und besitzen am Rand kleine Sägezähne. Sie sind metallisch grün bis bronzen oder orange und auf der Blattspreite sitzen Sternhaare. Die weißen Blüten bilden endständig eine aufrecht stehende Traube. Die Früchte sind stumpf dreiseitig, verkehrt-eiförmig und gelblich braun gefärbt (Madaus, 1938).

Abbildung 2: Die reifen getrockneten Früchte und die Samen von *Croton tiglium* L.

Die Droge Semen crotonis sind die Samen aus den reifen getrockneten Früchten. Sie sind etwa 10-13 mm lang und 6-9 mm breit, eiförmig und einseitig etwas abgeplattet, beidseitig

stumpf und von einer matt rötlichbraunen bis gelblichen Färbung, welche stellenweise matt schwärzlich unregelmäßig gesprenkelt ist (HAB, 2014). Unter der zerbrechlichen Samenschale liegt eine glatte, silbergraue Haut, welche den gelblich stumpf-vierkantigen Samenkörper umgibt (Hager *et al.*, 2007).

Anwendung

Traditionell wurde Crotonöl als drastisches Purgans (Abführmittel) eingesetzt und dafür wurde es gemischt mit Rizinusöl eingenommen (Hager *et al.*, 2007). Noch bis zum DAB 6 wurde Oleum cotonis als eigene Monographie aufgeführt. Im Deutschen Arzneibuch von 1910 wird für Krotonöl eine größte Einzelgabe von 0,05 g maximal drei mal täglich angegeben (DAB, 1910). Als Bestandteil des Baunscheidtöls wurde es im Rahmen der Baunscheidttherapie mithilfe einer Nadelwalze (Lebenswecker) unter die Haut gebracht, wo es seine hautreizende Wirkung entfalten konnte. Dort kommt es zu einer Quaddelbildung, was durch die dabei entstehende Reizwirkung bei vielen chronisch entzündlichen Krankheiten helfen soll (Spennemann, 2007).

In der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) wird *Croton tiglium* L. seit über 2000 Jahren angewendet, trägt dort den Namen bā dòu und gehört zu den 50 „fundamentalen“ Pflanzen (Zhang *et al.*, 2013). Anwendung findet *Croton tiglium* L. heute vor allem in der Homöopathie in hohen Verdünnungen bei Magen-Darm-Erkrankungen, Hautleiden und Infektionen. Zu den Indikationen gehören dabei hauptsächlich Diarrhoe, Ekzem, Herpes simplex, Juckreiz und Windpocken (homoeopathiewelt.com, 2015).

Inhaltsstoffe

Die Hauptinhaltsstoffe der Crotonsamen sind Mono-, Di- und Triester der Diterpenalkohole Phorbol und 4-Desoxy-4α-phorbol, welche von van Duuren & Orris (1965) erstmals als tumorpromovierende Prinzipien beschrieben wurden. Hecker (1968) isolierte und untersuchte dann ausführlich die aktiven Inhaltstoffe des Crotonöls.

Die Phorbol-12-13-diester sind die hauptsächlich aktiven Inhaltsstoffe, aber es kann auch aus den „kryptischen“ Triestern durch Abspaltung einer Carbonsäure ein aktiver Stoff gebildet werden. Das Crotonöl wirkt akut toxisch, wobei es bei der oralen Applikation zu vermehrtem Speichelfluss, Reizungen der Schleimhäute, Erbrechen, Diarrhoe, Nierenreizungen, Kopfschmerzen und Kreislaufkollaps kommen kann (Gläser, 1991; Hager *et al.*, 2007).

Zwei in *Croton tiglium* L. enthaltene toxische Proteine sind Crotin I und Crotin II. Sie gehören zu den ribosom-inaktivierenden Proteinen (RIP) Typ 1 und sind in den Samen zu finden (Schrot *et al.*, 2015).

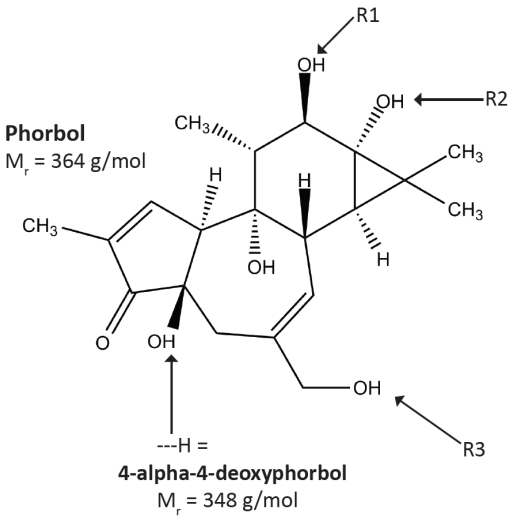


Abbildung 3: Die beiden Tiglianditerpen-Grundalkohole Phorbol und 4-Desoxy-4α-phorbol bilden durch Veresterung der drei markierten Positionen die tumorpromovierenden Inhaltsstoffe von *Croton tiglium* L.

Heute findet der wichtigste Vertreter dieser Stoffklasse, das in Abb. 4 dargestellte 12-O-tetradecanoylphorbol-13-O-acetat (TPA), Anwendung in der Zellkultur als Differenzierungsargens. Es wurden bisher etwa 30 unterschiedliche Phorbolester aus Crotonöl in der Literatur beschrieben (Vogg *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2013).

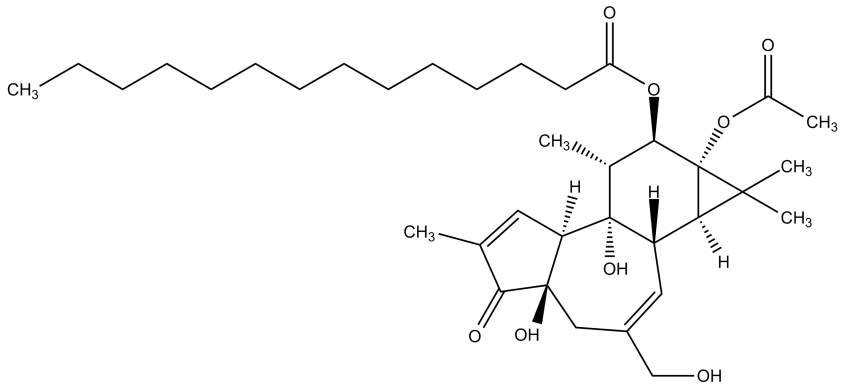


Abbildung 4: Einer der Hauptinhaltsstoffe des Crotonöls und der bekannteste Phorbolester ist das 12-O-tetradecanoylphorbol-13-O-acetat (TPA), auch bekannt unter dem Namen Phorbol myristat acetat (PMA). Heute findet er häufig Anwendung als PKC Induktor zur Einleitung der Differenzierung in der Zellkultur.

Die Samen (Crotonis semen) enthalten außer den zahlreichen Phorbolestern eine große Menge an fettem Öl, Proteinen und in geringeren Mengen Crotonharz, Crotonosid (Idoguanin-d-ribosid), Saccharose, Saponine und Glykoside (Hager *et al.*, 2007).

Im Verlauf dieser Arbeit wird das 4-Desoxy-4α-phorbol wegen der besseren Lesbarkeit nur mit Desoxyphorbol benannt.

1.2.2 *Jatropha curcas* L. - Purgiernuss

Beschreibung

Die Purgiernuss ist ein im tropischen Amerika beheimateter bis zu 6 Meter hoher sukkulenter Strauch mit stämmigen Zweigen, welche von einer abschälenden Rinde bedeckt sind. Bei Verletzung tritt ein gelber milchiger Latex aus. Die leicht drei- bis fünffach gelappten, etwa 15 cm breiten und 13 cm langen Blätter sitzen wechselständig auf etwa 5 cm langen Stielen. Die glockigen, gelblich bis grünen Blüten sitzen in kleinen Doldentrauben zusammen und sind etwa 6 cm lang. Die Früchte sind 2-4 cm lang, kuglig oval und ändern ihre Farbe mit zunehmender Reife von grün über gelblich bis schwarz. In drei Fächern enthalten sie jeweils einen Samen (Hager *et al.*, 2007; Duke, 1983).

Die Samendroge (Jatrophae curcadis semen) sind dunkelbraune bis schwarze, fein gelb streifige oder reihig punktierte, elliptisch abgerundete Samen. Sie sind etwa 16-20 mm lang und 10-12 mm dick, auf der Rückseite gewölbt und bauchseitig dachfirstartig hervortretend oder abgerundet abgeflacht. Unter dem harten aber spröden Perikarp liegen die von einer weißen Schale bedeckten Samen (HAB, 2014).

Abbildung 5: Die Samen von *Jatropha curcas* L. und die Früchte in unterschiedlichen Reifestadien (wikimedia.org)

Anwendung

Der hohe Gehalt an fettem Öl von 25-50 % macht die Samen als Quelle für natürliche Treibstoffe (Biodiesel) sowie zur Seifenherstellung interessant. Hierfür werden die Pflanzen auf großen Plantagen in tropischen Regionen mit geringeren Niederschlägen angebaut. Des Weitern kann der Presskuchen der Samen nach der Ölgewinnung aufgrund seines hohen Proteingehalts als Tierfutter genutzt werden, sofern zuvor eine Detoxifizierung der noch enthaltenen Phorbolester stattgefunden hat (Wakandigara *et al.*, 2013).

In den Anbaugebieten wird es noch heute als drastisches Abführmittel und bei Hautkrankheiten eingesetzt, wobei im europäischen Raum die Anwendung aufgrund der Toxizität

obsolet ist. Die Samen werden zuvor geröstet, wobei die toxischen Proteine inaktiviert werden. In Südamerika wird die Droge noch bei Wurmbefall und in Afrika bei Syphilis angewendet (Hager *et al.*, 2007). In der Homöopathie wird *Jatropha curcas* L. in hohen Verdünnungen noch recht häufig verordnet und zwar bei profusen Diarrhöen, häufig mit Muskelkrämpfen und kolikartigen Affektionen verbunden, gegen Cholera und Vomitus (Madaus, 1938).

Inhaltsstoffe

Die enthaltenen Diterpenester sind als intramolekulare Diester über die Positionen 13 und 16 des Grundalkohols 12-Desoxy-16-hydroxyphorbol verbrückt. Haas *et al.* (2002) beschreibt sechs verschiedene Ester als sogenannte Jatrophafaktoren, die sich nur in dem Aufbau der Esterbrücke unterscheiden. Alle Verbindungen haben die gleiche relative Molekülmasse und zwei Verbindungen unterscheiden sich nur in der räumlichen Anordnung der Position 8' in der Esterbrücke.

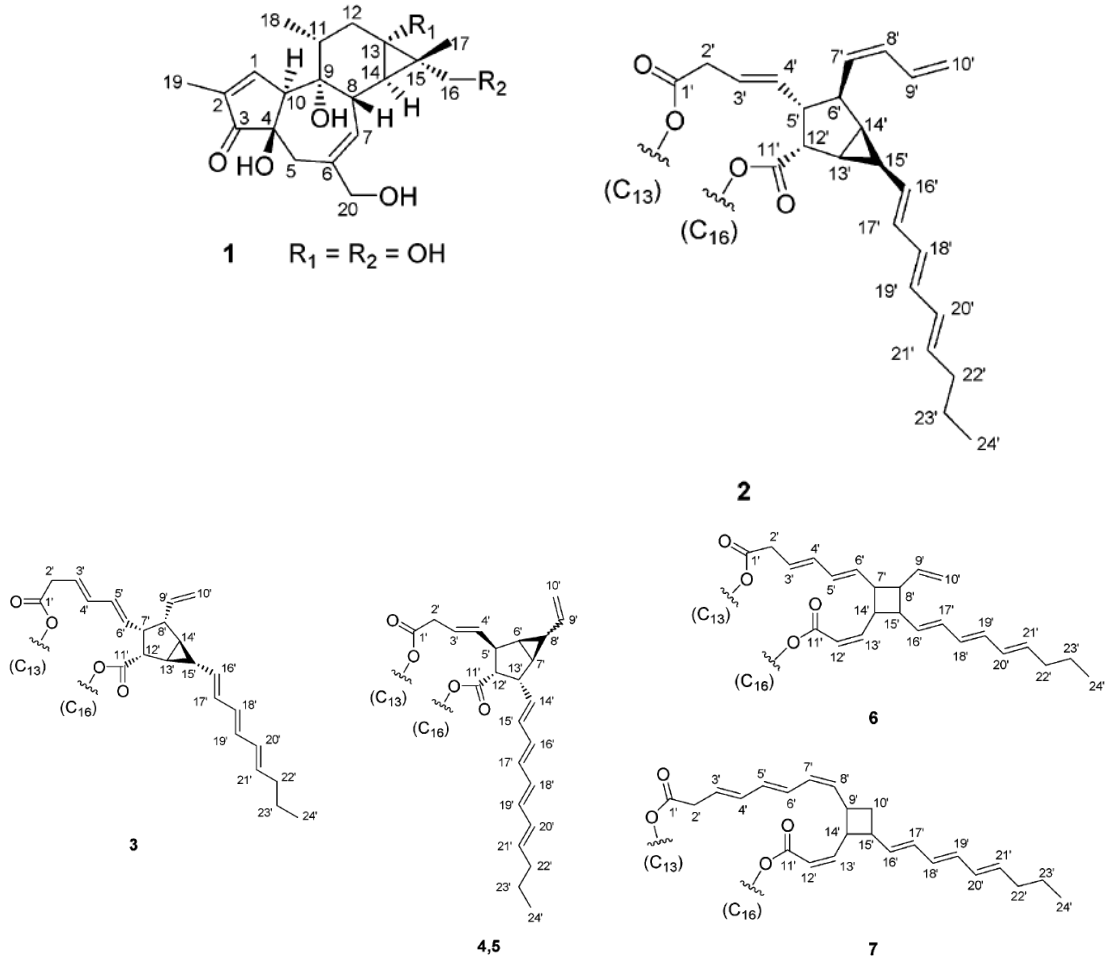


Abbildung 6: Strukturformeln der Jatrophafaktoren (Haas *et al.*, 2002).
1: Grundalkohol der Jatrophafaktoren ist das 12-Desoxy-16-hydroxyphorbol
2-7: Die unterschiedlichen Esterbrücken der Jatrophafaktoren bilden an den Positionen 13 und 16 des Grundalkohols einen intramolekularen Diester

Generell werden aber zwei Varietäten von *Jatropha curcas* L. unterschieden. Es handelt sich dabei um eine toxische und eine nicht-toxische Varietät. Also enthalten nicht alle Pflanzen dieser Art zwangsläufig die beschriebenen Inhaltsstoffe, sondern es gibt einen in Mexiko beheimateten nicht giftigen Genotyp ohne einen relevanten Gehalt an Phorbolestern (Makkar *et al.*, 1998, 2008).

Als weitere biologisch aktive Inhaltsstoffe enthalten die Samen von *Jatropha curcas* L. noch das insektizid wirksame Jatropherol-I sowie β-1,3-Glucanase mit antifungaler Aktivität (Jing *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005).

Im Milchsaft der Pflanze sind das wundheilungsfördernde Curcain, das gegen Malaria wirksame Curcacycline B und das antifungal aktive Jatrophidin als aktive Inhaltsstoffe zu nennen. Außerdem enthalten die Wurzeln noch die cytotoxischen Curcasone A-D (Devappa *et al.*, 2010).

Jatropha curcas L. enthält folgende Phytotoxine, die zu der Gruppe der RIPs vom Typ 1 gehören (Schrot *et al.*, 2015):

- Curcin I aus den Samen
- Curcin II nur rekombinant
- Curcin-L aus den Blättern
- Jc-SCRIP aus der Samenschale

1.2.3 *Euphorbia cyparissias* L. - Zypressenwolfsmilch

Beschreibung

Die Zypressenwolfsmilch ist eine in der nördlichen Hemisphäre weit verbreitete 15-50 cm hohe ausdauernde, buschige Staude mit dicken kriechenden Ausläufern. Sie besitzt einen holzigen, oft knorrigen, ästigen und schräg liegenden Wurzelstock mit gedrungenem Wurzelköpfchen. Sie ist von Europa über Nordafrika bis nach Nordasien zu finden und sogar nach Nordamerika eingeschleppt, wo sie auf sandigen, kalkhaltigen Böden, in Waldlichtungen oder auf Äckern anzutreffen ist. Die aufrechten Stängel sind kahl, gelblichgrün und tragen spiralig aufsteigende, sitzende, 1-2 cm lange, schmal linealische Blätter. Die kleinen, gelben Blüten bilden endständige Trugdolden und, wo die Doldenstrahlen entspringen, sitzt eine Hülle aus zahlreichen zurückgeschlagenen Blättern. Die Pflanze führt in allen Teilen Milchsaft, der bei Verletzung austritt (Hager *et al.*, 2007; Madaus, 1938).

Abbildung 7: *Euphorbia cyparissias* L. Blütenstände und Kraut (wikimedia.org)

Anwendung

Innerlich wurde der Auszug der Pflanze bei Verstopfung, zur Förderung der Harnabsonderung und bei Zahnschmerzen angewandt. Gegen Warzen und Hühneraugen fand der Saft als solcher oder in Salben eingearbeitet Anwendung. Von der Anwendung ist aus heutiger Sicht aufgrund der enthaltenen Diterpenester abzuraten (Hager *et al.*, 2007). In homöopathischen Verdünnungen findet der Auszug des Krautes hauptsächlich bei chronischen Reizzuständen der Schleimhäute und der Haut sowie Augenentzündungen Verwendung. Ferner werden noch Diarrhöen, Magenkrämpfe, Vomitus, Brechdurchfall, Gelenkschmerzen und Infektionskrankheiten mit starkem Exanthem als Anwendungsgebiete genannt (Madaus, 1938).

Inhaltsstoffe

Die Hauptinhaltsstoffe der Pflanze sind Flavonole mit Quercetin- und Kämpferol-3-O-glucuronid als Hauptkomponenten. Des Weiteren sind noch einige Triterpene, Fettalkohole, Harz, Gummi, Kautschuk sowie weitere niedrig konzentrierte Verbindungen enthalten (Ott, 1978; Hager *et al.*, 2007).

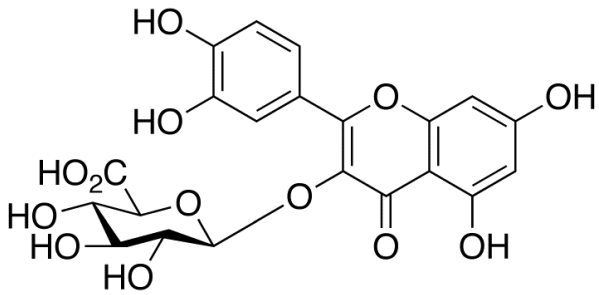
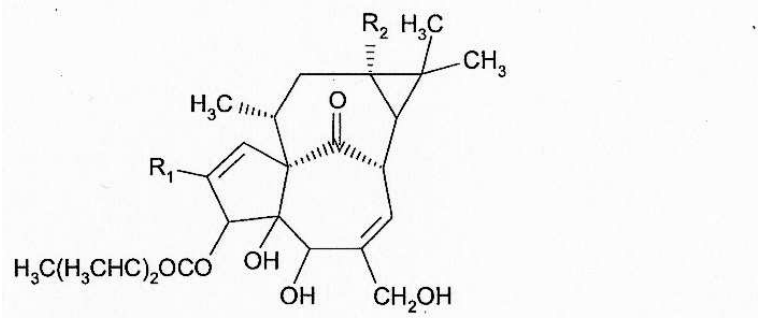


Abbildung 8: Strukturformel von einem der Hauptinhaltsstoffe des Krautes von *Euphorbia cyparissias* L. dem Quercetin 3-O-glucuronid (trc-canada.com)

Die für diese Arbeit interessanten Inhaltsstoffe sind die 14 unterschiedlichen Di- und Triester der Diterpenalkohole 13-Hydroxyingenol und 13,19-Dihydroxyingenol, die in der Pflanze zu finden sind. Dieses sind die irritierenden Inhaltsstoffe und werden nach Ott (1978) als Cyparissiasfaktoren 1-14 benannt. Sie haben als Säurekomponenten die langkettigen Carbonsäuren mit Caprinsäure (C_{10}) und Laurinsäure (C_{12}), sowie die kürzere, verzweigte Carbonsäure 2,3-Dimethylbuttersäure oder Benzoesäure.



Cyparissias-faktoren	R_1	R_2
Cy6	$-CH_2OCO(CHCH_3)-CH_3$	$-OCO(CHCH_3)-CH_3$
Cy11	$-CH_3$	$-OCOC_9H_{19}$
Cy14	$-CH_3$	$-OCOC_{11}H_{23}$

Abbildung 9: Beispielhaft drei Cyparissiasfaktoren aus *Euphorbia cyparissas* L. (Hager *et al.*, 2007)

Cyparissiasfaktor Cy_6 stellt einen Triester des 13,19-Dihydroxyingenols dar, wobei alle drei Estergruppen die 2,3-Dimethylbuttersäure gebunden haben. Cyparissiasfaktor Cy_{11} und Cy_{14} sind die ensprechenden Diester des 13-Hydroxyingenols mit Caprin- oder Laurinsäure als Säurekomponete.

Die im Test am Mausohr am stärksten tumorpromovierend aktiven Cyparissiasfaktoren sind Cy_{11} und Cy_{14} mit einer, dem TPA vergleichbaren, irritativen Dosis von 0,006 und 0,012 $^{nmol}/_{Ohr}$. Sie gehören somit zu den stärksten bekannten Tumorpromotoren unter den Diterpenestern (Ott, 1978; Teuscher & Lindequist, 2010).

1.3 Homöopathische Urtinkturen

Urtinkturen sind wässrig-ethanolische flüssige Zubereitungen aus pflanzlichen Presssäften oder Auszüge pflanzlicher und tierischer Bestandteile sowie Nosoden. Die Urtinkturen werden aus Pflanzen oder deren Teile in frischer oder getrockneter Form nach den Herstellungsvorschriften des HAB (2014) durch Mazeration, Digestion, Dekoktion oder Fermentation hergestellt HAB (2014).

Sie sind durch das Kurzzeichen Ø gekennzeichnet und dienen als Ausgangsmaterial für die nachfolgende Potenzierung, wobei durch die Anfertigung von Verdünnungen die eigentlichen homöopathischen Arzneimittel hergestellt werden.

Als solche stellen aber die unverdünnten Urtinkturen einen der Tinktur vergleichbaren Auszug dar und enthalten einen nennenswerten Gehalt an Inhaltsstoffen. Diese Stoffe gilt es quantitativ zu erfassen und somit eine Aussage über das toxische Potenzial der Urtinktur oder ihrer Verdünnungen zu ermöglichen.

Die homöopathischen Urtinkturen sollen als Ausgangsmaterialien zur Herstellung von homöopathischen Zubereitungen seit einigen Jahren nach und nach in das Europäische Arzneibuch aufgenommen werden. Dafür muss für jede Zubereitung nach den Vorschriften vom EDQM (2013) eine Monographie erstellt werden.

Für die Aufnahme der Urtinkturen in die Monographien des Europäischen Arzneibuchs sind für die als bedenklich einzustufenden Inhaltsstoffe Quantifizierungsmethoden notwendig. Dabei handelt es sich häufig um Konventionsmethoden und diese haben nicht den Anspruch, einen wahren Gehalt zu ermitteln.

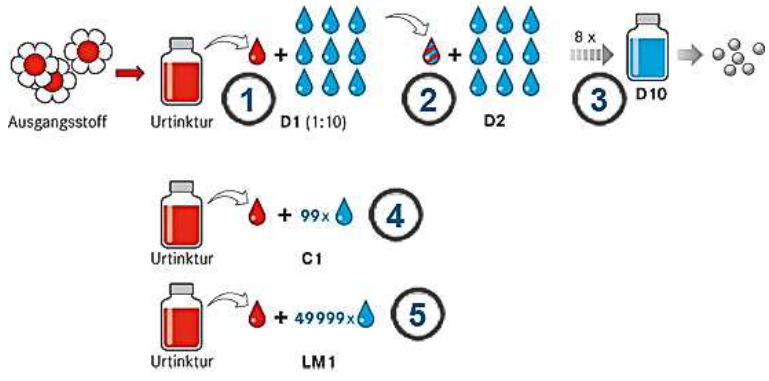


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Herstellung von potenzierten homöopathischen Zubereitungen (meine-gesundheitsakademie.de)

1.4 Zielsetzung

Ursprünglich war es das Ziel dieser Arbeit eine allgemeingültige Methode für die quantitative Bestimmung von tumorpromovierenden Diterpenestern aus homöopathischen Urtinkturen zu entwickeln. Dafür sollte zunächst eine enzymatische Spaltung der Diterpenester untersucht werden, wodurch die enthaltenen Ester zu den Grundalkoholen umgesetzt werden und diese werden dann über entsprechende Standards quantifiziert. Mit einer Methode für alle Urtinkturen konnte wegen der sehr unterschiedlichen Inhaltsstoffe nicht gearbeitet werden.

Es musste also zunächst die exakte Zusammensetzung der zu bestimmende Urtinktur qualitativ genau beschrieben werden. Davon ausgehend sollte dann eine passende Quantifizierungsmethode entwickelt werden. Sofern überhaupt eine Quantifizierung aus den komplexen Mischungen so einfach möglich ist, so muss für diese in den meisten Fällen mit sogenannten Konventionsmethoden gearbeitet werden.

Es war also notwendig für jede Urtinktur separat eine Bestimmungsmethode zu entwickeln, die es ermöglicht, reproduzierbar einen Gesamtgehalt der enthaltenen Diterpenester anzugeben. Es sollte vorausgehend eine möglichst genaue qualitative Beschreibung der tumorpromovierenden Verbindungen erfolgen und davon ausgehend eine Methode zur Quantifizierung erarbeitet werden.

Dafür sollten zunächst die Diterpenester aus den Urtinkturen mit modernen Analysemethoden identifiziert werden. Hierfür wurde die UHPLC-MS/MS gewählt, da es die Identifizierung der unterschiedlichen Verbindungen aus einem komplexen Gemisch ermöglicht.

Um einen Gesamtgehalt der Diterpenester zu erhalten, müssen die Phorbolester-Peaks aufsummiert werden, sofern sie isoliert und zeitlich begrenzt auftreten. Ansonsten muss eine geeignete Methode zur Aufspaltung der Ester entwickelt werden, so dass über die Grundalkohole quantifiziert werden kann. Hierfür ist eine vollständige Hydrolyse unter schonenden Bedingungen notwendig, damit die Ester komplett gespalten werden, aber die Grundalkohole noch für eine quantitative Bestimmung intakt bleiben.

Die entwickelte Quantifizierungsmethode sollte anschließend validiert werden, um eine Eignung als mögliche Bestimmungsmethode der Diterpenester für das Europäische Arzneibuch zu zeigen.

Des Weiteren sollte eine Übersicht über die unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien geschaffen werden, wofür die entwickelte Methode zur Quantifizierung diente sowie ein qualitativer Vergleich über HPLC-Analyse erfolgte.

2 Material

2.1 Untersuchungsmaterial

Es wurden homöopatische Urtinkturen aus *Croton tiglium* L., *Jatropha curcas* L. und *Euphorbia cyparissias* L. von der Firma DHU (Karlsruhe) für die Untersuchung zur Verfügung gestellt. Croton Urtinktur wurde zusätzlich noch von der Firma Dr. Reckeweg & Co (Bensheim) bezogen. Croton Samen aus Sammlungen in unterschiedlichen Herkunftsländern wurden ebenfalls von DHU und Dr. Reckeweg & Co zur Untersuchung bereitgestellt.

2.1.1 Urtinkturen

Die homöopathischen Urtinkturen aus den Samen von *Croton tiglium* L. und *Jatropha curcas* L. wurden nach der HAB Vorschrift 4a hergestellt. Die pulverisierte Droge (710) wird dabei durch Mazeration mit Ethanol 86 % (m/m) extrahiert.

Bei *Euphorbia cyparissias* L. wird die ganze frische Pflanze zur Blütezeit verwendet und nach Vorschrift 3a mit Ethanol 60 % (m/m) extrahiert.

Im HAB werden bei der Prüfunge auf Reinheit Spezifikationen für die jeweiligen Urtinkturen angegeben. Demnach soll die Relative Dichte und der Trockenrückstand innerhalb des vorgegebenen Bereichs liegen. Für die Croton Urtinktur wird des Weiteren auch noch eine Gehaltsbestimmung angegeben, die aber nur den Trockenrückstand der in Petroläther ausschüttelbaren Fraktion darstellt und keine Aussage über den Gehalt an Phorbolestern in der Urtinktur ermöglicht (HAB, 2014).

Die Urtinkturen wurden aufgrund der besseren Lesbarkeit in der Arbeit nur mit dem Namen der Gattung bezeichnet oder mit dem Anfangsbuchstaben der Gattung und UT für Urtinktur abgekürzt.

Croton Urtinktur

Die Croton Urtinktur der DHU mit der Charge 102 war neben den selbst angefertigten Extrakten das Untersuchungsmaterial, woran die meisten Versuche dieser Arbeit durchgeführt wurden. Später stellte die DHU eine zweite Charge 103 zur Verfügung, welche zum späteren Zeitpunkt der Arbeit für qualitative und quantitative Untersuchungen genutzt wurde. Die Urtinktur der Charge 102 war eine leicht gelbliche, klare Flüssigkeit mit leicht nussigem Geruch. Bei der Lagerung im Kühlschrank entstand nach einiger Zeit eine sehr kleine zweite flüssige Phase tröpfchenförmig am Boden des Gefäßes. Vermutlich hat sich eine in der Kälte nicht mehr im wässrigen Ethanol lösliche lipophile Fraktion

abgeschieden. Es ist davon auszugehen, dass es sich dabei um fette Öle handelt und dies keinen Einfluss auf den Gehalt an Phorbolestern hat. Generell kann die Urtinktur im Hinblick auf die enthaltenen Phorbolester als stabil betrachtet werden, da die Charge 102 ohne merkliche Veränderungen in der Zusammensetzung über die gesamte Zeit dieser Arbeit wiederholt analysiert wurde.

Dr. Reckeweg hat zwei Chargen Croton Urtinktur zur Verfügung gestellt, welche beide aus Samen der Charge 22277 durch 27 Tage Mazeration im April 2014 hergestellt wurden. Das Drogenmaterial stammte von der Firma Stephan WE aus einer Wildsammlung im September 2011 in China (Guanxi). Die beiden Urtinkturen hatten folgende Spezifikationen nach der HAB Monographie:

- Charge: 1404T0001 TR = 1,29 % Gehalt = 1,08 % Rel. Dichte = 0,8344
- Charge: 1404T0002 TR = 1,26 % Gehalt = 1,01 % Rel. Dichte = 0,8341

Es ist zu vermerken, dass die Urtinkuren nicht den Vorgaben der HAB Spezifikation zum Gehalt und Trockenrückstand entsprachen und daher nicht industriell genutzt werden konnten. Für den Forschungszweck stellte dies aber keine Probleme dar, denn es konnten in beiden Urtinkturen bei der Analyse Phorbolester nachgewiesen werden.

Jatropha Urtinktur

Die DHU hat zwei Urtinkturen aus *Jatropha curcas* L. zur Verfügung gestellt, welche die Chargen 101 und 102 hatten. Beides waren klare, fast farblose Flüssigkeiten, wobei die Charge 101 einen leichten Gelbstich aufwies.

Euphorbia Urtinktur

Von der Euphorbia Urtinktur wurde ebenfalls zwei Chargen von der DHU bezogen. Die beiden Chargen 100 und 101 waren tiefgrüne, klare Flüssigkeiten von leichtem, charakteristischem Geruch.

2.1.2 Samendrogen

Verschiedene Samenproben von *Croton tiglium* L. wurden durch die beiden Firmen DHU und Dr. Reckeweg & Co bereitgestellt. Daraus wurden wiederum methanolische Extrakte hergestellt, um sie untereinander phytochemisch zu vergleichen.

Die Samen zeigten leichte Unterschiede in Färbung und Geruch, aber waren sonst im Form und Größe vergleichbar.

- DHU Charge: D100078

- Dr. R. Chargen: 22224; 22277; 22464; 22747

Samen von *Jatropha curcas* L. wurden über die Firma Uhlig-Kakteen (Kernen im Remstal) bezogen, um sie zu extrahieren und mit den Urtinkturen zu vergleichen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	**Hersteller**
DC-Glasplatten 100 × 200 mm 250 µm (Kieselgel, 60 Å, F254)	Merck (Darmstadt)
graduierte Zentrifugenröhrchen 15 mL; 50 mL	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße 1,5 mL; 2 mL	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße 1,5 mL mit Schraubdeckel	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
HPLC Vials 1,5 mL; 11,6 × 32 mm	VWR (Darmstadt)
Deckel für Vials schwarz mit zentralem Loch	VWR (Darmstadt)
Insets für Vials 100 und 200 µL	VWR (Darmstadt)
Spritzen: 1; 2 und 25 mL Omnifix	B|Braun (Melsungen)
Spritzenfilter 0,2 µm	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Std. (50-1000; 500-2500; 100-5000 µL)	Eppendorf (Hamburg)
Pipette Tip Micropoint 0,1-10 µL	VWR (Darmstadt)
Universal tips yellow 2-200 µL	VWR (Darmstadt)

2.3 Chemikalien und Substanzen

Soweit wie möglich und notwendig wurden Chemikalien verwendet, die dem Reinheitsgrad zur Analyse (p.a.) entsprechen. Das verwendete Wasser wurde nach einer Vorreinigung durch eine Reinstwasseranlage deionisiert und hatte eine Leitfähigkeit von 0,055 $\mu S/cm$ bei 25 °C.

2.3.1 Allgemein

Produktbezeichnung	**Hersteller**
Acetonitril - HPLC Qualität	Fisher Scientific (Schwerte)
Acetonitril - LCMS Qualität	VWR (Darmstadt)
Ameisensäure - 100 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Bariumhydroxid Octahydrat	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Celite 545	Fluka (Neu-Ulm)
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
Diethylether	Merck (Darmstadt)
Essigsäure - 100 %	Fisher Scientific (Schwerte)
Ethanol - absolut	Merck (Darmstadt)
Ethylacetat	VWR (Darmstadt)
Kaliumcarbonat	Carl Roth (Karlsruhe)
Lithiumaluminiumhydrid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol - HPLC Qualität	Fisher Scientific (Schwerte)
Methanol - LCMS Qualität	VWR (Darmstadt)
Natriumacetat-trihydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriummethanolat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Petrolether (40-60 °C)	Th. Geyer (Renningen)
Schwefelsäure 98 %	Merck (Darmstadt)
Trishydroxymethylaminomethan	Merck (Darmstadt)
Trifluoressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Trizma hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Vanillin	Merck (Darmstadt)

2.3.2 Referenzsubstanzen

Es wurden folgende Standardsubstanzen für die Quantifizierung und zur Referenz in der höchsten im Handel erhältlichen Reinheit verwendet.

4α-Phorbol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ingenol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phorbol	LC Laboratories (Woburn, USA)
TPA	Calbiochem, Merck (Darmstadt)

2.3.3 Enzymatische Hydrolyse

Enzyme

Folgende Enzyme wurden als Suspension in den entsprechenden Puffern angesetzt oder bei immobilisierten Enzymen als Feststoff zugesetzt:

Lipase B aus *Candida antarctica* immobilisiert	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Esterase aus *Bacillus subtilis*	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Esterase aus *Bacillus stearothermophilus*	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pektinase aus *Aspergillus niger*	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Postmitochondrial Supernatant (S-9)	Trinova Biochem (Gießen)
Schweineleberesterase	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Puffer

Es wurden folgende Puffersysteme für die enzymatische Hydrolyse verwendet:

- Tris-HCl pH 7,5 und 8 bei 37 und 40 °C;
  0,1 und 0,05 $^{mol}/_{L}$ + 2 $^{mmol}/_{L}$ Calciumchlorid
- Dihydrogenphosphat pH 7,5 bei 37 °C; 0,1 $^{mol}/_{L}$
- Essigsäure-Acetat pH 5 bei 50 °C; 0,1 $^{mol}/_{L}$

2.3.4 Alkalische Hydrolyse

Reagenzien

- Natriummethanolat 0,1 $^{mol}/_{L}$ in MeOH
- Bariumhydroxid 0,1 $^{mol}/_{L}$ in MeOH
- Kaliumcarbonat 0,1 $^{mol}/_{L}$ in MeOH
- Natriumhydroxid 0,1 $^{mol}/_{L}$ in MeOH
- Essigsäure 1 $^{mol}/_{L}$ in MeOH

2.4 Geräte

2.4.1 HPLC

Die Arbeiten zur Methodenentwicklung und späteren Quantifizierung wurden auf einer analytischen HPLC Anlage der Firma Shimadzu (Berlin) gemacht. Diese bestand aus einem Bausteinsystem mit folgenden Komponenten:

- Steuereinheit CBM-20A, wurde nach einem Jahr im Zuge eines Updates der Software gegen die frühere Steuereinheit vom CBM-10A getauscht
- Zweikanal UV-Detektor SPD-10AV
- Hochdruckgradientensystem mit zwei Pumpen LC-10AD
- Säulenofen CTO-10AC
- Autoinjektor SIL-10A mit Sample Cooler
- Fraktionssammler FRC-10A

Die neue Betriebssoftware LabSolution Version 5.5.1 von Shimadzu wurde nach dem Austausch der Steuereinheit auf einem Dell PC mit Windows 7 betrieben.

2.4.2 HPLC-MS

Die qualitativen Untersuchungen zur Identifikation der Diterpenester aus den Urtinkturen mittels HPLC-MS konnten nicht im Institut für Pharmazie durchgeführt werden. Dafür wurden Geräte entweder im Institut für Pharmokognosie der Medizinischen Universität Warschau oder in der MS Core Facility des Fachbereichs an der FU-Berlin genutzt. Dabei kamen folgende Instrumente zum Einsatz:

- Anlage 1 Warschau:

  Iontrap-MS/MS-UHPLC
  HPLC: Dionex UltiMate 3000 LC Systems, Thermo Scientific (Langenselbold)
  MS: Amazon SL Iontrap, Bruker (Bremen)
  CAD: Corona Ultra RS (Charged Aerosol Detector), Thermo Scientific (Langenselbold)

- Anlage 2 MS Core Facility:

  ESI-MSD-TOF-HPLC
  HPLC: 1100 Series, Agilent Technologies (Waldbronn)
  MS: ESI-TOF 6210, Agilent Technologies (Waldbronn)

- Anlage 3 MS Core Facility:

  ESI-IMS-MS/MS-UHPLC
  ACQUITY UPLC System, Waters (Eschborn)
  SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometry, Waters (Eschborn)
  Das Hybridgerät beinhaltet vereinfacht gesagt ein Q-TOF mit einem Ionenmobilitätsspektrometer.

Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte später am eigenen Computer mit der entsprechenden Software Bruker Compass Data Analysis oder MassLynx von Waters.

2.4.3 HPLC Säulen

Es wurden folgende HPLC-Säulen für diese Arbeit verwendet:

- Kinetex Core-Shell Säulen, Phenomenex (Aschaffenburg)
  1,7 µm, 2,1 x 150 mm,100 Å,
  XB-C18
  2,6 µm, 4,6 x 100 mm, 100 Å:
  C8, XB-C18 und PFP
- LiChrosorb 100 RP-18, Merk (Darmstadt)
  5 µm, 4 x 250 mm, 100 Å
  C18
- ACQUITY UPLC BHE Säule, Waters (Eschborn)
  1.7 µm, 2,1 x 50 mm, 130 Å
  C18

2.4.4 SPE Kartuschen

- MACHEREY-NAGEL (Düren):
  SiOH-Normalphase, RP18, RP18 Ec, RP18 Hydra
- Phenomnex (Aschaffenburg):
  Reversed Phase: Strata C18-E und Strata-X RP (Polymer)
  Ionenaustausch: Strata-X-A Anion (Polymer) und Strata ABW
- United Chemical Technologies (Bristol, UK):
  Diethylamino, Aminopropyl, PSA, Cyanopropyl (+endcapped), Diol, C18 EC, C8(+ Carboxylsäure)

2.4.5 Sonstige Geräte

Produktbezeichnung	**Hersteller**
Thermoschüttler:	
- HLC MKR13	DITABIS (Pforzheim)
- Grant Bio PHMT-PSC24	Grant (Cambridge, UK)
Magnetrührer: IKAMAG RCT	IKA (Staufen)
Vakuumpumpe CVC24	Vaccubrand (Wertheim)
SPE Column Processors - 12G	J.T. Baker Lab (USA)
DC Horizontal-Entwicklungskammer (20 x 10 cm)	CAMAG (Muttenz, CH)
DC Auftragegerät Linomat IV	CAMAG (Muttenz, CH)
Schüttler/ Vortexer:	
- Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
- RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen)
pH-Meter:	
- 766 Calimatic	Knick (Berlin)
- sympHony SP70P	VWR (Darmstadt)
Kolbenhubpipetten	
1-10; 10-100; 20-200; 100-1000; 500-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Reinstwasseranlage: Labostar UV 2	Siemens (Barsbüttel)
Rotationsverdampfer: Rotavapor R114	Büchi (Flawil, CH)
Ultraschallbad Sonorex RK 100	BANDELIN electronic (Berlin)
Vakuumzentrifuge:	
- Savant SPD111V SpeedVac	Thermo Scientific (Langenselbold)
- Vacuum concentrator	Bachofer (Reutlingen)
Waagen:	
- CP224S-OCE (Analysenwaage)	Satorius (Göttingen)
- portable PT1200 (Rezepturwaage)	Satorius (Göttingen)
- XS 205 DualRange (Analysenwaage)	Mettler-Toledo (Gießen)
Zentrifugen:	
- Medifuge 200S	Heraeus Instruments (Hanau)
- Z 233 M-2	HERMLE (Wehingen)
- Mikro 20	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

3 Methoden

3.1 Theoretische Grundlagen

3.1.1 HPLC in der Phytoanalytik

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ist in der Phytoanlaytik eine Standardmethode zur Auftrennung von komplexen Stoffgemischen wie sie Pflanzenextrakte im Allgemeinen und hier im Speziellen die homöopathische Urtinkturen darstellen. Es wird bei der klassischen HPLC mithilfe von Absorptions- und Desorptionseffekten eine Retention der Analyten beim Durchfließen einer stationären Phase in der Säule erzielt. Diese Retention ist abhängig von der Polarität der Analyten sowie der stationären Phase, also dem Säulenmaterial, und kann durch die Variation der mobilen Phase, also dem Fließmittel, beeinflusst werden.

Des Weiteren wird die Trennung durch die Länge, den Durchmesser der Säulen und die Beschaffenheit des Füllmaterials bestimmt. In der modernen HPLC unterscheidet man den Aufbau der stationären Phase als monolithischen Kieselgelstab, klassische vollporöse Partikel oder sogenannte Core shell Partikel. Bei den Partikeln wird grob zwischen Durchmessern über und unter 2 µm unterschieden, wobei für die kleineren Partikel bei gleicher Fließgeschwindigkeit ein höherer Gegendruck entsteht. Hierfür werden spezielle UHPLC-Systeme verwendet, die auch bei Drücken bis 1000 bar arbeiten können. Klassische HPLC arbeitet dagegen mit Drücken bis maximal 400 bar.

Die HPLC war für diese Arbeit die Methode der Wahl, da es sich bei den homöopathischen Urtinkturen um flüssige ethanolisch-wässrige Extrakte aus den entsprechenden Pflanzen oder Drogen handelt und somit zur Analyse eine Auftrennung der enthaltenen Substanzen notwendig ist. Zur Auftrennung der Extrakte muss jeweils eine entsprechende Methode erarbeitet werden, die speziell auf die enthaltenen Analyten hin angepasst wird. Es wurde in dieser Arbeit sowohl mit der klassischen HPLC, als auch mit UHPLC-Systemen gearbeitet.

Bei dem für diese Arbeit verwendeten Säulenmaterial handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen HPLC-Säulen. Die Säule ist gepackt mit sogenannten Core-Shell Partikeln, die einen festen Kern und eine poröse Hülle besitzen. Im Gegensatz zu vollporösen Partikeln haben sie den Vorteil, dass sie auch bei kleinerem Partikeldurchmesser einen höheren Durchfluss ermöglichen, ohne dabei sehr hohen Gegendruck zu erzeugen. Es entstehen außerdem eine kompaktere Säulenpackung sowie geringere Diffusionswege; dies erhöht die Trennleistung des Systems. Dies wirkt sich auch positiv auf die Peakform aus, denn es entstehen so schmalere und dadurch höhere Peaks (GIT-Labor.de, 2015).

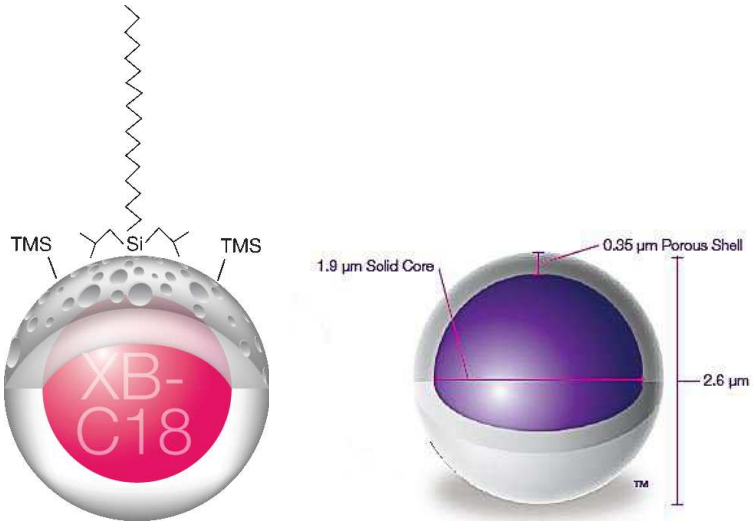


Abbildung 11: Aufbau des XB-C18 Säulenmaterials und eines Core-Shell Partikels (phenomenex.com)

Diese Core-Shell Säulen werden von unterschiedlichen Herstellern angeboten, wobei wir ausschließlich die Kinetex Säulen von Phenomenex in Verwendung hatten. Hierbei kamen drei unterschiedlich modifizierte Kieselgel-Materialien als stationäre Phase zum Einsatz: C8, XB-C18 und PFP.

Die C8 ist eine klassische RP-Säule mit Octyl-Ketten, welche durch die noch freien Silanolgruppen auch verstärkt hydrophile Wechselwirkungen zulässt und sich somit für polare Proben eignet.

Bei der XB-C18 dagegen sind die Silanolgruppen durch Methylether sowie Isobutylether abgeschirmt und durch die längere Kohlenstoffkette bekommt man eine stark lipophile Oberfläche.

PFP ist eine spezielle RP-Phase, die durch Pentafluorphenylreste zusätzlich zu den lipophilen Eigenschaften des Pentanrestes auch π-π-Wechselwirkungen des Phenylrings sowie Interaktionen der freien Elektronenpaare des Fluors ermöglicht. Hierfür wurde eine verbesserte Trennleistung durch Wechselwirkungen zu den freien Hydroxylgruppen des Phorbols erwartet. Es wurde aufgrund der besseren Peakform und dadurch schärferen Trennung in der späteren Arbeit ausschließlich die XB-C18 Säule verwendet.

Eine genauere Beschreibung der HPLC und ihren theoretischen Grundlagen wird in dieser Arbeit nicht gegeben und es dafür auf das Fachbuch von Meyer (2008) verwiesen.

3.1.2 HPLC-MS-Kopplung

Die klassische HPLC arbeitet mit der Detektion der Analyten durch die Absorption von UV-Licht bestimmter Wellenlängen. Sofern die Inhaltsstoffe bekannt sind und durch Referenzsubstanzen identifiziert werden können eignet sich diese Methode besonders gut

auch zur Quantifizierung von Substanzen. Schwierig wird es aber bei dem Fehlen von Referenzsubstanzen und der Analyse von sehr komplexen Stoffgemischen.

Für die Identifikation von Stoffen aus komplexen Mischungen wie den Urtinkturen eignet sich besonders gut die Kopplung mit einem Massenspektrometer als Detektor. Dieses wird hinter den UV-Detektor an die HPLC angeschlossen und ermöglicht so die Bestimmung der Molekülmasse der einzelnen Peaks. Die einfache HPLC-MS-Kopplung lässt das Molekül als solches noch intakt und bestimmt nur die relative Molekülmasse der Verbindungen.

Durch die Kopplung mit speziellen mehrdimensionalen Massenspektrometern kann man noch eine weitere Aufspaltung der Moleküle in einzelne Tochterionen bekommen. So erhält man in den MS/MS-Spektren durch die spezifische Fragmentierung der Moleküle eine Aussage über deren möglichen Aufbau. Im Falle der Diterpenester kann so z.B. die gebundene Säurekomponente ermittelt werden und wenn die möglichen Grundalkohole mit ihren spezifischen Fragmenten auch bekannt sind, kann so eine hinreichend genaue Identifikation der gesuchten Verbindungen erfolgen.

3.1.3 HPLC Methodenentwicklung

Ein großer Teil dieser Arbeit bestand aus der Methodenentwicklung und -optimierung. Es mussten die HPLC-Methoden für jede einzelne Urtinktur und später für die Hydrolyseprodukte entwickelt werden. Hierbei geht es darum, die Stoffe unterschiedlicher aber in diesem Fall auch sehr ähnlicher Polarität durch die Variation der mobilen und stationären Phase bestmöglich aufzutrennen. Um eine Auftrennung der einzelnen Ester und Grundalkohole zu ermöglichen, mussten jeweils spezielle Gradientensysteme für die Fließmittel ausgearbeitet werden, wobei zum Teil mit sehr langen und flach ansteigenden Anteilen an organischem Fließmittel gearbeitet werden musste.

Grundsätzlich kann man die Trennung durch unterschiedliche Säulenmaterialien und die Fließmittelzusammensetzung beinflussen. Anfangs wurde als organisches Fließmittel Methanol verwendet, doch im Laufe der Methodenoptimierung wurde das Fließmittel gegen Acetonitril ausgestauscht. Dieser Wechsel führte zu einer deutlichen Verbesserung der Trennung.

Da keine aciden Strukturen in den Phorbolestern zu finden sind, wirkte sich ein Zusatz von Säure nicht positiv auf die Trennung aus und es wurde deshalb hier darauf verzichtet. Säurezusatz kam nur bei den HPLC-MS-Untersuchungen zum Einsatz, da es hier als Standardlaufmittel dient und für die Ionisierung von Vorteil ist. Die phenolischen Strukturen der Flavonole in *Euphorbia cyparissias* L. setzen jedoch auch einen Zusatz von Säure zum Laufmittel voraus, da es sonst zu einer starken Peakverbreiterung kommt.

An die eigentliche Analyse schließt sich immer eine Wasch- und Äquilibrierungsphase an, wobei zunächst mit reinem organischen Lösungsmittel und dann mit dem Laufmittelgemisch der Startbedingungen die Säule gespült wird. Dadurch werden gleiche Retentionszeiten gewährleistet und durch das Spülen werden Memoryeffekte durch das Verbleiben von Analyten auf der Säule vermieden.

3.1.4 HPLC Quantifizierung

Zur Gehaltsbestimmung von bekannten Verbindungen aus Substanzgemischen kann die HPLC verwendet werden. Dafür ist eine Auftrennung der zu bestimmenden Verbindung in einem einzelnen Peaks notwendig, welcher dann über die integrierte Peakfläche gegen einen Standard bekannter Konzentration berechnet werden. Die Peakfläche ist dabei proportional zu der Analytenkonzentration.

Der Standard wird dazu bei einer internen Kalibrierung der Probe zugesetzt um einen möglichen Matrixeffekt bei der Messung miteinbeziehen zu können oder aber bei der externen Kalibrierung wird der Standard seperat vermessen.

Die Peakfläche wird über Integration berechnet und trägt eine Flächeneinheit, die sich aus dem Detektorsignal und der Zeiteinheit zusammensetzt. In dieser Arbeit werden die Peakflächen immer ohne Einheit dargestellt, wobei aber hier für alle Flächen die Einheit $[mV * sec]$ gilt.

3.2 Enzymatische Esterhydrolyse von Phorbolestern aus Croton Urtinktur

3.2.1 Methode

Eine Möglichkeit für eine schonende Methode zur Spaltung von Estergruppen wäre die Nutzung von speziellen Enzymen. Diese Enzyme greifen nur die Estergruppen an und dabei bleibt das restliche Molekül möglichst unverändert. Dazu können unterschiedliche Enzymklassen in Frage kommen, die jeweils bestimmte Estergruppen spalten. Eine Auswahl von verschiedenen Esterasen, Pektinase, Lipase und Rattenleberenzymen wurde auf die Phorbolester aus der Croton Urtinktur als Substrat getestet.

Dabei wurde für die einzelnen Enzyme jeweils das entsprechende pH-Optimum mit entsprechenden Puffern eingestellt. Inkubiert wurde die Mischung dann in einem Thermoschüttler beim jeweiligen Temperaturoptimum für 1, 4 und 24 Stunden. Das Resultat wurde dann im HPLC-UV-Chromatogramm mithilfe der Standardsubstanzen Phorbol, 4α-Phorbol und TPA ausgewertet. Die Enzyme wurden zunächst an der Reinsubstanz des Phorbolesters TPA getestet und dann wurde die Übertragbarkeit auf die heterogen zusammengesetzte Urtinktur untersucht. Das zur Auswertung der Spaltprodukte genutzte HPLC-System 1 war folgendes:

System 1	
Anlage:	Shimadzu HPLC
Säule:	Kinetex XB-C18 + Vorsäule
Fließmittel:	(A) Methanol, (B) H_2O
Gradient:	0-3 min 10 % A
	3-5 min linear auf 100 % A
	5-15 min 100 % A
	15-17,5 min linear auf 10 %A
Flussrate:	1 $^{mL}/_{min}$
Injektionsvolumen:	40 µL
Detektion:	UV 254 nm

3.2.2 Durchführung

In ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurden 400 µL Pufferlösung mit einem Aliquot von 5 oder 10 µL TPA-Stammlösung in MeOH [1 $^{mg}/_{mL}$] gegeben und mit dem Vortexer bei geringer Drehzahl vermischt. Es wurden 5-20 µL des im Puffer suspendierten Enzyms [1 $^{U}/_{µL}$] versetzt und erneut am Vortexer gemischt. Dann wurde bei der für die Enzyme entsprechenden Temperatur im Themoschüttler inkubiert. Während der gesamten Zeit wurde der Ansatz bei 500 rpm geschüttelt.

Nach bestimmten Zeiten wurden die Reaktionsgefäße entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 400 µL Methanol abgebrochen. Durch einen Kationen-Anionen-Austauscher wurde vom Puffer entsalzt, indem die Probe nach erfolgter Konditionierung über eine SPE-Säule (Strata ABW) gegeben und anschließend mit Methanol nachgespült wurde. Zum Entfernen der Lösungsmittel wurde die Probe in der Speedvac im Vakuum bei 55°C für 2-4 Stunden bis zur Trockne eingeengt.

Nach dem Redispergieren des Rückstandes in 80 µL Methanol wurde bei 15000 g zentrifugiert und der Überstand in ein HPLC-Vial mit 100 µL-Inset überführt. Davon wurden 40 µL in dem oben stehenden HPLC-System 1 vermessen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch Vergleich mit den Standards TPA, Phorbol und 4α-Phorbol.

3.2.3 Immobilisierung

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Enzyme zu verringern und die enzymatische Hydrolyse auch in einem höheren Anteil an organischen Lösungsmitteln durchführen zu können, gibt es die Möglichkeit, die Enzyme durch Bindung an einen Träger wie etwa Kieselgel zu immobilisieren. Es können schon fertig immobilisierte Enzyme erworben werden oder es werden diese selbst auf den Träger gebracht.

Für diese Untersuchung wurde die Lipase B fertig immobilisiert auf Immobead 150P Pellets gekauft und andere einzelne Enzyme wurden selbst auf Kieselgel (Celite 545) immobilisiert.

Dafür wurden ein bestimmte Menge der Enzyme zunächst in 2 mL Tris-Puffer pH 8 suspendiert, es wurden 1 g Celite zugegeben und sorgfältig vermischt. Anschließend wurde in der Speedvac 12 Stunden bei 35°C unter Vakuum getrocknet (Persson & Bornscheuer, 2003).

Es wurde dann versucht, die enzymatische Hydrolyse in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln durchzuführen, um die Phorbolester während der Reaktion in Lösung zu halten und so einen besseren Angriff der Enzyme zu ermöglichen.

3.3 Quantitative Bestimmung von Phorbolestern aus Croton Urtinktur als TPA-Äquivalente durch alkalische Esterhydrolyse

3.3.1 Methode

Wie schon in der Dissertation von Gläser (1991) beschrieben besteht auch die Möglichkeit der alkalischen Hydrolyse mit unterschiedlichen basischen Reagenzien (Gläser *et al.*, 1988; Gläser, 1991). Dabei haben sich vor allem Bariumhydroxid und Natriummethanolat als stark basische Reagenzien für die Spaltung bewährt. Des Weiteren wurden für diese Arbeit noch andere, weniger basische Reagenzien wie Kaliumcarbonat und Natriumhydroxid getestet um eine weitere Reaktion der entstehenden Grundalkohole zu vermeiden. Bei der Umsetzung im basischen Milieu kommt es zum einen zu der gewünschten Aufspaltung der Esterbindungen zu dem Grundalkohol, jedoch kommt es in der Wärme außerdem auch zu einer Epimerisierung des entandenen Phorbol zum 4α-Phorbol und zu weiteren Anschlussreaktionen.

Für die Hydrolyse wurde eine Natriummethanolat-Lösung [0,1 $^{mol}/_{L}$] als am besten geeignete Reagenz ermittelt und um die enstehenden Hydrolyseprodukte zu identifizieren wurde eine HPLC-MS/MS-Analyse durchgeführt.

Die nötigen Reagenzlösungen zur Hydrolyse wurden jede Woche frisch hergestellt und im Kühlschrank gelagert, um immer die gleichen Hydolysebedingungen zu gewährleisten. Speziell die Essigsäure in Methanol neigt dazu, durch Veresterung selbst in der Kälte nach wenigen Wochen die Konzentration herabzusetzen. Um eine Verdünnung der Reagenz mit der Probe zu vermeiden wurde vor dem Zusatz der Lösung die Probe im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.

Zur Auftrennung der Hydrolyseprodukte wurde der Gradient so gewählt, dass im polaren Bereich eine feine Trennung erreicht werden konnte und daran angeschlossen ist eine Auswaschphase mit reinem organischen Fließmittel.

Durch die schlechte Löslichkeit der Verbindungen in dem Fließmittelgemisch bei Startbedingungen können nur geringe Mengen bis 10 µL injiziert werden, da es sonst zu unsymmetrischen Peaks und unter Umständen sogar Split-Peaks kommen kann. Das Ergebnis war das HPLC-System 2, welches die Aufspaltung der aus den Phorbolestern bei der Hydrolyse entstehenden Verbindungen möglich machte.

System 2	
Anlage:	Shimadzu HPLC
Säule:	Kinetex XB-C18 + Vorsäule
Fließmittel:	(A) ACN, (B) H_2O
Gradient:	0-15 min von 5 % A auf 40 % A
	15-16 min auf 100 % A
	16-23 min 100 % A
	23-24 min auf 5 %A
	24-30 min 5 % A
Flussrate:	1 $^{mL}/_{min}$
Injektionsvolumen:	10 µL
Detektion:	UV 254 nm

3.3.2 Durchführung

100 µL der Urtinktur wurden für 15-20 Minuten bei 45 °C im Vakuum in der Speedvac bis zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde der Rückstand in 900 µL Natriummethanolat-Lösung [0,1 $^{mol}/_{L}$] aufgenommen und 3 Stunden bei 45 °C inkubiert. Der Ansatz wurde die gesamte Zeit im Thermoschüttler bei 750 rpm geschüttelt. Zum Stoppen der Reaktion wurden 100 µL Essigsäure in MeOH [1 $^{mol}/_{L}$] zugegeben und am Vortexer vermischt. Dann wurde 2 Minuten bei 15000 *g* zentrifugiert und der Überstand in HPLC-Vials überführt. Die Proben wurden im HPLC-System 2 bei 254 nm vermessen.

Für die Analyse der Croton Urtinktur und Extrakte wurde die Methode in einem größeren Volumen als bei der Kalibrierung durchgeführt, um mögliche Volumenfehler zu minimieren und auch keine Insets für die Vials zu benötigen.

3.3.3 Kalibrierung

Für die Kalibrierung wurde eine Standardlösung von TPA in MeOH [2 $^{mg}/_{mL}$] eingesetzt. Wegen den hohen Kosten wurden dabei mit 200 µL Endvolumen gearbeitet um die einzusetzende Menge an TPA zu reduzieren. Nach dem Abdampfen wurde dafür mit 180 µL Methanolat-Lösung aufgenommen. Zur Neutralisation wurden nach der Inkubation 20 µL Essigsäure zugesetzt und die Proben in HPLC-Vials mit 200 µL Insets überführt. Unterschiedliche Aliquote der TPA-Standardlösung wurden nach der für die Croton Urtinktur entwickelten Hydrolysemethode gespalten. Die daraus resultierenden Peaks wurden über ihre Flächen zwischen der Retentionszeit 6 und 12 Minuten aufsummiert und in einer Kalibriergeraden gegen die eingesetzte Masse an TPA pro Injektionsvolumen aufgetragen. Für die Kalibrierung wurde jede Konzentration in doppeltem Ansatz hydrolisiert und dann doppelt in die HPLC injiziert.

3.4 Quantitative Bestimmung von Phorbolestern aus Jatropha Urtinktur als TPA-Äquivalente mittels HPLC-UV

3.4.1 Methode

Eine Quantifizierung der Phorbolester nach einer alkalischer Hydrolyse, wie bei sie bei der Croton Urtinktur mit Natriummethanolat durchgeführt wurde, kam für die Jatropha Urtinktur wegen der überschaubaren Anzahl von Verbindungen und der durch Gläser (1991) beschriebenen Umlagerung zum Crotonphorbol im alkalischen Milieu nicht in Frage. Eine Quantifizierung der einzelnen Substanzen war hier nicht notwendig, da ein Gesamtgehalt der Phorbolester angestrebt wurde. Durch die starke strukturelle Ähnlichkeit der in *Jatropha curcas* L. enthaltenen 12-Desoxy-16-hydroxyphorbolestern liegen sie im HPLC-Chromatogramm sehr nahe beieinander und sind nur schwer vollständig voneinander zu trennen.

In dem Bereich des Chromatogramms, in dem die Jatrophafakroten zu finden sind, liegen keine anderen Verbindungen, so dass ein Quantifizierung über die Aufsummierung der Peakflächen in einer bestimmten Zeitspanne des Chromatogramms möglich war. Durch das Fehlen von spezifischen Standardsubstanzen für die entsprechenden Jatrophafaktoren im Handel, musste ein Umweg über einen vergleichbaren Standard gewählt werden. Die Quantifizierung erfolgte hierbei als TPA-Äquivalente, da TPA leicht in hoher Reinheit im Handel erhältlich ist und vergleichbare Eigenschaften aufweist. Es eignet sich außerdem gut als interner oder externer Standard, da es zu keiner Überschneidung der Peaks im Chromatogramm mit den Phorbolestern aus *Jatropha curcas* L. kommt. Es wird dabei angenommen, dass die Verbindungen eine sehr ähnliche Absorption bei 280 nm aufweisen, denn eine Bestimmung des genauen Responsefaktors war ohne Standardsubstanzen für die Jatrophafaktoren hier nicht möglich.

Die Trennung erfolgte, wie in der Literatur für die Phorbolester aus *Jatropha curcas* L. beschrieben, durch isokratische Elution mit einem Fließmittelgemisch aus Acetonitril und Wasser. Die genaue Zusammensetzung des Fließmittels musste dafür entsprechend auf unsere Anlage und die verwendete Kinetex Säule hin angepasst werden (Devappa *et al.*, 2013a).

Es entstand das HPLC-System 3, wobei die Phorbolester zwischen 6 und 12 Minuten und der TPA-Standard nach 15 Minuten, als seperate Peaks im Chromatogramm erschienen. Im Gegensatz zu den Diterpenestern aus *Croton tiglium* L. haben diese Verbindungen nur eine äußerst geringe UV-Absorption bei 254 nm, daher werden sie bei der für sie speziefischen Wellenlänge von 280 nm detektiert und selbst da zeigen die Urtinkturen nur eine geringe Absorption für die Phorbolester. Um ein ausreichend starkes Signal zu be-

kommen und dabei gleichzeitig sehr große Injektionsvolumen zu vermeiden, wurden die Proben vor der Injektion in die HPLC aufkonzentriert. Durch das Abdampfen des Lösungsmittel der Urtinktur und dem Lösen des Rückstandes in einem geringeren Volumen an Lösungsmittel wurden hier eine Aufkonzentrierung der Phorbolester erreicht.

3.4.2 Durchführung

Zur Aufkonzentrierung der Proben wurden zunächst 5 mL der Urtinktur am Rotationsverdampfer innerhalb von 5 min bei 40 °C und 100 mbar bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde dann in 500 µL Acetonitril im Ultraschallbad gelöst und durch einen 0,2 µm Spritzenfilter in ein HPLC-Vial überführt. Von der aufkonzentrierten Probe wurden jeweils 10-20 µL in das HPLC-System 3 injiziert und die resultierenden Peakflächen der Phorbolester bei 280 nm zwischen den Retentionszeiten 6 und 12 Minuten aufsummiert.

System 3

Anlage:	Shimadzu HPLC
Säule:	Kinetex XB-C18 + Vorsäule
Fließmittel:	(A) ACN, (B) H_2O
Gradient:	0-15 min 75 % A
	15-16 min auf 100 % A
	16-23 min 100 % A
	23-24 min auf 75 %A
	24-30 min 75 % A
Flussrate:	1 $^{mL}/_{min}$
Injektionsvolumen:	20 µL
Detektion:	UV 280 nm

3.4.3 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurden sieben Verdünnungen der TPA-Stammlösung [2 $^{mg}/_{mL}$] hergestellt, so dass eine Kalibriergerade von 2-20 µg TPA aufgenommen werden konnte. Jede Konzentration wurde zweimal hergestellt und jeweils zweimal in die HPLC injiziert. Die Mittelwerte der für jede Konzentration resultierenden vier Werte für die Peakfläche vom TPA-Peak (280 nm; t_R = 15 min) wurde gegen die Konzentration aufgetragen. Die Standardabweichung der Konzentrationswerte sind als Fehlerbalken in der Kalibriergerade dargestellt. Es konnte ein Linearität zwischen der Peakfläche und der Konzentration für den Arbeitsbereich zwischen 2 und 20 µg nachgewiesen werden.

3.5 Qualitative Untersuchung mittels UHPLC-DAD-CAD-MS/MS

Zur Untersuchung der genauen Zusammensetzung der Urtinkturen wurden sie mithilfe einer UHPLC-Methode aufgetrennt und mittels eines Iontrap-MS-Detektors durch ihre MS/MS-Signale identifiziert. Die komplexen Zusammensetzungen der Urtinkturen aus *Croton tiglium* L. und *Euphorbia cyparissias* L. machten sehr lange Analysezeiten mit einem flach ansteigendem Gradienten notwendig. Bei der Analyse der Croton Urtinktur kam es dabei sogar zu einer Analysenzeit von 200 Minuten pro Lauf, um eine ausreichende Auftrennung der einzelnen Peaks zu gewährleisten.

Das Eluat wurde dann in die ESI-Schnitstelle des Amazon SL Iontrap Massenspektrometers eingeleitet. Die Analyse wurde in einem Scan-Bereich von $^{m}/_{z}$ 70 bis $^{m}/_{z}$ 2200 durchgeführt und die Verbindungen wurden im Positiv- sowie Negativmodus vermessen.

ESI-Einstellungen:

- Zerstäuberdruck: 40 psi
- Trockengasstrom: 9 $^{L}/_{min}$
- Trockengastemperatur: 300 °C
- Kapillarspannung: 4,5 kV

Anschließend wurden die Urtinkturen in dem gleichen HPLC-System 3 durch einen CAD-Detektor (Charged aerosol detection) untersucht.

Diese relativ neue Detektionsmethode wurde erstmals von Dixon & Peterson (2002) eingeführt. Sie ermöglicht eine Detektion von schlecht verdampfbaren Analyten auch wenn sie kein Chromophor besitzen und somit für die Detektion durch klassische Geräte mit UV- oder DAD Detektoren nicht zugänglich sind. Dies ist bei den Diterpenestern von Vorteil, da eine von ihrer schlechten UV-Absorption unabhängige Detektion möglich ist und so in die wirklichen Konzentrationsverhältnisse zu den anderen Inhaltsstoffen durch die Peakflächen im Chromatogramm wiedergespiegelt werden.

Die Trennbedingungen waren bei der CAD-Analyse die gleichen wie bei den UHPLC-DAD-MS/MS-Analysen. Die benötigte Druckluft wurde mit dem DynAirSilent Kompressor (Shanghai Dynamic Industry, China) mit einem Druck von 35 psi für den Detektor bereitgestellt.

3.5.1 Croton Urtinktur

Für die Analyse der Croton Urtinktur war ein sehr langer Gradient mit flach ansteigendem Anteil an organischem Fließmittel notwendig, um eine ausreichende Auftrennung der Verbindungen für eine Identifikation der einzelnen Peaks zu ermöglichen.

Die Identifikation erfolgte danach im Data Analysis Tool von der Compass for amaZon Software durch Zuordnung der entsprechenden Carbonsäuren für die passenden Tochterionen der Phorbolester.

Folgendes HPLC-System 4 wurde für die Analyse verwendet:

System 4	
Anlage:	UHPLC-MS/MS (Warschau)
Säule:	Kinetex XB-C18 1,7 µm + Vorsäule
Fließmittel:	(A) ACN + 0,1 % HCOOH,
	(B) H_2O/ ACN (95/5) + 0,1 % HCOOH
Gradient:	0-10 min 10 % A auf 50 %A
	10-180 min linear auf 100 % A
	180-200 min 100 % A
Flussrate:	3 $^{mL}/_{min}$
Injektionsvolumen:	2 µL
Detektion:	DAD-CAD-MS/MS

3.5.2 Euphorbia Urtinktur

Zur Beschreibung der Euphorbia Urtinktur wurde zuerst versucht, die Urtinktur mit einer DC-Methode aufzutrennen und die Diterpene mithilfe einer Sprühreagenz zu detektieren. Dieser Versuch wurde bald verworfen, da durch die heterogene Zusammensetzung der Urtinktur aus der ganzen Pflanze eine Identifikation der Diterpene so nicht möglich war. Durch eine HPLC-UV-Methode konnte zumindest die Urtinktur soweit aufgetrennt werden, dass die einzelnen Inhaltsstoffe als isolierte Peaks im Chromatogramm zu erkennen waren, doch alleine an der Absorption im UV-Licht konnte ebenfalls keine Aussage über die Identität der einzelnen Verbindungen getroffen werden.

Schließlich wurde die Urtinktur mittels einer UHPLC-Methode aufgetrennt und anhand der MS/MS-Spektren einige von den in der Literatur beschriebenen Ingenolester identifiziert. Die letzte ausführliche Arbeit zu *Euphorbia cyparissas* L. und den enthaltenden Ingenolestern wurde im Zuge der Dissertation von Ott (1978) angefertigt. Dort wurden 14 verschiedene Ingenolester isoliert und als Cyparissiasfaktoren 1-14 beschrieben, wobei nur acht der beschriebenen Ester in ausreichender Konzentration in der Urtinktur zu erwarten waren. Diese Verbindungen galt es in der Urtinktur mittels moderner HPLC-

MS/MS-Methoden anhand ihrer Fragmentierungsmuster zu identifizieren. Bei den zu erwartenden Cyparissiasfaktoren handelt sich um fünf unterschiedliche 13-Hydroxyingenol- und drei 13,19-Dihydroxyingenolderivate. Dabei gibt es eine überschaubare Anzahl von Säurekomponenten, wobei sich die Verbindungen zum Teil nur in der Position der Estergruppen unterscheiden.

Folgendes HPLC-System 5 wurde für die Analyse verwendet:

System 5	
Anlage:	UHPLC-MS/MS (Warschau)
Säule:	Kinetex XB-C18 1,7 µm + Vorsäule
Fließmittel:	(A) ACN + 0,1 % HCOOH,
	(B) H_2O/ ACN (95/5) + 0,1 % HCOOH
Gradient:	0-10 min 10 % A auf 50 % A
	10-100 min linear auf 100 % A
	100-120 min 100 % A
Flussrate:	3 $^{mL}/_{min}$
Injektionsvolumen:	2 µL
Detektion:	DAD-CAD-MS/MS

3.6 Qualitative Untersuchung mittels UHPLC-MS/MS

Für die Spaltprodukte der Phorbolester nach der alkalischen Hydrolyse der Croton Urtinktur und für die Phorbolester aus Jatropha Urtinktur waren die in Warschau aufgenommenen MS/MS-Daten nicht für eine Identifikation ausreichend. Diese Proben wurden zur genaueren Beschreibung noch ein weiteres Mal auf einem sehr empfindlichen HPLC-MS/MS-Gerät in der MS Core Facility des Fachbereichs an der Freien Universität Berlin untersucht.

Die interne Kalibrierung erfolgte über die LockMass LeuEnk $^{m}/_{z}$ 556,2766.

Die Kollisionsenergie für die MS/MS-Messungen betrugen zwischen 15 und 25 eV.

(+)-ESI-Einstellungen:

- Zerstäuberdruck: 6,0 bar
- Trockengasstrom: 650 $^{L}/_{h}$
- Trockengastemperatur: 250 °C
- Kapillarspannung: 3,15 kV

(-)-ESI-Einstellungen:

- Zerstäuberdruck: 6,0 bar
- Trockengasstrom: 600 $^{L}/_{h}$
- Trockengastemperatur: 250 °C
- Kapillarspannung: 2,6 kV

3.6.1 Hydrolyseprodukte aus Croton Urtinktur und TPA

Die aus der Croton Urtinktur und dem TPA-Standard bei der alkalischen Hydrolyse entstandenen Verbindungen wurden im MS/MS untersucht. Es wurde eine Identifikation als Spaltprodukte der Phorbolester durch die spezifischen Tochterionen der Verbindungen erzielt. Die Trennungsbedingungen wurden ausgehend von der Quantifizierungsmethode das UHPLC-System angepasst, so dass eine vollständige Auftrennung der Spaltprodukte erreicht wurde.

System 6

Anlage:	UHPLC-MS/MS (MS Core Facility)
Säule:	ACQUITY UPLC BHE C18 1,7 µm
Fließmittel:	(A) ACN + 0,1 % HCOOH,
	(B) H_2O + 0,1 % HCOOH
Gradient:	0-10 min 5 % A auf 40 % A
	10-11 min linear auf 100 % A
	11-20 min 100 % A
Flussrate:	3 $^{mL}/_{min}$
Injektionsvolumen:	2 µL
Detektion:	UV 254 nm - MS/MS

3.6.2 Jatropha Urtinktur

Die in Jatropha Urtinktur enthaltenen 12-Desoxy-16-hydroxyphorbolester sind relativ schlecht ionisierbar. Um diese sichtbar zu machen, wurde ein hochauflösendes Massenspektrometer aus der MS Core facility des Fachbereichs genutzt. Die Trennung erfolgte wieder über eine vorgeschaltete UHPLC, so dass in kurzen Analysezeiten die Probe vollständig aufgetrennt werden konnte.

Die einzelnen Peaks wurden im Positiv- und Negativmodus gemessen und anschließend noch die MS/MS-Spektren für charakteristische Tochterionen aufgenommen. So konnten die fünf aus der Literatur bekannten Diterpenester identifiziert werden und stehen nun durch ihre charakteristischen Peakmuster einer quantitativen Analyse per UV-Detektion zur Verfügung.

System 7

Anlage:	UHPLC-MS/MS (MS Core Facility)
Säule:	ACQUITY UPLC BHE C18 1,7 µm
Fließmittel:	(A) ACN + 0,1 % HCOOH,
	(B) H_2O + 0,1 % HCOOH
Gradient:	0-10 min 75 % A
	10-11 min linear auf 100 % A
	11-20 min 100 % A
Flussrate:	3 $^{mL}/_{min}$
Injektionsvolumen:	5 µL
Detektion:	UV 280 nm - MS/MS

3.7 Extraktherstellung aus Croton und Jatropha Samen

Es wurden zur Untersuchung der Samendrogen und dem Vergleich mit den Urtinkturen Extrakte durch Mazeration in Methanol hergestellt. Für die Extraktion wurden je 1 g Samenmaterial im Mörser fein zerkleinert und mit 10 mL Methanol extrahiert. Dies ergab eine vergleichbare Konzentration wie bei den nach HAB Vorschrift 4a hergestellten Urtinkturen.

Dazu wurden die zerkleinerten Samen in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen in dem Methanol für etwa 12 Stunden extrahiert und über die Zeit mehrfach geschüttelt. Dann wurde die Mischung für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde 2 Minuten bei 3000 *g* zentrifugiert, um das Samenmaterial abzutrennen. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µL-Spritzenfilter gereinigt und in HPLC-Vials aufgeteilt. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei < 8 °C im Kühlschrank.

3.8 Qualitativer Vergleich von Urtinkturen und Extrakten aus Crotonsamen mittels HPLC-UV

Für den Vergleich der Urtinkturen sowie der Extrakte wurde die UHPLC-Methode von der Analyse der Urtinktur in Warschau auf die Shimadzu Anlage im Institut so angepasst, dass ein ähnlicher, langsam ansteigender Gradient die komplexe Mischung auftrennte und dadurch die Chromatogramme anhand ihrer Muster vergleichbar waren. Mit dieser Methode wurden dann die methanolischen Extrakte aus fünf verschiedenen Samenproben und den vier verschiedenen Urtinkturen verglichen. Die Interpretation erfolgte durch Vergleich der Muster untereinander und der Identifikation einzelner markanter Peaks durch Vergleich mit dem HPLC-MS-Chromatogramm der Croton Urtinktur.

System 8

Anlage:	Shimadzu HPLC
Säule:	Kinetex XB-C18 + Vorsäule
Fließmittel:	(A) ACN, (B) H_2O
Gradient:	0-10 min von 5 % A auf 30 % A
	10-180 min auf 100 % A
	180-190 min 100 % A
	190-191 min auf 5 %A
	191-200 min 5 % A
Flussrate:	1 $^{mL}/_{min}$
Injektionsvolumen:	10 µL
Detektion:	UV 254 nm

3.9 Festphasenextraktion

Festphasenextraktion (solide phase extraction = SPE) stellt eine Trennungsmethode zur Probenvorbereitung dar. Es wird abhängig von der Art der stationären Phase beispielsweise durch Absorption, Verteilung oder Ionenaustausch eine Retention der Analyten aus einer Probe erreicht. Dies wird entweder zum Abtrennen störender Bestandteile oder dem Aufkonzentrieren des gewünschten Stoffes genutzt (Macherey-Nagel, 2013).

Durch positiven oder negativen Druck wird die Probenlösung bzw. das Lösungsmittel auf eine Schicht aus stationärer Phase in den SPE-Kartuschen gegeben. Es kann entweder durch eine aufgesetzte Spritze ein Überdruck erzeugt werden und so das Fließmittel durch die stationäre Phase gepresst werden oder es wird durch das Anlegen eines Unterdrucks an einem SPE Processor das Lösungsmittel durch die Kartusche gesaugt.

Bei der Durchführung der SPE werden vier Phasen unterschieden:

1. Konditionierung
   Um eine reproduzierbare Wechselwirkung des Analyten mit dem Sorbens zu garantieren, wird dieses mit 2-3 Säulenvolumina Methanol, gefolgt von dem Lösungsmittel des Analyten (z.B. Wasser) konditioniert.
2. Probenaufgabe
   Bei einem ungefähren Durchfluss von 3 $^{mL}/_{min}$ wird die Probe aufgegeben.
3. Waschen
   Ein Waschen des Sorbens kann unter Umständen entfallen. Ein Trockensaugen des Sorbens nach dem Waschen ist anzuraten, um die Elution zu verbessern
4. Elution
   Mit einer Elutionsgeschwindigkeit von ca. 1 $^{mL}/_{min}$ wird der Analyt wieder von der Säule gespült.

Mithilfe der Festphasenextraktion sollte wie bei Gläser (1991) beschrieben eine Auftrennung der Croton Urtinktur in unterschiedliche Fraktionen erreicht werden, welche die weitere Analyse der Bestandteile erleichtert. Dafür wurde die Urtinktur über eine SPE Normalphase (SiOH) aufgetrennt. Um eine Bindung an der Normalphase zu erreichen, musste zunächst das wässrig-ethanolische Lösungsmittel der Urtinktur abgedampft und der Rückstand in lipophilen Lösungsmittel gelöst werden. Aus dieser Lösung wurden die Phorbolester auf der Säule adsorbiert und durch die Elution mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln erfolgte eine Auftrennung in zwei Fraktionen. Es wurde einmal mit einer Mischung aus Diethylether/ Petrolether (3/2) die lipophile Fraktion eluiert und anschließend mit Ethylacetat die polare Fraktion von der SPE-Kartusche gewaschen.

Des Weiteren wurde eine Aufarbeitung nach der enzymatischen Hydrolyse mittels SPE

untersucht. Hierbei fanden unterschiedliche Säulenmaterialien Anwendung, um die Hydrolyseprodukte neben den noch nicht umgesetzten Phorbolestern anzureichern.

Im Falle der Jatropha Urtinktur wurde die SPE für eine mögliche Aufkonzentrierung der Phorbolester aus der Urtinktur ausprobiert. Dies sollte durch das Auftragen von einem relativ großen Volumen der Urtinktur auf die SPE-Kartusche und der nachfolgenden Elution in einem geringeren Volumen an organischen Lösungsmittel erreicht werden.

Für die Euphorbia Urtinktur kann eine C18-SPE-Kartusche genutzt werden, um die sehr hydrophilen Hauptbestandteile abzutrennen und so die nachfolgende HPLC-Analyse zu erleichtern.

3.10 Dünnschichtchromatographie

Zu Beginn der Arbeit wurden mithilfe der Dünnschichtchromatographie Vorversuche durchgeführt, in denen die Urtinkturen auf Diterpenester getestet wurden.

Die DC-Glasplatten wurden mit einem Plattenschneider zugeschnitten und die Proben mit einem Auftragegerät als dünne Banden auf die DC-Platten aufgetragen. Die Entwicklung der Platten erfolgte in einer Horizontalkammer mit unterschiedlichen Fließmittelgemischen.

Zum Nachweis der Diterpene wurden die Platten mit Vanillin 2 % in Schwefelsäure besprüht und 5 min auf 100 °C erhitzt. Die Platten wurden davor und danach unter UV/VIS-Beleuchtung in der Kammer ausgewertet und abfotografiert.

3.11 Statistische Verfahren

Es wurden zur Auswertung der Messdaten folgende statistische Verfahren angewendet, wobei die Berechnung mittels Excel 2011 für Mac und dem StatPlus Zusatzprogramm für die Regressionsanalyse durchgeführt wurden.

Lineare Regressionsgerade

$$y = mx + b$$

Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}\sqrt{\sum(y_i - \bar{y})^2}}$$

Steigung

$$m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{N}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}$$

Schnittpunkt mit der Y-Achse

$$b = \frac{\sum y - m\sum x}{N}$$

Mittelwert

$$\overline{x} = \frac{\sum x}{N}$$

Standardabweichung

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N-1}\sum(x_i - \overline{x})^2}$$

Relative Standardabweichung

$$RSD = \frac{SD}{\overline{x}} * 100\,\%$$

Varianz

$$SD^2 = \frac{1}{N-1}\sum(x_i - \overline{x})^2$$

F-Test

Für die Prüfung auf Signifikanz der Regressionsfunktion wurde der F-Test herangezogen. Durch die Berechnung des F-Wertes wird überprüft, ob das Bestimmtheitsmaß nur zufällig oder durch den Zusammenhang mit den Daten entstanden ist.

T-Test

Die Koeffizienten der Regressionsfunktion wurden mit dem T-Test auf Signifikanz geprüft. Die Tests wurden im Zuge der Regressionsanalyse mit Excel durchgeführt.

Residuenanalyse

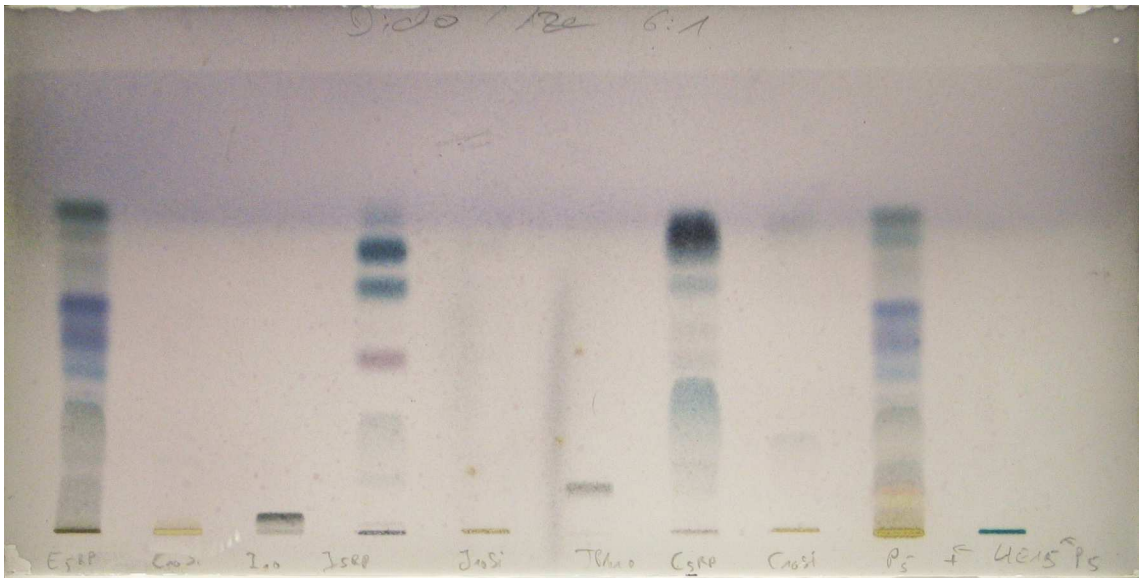
Zur Veranschaulichung der Verteilung der einzelnen Messwerte wurde jeweils die Differenz zum errechneten Wert in einem Residuenplot dargestellt. Sie dient dadurch zur Beurteilung der Güte des linearen Regressionsansatzes.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Dünnschichtchromatographie

Es wurde zu Beginn dieser Arbeit versucht, mittels DC die Urtinkturen aufzutrennen und die Phorbolester daraus zu detektieren.

Zur Beschreibung der Diterpenester aus den Urtinkturen stellte sich die DC als nicht geeignete Methode heraus. Die Verbindungen weisen selbst keine UV-Löschung oder Absorption auf und müssen durch eine relativ unspezifische Sprühreagenz sichtbar gemacht werden. Außerdem ist die Trennleistung der DC bei diesen komplexen Mischungen nicht ausreichend, um eine Aussage treffen zu können.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Abbildung 12: Beispiel eines Dünnschichtchromatogramms von den verschiedenen Urtinkturen nach den SPE Versuchen und von den Standards. Die Detektion erfolgte mit Vanillin 2% in Schwefelsäure und Erhitzen für 5 Minuten bei 100 °C. [1: EUT (SPE-RP18), 2: EUT (SPE-SiOH), 3: Ingenol, 4: JUT (SPE-RP18), 5: JUT (SPE-SiOH), 6: TPA, 7: CUT (SPE-RP18), 8: CUT (SPE-SiOH), 9: EUT, 10: Phorbol]

Für die Detektion der Hydrolyseprodukte und die Interpretation der Hydrolysebedingungen ist die DC nicht geeignet, da es keine gleichzeitige Auftrennung der Phorbolester und Grundalkohole ermöglicht und sie bei der Startlinie hängen bleiben. Generell kann man sagen, dass die DC für die Analyse von Diterpenestern aus den Urtinkturen als nicht ausreichend selektive Methode anzusehen ist und daher nach den Vorversuchen nicht weiter in dieser Arbeit zur Anwendung kam.

4.2 Festphasenextraktion

Croton Urtinktur

Für die Croton Urtinktur wurde versucht eine Auftrennung der Phorbolester in Di- und Triesterfraktionen nach der Methode von Gläser (1991) nachzuvollziehen. Hierbei wurden auch zwei Fraktionen gewonnen, die sich durch eine unterschiedliche Polarität auftrennen ließen. Jedoch kann man diese Fraktionen nicht so einfach als Di- und Triesterfraktion bezeichnen.

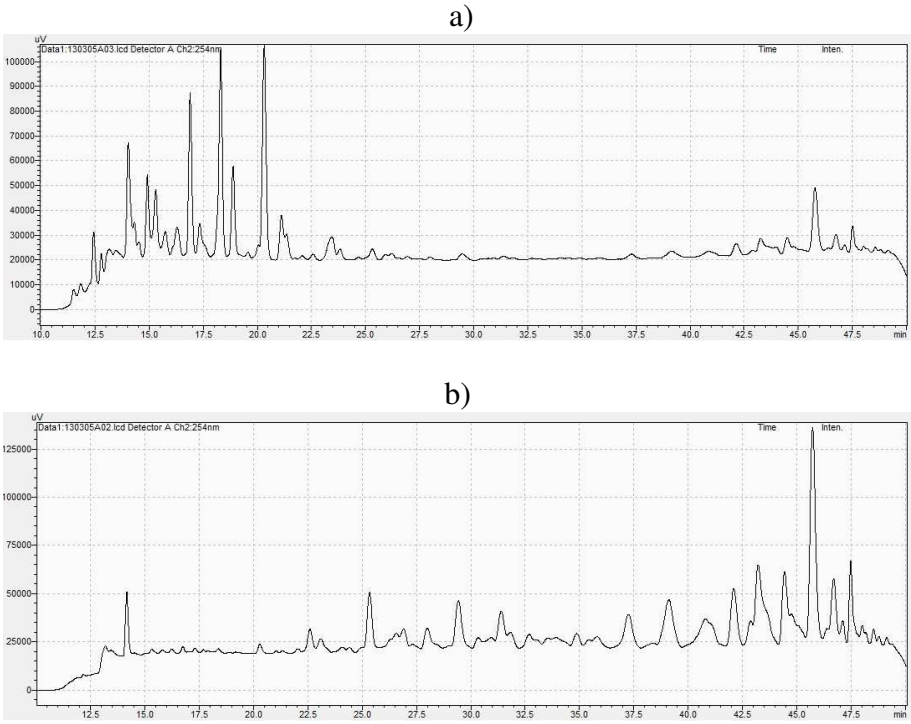


Abbildung 13: Croton Urtinktur nach Auftrennung über eine SPE-Normalphase
a) hydrophiele Fraktion durch Elution mit Ethylacetat
b) lipophiele Fraktion durch Waschung mit Diethylether/ Petrolether 3/2

Wie aus den HPLC-MS-Analysen der Croton Urtinktur im Abschnitt 4.7.1 hervorgeht ist, die Zusammensetzung um einiges komplexer als noch von Gläser (1991) angenommen. So kann durch diese Methode zwar eine Auftrennung in eine lipophile und eine hydrophile Fraktion erreicht werden, doch sind in diesen nicht ausschließlich Di- oder Triester enthalten. Im mittelpolaren Bereich kommt es nämlich zu einer Überschneidung der längerkettigen Diester und den kurzkettigen Triestern, welche eine vergleichbare Lipophilie aufweisen. Außerdem sind die Desoxyphorboldiester durch die fehlende Hydroxylgruppe an der 4-Position auch etwas lipophiler und ebenfalls in diesem Bereich zu finden.

Jatropha Urtinktur

Das Ziel der Probenvorbereitung mittels SPE bei der Jatropha Urtinktur sollte eine Aufkonzentrierung der Phorbolester in den Proben für die HPLC-Analyse sein. Duch den hohen Gehalt an Fetten Ölen in der Urtinktur kam es hier schnell zu einer Sättigung und einer davon gefolgten Trübung des Eluats durch Emulsionsbildung. Durch die Bindung der Fette an das Sorbens wurde auch schnell die Säule zugesetzt, so dass es zu keiner weiteren Anreicherung der Phorbolester kommen konnte und diese schon beim Auftragen durchbrachen. Dadurch kommt es zu einer ungenügenden Wiederfindungsrate und macht diese Methode ungeeignet für eine nachfolgende Quantifiziertung. Da nur wenig andere Inhaltsstoffe in der Jatropha Urtinktur enthalten sind, wurde hier auf eine Aufarbeitung durch SPE verzichtet und die Aufkonzentrierung der Urtinktur wurde durch das Einengen im Vakuum durchgeführt.

Euphorbia Urtinktur

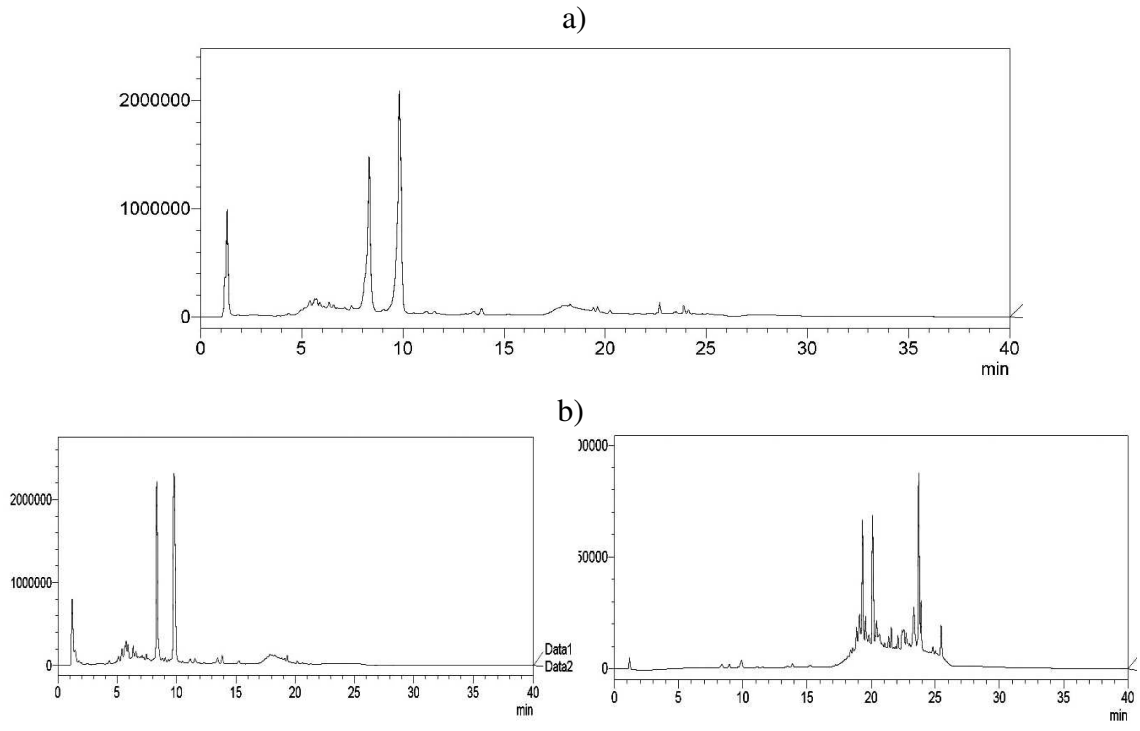


Abbildung 14: a) Chromatogramm der Euphorbia Urtinktur unbehandelt bei 254 nm
b) Chromatogramme nach der Auftrennung über eine RP18-Hydra-SPE-Kartusche. Links ist der hydrophile Teil mit den angetrennten Flavonolen, welche sich nicht auf der Kartusche anreichern. Im rechten Chromatogramm sieht man die lipophile Fraktion nach der Elution in einem geringeren Volumen und die damit verbundenen Aufkonzentrierung.

Eine Abtrennung der sehr polaren Bestandteile wie der in Euphorbia Urtinktur enthaltenen Flavonol-Glucuronide vor der Analyse durch eine SPE-Probenvorbereitung erleich-

terte das Arbeiten mit der Urtinktur. Diese Verbindungen besitzen eine viel größere Absortion im UV-Licht und so überragen ihre Peaks das restliche Chromatogramm. Die Abtrennung der polaren Bestandteile erfolgte in einem einfachen Probenvorbereitungsschritt mit einer C18-Kartusche. Bei den Analysen an der UHPLC-MS wurde aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Gerätes auf eine Aufarbeitung der Probe verzichtet.

Probenvorbereitung nach der Hydrolyse

Ein Problem nach der Durchführung der enzymatischen Hydrolyse im wässrigen Puffersystem war es, die Analyten wieder in eine konzentriertere organische Lösung zu bekommen, um sie in der HPLC zu analysieren. Die deutlich hydrophileren Grundalkohole ließen sich leicht durch eine SPE-Kartusche vom Rest abtrennen und so in eine injizierbare Form bringen. Doch ließ sich so keine Aussage über die nicht umgesetzte Menge an Phorbolestern treffen. Durch die unterschiedliche Polarität der Grundalkohole und der Ester ließen sich nicht beide auf einer Kartusche zusammen anreichern.

Nach der enzymatischen Hydrolyse in wässrigen Pufferlösungen waren durch das Abdampfen des Lösungsmittels die dabei aufkonzentrierten Salze der Puffer ein Problem. Um ein Auskristallisieren des Puffers in dem geringeren Injektionsvolumen zu vermeiden, wurde zunächst nach der Hydrolyse mithilfe eines unspezifischen Kationen- und Anionenaustauschers in Form einer SPE-Kartusche die Probe entsalzt und anschließend das Lösungsmittel abgedampft. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Säulenmaterialien hintereinander machte die Methode durch die ungenügende Wiederfindungsrate für eine nachfolgende Quantifizierung ungeeignet. Deshalb wurde auch hier der Weg über das Abdampfen des wässrigen Lösungsmittels und dem Lösen des Rückstandes in einem geringeren Volumen an Methanol gewählt.

Nach der enzymatischen Hydrolyse in wässrigen Pufferlösungen waren durch das Abdampfen des Lösungsmittels die dabei aufkonzentrierten Salze der Puffer ein Problem. Um ein Auskristallisieren des Puffers in dem geringeren Injektionsvolumen zu vermeiden, wurde zunächst nach der Hydrolyse mithilfe eines unspezifischen Kationen- und Anionenaustauschers in Form einer SPE-Kartusche die Probe entsalzt und anschließend das Lösungsmittel abgedampft. Die Puffersalze konnten so vollständig aus den Proben entfernt werden, so dass nach dem Abdampfen keine Salze mehr auskristallisierten und es somit nach dem Lösen des Rückstandes in Methanol zu keinen Ausfällungen der Salze mehr kommen konnte.

4.3 Enzymatische Hydrolyse von Phorbolestern aus Croton Urtinktur

Der erste Ansatz zu einer schonenden Methode für den Abbau der Diterpenester zur nachfolgenden Quantifizierung war der Einsatz von speziellen Enzymen für die Spaltung der Esterbindungen. Diese Vorgehensweise zur Umsetzung der Phorbolester zu ihrem Grundalkohol schien zu Anfang sehr vielversprechend, da es zu einer Abspaltung der Säurekomponenten aus den Phorbolestern kommen sollte, ohne die Diterpenalkohole weiter zu verändern oder abzubauen. Wegen der schlechten Reproduzierbarkeit und Problemen in der Aufarbeitung der Proben musste der Versuch der enzymatischen Esterhydrolyse für die quantitative Bestimmung der Phorbolester aus Croton Urtinktur nach einiger Zeit wieder verworfen werden.

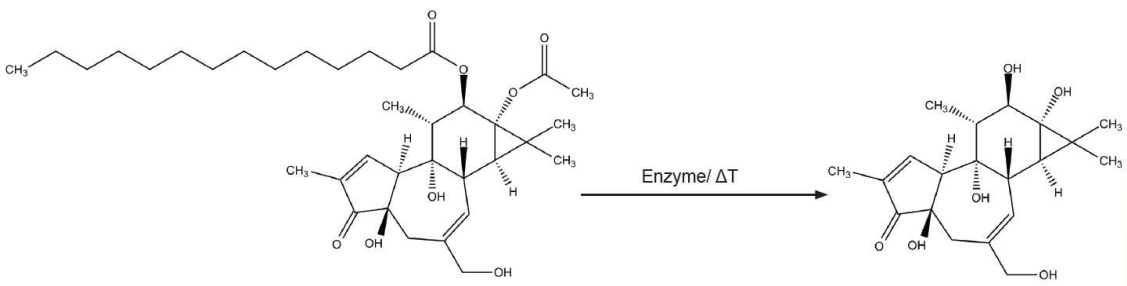


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Reaktion von TPA zu seinem Grundalkohol Phorbol durch die Reaktion mit Enzymen bei dem entsprechenden Temperaturoptimum.

Ein Problem dabei war die sehr heterogene Zusammensetzung der Phorbolester in der Urtinktur mit langen und kurzen Säureketten. Dies macht es schwierig, mit nur einem Enzym alle Ester aufzuspalten, da die speziellen Enzyme immer eine gewisse Substratspezifität aufweisen und vorzugsweise Ester einer bestimmten Kettenlänge spalten. Des Weiteren stellte die Löslichkeit der Phorbolester in wässrigen Puffern ein Problem dar, denn es ist davon auszugehen, dass sie dort nur als Suspension vorliegen und somit nicht gänzlich für die Enzyme zugänglich sind. Durch das Fehlen von entsprechender Literatur zur Anwendung von Enzymen für die Spaltung ähnlicher Verbindungen konnte nur versucht werden, die optimalen Bedingungen für andere Substrate auf unsere Phorbolester zu übertragen.

Ein grundsätzliches Problem bei der Aufarbeitung nach erfolgter Inkubation bestand darin, die Hydrolyseprodukte und die restlichen nicht gespaltenen Phorbolester gemeinsam in eine für die HPLC-Analyse geeignete Lösung zu bringen. Dafür musste der Ansatz in ein organisches Lösungsmittel überführt werden in dem beide Verbindungen, also Ester und Grundalkohole, löslich sind.

Die Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion (SPE) wäre hier naheliegend, da diese besonders geeignet ist, um Analyten aus wässrigen Systemen anzureichern. Jedoch

sind die unterschiedlichen Polaritäten der Phorbolester und ihre Grundalkohole so groß, dass sie nicht gemeinsam auf einem Sorbensmaterial angereichert werden konnten. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Kartuschen hintereinander wäre in diesem Fall eine Möglichkeit, doch durch die geringen Probenvolumina und der dabei schlechten Wiederfindungsrate wurde diese Methode zur Probenaufarbeitung wieder verworfen.

Die hier besser geeignete Methode war das Entfernen des wässrigen Lösungsmittels durch das Abdampfen im Vakuum und dem Lösen des Rückstandes in einem geringen Volumen eines geeigneten organischen Lösungsmittels. Hierdurch entstand jedoch ein weiteres Problem in der Aufkonzentrierung der Puffersalze, die zu einem gewissem Teil auch in dem für die Injektionslösung verwendeten Methanol löslich sind. Dies führte zu einer hohen Konzentration an Puffer in der Injektionslösung, wodurch es häufig zu Ausfällungen kam. Das Abtrennen der Puffersalze durch einen unspezifischen Kationen-Anionen-Austauscher vor dem Abdampfen des wässrigen Lösungsmittel führte schließlich zum gewünschten Ergebnis. Genutzt wurde dafür eine Strata ABW SPE-Kartusche mit einem unspezifischen Ionenaustauscherbett, über den die Probe zum Entsalzen gegeben wurde.

Folgende Enzyme wurden zur Hydrolyse der Phorbolester ausgewählt:

Es wurden zwei Esterasen aus Bacillus-Arten für diese Untersuchung ausgewählt. Beide wurden rekombinant in *E. coli* hergestellt. Ursprünglich stammen diese Enzyme aus zwei Bakterienstämmen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus stearothermophilus.*

Eine weitere Esterase aus der Schweineleber wurde eingesetzt. Im Gegensatz zu den anderen Esterasen wurde die Schweinsleberesterase nicht rekombinant hergestellt, sondern durch Extraktion direkt aus Schweinelebern und anschließender Aufreinigung gewonnen.

Die darüber hinaus ausgewählte Pektinase ist ein Enzym der Familie der Glykosidasen und führt zur zufälligen hydrolytischen Spaltung von 1,4-α-D-galaktosiduronischen Bindungen im Pektin. Es wurde davon ausgegangen, dass die Pektinas auch die Ester der Diterpene angreift und es so zu einer Spaltung kommt. Es erfolgte durch die Pektinase zwar ein gewisser Abbau, aber es konnte kein Grundalkohol gefunden werden. Die Pektinase aus *Aspergillus niger* wurde ebenfalls rekombinant in *E. coli* hergestellt.

Lipasen sind Enzyme, die Fettsäureester in Triglyceriden spalten und kamen deshalb auch hier als Enzyme zur Spaltung der Phorbolester in Frage. Hidayat *et al.* (2013) haben für *Jatropha curcas* L. eine Methode zur Detoxifizierung beschrieben, bei der durch eine Lipase aus Reiskleie die Phorbolester gespalten werden. Eine im Handel erhältliche Lipase ist die Lipase B aus *Candida antarctica*, welche für diesen Versuch ausgewählt wurde. Die Lipase wurde rekombinant in *Aspergillus oryzae* hergestellt und kam in immobilisierter Form auf Immobead 150 Pellets.

Es wurde weiterhin ein Enzympräparat aus Rattenlebern verwendet, welches der Überstand nach Zentrifugation bei 9000 g ist (S9). Dies enthält vor allem Enzyme aus der

Cytochrom-P450 Familie, wovon einige auch in der Lage sind, Ester zu spalten. Doch ist dies nicht die einzige Funktion der Enzyme und so kommt es bei der Inkubation der Phorbolester auch zu einem nicht genauer definierten weiteren Abbau der Verbindungen. Es entsteht so eine nicht zu quantifizierende Mischung aus unbekannten Reaktionsprodukten. Der „Postmitochondrial Supernatant“ (S9) aus Rattenleber kam als mit Acrolor stabilisiertes Lyophilisat. Es wurde wie beschrieben in Puffer rekonstituiert und dann zwischen den Analysen bei -20 °C gelagert.

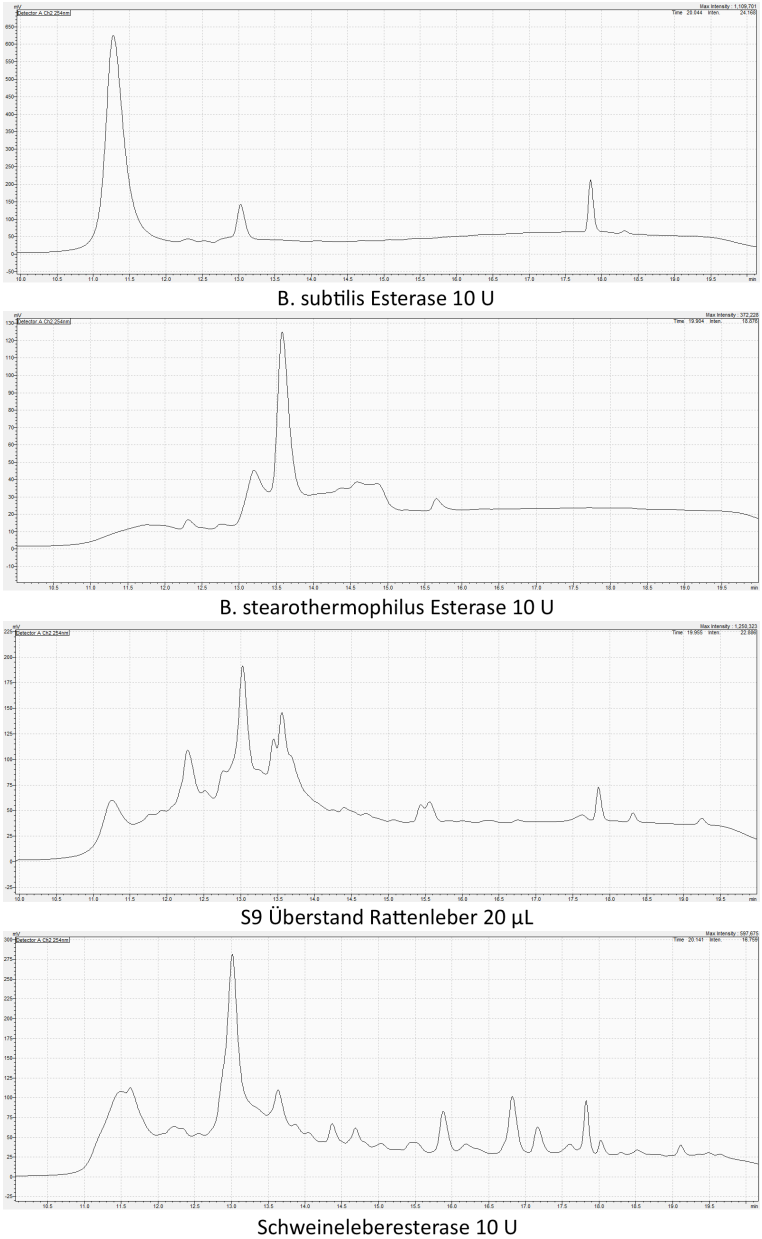
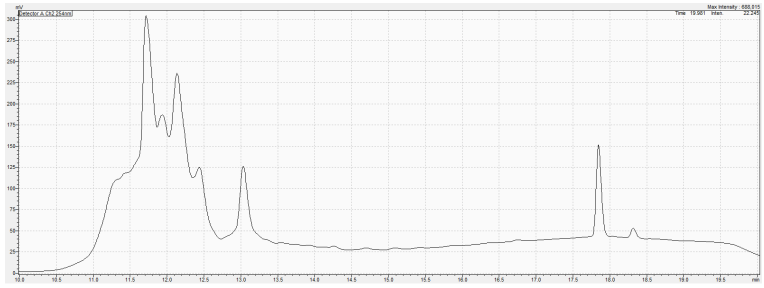
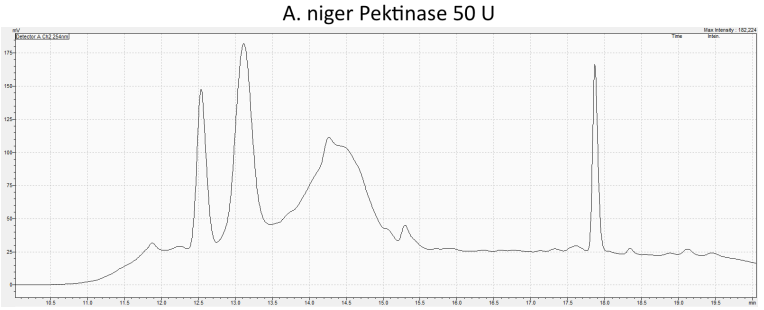


Abbildung 16: Übersicht der recht unterschiedlichen Ergebnisse der enzymatische Hydrolyse von jeweils 5 µg TPA durch unterschiedliche Enzyme. Es wurde die jeweils angegebene Menge des Enzyms im Puffer mit dem für das Enzym optimalen pH-Wert und der optimalen Temperatur für 20 Stunden mit dem Substrat inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie Abschnitt 3.2 im Methodenteil beschrieben.

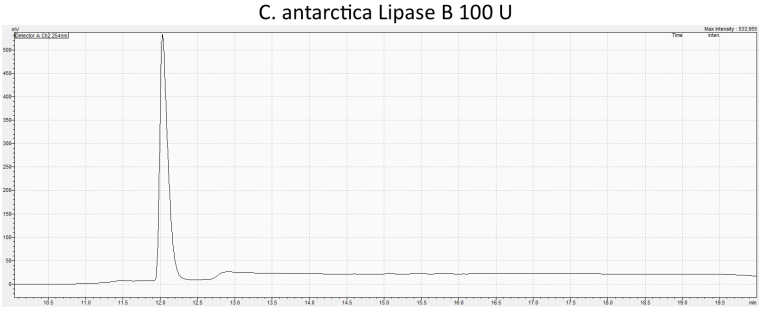
Aus den Chromatogrammen in Abb. 16 und 17 wird deutlich, dass durch die Enzyme keine vergleichbare Hydrolyse zu definierten Spaltprodukten stattfindet. Anstatt der erwarteten Grundalkohole entstanden häufig Gemische aus nicht durch die Standards zu identifizierenden Produkten. Außerdem kommt es selbst bei einer Inkubation über 24 Stunden in den seltensten Fällen zum vollständigen Abbau des Substrats und es bleibt ein Peak auf der Höhe des TPA-Standards bestehen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei der Umsetzung der Croton Urtinktur als Substrat eine deutliche Reduktion der Phorbolester im unpolaren Bereich des Chromatogramms stattfindet.



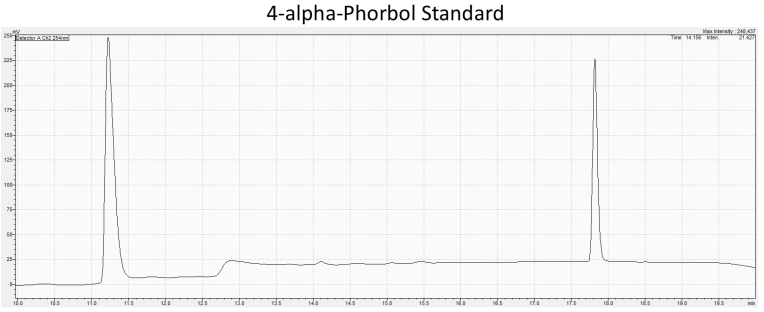
A. niger Pektinase 50 U



C. antarctica Lipase B 100 U



4-alpha-Phorbol Standard



Phorbol und TPA Standard

Abbildung 17: Weitere Chromatogramme nach der enzymatischen Hydrolyse und die von den unbehandelten Standardsubstanzen in dem im Abschnitt 3.2 beschriebenen HPLC-System 1. Es wurde durch Vergleich der Peaks bei den entsprechenden Retentionszeiten überprüft, ob sich TPA abgebaut oder der Grundalkohol bzw. sein Epimer enstanden war.

Am aussichtsreichsten für die enzymatische Spaltung der Phorbolester war noch die Hydrolyse mit *Bacillus subtilis* Esterase unter optimalen Bedingungen mit einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 8 im Tris-Puffer unter Zusatz von 2 $^{mmol}/_{L}$ Calciumchlorid (Kaiser *et al.*, 2006; Wiggers *et al.*, 2009).

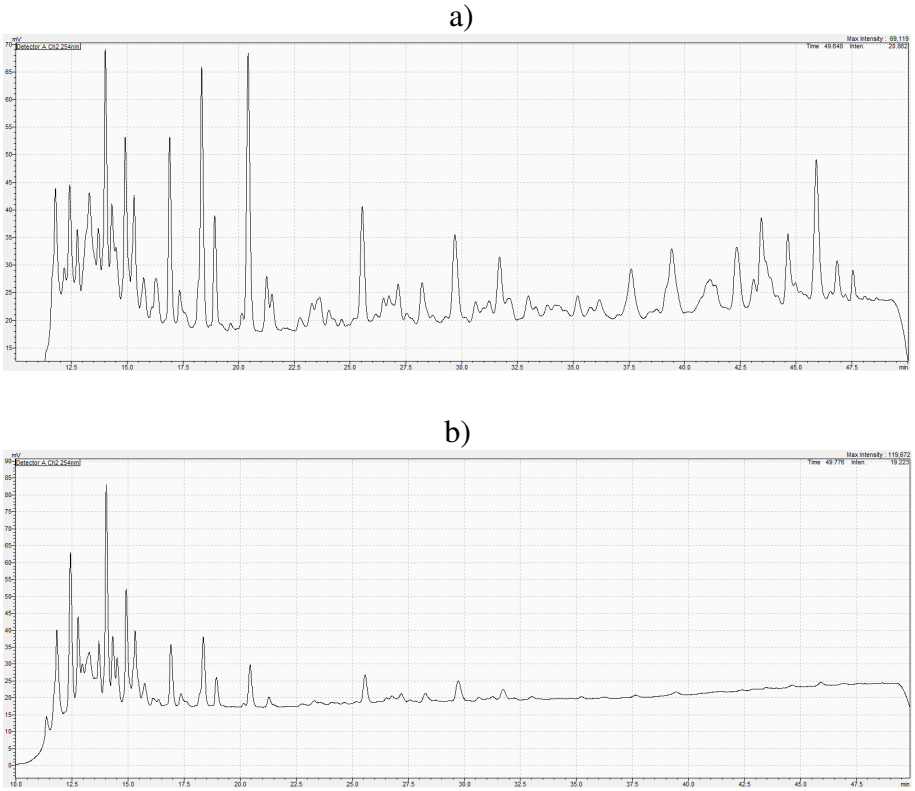


Abbildung 18: Croton Urtinktur vor und nach der enzymatischen Hydrolyse nach der Methode aus Abschnitt 3.2 mit *B. subtilis* Esterase 10 U; 24 h; Tris-Puffer pH 8; 37 °C
Das Chromatogramm a) zeigt die unbehandelte Croton Urtinktur.
Das Chromatogramm b) zeigt die Urtinktur nach der Inkubation mit *B. subtilis* Esterase.

In Abb. 18 zeigt das obere der beiden Chromatogramme die Croton Urtinktur im Normalzustand vor der Hydrolyse und darunter sieht man den Zustand nach der Hydrolyse für 24 Stunden mit 10 Units der *Bacillus subtilis* Esterase in Tris-Puffer pH 8 bei 37 °C. Es wird deutlich, dass es zu einer starken Reduktion der Phorbolester im lipophilen Bereich des Chromatogramms ab einer Retentionszeit von 20 Minuten kommt. Ab einer Retentionszeit von 30 Minuten erfolgt eine nahezu vollständige Hydrolyse.

Es ist davon auszugehen, dass die dort befindlichen langkettigen Säurekomponenten leichter gespalten werden als die kürzeren im hydrophilen, vorderen Bereich. Außerdem werden zuerst die Triester gespalten, was wiederum an der besseren Zugänglichkeit der Ester an der Hydroxylgruppe in Position 20 des Phorbols liegen kann. Es ist dabei jedoch keine deutliche Zunahme der Peaks auf Höhe der Grundalkohole bei einer Retentionszeit zwischen 10 und 12 Minuten zu beobachten. Deshalb ist davon auszugehen, dass die bei der

Spaltung entstandenen Grundalkohole sofort weiter abgebaut wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Grundproblem der enzymatischen Hydrolyse von Diterpenestern mit sehr unterschiedlichen Kettenlängen ist, dass die Enzyme häufig eine Substratspezifität aufweisen und bevorzugt nur Ester von bestimmten Kettenlängen spalten. Bei der heterogenen Zusammensetzung der Croton Urtinktur mit Kettenlängen der Säurekomponenten von 2 bis 18 Kohlenstoffatomen wird der gleiche Angriff an allen Estergruppen durch ein Enzym recht unrealistisch. Es wäre also ein Enzymgemisch notwendig, das alle Estergruppen gleichmäßig spalten kann.

Eine weitere Problematik ergab sich aus der schlechten Löslichkeit der Phorbolester im wässrigen Puffer-System und der Instabilität der Enzyme in organischen Lösungsmitteln. Es ist also davon auszugehen, dass die Phorbolester im wässrigen Puffersystem nur als Suspension vorliegen und dadurch den Enzymen nicht vollständig zur Verfügung stehen. Daraus ergab sich der Ansatz, die Hydrolyse im organischen Medium durchzuführen und die Enzyme durch Immobilisation zu schützen. Die Immobilisierung der Esterasen aus *Bacillus subtilis* und *B. stearothemophilus* erfolgte nach Persson & Bornscheuer (2003) mit Celite. Außerdem wurde eine bereits immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* verwendet (Juhl *et al.*, 2010; Idris & Bukhari, 2012). Es wurden unterschiedliche organische Lösungsmittel wie Methyl-tert-butylether, Methanol, Ethanol und Acetonitril als Reaktionslösung ausprobiert. Durch die Immobilisierung konnte aber keine Verbesserung der Substratumsetzung erreicht werden.

Aufgrund von sehr schlecht reproduzierbaren Ergebnissen in den Versuchen der enzymatischen Hydrolyse wurde dieser Ansatz wieder verworfen und es wurde anstatt der enzymatischen Hydrolyse eine alkalische Spaltung der Ester für die anschließende Quantifizierung gewählt.

4.4 Alkalische Hydrolyse von Phorbolestern aus Croton Urtinktur

Nachdem die enzymatische Hydrolyse als geeignete Methode zur schonenden Spaltung der Ester nicht zum gewünschten Ergebnis führte, musste eine alternative Methode gefunden werden. Dafür wurde zunächst versucht, die bereits in der Literatur beschriebene Methode der Hydrolyse mit Natriummethanolat und der Quantifizierung des resultierenden Phorbols auszuprobieren und mit modernen Methoden nachzuvollziehen. Jedoch erfolgte bei der alkalischen Hydrolyse in der Wärme eine fast vollständige Epimerisierung der OH-Gruppe an der Position 4 zum 4-α-Phorbol, so dass eine Quantifizierung wie von Gläser (1991) beschrieben nach erfolgter Hydrolyse nur über Phorbol nicht möglich ist. Außerdem spricht gegen seine einfache Methode, bei der nur das entstandene Phorbol bestimmt wird, dass die Spaltprodukte der Desoxyphorbolester dabei nicht mitbestimmt werden.

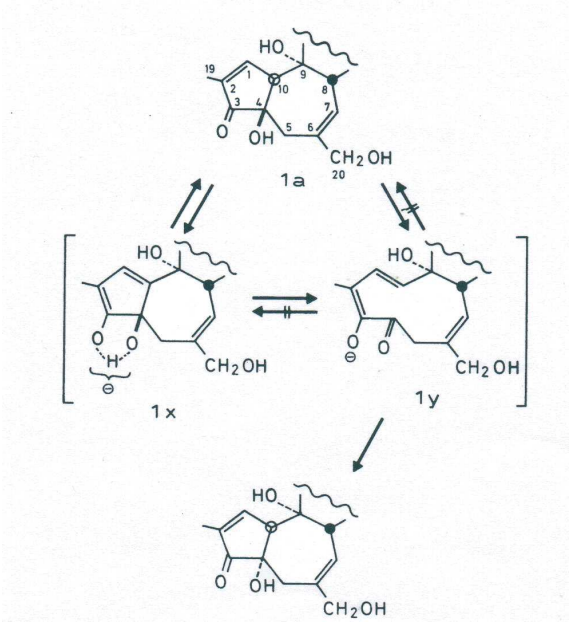


Abbildung 19: Reaktionsmechanismus der Epimerisierung von Phorbol zu 4-α-Phorbol (Hecker & Schmidt, 1974).

Die von Gläser (1991) beschriebene Hydrolyse bei Raumtemperatur ergab zwar weniger 4-α-Phorbol, jedoch kam es dabei auch zu keiner vollständigen Hydrolyse der Phorbolester. Daher wurde die Methode so optimiert, dass eine nahezu vollständige Hydrolyse erfolgt und die dabei entstehenden Verbindungen über die Summe der Peakflächen quantifiziert werden. Dafür musste zunächst untersucht werden, was bei der Hydrolyse mit Natriummethanolat aus den Phorbolestern entsteht.

Von den zur alkalischen Esterhydrolyse unterschiedlichen getesteten Reagenzien eignete sich Natriummethanolt-Lösung am besten, um die Ester vollständig und reproduzierbar

zu hydrolysieren. Die gleichen Ergebnisse zeigten bereits die Untersuchungen von Gläser (1991), wogegen aber bei unseren Versuchen nach der Umsetzung ein anderes Peakmuster beobachtet werden konnte. Jedoch kann dies auch an der damals angewendeten Aufarbeitung mit SPE und der Analyse über HPLC-Normalphasen liegen. Diese Methode ist nach heutigem Standpunkt als veraltet anzusehen und möglicherweise wurden deshalb nicht alle Peaks erkannt.

Bei der Hydrolyse mit Bariumhydroxid war die Epimerisierung an der Position 4 noch stärker, so dass schon nach kurzer Zeit fast ausschließlich das 4-α-Phorbol vorlag. Gegen eine Durchführung der Hydrolyse mit Bariumhydroxid sprach die relativ schlechte Löslichkeit in Methanol, so dass die Lösungen wenig stabil waren und immer an der Löslichkeitsgrenze gearbeitet werden musste. Hinzu kommt die Entsorgungsproblematik und eine gewisse Toxizität bei der Verwendung von löslichen Bariumverbindungen, welche es zu vermeiden galt, um die Praktikabilität der Methode zu gewährleisten.

Es wurden noch andere, weniger stark basische Reagenzien wie Kaliumcarbonat und Natriumhydroxid zur Hydrolyse getestet, doch kam es dabei meist nicht zur vollständigen Hydrolyse der Ester. Außerdem wurde noch die bei Ott (1978) beschriebene Methode der reduktiven Esterhydrolyse von Ingenolestern mit Lithiumaluminiumhydrid an den Phorbolestern getestet. Durch die kaum zu kontrollierende Reaktion und die daraus resultierenden unzufrieden stellenden Ergebnisse wurde diese Methode nicht weitergeführt.

Die Hydrolyse mit Natriummethanolat war die am besten reproduzierbare Methode, die auch zur vollständigen Spaltung der Phorbolester führte und daher für die Quantifizierung ausgewählt wurde. Es musste also noch gezeigt werden, dass alle Peaks in dem Bereich der Grundalkohole als Spaltprodukte der Phorbolester anzusehen sind und damit zur Quantifizierung aufsummiert werden können. Dies erfolgte durch Untersuchung der Proben mithilfe der Massenspektrometrie.

4.4.1 Qualitative Untersuchung der Hydrolyseprodukte mittels UHPLC-MS/MS

Zur Identifikation der Hydrolyseprodukte wurde eine Probe von Croton Urtinktur hydrolysiert und anschließend am UHPLC-MS/MS in der MS Core facility des Fachbereichs untersucht. Verglichen wurden die Daten mit den auf der UHPLC-MS/MS Anlage in Warschau gewonnenen Daten.

Es wurden bei unseren Untersuchungen zusätzlich zu den erwarteten Grundalkoholen und ihren Epimeren noch zwei weitere Peaks nach der Hydrolyse mit Natriummethanolat gefunden, die nicht von Gläser (1991) beschrieben wurden. Hierbei handelt es sich um Verbindungen, die eine um $^{m}/_{z}$ 14 höhere Masse haben und als Produkte aus der Hydrolyse mit Natriummethanolat hervorgehen.

Es ist also davon auszugehen, dass es während der Hydrolyse in der Wärme auch zu einer Substitution einer OH-Gruppe durch das Methanolat kommt und hier somit die entsprechenden in Abb. 20 dargestellten Methylether zu finden sind. Um dies zu belegen wurde versucht, durch einen Austausch der Base die Substitution zu eine Richtung zu steuern. Dabei erhielt man bei Bariumhydroxid kein Substitutionsprodukt und bei der Umsetzung mit Natriumethanolat eine um die Masse von $^{m}/_{z}$ 28 höher liegenden Verbindungen, die dem Ethylether entspricht.

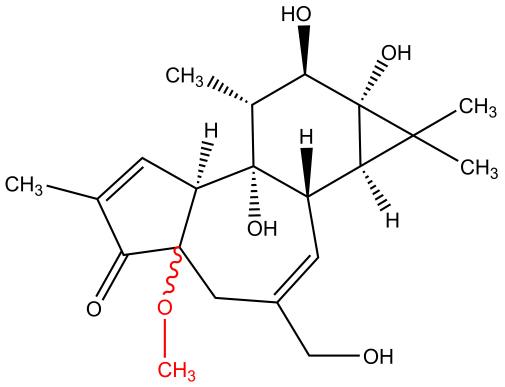


Abbildung 20: Die mögliche Strukturformel von Phorbolmethylether, der als Substitutionsprodukt bei der Hydrolyse mit Natriummethanolt auftritt. Die Methoxy-Gruppe ist hier rot hervorgehoben und Orientierung kann dabei in beide Richtungen erfolgen, denn es wurden im LCMS zwei entsprechende Signale gefunden. Mit einer Masse von $^{m}/_{z}$ 378 liegt diese um 14 höher als die des Phorbols, was der zusätzlichen CH_2-Gruppe entspricht.

Es wurden neun Verbindungen als Produkte der Hydrolyse der Phorbolester aus Croton Urtinktur identifiziert. Dabei handelt es sich um Produkte der Grundalkohole Phorbol und Desoxyphorbol, denn bei allen sind noch die charakteristischen Fragmente zu finden.

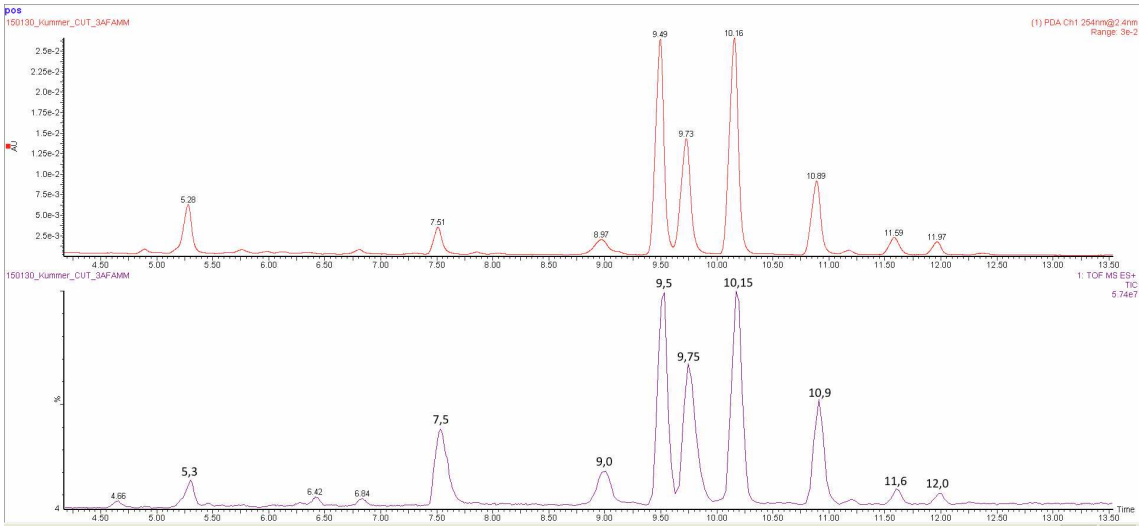


Abbildung 21: UV-Chromatogramm bei 254 nm (oben) und TIC (unten) von Croton Urtinktur nach der Hydrolyse mit Natriummethanolat [0,1 $^{mol}/_{L}$]; 3 h bei 45 °C. Die Zuordnung der Peaks ist in Tab. 3 dargestellt.

Bei der MS/MS-Analyse konnten die durch die Hydrolyse entstandenen Verbindungen eindeutig anhand ihrer Spektren den Grundalkoholen Phorbol sowie Desoxyphorbol zugeordnet werden. Außerdem wurden die Epimere und Substitutionsprodukte der Diterpenalkohole den Peaks zugeordnet. Zwei weitere Peaks konnten als Spaltprodukte der Grundalkohole identifiziert werden, welche unter der Abspaltung von Wasser aus dem Molekül entstehen. Daraus resultiert die in Tab. 3 dargestellte Zuordnung der Hydrolyseprodukte aus dem Chromatogramm in Abb. 21.

Tabelle 3: Übersicht über die Hydrolyseprodukte aus Croton Urtinktur nach der Umsetzung mit Natriummethanolat entsprechend dem Chromatogramm in Abb. 21.

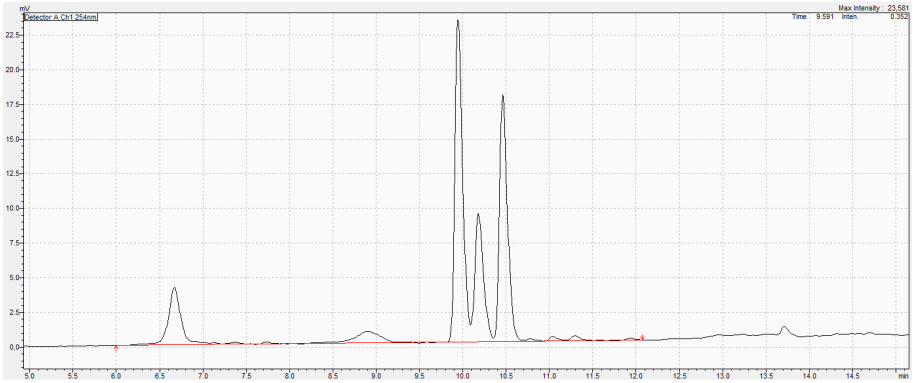
MS-Ionen der Hydrolyseprodukte	t_R [min]	M[$^m/_z$]
Phorbol - 2 H_2O + H^+	5,3	329
Phorbolmethylether - 2 H_2O + H^+	7,5	343
Phorbol + H^+	9,0	365
4α-Phorbol + Na^+	9,5	387
Phorbolmethylether + Na^+	9,75	401
4α-Phorbolmethylether + $NH_4{}^+$	10,15	396
4-Desoxy-4α-phorbol - 2 H_2O + H^+	10,9	313
4-Desoxy-4α-phorbol - H_2O + H^+	11,6	331
4-Desoxy-4α-phorbol + Na^+	12,0	371

Bei der Hydrolyse der Phorbolester kommt es zu einer Epimerisierung zum 4α-Phorbol und zur Substitution einer Hydroxylgruppe zum Phorbolmethylether. Dies muss an der 4-Position geschehen, da es kein entsprechendes Produkt aus den 4-Desoxyphorbolestern gibt. Des Weiteren kommt es noch zu weiteren Produkten durch die Abspaltung von ein oder zwei Wassermolekülen.

4.5 Quantitative Bestimmung von Phorbolestern aus Croton Urtinktur

Eine Quantifizierung der Phorbolester aus Croton Urtinktur kann nicht direkt erfolgen, da es sich hier um eine Vielzahl von verschiedenen Phorbolesterderivaten mit unterschiedlichen Polaritäten handelt. Deshalb sind die Verbindungen über das gesamte Chromatogramm verteilt und nicht wie bei der Jatropha Urtinktur in einem klar abzugrenzenden Bereich zu finden. Durch die vorher durchgeführte Hydrolyse der Ester reduziert sich die Anzahl der zu quantifizierenden Peaks aus der Urtinktur enorm. Es wurde jedoch nicht erreicht, dass nach der Spaltung ausschließlich die entsprechenden Grundalkohole wie bei Gläser (1991) beschrieben vorliegen.

a)



b)

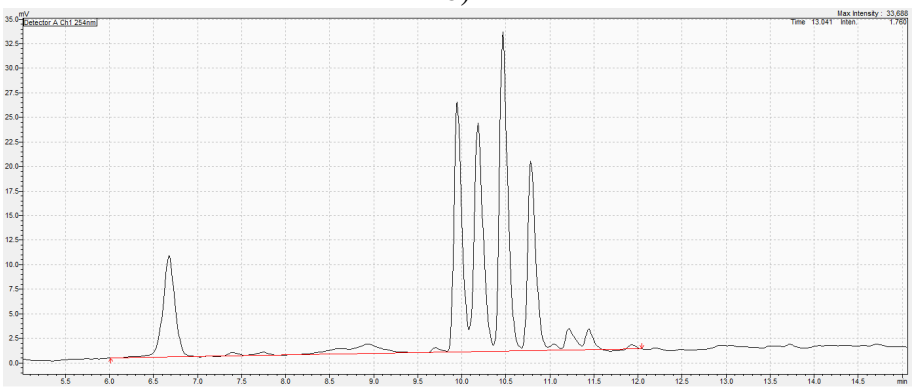


Abbildung 22: TPA und Croton Extrakt nach der alkalischen Hydrolyse mit Natriummethanolat nach der Methode aus Abschnitt 3.3, wobei die Summe der Peakflächen zwischen der Retentionszeit von 6 und 12 Minuten für die Quantifizierung als TPA-Äquivalente genutzt wurden.

Es liegt nach der Behandlung mit Natriummethanolat in der Wärme ein Gemisch aus Hydrolyseprodukten vor, deren Peaks in einem klar definierten Bereich des Chromatogramms zusammen auftreten und für die Quantifizierung zusammengezählt werden. Mithilfe von Standardsubstanzen und der HPLC-MS/MS-Analyse konnte gezeigt werden,

dass die resultierenden Peaks alle als Produkte der Hydrolyse entstehen und dadurch für die Quantifizierung gemeinsam herangezogen werden können.

4.5.1 Validierung

Die Behandlung der Standardsubstanz TPA unter den gleichen Hydrolysebedingungen für die Kalibrierung und die Erstellung einer Regressionsgeraden über die Summer der Peakflächen der Spaltprodukte bezieht dadurch gleich den Prozess der Hydrolyse mit in die Validierung ein. Da es in dieser Arbeit um die Entwicklung einer Methode geht, welche als Konventionsmethode nicht den Anspruch auf einen wahren Gehalt erhebt, wurden für die Validierung nicht alle nach ICH (2005) vorgeschriebenen Parameter bestimmt.

Es wurden die optimalen Temperatur- und Zeitverhältnisse für die Hydrolysebedingungen ermittelt, wobei sich ein Optimum bei 45°C und 3 Stunden ergab. Bei diesen werten konnte eine maximale Umsetzung zu den Hydrolyseprodukten erreicht werden. Bei längeren Zeiten oder höheren Temperaturen kam es wiederum zum Abbau der entstandenen Grundalkohole. Für die eingesetzte Menge der Urtinktur konnte auch ein linearer Zusammenhang mit den resultierenden Peakflächen über einen Bereich von 10 bis 80 µL Urtinktur für ein Ansatzvolumen von 200 µL gezeigt werden.

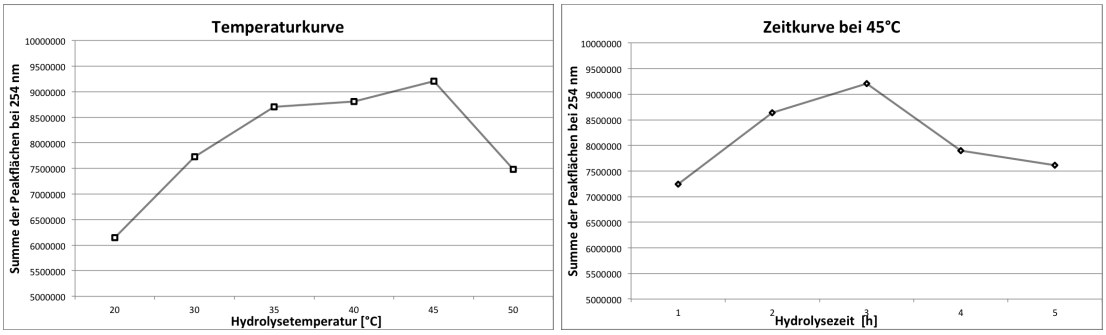


Abbildung 23: Temperatur- und Zeitkurve für die Hydrolyse von Croton Urtinktur mit Natriummethanolat nach der im Abschnitt 3.3 beschrieben Methode, wobei die Summe der Peakflächen von den Hydrolyseprodukten bei 254 nm gegen die Zeit bzw. Temperatur aufgetragen wurde. Die Temperaturkurve wurde bei einer konstanten Reaktionszeit von 3 Stunden aufgenommen und die Zeitkurve dann bei einer konstanten Temperatur von 45°C.

Linearität

Linearität wurde durch die Aufnahme einer Regressionsgeraden über sechs Konzentrationswerten, die den Arbeitsbereich definieren, nachgewiesen. Jeder Konzentrationswert wurde durch doppelte Hydrolyse und anschließender doppelter Injektion in die HPLC erhalten. Sie setzen sich also aus 4 Einzelwerten und jeweils aus der Summe der Peakflächen der Hydrolyseprodukte von TPA zusammen. Die Standardabweichung der Einzelwerte wurde in der Kalibriergerade als Fehlerbalken dargestellt.

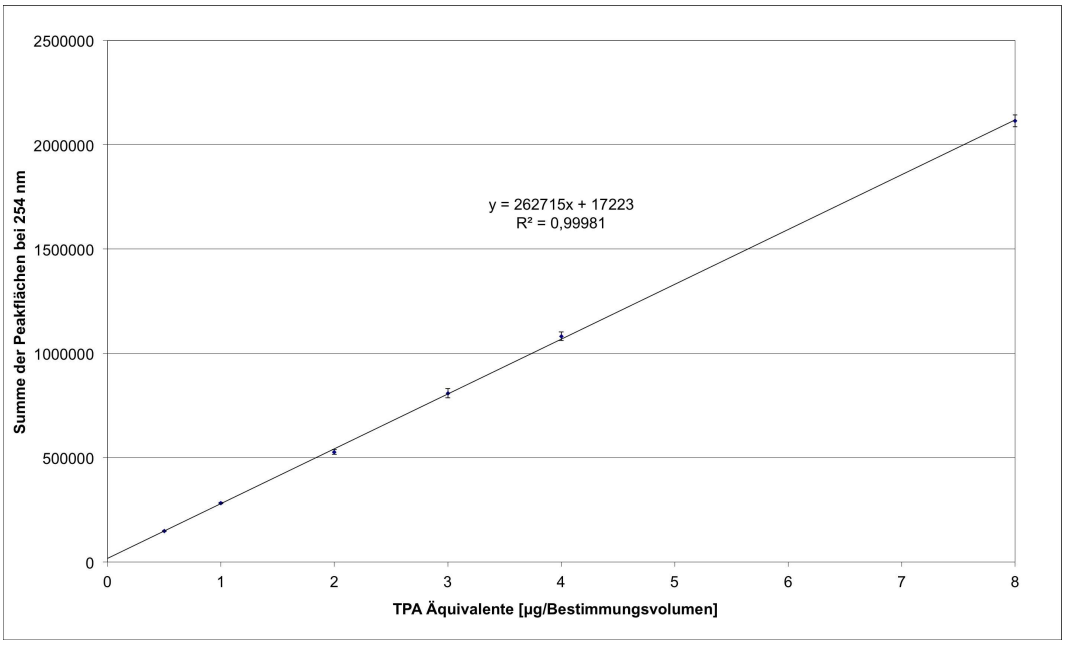


Abbildung 24: Kalibriergerade für die Quantifizierung der Phorbolester aus Croton Urtinktur über den TPA-Standard nach der alkalischen Hydrolyse; 3 h bei 45 °C mit Natriummethanolat [0,1 $^{mol}/_{L}$] detektiert bei 254 nm; n = 4; $\overline{x} \pm$ SD.

Kalibrierfunktion:

$$y = 262715x + 17223$$

Korrelationskoeffizient:

$$r = 0,9996$$

Präzision

Präzision wurde durch die wiederholte Hydrolyse und Vermessung einer Standardkonzentration bestimmt. Dafür wurde eine TPA-Standard von 40 µg fünfmal hydrolisiert und anschließend jeweils doppelt in der HPLC vermessen. Die daraus resultierenden zehn Werte wurden anhand ihrer relativen Standardabweichung bewertet.

Tabelle 4: Messwerte zur Beurteilung der Präzision von der TPA-Hydrolyse wurden durch fünf wiederholte Hydrolysen und jeweils doppelter Injektion einem Aliquot von 40 µg TPA gewonnen.

n	Summe der Peakflächen
1	519135
2	517079
3	540561
4	532034
5	553713
6	513502
7	494208
8	520483
9	499082
10	482922
$\overline{x}$	517271,9
RSD	4,16 %

Genauigkeit

Genauigkeit wurde über das Spiken von 20 µL Croton Urtinktur mit 30 und 40 µg TPA-Standard vor der Hydrolyse bestimmt. Daraus resultierte ein linearer Anstieg im Gesamtgehalt durch die Zugabe von TPA. Die Zunahme der Gesamtfläche entsprach der Summe der Peakflächen der zugesetzten Menge an TPA.

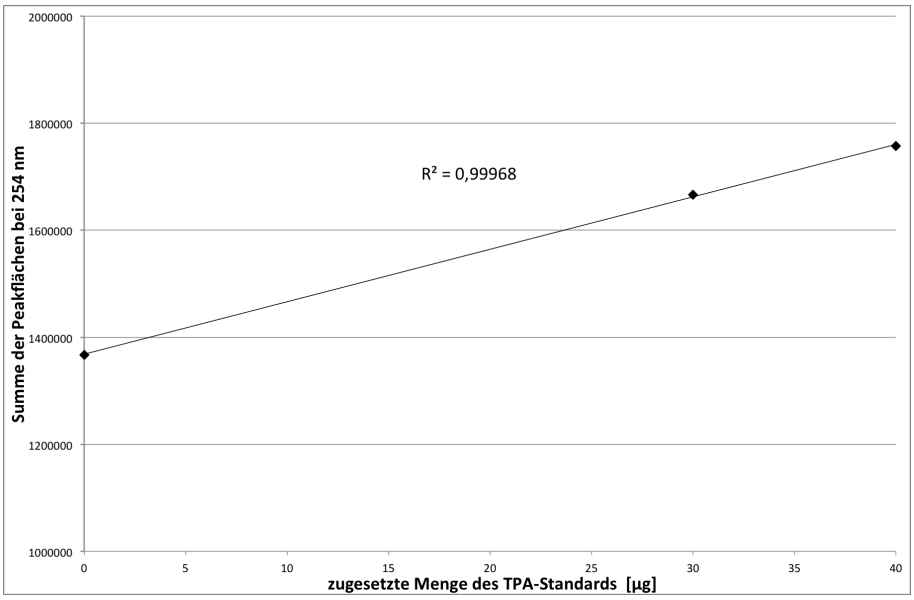


Abbildung 25: Zunahme der Peakflächen durch das Spiken von 20 µL Croton Urtinktur mit 30 und 40 µg TPA-Standard vor der Hydrolyse nach der Methode aus Abschnitt 3.3. Die lineare Zunahme der Peakflächen entspricht der zugesetzten Menge an Standard.

Selektivität

Es wurde gezeigt, dass bei der Injektion von nicht hydrolisiertem TPA bzw. Urtinktur keine relevanten Signale auf der Höhe der Hydrolyseprodukte zu finden waren. In der Croton Urtinktur war ein sehr kleiner Phorbol-Peak zu sehen, doch machte dieser nur $< 1\,\%$ der später in der hydrolysierten Urtinktur bestimmten Gesamtfläche aus und war daher zu vernachlässigen.

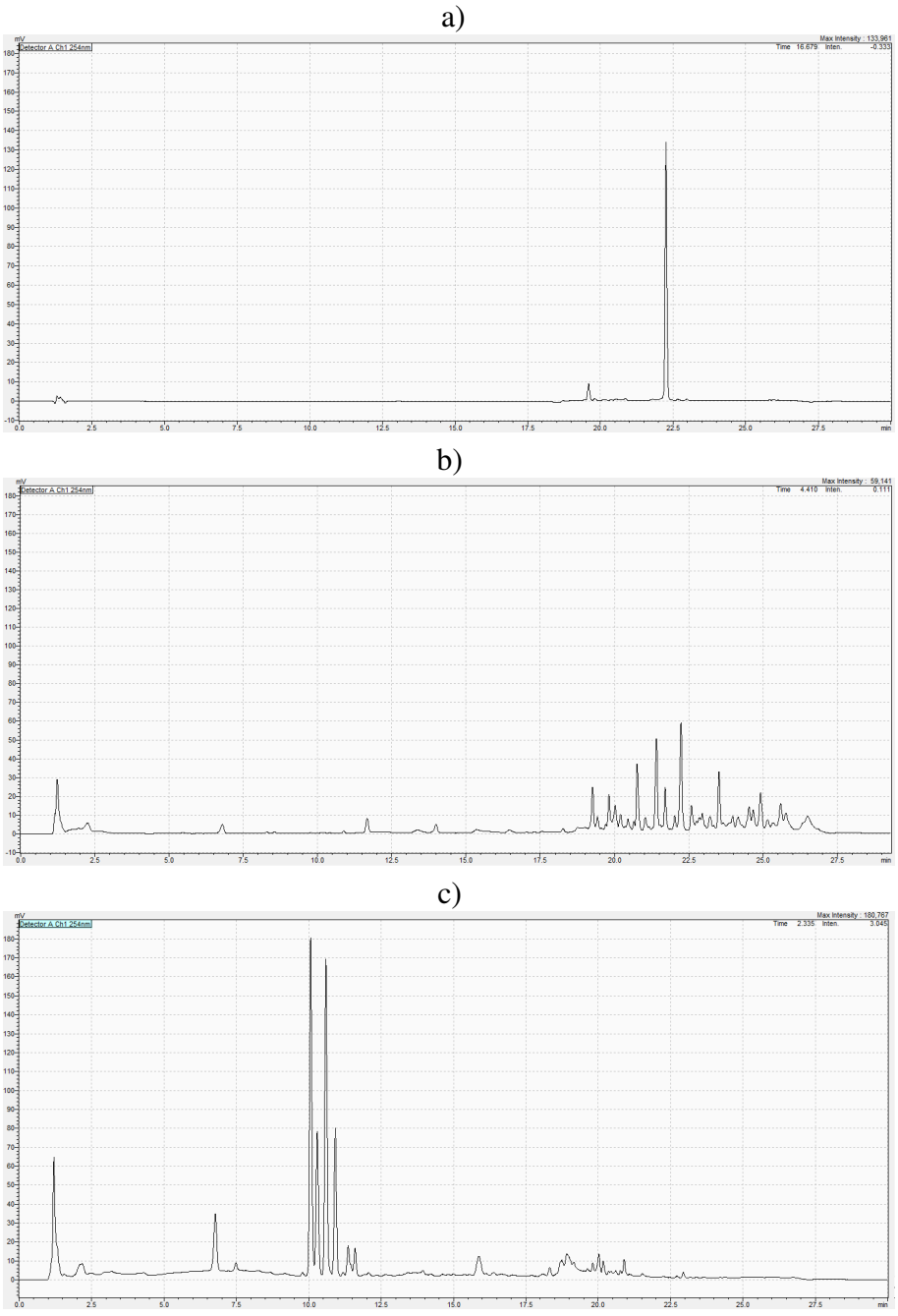


Abbildung 26: a) TPA-Standard und b) Croton Urtinktur im HPLC-System 2 ohne vorherige Hydrolyse zeigen im Vergleich zu der hydrolysierten Urtinktur c) die Selektivität der Bestimmungsmethode, da keine relevanten Signale im Retentionsbereich der Hydrolyseprodukte zwischen Minute 6 und 12 auftreten.

Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Bestimmungsgrenze (LOQ) und Nachweisgrenze (LOD) wurden über den Standardfehler und die Steigung der Kalibriergerade rechnerisch bestimmt (Dolan, 2015). Der Standardfehler entspricht der Standardabweichung der Regressionsgerade für den gesamten Bereich und wurde hier anstelle von der Standardabweichung des Blindwertes verwendet. Diese Methode zur Bestimmung von LOD und LOQ ist in diesem Fall am besten geeignet, denn dabei haben sehr viele Einzelwerte Einfluss. Weiter mögliche Methoden zur Bestimmung nach ICH wären die visuelle Bestimmung und die Bestimmung anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (ICH, 2005).

$$LOD = \frac{3,3 * SD}{m} = \frac{3,3 * 10950}{262715} = 0,318 \mu g$$

$$LOQ = \frac{10 * SD}{m} = \frac{10 * 10950}{262715} = 0,417 \mu g$$

Statistische Auswertung

Signifikanz der Bestimmtheitsmaß wurde durch den F-Test geprüft und ergab einen F-Wert von 30179,4. Die Nullhypothese konnte abgelehnt werden da der P-Wert gegen Null strebt.

Die Koeffizieten der Regressionfunktion sind signifikant, denn mit den T-Werten 2,8735 und 173,72 konnte die Nullhypothese H_0 (5%) abgelehnt werden.

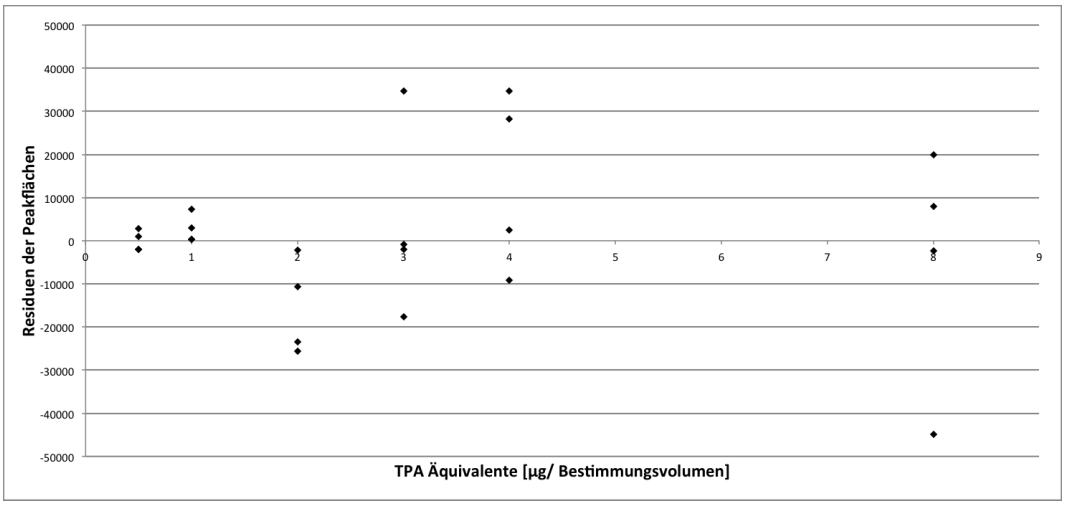


Abbildung 27: Residuenplot für die Kalibriergerade der Gehaltsbestimmung von Croton Urtinktur als TPA-Äquivalente. Es lässt sich daraus erkennen, wie die Messwerte um den über die Kalibrierfunktion errechneten Wert verteilt sind und daraus wird die Qualität des linearen Ansatzes deutlich.

4.5.2 Ergebnisse

Es wurden alle vorhandenen Urtinkturen und die selbst hergestellten Extrakte aus den unterschiedlichen Samenproben zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Phorbolestern unter den beschriebenen Bedingungen mit Natriummethanolat hydrolysiert. Die Peakflächen der resultierenden Hydrolyseprodukte wurden aufsummiert und als TPA-Äquivalente über die Kalibiergerade berechnet. Die Urtinkturen und die Extrakte wurden jeweils als dreifacher Ansatz hydrolysiert. Jede Probe wurde dann doppelt in die HPLC injiziert, so dass sich für jede Probe sechs Einzelwerte ergeben. Es wurde der Mittelwert der Gesamtfläche berechnet und davon die relative Standardabweichung. Über die Kalibrierfunktion wurde der Gehalt für die entsprechenden Gesamtflächen und deren Standardabweichung berechnet. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 10 µL und die eingesetzte Menge an Urtinktur und Extrakt wurde bei der Hydrolyse auf ein Zehntel verdünnt. Daher konnte durch die Berechnung ohne einen Faktor direkt auf den Gehalt in der Ausgangslösung geschlossen werden. Aus der Kalibrierfunktion ergibt sich folgende Berechnungsformel:

$$Gehalt\left[\mathrm{mg}/\mathrm{mL}\right] = \frac{Gesamtfläche - 17223}{262715}$$

Tabelle 5: Quantitative Phorbolesterbestimmung aus den Croton Urtinkturen und den Extrakten als TPA-Äquivalente durch alkalische Hydrolyse nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Methode; n = 6.

	Charge	$\overline{x}$ der Gesamtfläche	RSD %	Gehalt [mg/mL]	±SD [mg/mL]
Urtinkturen	DHU 102	1244531,8	1,49	4,67	0,005
	DHU 103	585021,5	1,9	2,16	0,023
	Dr. R 001	868831,5	1,26	3,24	0,024
	Dr. R 002	872496,3	4,82	3,26	0,094
Extrakte	D100078	1035704,2	2,08	3,88	0,016
	22224	866533,8	4,66	3,23	0,088
	22277	881013,7	2,47	3,29	0,017
	22747	1099855,7	4,34	4,12	0,116
	22464	1155372,7	2,04	4,33	0,024

4.5.3 Diskussion

Mit der entwickelten Quantifizierungsmethode nach der alkalischen Hydrolyse der Ester konnte eine einfache Methode etabliert werden, um eine Aussage über die gesamte Menge an Phorbol- und Desoxyphorbolestern in den Urtinkturen und Extrakten zu treffen. Die ermittelten Konzentrationen sind aber nicht als wahrer Wert für einen absoluten Gehalt zu verstehen, sondern sollen als eine Hilfestellung zur Interpretation des toxischen Potenzials von homöopathischen Zubereitungen aus *Croton tiglium* L. angesehen werden. Es handelt sich hierbei um eine Konventionsmethode, die versucht eine Vielzahl von über 100 verschiedenen Phorbolesterderivaten in der Croton Urtinktur, in einem Gesamtgehalt zu beschreiben.

Es wurde versucht, die optimalen und am besten reproduzierbaren Hydrolysebedingungen auszuarbeiten. Es wird jedoch dabei immer auch einen gewissen Teil an noch nicht hydrolysierten Phorbolester zurückbleiben und die entstandenen Grundalkohole werden sich auch zu einem gewissen Teil schon wieder zersetzt haben. Durch die Vermessung der Standardsubstanz TPA unter den gleichen Hydrolysebedingungen und der Kalibrierung über die Hydrolysprodukte ist dieser Verlust hierbei schon mit eingerechnet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Urtinkturen und die selbst hergestellten Extrakte einen etwa vergleichbaren Gehalt an Phorbolestern aufweisen. Hierbei wurden Werte zwischen 2 und 5 $^{mg}/_{mL}$ berechnet und als TPA-Äquivalente für den Gesamtgehalt ermittelt.

Vergleicht man die mit dieser Methode ermittelte Menge an Phorbolestern aus der Croton Urtinktur mit der von Gläser (1991) bestimmten Menge an TPA-Äquivalenten von 1,2 $^{mg}/_{g}$ für die Croton Urtinktur, fällt auf, dass selbst die Charge DHU 103 mit dem geringsten Gehalt immer noch einen fast doppelt so hohen Wert für die TPA-Äquivalente ergibt. Das könnte zum einen in einem tatsächlich geringeren Gehalt liegen. Zum anderen aber liegt es hier nahe davon auszugehen, dass ein Teil der Phorbolester in der von Gläser (1991) angewendeten Methode nicht erfasst wurde.

Wie die HPLC-MS/MS Analyse gezeigt hat, entstehen bei der Hydrolyse mit Natriummethanolat eine Vielzahl unterschiedliche Produkte. Diese werden bei der quantitativen Bestimmung ausschließlich über den Phorbol-Peak nicht miterfasst. Außerdem wurden bei der Methode von Gläser (1991) keine Desoxyphorbolester bestimmt, welche einen bedeutenden Anteil am Gesamtgehalt ausmachen. Die Umsetzung der Phorbolester mit Natriummethanolat erfolgte dort über eine Zeit von 2 bis 2,5 Stunden bei Raumtemperatur. Bei den Versuchen, diese Methode zu wiederholen wurde bei Raumtemperatur in diesem Zeitraum nur eine teilweise Hydrolyse der Phorbolester erreicht. Eine weitere Fehlerquelle könnte sein, dass die Auftrennung der Urtinktur über eine SPE-Normalphase in Di- und Triesterfraktionen vor der Hydrolyse keine genaue Wiederfindung zulässt und ein Teil der Phorbolester entweder auf der SPE-Kartusche verbleibt oder schon beim Auftra-

gen durchbricht.

Es lässt sich außerdem sagen, dass sich aufgrund der in dieser Arbeit angewendeten moderneren Trennungsmethoden erst zu einer genaueren Auftrennung der Hydrolyseprodukte gekommen ist. Diese wurden in der von Gläser (1991) angewendeten Analyse über HPLC-Normalphasen nicht weiter aufgetrennt. Die in dieser Arbeit erfolgte Analyse der Hydrolyseprodukte mittels HPLC-MS/MS war zu dieser Zeit noch nicht gängig, so dass die Spaltprodukte der Phorbolester vielleicht auch einfach nicht erkannt wurden. Wie das Chromatogramm in Abb. 28 von Gläser (1991) zeigt, waren durchaus noch weitere, nicht näher beschriebene Peaks in der Nähe des Phorbol-Peaks zu finden.

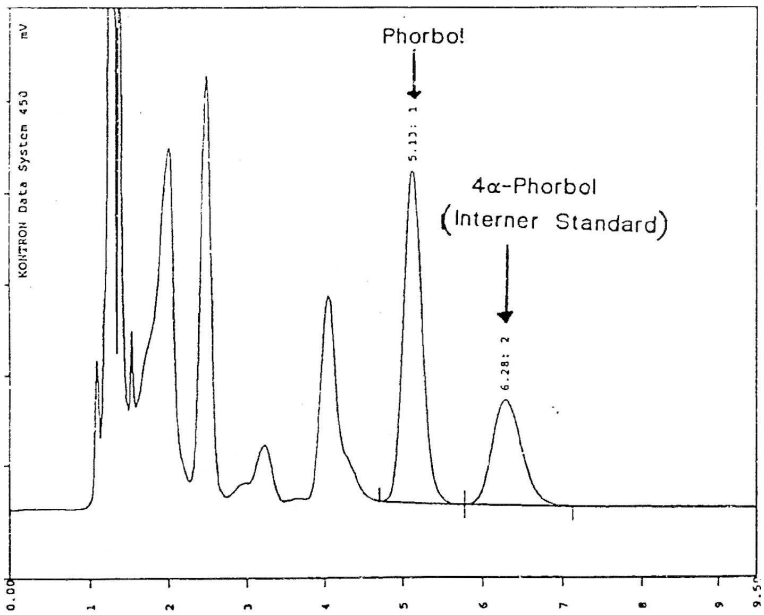
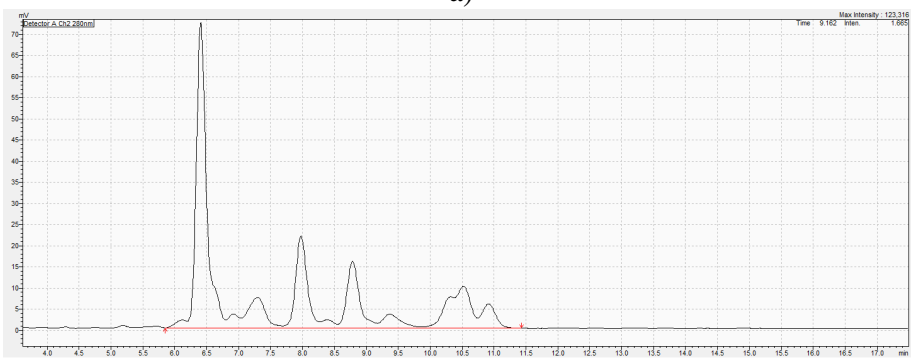


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm von Gläser (1991) zeigt die Quantifizierung von Phorbol nach der alkalischen Hydrolyse mit Natriummethanolat [0,1 $^{mol}/_{L}$] über 4α-Phorbol als internen Standard.

4.6 Quantitative Bestimmung von Phorbolestern aus Jatropha Urtinktur

Für die Quantifizierung der Jatrophafaktoren aus der Urtinktur wurde eine isokratische HPLC-Methode gewählt, bei der die Phorbolester in einem definierten Bereich eluiert werden und gegen einen TPA-Standard im gleichen HPLC-System bei unterschiedlicher Retentionszeit bestimmt werden.

a)



b)

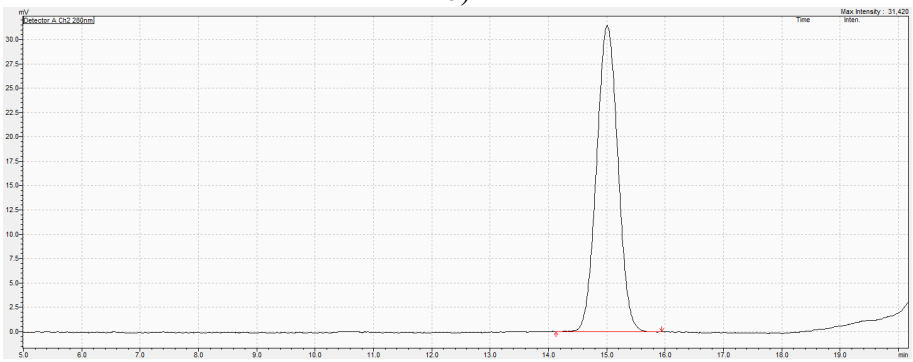


Abbildung 29: Wie in Chromatogramm a) ersichtlich wurden die Peakflächen der Jatrophafaktoren zwischen den Retentionszeiten 6 und 12 Minuten zusammenzogen und als TPA-Äquivalente, nach der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Methode, durch eine externe Kalbrierung über eine Kalibriergerade mit dem in Chromatogramm b) dargestellten TPA-Standard bei der Retentionszeit von 15 min berechnet. Hierbei wird deutlich, dass im Retentionsbereich des Standards keine Signale in der Urtinktur sichtbar sind und damit TPa auch als interner Standard genutzt werden könnte.

4.6.1 Validierung

Linearität

Linearität wurde durch die Aufnahme einer Regressionsgeraden über sechs Konzentrationen, die den Arbeitsbereich definieren, nachgewiesen. Jeder Konzentrationswert wurde

durch doppelte Hydrolyse und anschließende doppelte Injektion in die HPLC erhalten. Sie setzen sich also aus 4 Einzelwerten und jeweils aus der Summe der Peakflächen der Hydrolyseprodukte von TPA zusammen. Die Standardabweichung der Einzelwerte wurde in der Kalibriergerade als Fehlerbalken dargestellt.

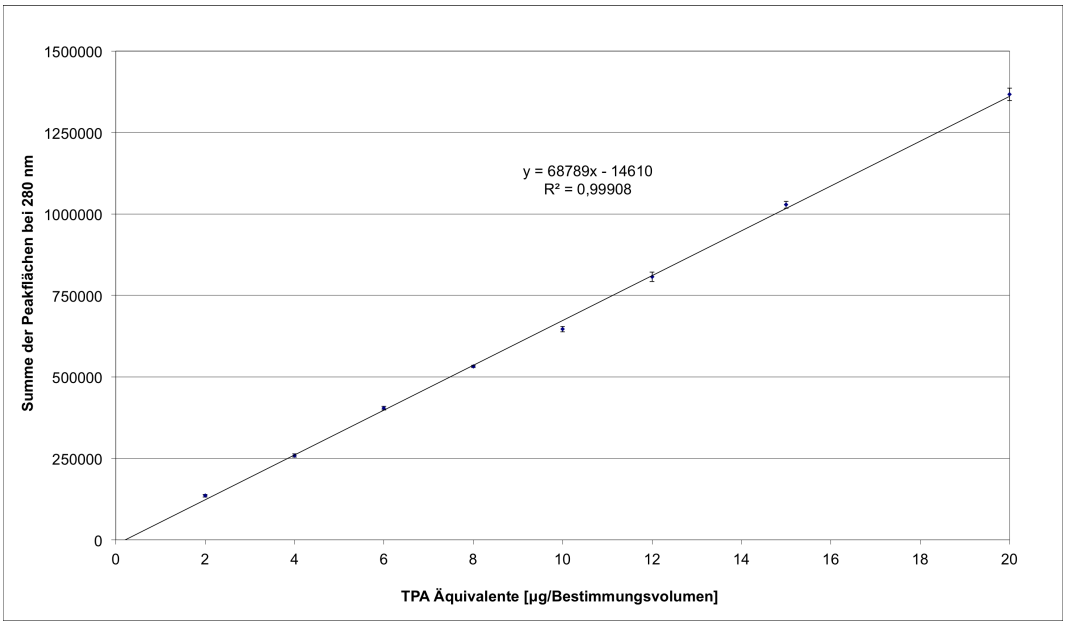


Abbildung 30: Kalibriergerade für die Quantifizierung der Phorbolester aus Jatropha Urtinktur über den TPA-Standard bei isokratischer Elution mit 75 % Acetonitril detektiert bei 280 nm; n = 4; $\overline{x} \pm$ SD.

Kalibrierfunktion:

$$y = 68789x - 14610$$

Korrelationskoeffizient:

$$r = 0,9993$$

Präzision

Präzision wurde durch wiederholtes Injizieren einer Standardlösung im mittleren Konzentrationsbereich und der Beurteilung über die relative Standardabweichung ermittelt.

Tabelle 6: Präzision der TPA-Kalibrierung wurde durch das Herstellen von fünf gleichen Verdünnungen und jeweils doppelter Injektion von 10 µg TPA untersucht.

n	Peakfläche TPA-Standard
1	645083
2	645874
3	641297
4	630075
5	678577
6	673958
7	656790
8	650733
9	640514
10	639340
$\overline{x}$	650224,1
RSD	2,44 %

Selektivität

Wie in Abb. 29 dargestellt, wurde gezeigt, dass bei der Injektion von der Urtinktur keine relevanten Signale auf der Höhe des TPA-Standards zu finden sind. Außerdem wurde wie in Abschnitt 4.7.2 beschrieben durch die MS/MS-Analyse gezeigt werden, dass es sich bei allen Peaks in dem aufsummierten Bereich um die Jatrofafaktoren handelt.

Genauigkeit

Genauigkeit konnte hier durch das Aufspiken der Urtinktur nicht bestimmt werden, da es sich bei TPA nicht um einen der zu bestimmenden Inhaltsstoffe handelt und es somit durch die Zugabe von TPA nicht zum Anstieg der zu bestimmenden Peaks kommen würde.

Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Bestimmungsgrenze (LOQ) und Nachweisgrenze (LOD) wurden auch hier über die Standardabweichung (SD) und die Steigung der Kalibriergerade (m) rechnerisch bestimmt (Dolan, 2015):

$$LOD = \frac{3,3 * SD}{m} = \frac{3,3 * 13394}{68789} = 0,643\,\mu g$$

$$LOQ = \frac{10 * SD}{m} = \frac{10 * 13394}{68789} = 1,947\,\mu g$$

Statistische Auswertung

Signifikanz der Bestimmtheitsmaß wurde durch den F-Test geprüft und ergab einen F-Wert von 6538,1. Die Nullhypothese konnte abgelehnt werden da der P-Wert gegen Null strebt.

Die Koeffizieten der Regressionfunktion sind signifikant, denn mit den T-Werten -2,7333 und 143,09 konnte die Nullhypothese H_0 (5%) abgelehnt werden.

Durch die Darstellung der Differenz zwischen den einzelnen Messwerten und dem über die Regressionsfunktion berechneten Wert in einem Residuenplot, konnte die Güte des linearen Ansatzes der Kalibrierfunktion veranschaulicht werden.

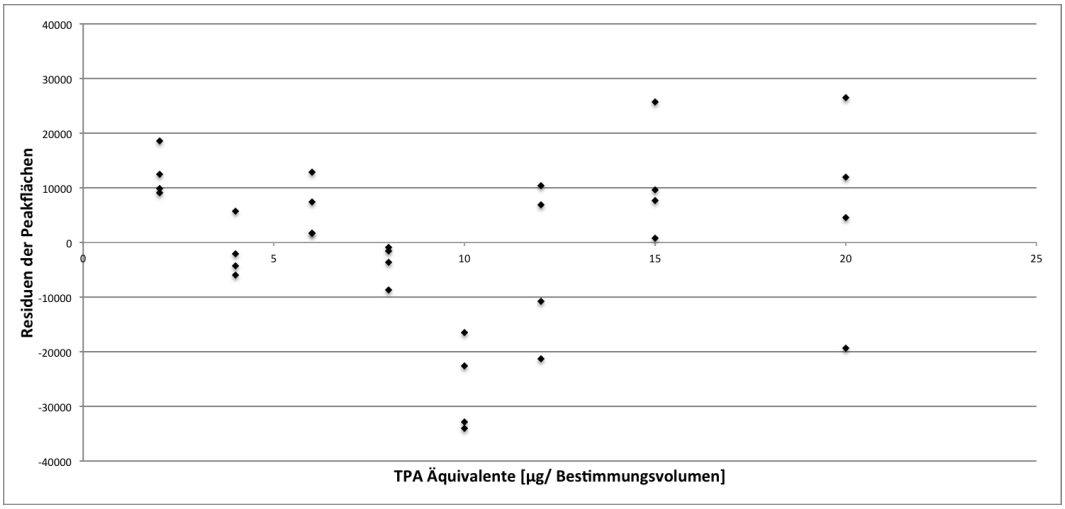


Abbildung 31: Residuenplot für die Kalibriergerade der Gehaltsbestimmung von Jatropha Urtinktur als TPA-Äquivalente.

4.6.2 Ergebnisse

Es wurde die entwickelte und validierte Methode zur quantitativen Bestimmung der Phorbolester auf die Urtinkturen der Charge 101 und 102 sowie auf den aus den Samen selbst hergestellten methanolischen Extrakt angewendet. Hierbei wurden die Urtinkturen wie beschrieben aufkonzentriert und anschließend jeweils dreimal in der HPLC vermessen. Vom aufkonzentrierten Extrakt wurden 10 µL und von den Urtinkturen je 20 µL injiziert, damit die Summe der Peakflächen innerhalb des Arbeitsbereiches lag. Aus der Kalibrierfunktion und dem Injektionsvolumen ergibt sich folgende Berechnungsformel:

$$Gehalt\left[\mathrm{mg/mL}\right] = \frac{Gesamtfläche + 14610}{68789} * \frac{1}{Injektionsvolumen}$$

Tabelle 7: Quantitative Bestimmung der Phorbolester aus Jatropha Urtinkturen und Extrakt als TPA-Äquivalente; n = 3.

	$\overline{x}$ der Gesamtfläche	RSD [%]	Menge [µg/Injektion]	Gehalt [mg/mL]	±SD [mg/mL]
Jatropha Extrakt	971232	1,96	14,3	1,43	0,049
JUT 101	1120469,7	1,13	16,5	0,83	0,020
JUT 102	907066,3	0,29	13,4	0,67	0,013

4.6.3 Diskussion

Somit ergibt sich für die Urtinkturen aus *Jatropha curcas* L. ein deutlich geringerer Gehalt an Phorbolestern als aus der Croton Urtinktur, was bei der deutlich geringeren Zahl an Verbindungen auch zu erwarten war. Um den genauen Gehalt an den entsprechenden Desoxyhydroxyphorbolesern, also den Jatrophafaktoren, angeben zu können, wären jedoch die passenden Standardsubstanzen notwendig. Da diese nicht käuflich zu erwerben sind, musste hier der Umweg über eine strukturell ähnliche und gut erhältliche Standardsubstanz gegangen werden. Hierfür wurde TPA gewählt, da diese in hoher Reinheit relativ günstig im Handel zu kaufen ist.

Eine vollständige Trennung der einzelnen Jatrophafaktoren im Chromatogramm ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit nur relativ schwer zu realisieren. Daher wurde hier der Weg über eine Konventionsmethode zur Bestimmung eines Gesamtgehalts gewählt.

Hierbei wurden alle Signale im Bereich der Phorbolester aufsummiert und über eine externe Kalibrierung als TPA-Äquivalente bestimmt. Dies gibt natürlich nicht den wahren Wert der Jatrophafaktoren wieder, doch es ist für die Gehaltsbestimmung in einer Arzneibuchmonographie eine hinreichend genaue Bestimmungsmethode. Es geht dabei nicht um eine genaue quantitative Bestimmung der einzelnen Inhaltsstoffe, sondern um eine Interpretation der Gefährlichkeit bei der Anwendung der entsprechenden homöopatischen Arzneimittel, welche aus den Urtinkturen hergestellt werden.

Im Gegensatz zu den in den letzten Jahren wenigen erschienenen Arbeiten über *Croton tiglium* L. und *Euphorbia cyparissias* L. wird zu *Jatropha curcas* L. aktuell deutlich mehr geforscht. Besonderes Interesse richtet sich dabei auf die Verwendung der fetten Öle als Biotreibstoff, aber auch im Hinblick auf die Phorbolester wurde einiges veröffentlicht. Für eine Nutzung des sehr proteinreichen Presskuchens der Samen nach der Ölgewinnung als Futtermittel wurden mehrere Methoden zur Detoxifizierung und auch zur quantitativen Bestimmung der Phorbolester beschrieben. Der Abbau der Phorbolester erfolgt dabei auf unterschiedliche Wege wie z.B. enzymatisch, chemisch oder mittels Bestrahlung (Baldini *et al.*, 2014; Gogoi *et al.*, 2014; Nakada *et al.*, 1988; Guedes *et al.*, 2014; Hidayat *et al.*, 2013). Die Quantifizierung der Jatrophafaktoren erfolgt dabei meist ebenfalls als TPA-Äquivalente in einer HPLC-UV Methode bei 280 nm.

4.7 Qualitative Untersuchung der Urtinkturen mittels UHPLC-MS/MS

4.7.1 Croton Urtinktur

Für die Identifizierung der Phorbolester aus der Croton Urtinktur wurde zunächst versucht, mithilfe der analytischen HPLC und dem Fraktionssammler die 15 Hauptpeaks des HPLC-Chromatogramms aufzufangen und massenspektrometrisch im ESI-TOF zu analysieren. Zu diesem Zeitpunkt war aber noch nicht die viel komplexere Zusammensetzung der Urtinktur bekannt und es wurde von den in der Literatur beschriebenen etwa 30 verschiedenen Phorbolestern ausgegangen. Durch die Verwendung einer einfachen HPLC-UV-Methode wurde daher keine vollständige Auftrennung der Urtinktur erreicht und eine Überlagerung der Peaks nicht erkannt. Durch diese überlagerten Peaks konnten keine reinen MS-Spektren aus den isolierten Fraktionen erhalten werden.

Für die genaue Beschreibung der enthaltenen Phorbolester musste also zunächst eine feinere Auftrennung der Proben und eine direkte Identifikation der Peaks mittels MS/MS-Detektor aus dem Chromatogramm erfolgen. Hierfür wurde die UHPLC-MS/MS im Institut für Pharmakognosie in Warschau für einige Zeit zur Verfügung gestellt und es wurden die folgenden Untersuchungen dort durchgeführt. Für die Bestimmung der einzelnen Bestandteile der Urtinktur wurde diese zunächst mittels eines sehr langen und flach ansteigenden Gradienten aufgetrennt und anschließend die einzelnen Peaks über die MS/MS-Signale soweit wie möglich identifiziert.

Bei der Fragmentierung der Phorbolester entstanden als charakteristische Spaltprodukte des Grundalkohols 4-Desoxy-4α-phorbol die durch Abspaltung von zwei oder drei Wassermolekülen die Tochterionen $^{m}/_{z}$ 313 $\rightarrow$ 295 und bei Phorbol entsprechend durch drei oder vier Wassermoleküle $^{m}/_{z}$ 311 die über ihre Fragmentierung als Phorbolesterderivate zu erkennen waren.

Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte manuell durch Vergleich der entstandenen Tochterionen der einzelnen Peaks mit den aus der Literatur in Frage kommenden Säurekomponenten. Es wurden in der Literatur bereits 13 verschiedene Carbonsäuren beschrieben, die als Säurekomponenten der Phorbolester anhand ihrer Molekülmassen den untersuchten Verbindungen zugeordnet werden konnten (Zhang *et al.*, 2013; Vogg *et al.*, 1999; Kinghorn & Erdelmeier, 1991; Hecker & Schmidt, 1974).

Mit Capron- und Stearinsäure wurden zwei weitere Carbonsäuren identifiziert. Durch die spezifischen Massenverluste entsprechend ihrer Molekularmasse und der strukturellen Homologie zu den anderen Säurekomponenten wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um diese Verbindungen handelt. Für eine genaue Identifikation wäre hier, sowie bei den anderen neuen Verbindungen, eine Untersuchung mittels NMR notwendig.

Tabelle 8: Säurekomponenten der Phorbolester mit Trivialnamen, den in dieser Arbeit verwendeten Esterbezeichnungen und der zugehörigen relativen Molekülmasse (Vogg *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2013).

Carbonsäure	Esterbezeichnung	M_r
Essigsäure	-acetat	60
Propionsäure	-propanoat	74
(Iso)Buttersäure	-butanoat	88
Tiglinsäure	-methylbutenoat	100
2-Methylbuttersäure	-methylbutanoat	102
Capronsäure	-hexanoat	116
Phenylessigsäure	-phenylacetat	136
Caprylsäure	-octanoat	144
Caprinsäure	-decanoat	172
Laurinsäure	-dodecanoat	200
Myristinsäure	-tetradecanoat	228
Palmitinsäure	-hexadecanoat	256
Linolsäure	-linoleat	280
Ölsäure	-oleat	282
Stearinsäure	-stearat	284

Zur Identifikation der Verbindungen wurden die jeweiligen MS/MS-Spektren der Molekülpeaks betrachtet und dabei auf die für die abgespaltenen Säurekomponeten spezifischen Masseverluste untersucht. Wenn einem Peak die entsprechenden Säurekomponenten zugeordnet werden konnten, so wurde durch Addition der Masse vom Grundalkohol mit der Masse der jeweiligen Carbonsäuren und unter Abzug der Masse des Wassers aus den Esterbindungen zurückgerechnet. Erhält man so wieder die relative Molekülmasse des erwarteten Verbindung, ist von einer korrenkten Zuordnung der Säurekomponenten auszugehen.

Der Molekülpeak liegt hier in den meisten Fällen als Natriumaddukt vor und damit noch um 23 Masseneinheiten höher. Dieser Vorgang wurde für alle untersuchten Peaks durchgeführt, wodurch eine genaue Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Phorbolester für 100 unterschiedliche Verbindungen erreicht werden konnte. Es wurden Mono-, Di- und Triester der beiden Grundalkohole über das gesamte Chromatogramm verteilt identifiziert.

Aus dem HPLC-UV-Chromatogramm werden drei Verbindungen in der Diesterfraktion und vier Triester als prominente Peaks deutlich. Dabei handelt es sich um Phorbol acetat methylbutenoat, Phorbol butanoat methylbutenoat und Phorbol acetat tetradecanoat. Bei den Triestern sind Phorbol methylbutenoat methylbutanoat dodecanoat, Desoxyphorbol acetat methylbutenoat linoleat, Phorbol acetat decanoat linoleat und Phorbol methylbutenoat decanoat linoleat als herausragende Peaks erkennbar. Es liegt daher nahe, diese

Verbindungen als die Hauptkomponenten zu bezeichnen, doch muss man für die genauen Mengenverhältnisse auch die UV-Absorption der Verbindungen beachten. Unabhängig von der Fähigkeit zur UV-Absorption werden die Mengenverhältnisse im CAD-Chromatogramm anders dargestellt.

Dagegen wird aus der CAD-Detektion deutlich, dass ein anderer Peak bei t_R = 75 min das Chromatogramm deutlich überragt und somit als Hauptkomponente der Urtinktur angeführt werden muss. Es handelt sich dabei um das Phorbol acetate dodecanoate, welches auch im TIC ein deutlich größeres Signal zeigt. Es wird im TIC und CAD-Chromatogramm außerdem deutlich, dass einige weitere Verbindungen in relevanten Mengen in der Urtinktur vorliegen, die im UV-Chromatogramm kaum sichtbar sind, aber dennoch hier in der Liste aufgeführt sind.

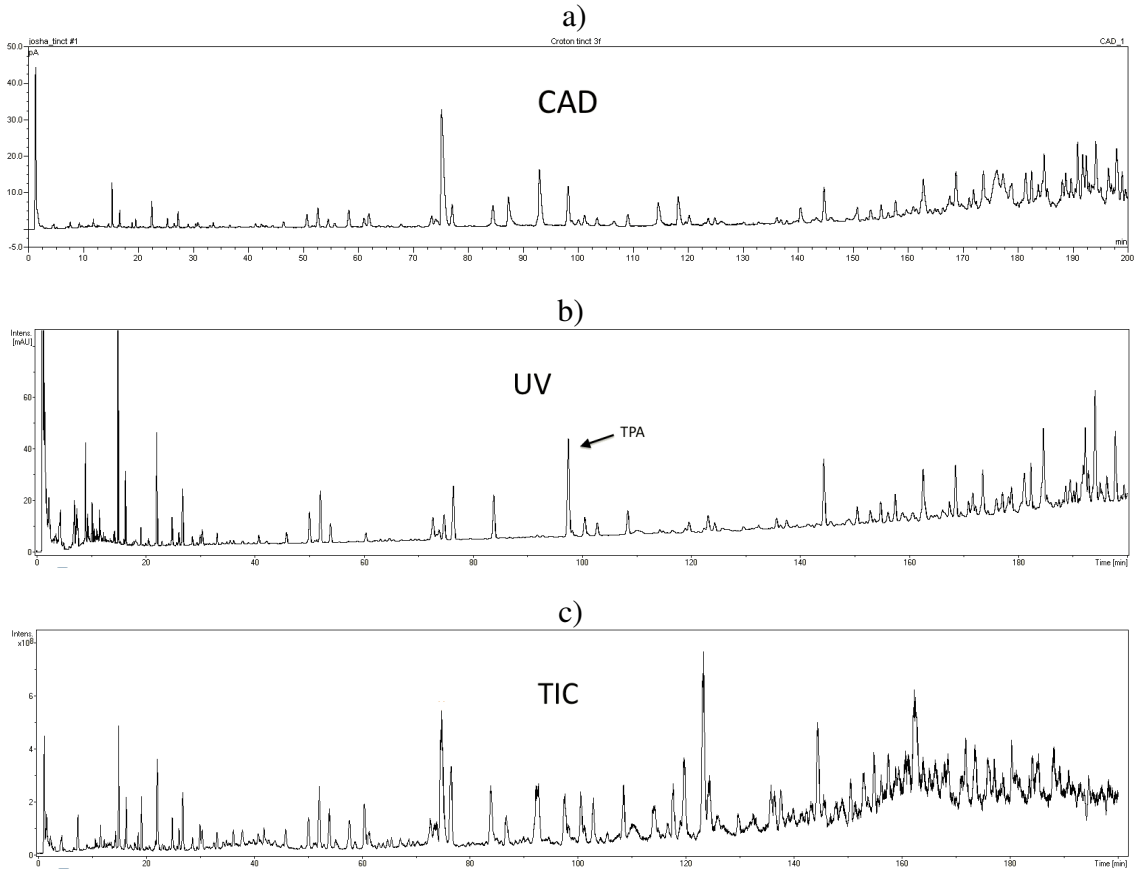


Abbildung 32: CAD, UV und MS Chromatogramme von Croton Urtinktur zum Vergleich gegenüber gestellt. Aufgenommen in HPLC-MS-Anlage 1 nach der im Abschnitt 3.5 beschriebenen Methode. Chromatogramm a) zeigt die CAD-Detektion, woraus die wahren Mengenverhältnisse der Inhaltsstoffe deutlich werden. Chromatogramm b) zeigt die UV-Detektion bei 254 nm. Chromatogramm c) zeigt das TIC der MS-Detektion und daraus wird ersichtlich, dass die Verteilung der Peaks eher dem des CAD-Chromatogramms entspricht.

Das dominante Signal im TIC bei t_R = 123 min entspricht einer Verunreinigung der Probe mit Phthalaten als Weichmacher aus Kunststoff und weist die charakteristischen starken

MS-Signale bei $^{m}/_{z}$ 413 $[M+Na]^+$ und 803 $[2M+Na]^+$ auf (waters.com, 2015). Durch eine sehr gute Ionisierbarkeit der Phthalate tritt diese Verunreinigung besonders im MS-Chromatogramm in Erscheinung.

Die in Tab. 10 aufgeführten Verbindungen konnten anhand von sauberen MS-Spektren den entsprechenden Säurekomponenten zugeordnet werden, was als hinreichend genaue Identifikation für das Vorliegen in der Urtinktur ausreichen sollte. Die genauen Positionen der jeweiligen Ester können mithilfe der Massenspektrometrie nicht geklärt werden. Hierfür ist eine Analyse der reinen isolierten Verbindungen mittels NMR-Spektroskopie notwendig. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der einzelnen Phorbolester, die komplexe Zusammensetzung der Urtinktur und der zum Teil sehr geringen Konzentration sind viele der enthaltenen Verbindungen nur schwer in ausreichender Reinheit und Menge für die NMR-Analyse zu isolieren.

Es wurden immer die Natriumaddukte der Verbindungen gefunden, daher wurden auch diese in der Tabelle aufgeführt. Die relative Molekülmasse ergibt sich daraus durch Abzug von 23 für die Masse eines Natriumions. Des Weiteren wurden für die identifizierten Verbindungen nicht die MS/MS-Signale jedes einzelnen Tochterion in die Tabelle aufgenommen, sondern der Übersichtlichkeit wegen die entsprechenden Massenverluste für die jeweiligen Säurekomponeten der Ester aufgeführt.

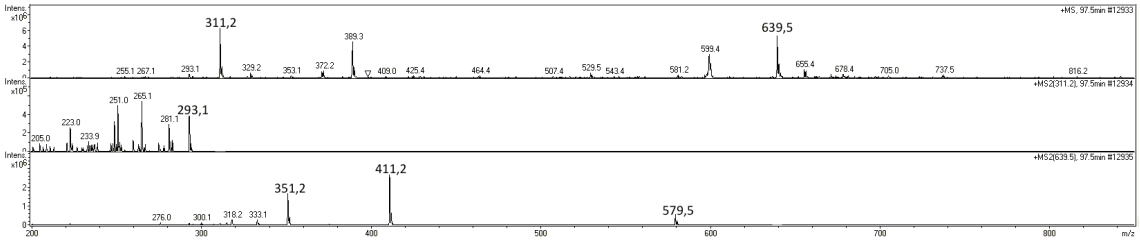


Abbildung 33: Beispiel des MS/MS-Spektrums für TPA, das als Natriumaddukt mit der Masse $^{m}/_{z}$ 639 $[M+Na]^+$ bei t_R = 97,5 min zu finden ist. Die Identifikation erfolgte über die entsprechenden Tochterionen $^{m}/_{z}$ 579 und 411. Diese zeigen den spezifischen Masseverlust der Carbonsäuren 60 für Essigsäure und 228 für Myristinsäure. Außerdem ist noch das Ion bei $^{m}/_{z}$ 351 $[M+Na]^+$ zu finden, das dem Natriumaddukt des Phorbol-Grundgerüstes nach der Abspaltung der beiden Ester entspricht. $^{m}/_{z}$ 311 $[M+H]^+$ ist das dem Phorbol entsprechende Tochterion, welches aus der Abspaltung von 3 mal Wasser hervorgeht. Durch weitere Abspaltung von Wasser entsteht $^{m}/_{z}$ 293.

In Abb. 33 sieht man das MS/MS-Spektrum für TPA, aufgrund dessen die Vorgehensweise bei der Identifikation der einzelnen Substanzen deutlich werden soll. Der Molekülpeak ist dort als Natriumaddukt bei $^{m}/_{z}$ 639 $[M+Na]^+$, also 23 höher als die relative Molekülmasse von $^{m}/_{z}$ 616, zu finden.

Insgesamt konnten so 100 unterschiedliche Phorbolester in der Croton Urtinktur identifiziert werden, wobei bisher nur etwa 30 Verbindungen in der Literatur beschrieben wurden. Bei den bereits beschriebenen Verbindungen handelt es sich zum größten Teil um

Phorboldiester.

Die Benennung der Verbindungen erfolgte nach Vogg *et al.* (1999) und wurde wegen der besseren Lesbarkeit durch der systematische Nomenklatur gewählt. Es wurde dabei vermieden, Trivialnamen zu verwenden und ebenfalls wurden Lokanten in der Tabelle weggelassen, da die genauen Positionen für die identifizierten Ester nicht bekannt sind. Die Säurereste wurden durch ihre Molekülmassen der Größe nach geordnet. Die einzelnen Säurekomponenten mit ihren Trivialnamen und entsprechender Esterbezeichnung sind in Tab. 8 übersichtlich aufgelistet.

Es wurden einige Mono- und Diester des Phorbols sowie des Desoxyphorbols neu identifiziert, die noch nicht aus der Literatur bekannt waren. Die noch nicht zuvor beschriebenen Mono- und Diester Verbindungen sind zur Übersicht in Tab. 9 aufgeführt (Zhang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Vogg *et al.*, 1999; Kinghorn & Erdelmeier, 1991; Hecker & Schmidt, 1974). Etwa die Hälfte der aus der Urtinktur identifizierten Verbindungen sind jedoch Triester, von denen nur wenige Ausnahmen in der Literatur bereits beschrieben wurden.

Tabelle 9: Neu identifizierte Mono- und Diester der Diterpenalkohole Phorbol und 4-Desoxy-4α-phorbol aus *Croton tiglium* L.

Gruppe	Name
Monoester	Phorbol methylbutanoat
	Desoxyphorbol methylbutanoat
	Desoxyphorbol methylbutenoat
	Phorbol dodecanoat
Diester	Desoxyphorbol butanoat methylbutenoat
	Desoxyphorbol methylbutenoat octanoat
	Desoxyphorbol acetat decanoat
	Phorbol butanoat decanoat
	Desoxyphorbol methylbutanoat decanoat
	Desoxyphorbol methylbutenoat dodecanoat
	Desoxyphorbol methylbutenoat linoleat
	Desoxyphorbol methylbutanoat linoleat

Die Phorboltrieser sind nicht direkt aktiv, aber können durch Abspaltung einer Carbonsäure in die entsprechenden Phorboldiester umgewandelt werden und werden als „kryptische“ Phorbolester bezeichnet. Da auch diese „kryptischen“ Phorbolester für die Einschätzung der gesamten Toxizität mit erfasst werden müssen, wurden für die Quantifizierung keine Auftrennung in Di- und Triester vorgenommen, sondern ein Gesamtgehalt bestimmt (Gläser, 1991).

Den in *Croton tiglium* L. enthaltenen Phorboltriestern wurde in der Literatur bisher nur

sehr wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Vogg *et al.* (1999) beschreibt ein Phorbol triacetat, Phorbol diacetat tetradecanoat und Phorbol acetat butanoat methylbutenoat. Diese Triester konnten aber von uns nicht in der Urtinktur identifiziert werden. Es konnten keine weiteren Triester aus *Croton tiglium* L. in der Literatur gefunden werden, so dass alle hier aufgeführten Triester aus Phorbol und Desoxyphorbol als in dieser Pflanze neu identifizierte Verbindungen angesehen werden können.

Die meisten von Zhang *et al.* (2013) und Wang *et al.* (2015) neu beschriebenen Verbindungen konnten auch in der beschriebenen Form in den Urtinkturen gefunden werden, wobei aber die Lineol- und Ölsäureester nur mit Methylbutanoat-Rest oder als Triester identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurden noch Triester mit einer Stearinsäure als Rest gefunden, die als Säurekomponente noch nicht aus der Literatur bekannt war.

Die von Vogg *et al.* (1999) aufgeführten Phorbol undecanoat und nonadienoat Ester konnten nicht in der Urtinktur gefunden werden.

Aktuell wurden von Zhang *et al.* (2015) elf weitere zytotoxisch wirksame Diterpenester aus den Blättern und Zweigen von *Croton tiglium* L. isoliert. Dabei handelt es sich zum Teil um Oxidationsprodukte der klassischen Phorbolester und sie tragen eine Ketogruppe oder ein Hydroperoxid an dem Siebenring des Tiglian-Grundgerüst. Da die Urtinktur ausschließlich aus den Samen hergestellt wird, sind diese Verbindungen hier nicht zu erwarten.

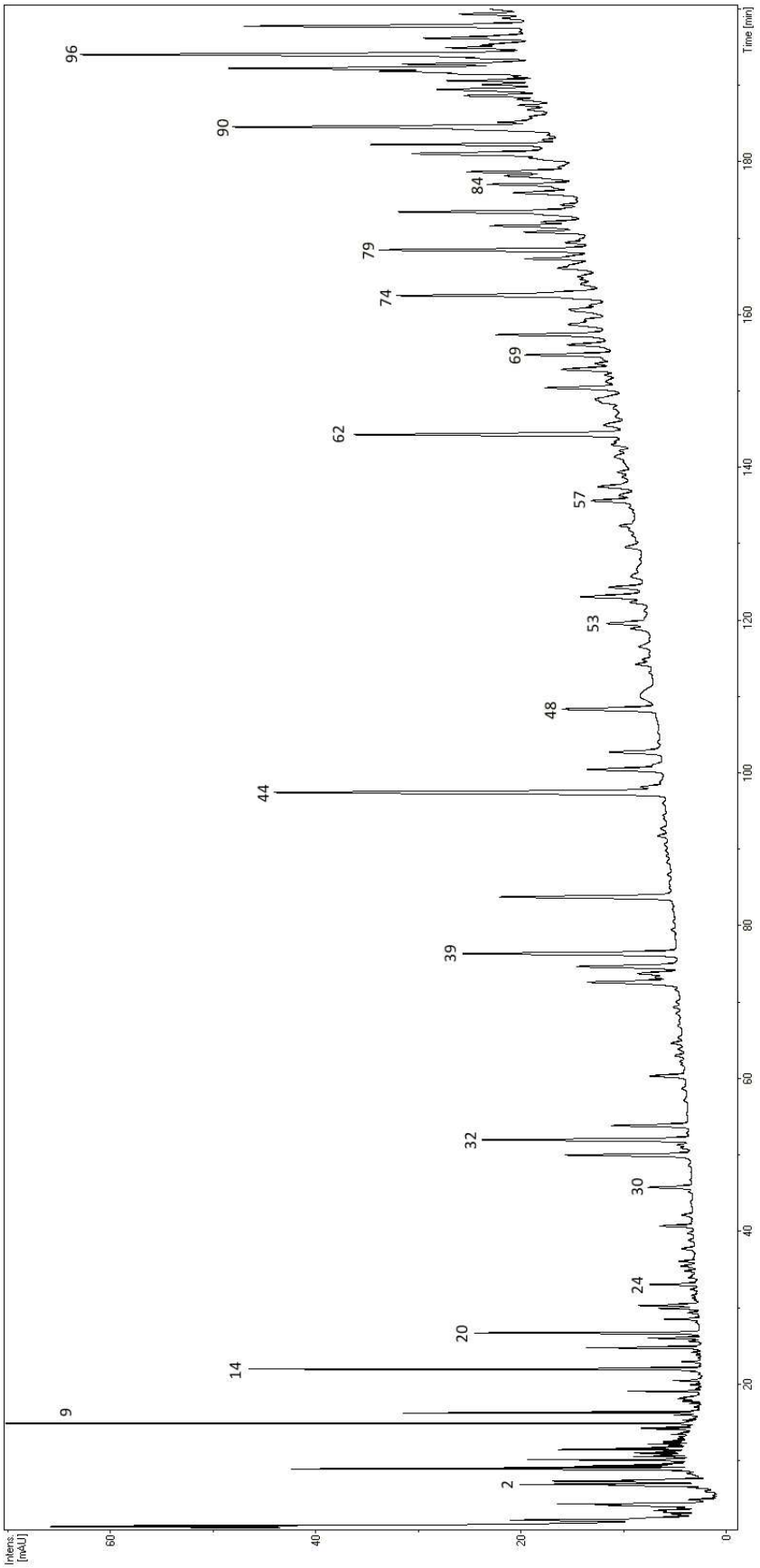


Abbildung 34: UV-Chromatogramm bei 254 nm der HPLC-MS Analyse von Croton Urtinktur mit der Zuordnung ausgewählter Peaks aus Tab. 10.

Tabelle 10: Phorbolester aus Croton Urtinktur in der Reihenfolge der Retentionszeit unter Angabe der relativen Molekülmasse, dem entsprechendem Natriumaddukt und den Säurekomponenten zugeordneten Masseverlusten im MS/MS Spektrum. $^{m}/_{z}$ wurde in der Tabelle aus Platzgründen weggelassen.

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
1	Phorbol acetat	4,5	429	406	-60		
2	Desoxyphorbol acetat	7,5	413	390	-60		
3	Phorbol diacetat	10,7	471	510	-60	-60	
4	Phorbol methylbuteonat	11,7	469	446	-100		
5	Phorbol methylbutanoat	12,3	471	448	-102		
6	Desoxyphorbol methylbutanoat	13	455	432	-102		
7	Desoxyphorbol methylbutenoat	13,6	453	430	-100		
8	Phorbol acetat butanoat	14,5	499	476	-60	-88	
9	Phorbol acetat methylbutenoat	15	511	488	-60	-100	
10	Phorbol acetat methylbutanoat	16,3	513	490	-60	-102	
11	Phorbol propanoat methylbutenoat	18	525	502	-74	-100	
12	Desoxyphorbol acetat methylbutenoat	19,3	495	472	-60	-100	
13	Desoxyphorbol acetat methylbutanoat	21,7	497	474	-60	-102	
14	Phorbol butanoat methylbutenoat	22	539	516	-88	-100	

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
15	Phorbol di-methylbutenoat	23,2	551	528	-100	-100	
16	Phorbol butanoat octanoat	24,4	561	560	-88	-144	
17	Phorbol butanoat methylbutanoat	25	541	518	-88	-102	
18	Phorbol methylbutanoat methylbutenoat	25,8	553	530	-100	-102	
19	Phorbol phenylacetat methylbutanoat	26	587	564	-100	-136	
20	Phorbol methylbutenoat methylbutanoat	27	553	530	-100	-102	
21	Phorbol methylbutanoat octanoat	29.5	575	574	-102	-144	
22	Desoxyphorbol butanoat methylbutenoat	30	523	500	-88	-100	
23	Phorbol dimethylbutanoat	31	555	532	-102	-102	
24	Phorbol octanoat acetat	33,5	555	532	-60	-144	
25	Desoxyphorbol butanoat methylbutanoat	34,5	525	502	-88	-102	
26	Phorbol methylbutenoat hexanoat	35	567	544	-100	-116	

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
27	Desoxyphorbol methylbutenoat phenylacetat	35,7	571	548	-100	-136	
28	Desoxyphorbol methylbutanoat methylbutenoat	36,5	537	514	-100	-102	
29	Desoxyphorbol methylbutenoat octanoat	38	579	556	-100	-144	
30	Phorbol dodecanoat	46	569	546	-200		
31	Phorbol acetat decanoat	50	583	560	-60	-172	
32	Phorbol acetat decanoat	52,1	583	560	-60	-172	
33	Phorbol octanoat methylbutenoat	54,5	595	572	-100	-144	
34	Phorbol octanoat methylbutanoat	60,5	597	574	-102	-144	
35	Desoxyphorbol acetat decanoat	65,5	567	544	-60	-172	
36	Phorbol acetat dodecanoat	72,5	611	588	-60	-200	
37	Phorbol butanoat decanoat	74	611	588	-88	-172	
38	Phorbol acetat dodecanoat	75	611	588	-60	-200	
39	Phorbol methylbutenoat decanoat	76,5	623	600	-100	-172	
40	Phorbol methylbutanoat decanoat	84	625	602	-102	-172	

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
41	Phorbol propanoat dodecanoat	86,8	625	602	-74	-200	
42	Phorbol acetat methylbutenoat decanoat	92,5	665	642	-60	-100	-172
43	Desoxyphorbol methylbutenoat decanoat	92,8	607	584	-100	-172	
44	Phorbol acetat tetradecanoat	97,5	639	616	-60	-228	
45	Phorbol methylbutenoat dodecanoat	101	651	628	-100	-200	
46	Desoxyphorbol methylbutanoat decanoat	102	609	586	-102	-172	
47	Phorbol acetat octanoat phenylacetat	103	691	668	-60	-144	-136
48	Phorbol methylbutanoat dodecanoat	108,5	653	630	-102	-200	
49	Phorbol acetat methylbutenoat dodecanoate	114	693	670	-60	-100	-200
50	Phorbol acetat methylbutenoat dodecanoat	116,5	693	670	-60	-100	-200
51	Desoxyphorbol methylbutenoat dodecanoat	117,5	635	612	-100	-200	

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
52	Phorbol acetat methylbutenoat dodecanoat	119	693	670	-60	-100	-200
53	Desoxyphorbol acetat linoleat	120	675	652	-60	-280	
54	Desoxyphorbol methylbutenoat linoleat	124	731	710	-100	-280	
55	Phorbol methylbutenoat methylbutanoat decaonat	126	707	684	-100	-102	-172
56	Desoxyphorbol methylbutanoat linoleat	130	733	710	-102	-280	
57	Phorbol butanoat methylbutenoat dodecanoat	135,8	721	698	-88	-100	-200
58	Phorbol acetat methylbutenoat tetradecanoat	137,5	721	698	-60	-100	-228
59	Phorbol acetat methylbutanoat tetradecanoat	142,3	723	700	-60	-102	-228
60	Phorbol acetat butanoat linoleat	143,2	761	738	-60	-88	-280
61	Phorbol butanoat methylbutanoat dodecanoat	143,5	723	700	-88	-102	-200
62	Phorbol acetat methylbutenoat linoleat	144,5	773	750	-60	-100	-280

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
63	Phorbol methylbutenoat methylbutanoat dodecanoat	145,5	735	712	-100	-102	-200
64	Phorbol butanoat methylbutenoat linoleat	149	801	778	-88	-100	-280
65	Phorbol acetat methylbutenoat linoleat	150,5	775	752	-60	-102	-280
66	Phorbol acetat octanoat dodecanoat	152,8	737	714	-60	-144	-200
67	Phorbol acetat methylbutanoat linoleat	153	775	752	-60	-102	-280
68	Phorbol methylbutenoat octanoat decanoat	153,7	749	726	-100	-144	-172
69	Phorbol acetat methylbutenoat hexadecanoat	154,8	749	726	-60	-100	-256
70	Phorbol butanoat methylbutenoat tetradecanoat	156	749	726	-88	-100	-228
71	Phorbol acetat methylbutenoat oleat	157,5	775	752	-60	-100	-282
72	Phorbol methylbutenoat methylbutanoat linoleat	158,8	815	792	-100	-102	-280

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
73	Phorbol methylbutanoat octanoat decanoat	159,5	751	728	-102	-144	-172
74	Desoxyphorbol acetat methylbutenoat linoleat	162	757	734	-60	-100	-280
75	Phorbol acetat methylbutanoat hexadecanoat	160,6	751	728	-60	-102	-256
76	Phorbol butanoat methylbutenoat linoleat	162.5	801	778	-100	-88	-280
77	Phorbol butanoat methylbutanoat linoleat	167.5	803	780	-102	-88	-280
78	Phorbol acetat methylbutenoat stearat	171	777	754	-60	-100	-284
79	Phorbol methylbutenoat methylbutanoat linoleat	168,5	815	792	-100	-102	-280
80	Phorbol methylbutenoat methylbutanoat hexadecanoat	171,5	791	768	-100	-102	-256
81	Phorbol methylbutanoat butanoat hexadecanoat	171,8	777	754	-88	-100	-256

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
82	Phorbol acetat methylbutanoat hexadecanoat	173,8	759	726	-60	-100	-256
83	Phorbol acetat methylbutenoat oleat	176	785	762	-60	-100	-282
84	Phorbol methylbutenoat methylbutanoat hexadecanoat	177.2	791	768	-100	-102	-256
85	Phorbol acetat decanoat linoleat	178	845	822	-60	-172	-280
86	Phorbol methylbuteonat methylbutanoat oleat	178,7	817	794	-100	-102	-282
87	Desoxyphorbol methylbutenoat methylbutanoat linoleat	180,4	799	776	-100	-102	-280
88	Phorbol methylbutenoat decanoat dodecanoat	183	805	822	-100	-172	-200
89	Phorbol acetat octanoat oleat	183	819	796	-60	-144	-282
90	Phorbol acetat decanoat linoleat	184,5	845	822	-60	-172	-280
91	Phorbol methylbuteonat methylbutanoat stearat	188,7	819	796	-100	-102	-284

Nr.	Name	t_R [min]	$[M+Na]^+$	M_r	MS^2	MS^2	MS^2
92	Desoxyphorbol methylbutenoat methylbutanoat oleat	189	801	778	-100	-102	-282
93	Phorbol acetat dodecanoat linoleat	190	873	850	-60	-200	-280
94	Phorbol acetat decanoat oleat	190,5	847	824	-60	-172	-282
95	Desoxyphorbol acetat decanoat linoleat	193	829	806	-60	-172	-280
96	Phorbol methylbutenoat decanoat linoleat	194	885	862	-100	-172	-280
97	Desoxyphorbol butanoate methylbutenoat stearat	195	789	766	-88	-100	-284
98	Phorbol methylbutanoat decanoat tetradecanoat	195,5	835	812	-102	-172	-228
99	Desoxyphorbol butanoat methylbutanoat stearat	197	791	768	-88	-102	-284
100	Phorbol methylbutanoat decanoat linoleat	198	887	864	-102	-172	-280

4.7.2 Euphorbia Urtinktur

Die Analyse der Euphorbia Urtinktur wurde ebenfalls auf der UHPLC-MS/MS-Anlage in Warschau durchgeführt. Dafür wurde eine eigene Methode erarbeitet, die es ermöglicht, die komplexe Zusammensetzung der Urtinktur aufzutrennen. Im Anschluss wurden zunächst die einzelnen Peaks nach den charakteristischen Spaltprodukten der zu erwartenden Hydroxy- und Dihydroxyingenolester untersucht und durch die entsprechenden Fragmentierungsmuster konnten die entsprechenden Peaks den in der Literatur beschriebenen Inhaltsstoffen zugeordnet werden.

Die drei zu erwartenden Dihydroxyingenolverbindungen besitzen jeweils dreimal die gleiche Estergruppe an unterschiedlichen Positionen und haben dadurch alle die gleiche relative Molekülmasse von $^{m}/_{z}$ 674. Dabei handelt es sich um die Ester der 2,3-Dimethylbuttersäure, mit einer Molekülmasse von $^{m}/_{z}$ 116. Somit sind neben dem Molekülpeak, der auch hier wieder als Natriumaddukt vorliegt, folgende Spaltprodukte durch einen Masseverlust von jeweils $^{m}/_{z}$ 116 zu erwarten: $^{m}/_{z}$ 697 $\rightarrow$ 581 / 465 $\rightarrow$ 349 $[M+Na]^+$.

In Abb. 35 a) zeigt das MS/MS-Spektrum genau diese erwarteten Spaltprodukte und so konnte der Peak bei t_R = 63,3 min diesen Verbindungen zugeordnet werden. Weitere Peaks mit dieser Masse und dem gleichen Fragmentierungsmuster wurden bei t_R = 59 und 62,5 min gefunden. Diese Verbindungen liegen trotz der verhältnismäßig höheren Molekülmasse im HPLC-Chromatogramm weiter vorne, da durch den zusätzlichen Sauerstoff der Hydroxylgruppe trotz der Veresterung eine geringere Retention erfolgt.

Bei den Hydroxyingenolverbindungen gibt es nur zwei Estergruppen, wobei die 2,3-Dimethylbuttersäure wieder eine Säurekomponente ist. Bei einer Verbindung ist diese durch Benzoesäure ausgetauscht und die andere Estergruppe ist mit entweder Caprin- oder Laurinsäure eine langkettige Carbonsäure. Daraus entstehen dann die relativen Molekülmassen von $^{m}/_{z}$ 616, 644 und 650, die wiederum als Natriumaddukte auftreten und als folgende Ionen im Chromatogramm zu finden sind: $^{m}/_{z}$ 639, 667 und 673 $[M+Na]^+$. Die entsprechenden Spaltprodukte für die Abspaltung von Benzoesäure ($^{m}/_{z}$ 122) und Laurinsäure ($^{m}/_{z}$ 200) sind in Abb. 35 c) mit folgenden Fragmenten zu finden $^{m}/_{z}$ 673 $\rightarrow$ 551 / 473 $\rightarrow$ 351 $[M+Na]^+$ und konnten dem Peak bei t_R = 77,5 min zugeordnet werden.

Drei der erwarteten Verbindungen unterscheiden sich wieder nur in der Position der Ester mit den Säurekomponenten Laurinsäure ($^{m}/_{z}$ 200) und 2,3-Dimethylbuttersäure ($^{m}/_{z}$ 116), was zu Signalen bei folgenden Massen führt $^{m}/_{z}$ 667 $\rightarrow$ 551 / 467 $\rightarrow$ 351 $[M+Na]^+$ und in Abb. 35 d) zu sehen ist. In der Urtinkur konnten nur zwei dieser Verbindungen bei t_R = 82,5 und 84,7 min identifiziert werden.

Ein weiterer Hydroxyingenoldiester mit 2,3-Dimethylbuttersäure ($^{m}/_{z}$ 116) und Caprinsäure ($^{m}/_{z}$ 172) ist in Abb. 35 b) identifiziert worden und im Chromatogramm zu finden bei t_R = 72,2 und 74 min; $^{m}/_{z}$ 639 $\rightarrow$ 523 / 467 $\rightarrow$ 351 $[M+Na]^+$ (Ott, 1978).

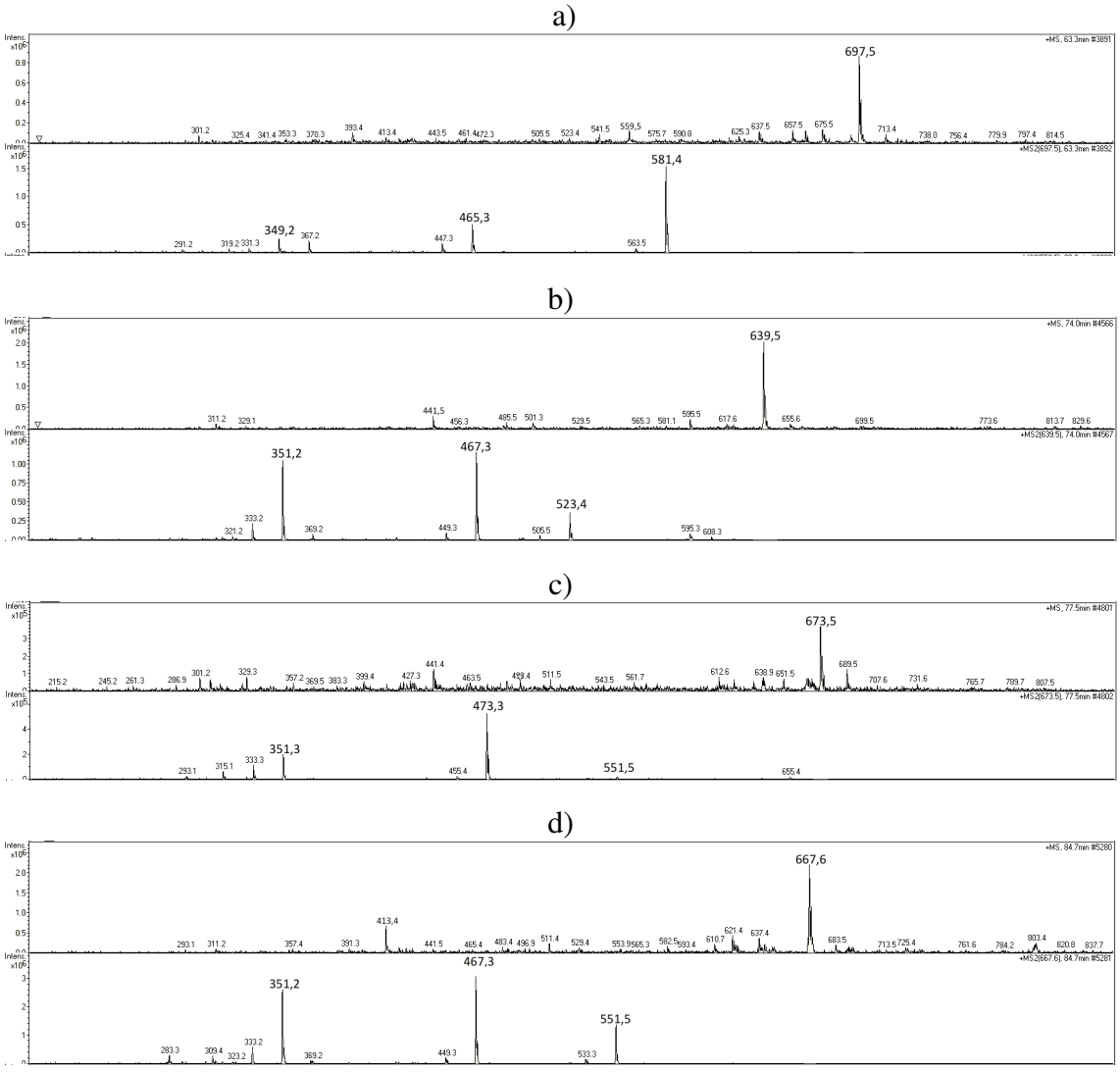


Abbildung 35: MS/MS-Spektren der Cyparissiasfaktoren aus der Euphorbia Urtinktur, wobei immer im jeweilig oberen Spektrum der Molekülpeak im einfachen MS zu sehen ist und darunter seine weiter Aufspaltung im MS/MS.
Das Spektrum a) zeigt den bei $t_R = 63{,}3$ min gefundenen Dihydroxyingeolester mit zweimal 2,3-Dimethylbuttersäure und der Fragmentierung $^{m}/_{z}$ 697 → 581 / 465 → 349 $[M+Na]^+$. Darunter sind die Spektren b), c) und d) der drei identifizierten Hydroxyingenolester bei $t_R = 74{,}0$ min; 77,5 min und 84,7 min. Spektrum b) zeigt den Ester mit Caprinsäure und 2,3-Dimethylbuttersäure mit dieser Fragmentierung $^{m}/_{z}$ 639 → 523 / 467 → 351 $[M+Na]^+$; c) mit Laurinsäure und Benzoesäure $^{m}/_{z}$ 673 → 551 / 473 → 351 $[M+Na]^+$; d) zeigt den Hydroxyingenolester der Laurinsäure und 2,3-Dimethylbuttersäure $^{m}/_{z}$ 667 → 551 / 467 → 351 $[M+Na]^+$.

Im UV-Chromatogramm sind die Peaks der einzelnen Cyparissiasfaktoren kaum zu erkennen und durch die heterogene Zusammensetzung der Urtinktur kann man keine sauber getrennten Peaks zuordnen. Die einzelnen Ingenolester befinden sich aufgrund der recht unterschiedlichen Polarität weit verteilt über einen breiten Bereich des Chromatogramms. Somit treten die Cyparissasfaktoren nicht in einem bestimmten Bereich auf und die Euphorbia Urtinktur ist nicht ohne weiteres zugänglich für eine reine HPLC-UV-Quantifizierungsmethode.

Eine Hydrolyse und die Analyse der Grundalkohole würde hier durch das Vorliegen vieler hydrophilen Verbindungen in der Urtinktur nicht leicht zu realisieren sein. Die Flavonole mit ihrem sehr gutem Chromophor und damit starker UV-Absorption überragen den Rest des Chromatogramms. Durch eine Probenvorbereitung mittels SPE könnten diese Verbindungen leicht von dem Rest abgetrennt werden. Dies wurde bei dieser Analyse nicht getan, um einen eventuell damit verbundenen Verlust interessanter Inhaltstoffe im hydrophilen Bereich zu vermeiden.

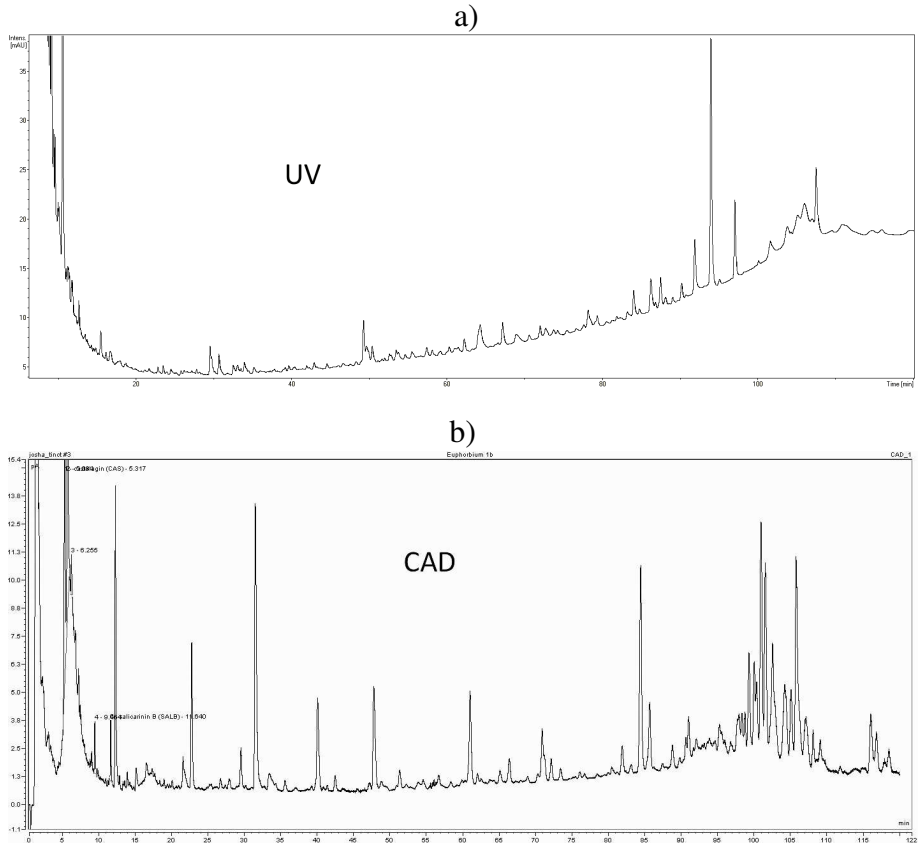


Abbildung 36: a) Zeigt das UV-Chromatogramm von Euphorbia Urtinktur bei 280 nm
b) Zeigt das CAD-Chromatogramm wobei die wahren, vom Chromophor der Substanzen unabhängigen Mengenverhältnisse in der Urtinktur dargestellt werden.

Wie auch bei der Croton Urtinktur wurde die Euphorbia Urtinktur zusätzlich noch mit dem CAD-Detektor analysiert. Dabei wurden die wahren Verteilungsverhältnisse der Inhaltsstoffe deutlich, wobei aber auch dort für die Ingenolester keine deutlicheren Signale zugeordnet werden konnten.

Im Massenspektrometer konnten die den Cyparissiasfaktoren entsprechenden Signale in einem recht weiten Bereich des Chromatogramms gefunden werden. Dabei waren die zugehörigen UV-Peaks der Diterpenester relativ schwach ausgeprägt und zum Teil von anderen Peaks überlagert. Damit ist eine Quantifizierung über die HPLC-UV-Methode für die Bestimmung des Gesamtgehalts nicht geeignet.

In der Literatur konnte bis auf die ausführliche Arbeit zur Identifikation der Ingenolester

von Ott (1978) keine weitere Beschreibung der Diterpenester aus *Euphorbia cyparissias* L. gefunden werden. Es gibt Untersuchungen zu ähnlichen Ingenolestern aus anderen Euphorbiaceen.

Da diese Untersuchungen schon einige Jahre zurück liegen und in dieser Arbeit keine geeignete Methode für Euphorbia Urtinktur gefunden werden konnte, ist eine genaue Analyse mit modernen Verfahren weiterhin ausstehend. Es konnten anhand der MS/MS-Daten einige der beschriebenen Verbindungen identifiziert werden, aber für eine genaue Beschreibung wäre eine Isolation mit anschließender NMR-Analyse notwendig.

4.7.3 Jatropha Urtinktur

Die 12-Desoxy-16-hydroxyphorbolester aus *Jatropha curcas* L. stellen eine besondere Herausforderung bei der Analyse dar, da sie im Gegensatz zu den Verbindungen aus *Croton tiglium* L. nur sehr schlecht im UV absorbieren und selbst im MS schlecht detektierbar sind. Die äußerst geringe Ionisierbarkeit dieser Verbindungen macht sie für eine Analyse im klassischen Massenspektrometer schwer zugänglich.

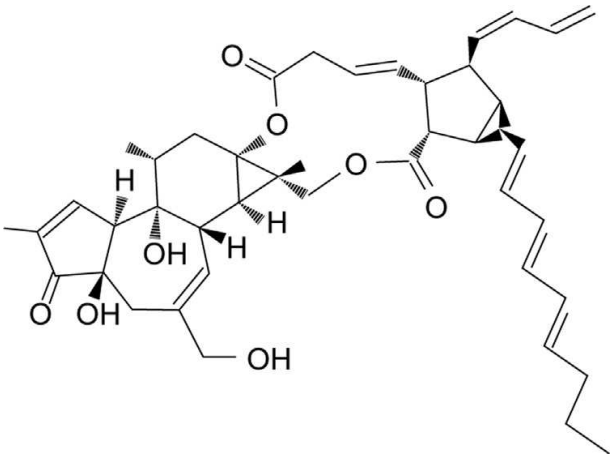


Abbildung 37: Strukturformel des Jatrophafaktors C2: 12-deoxy-16-hydroxyphorbol-4'-[12'14'-butadienyl]-6'-[16',18',20'-nonatrienyl]-bicyclo[3.1.0]hexane-(13-O)-2'-[carboxylate]-(16-O)-3'-]-8'-butenoic-10']ate oder kurz DHPB (Nakao *et al.*, 2014). Alle Phorbolester aus *Jatropha curcas* L. haben die gleiche Molekülmasse von 710 und eine sehr ähnliche Struktur. Dadurch sind sie sich im MS nicht zu unterscheiden.

Dies machte nach den nicht zufriedenstellenden Aufnahmen mit dem Iontrap-LCMS in Warschau eine erneute Analyse auf einem hochauflösenden Massenspektrometer in der MS Core Facility des Fachbereichs notwendig, um eine genaue Identifizierung der Substanzen in der Urtinktur zu realisieren. Dort konnten die Phorbolester im positiven sowie im negativen MS anhand ihrer charakteristischen Spaltprodukte und den entsprechenden Molekülpeaks identifiziert werden.

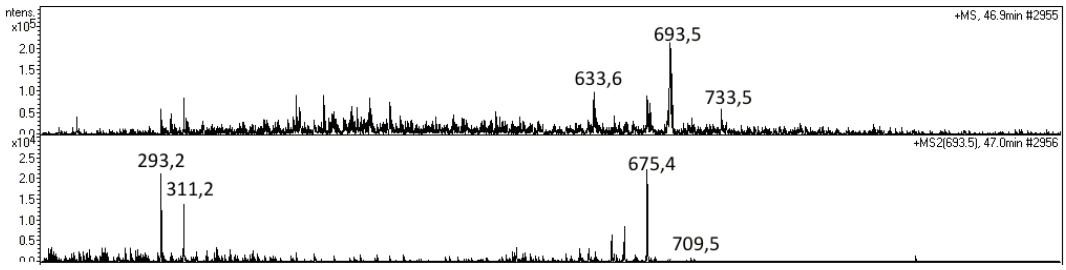


Abbildung 38: MS/MS-Spektrum im Postivmodus von dem Hauptpeak der Jatrophafaktoren. Durch einen Wasserverlust aus dem Molekül entsteht das domnierende Ion bei $^{m}/_{z}$ 693 $[M+H]^+$, aber es war auch das Natriumaddukt des Molekülions zu finden $^{m}/_{z}$ 733 $[M+Na]^+$. Im MS/MS-Spektrum treten einmal das Ion durch einen weitern Wasserverlust bei $^{m}/_{z}$ 675 $[M+H]^+$ und die dem Phorbol nach Abspaltung der Ester und OH-Gruppe entspechenden Ionen $^{m}/_{z}$ 311 und 293 $[M+H]^+$.

Wie in Abb. 38 dargestell waren im positiven Massenspektrum die erwarteten Massen des Natriumaddukts der Jatrophafaktoren mit $^{m}/_{z}$ 733 $[M+Na]^+$ und das entsprechende Molekülion $^{m}/_{z}$ 711 $[M+H]^+$ nur sehr schlecht zu finden. Jedoch war das Ion nach der Abspaltung eines Wassermoleküls $^{m}/_{z}$ 693 $[M+H]^+$ bei den untersuchten Peaks mit einem starken Signal zu finden. Durch einen weiteren Wasserverlust entstand das detktierbare Ion bei $^{m}/_{z}$ 675 $[M+H]^+$. Die für das Phorbol nach der Abspaltung der Ester und Hydroxylgruppen typischen Fragmente bei $^{m}/_{z}$ 311 und 293 $[M+H]^+$ wurden ebenfalls für diese Peaks gefunden. Nishshanka *et al.* (2016) beschreibt ebenfalls diese Ionen für die MS-Detektion der Phorbolester, dagegen konnten die weiteren bei Gaudani *et al.* (2009) und Liu *et al.* (2013) beschriebenen Ionen nicht gefunden werden (Gaudani *et al.* (2009): $^{m}/_{z}$ 391, 225, 331; 524; 618; 635; 761; 787 und Liu *et al.* (2013): $^{m}/_{z}$ 337.3; 533.1; 647.4; 691.3).

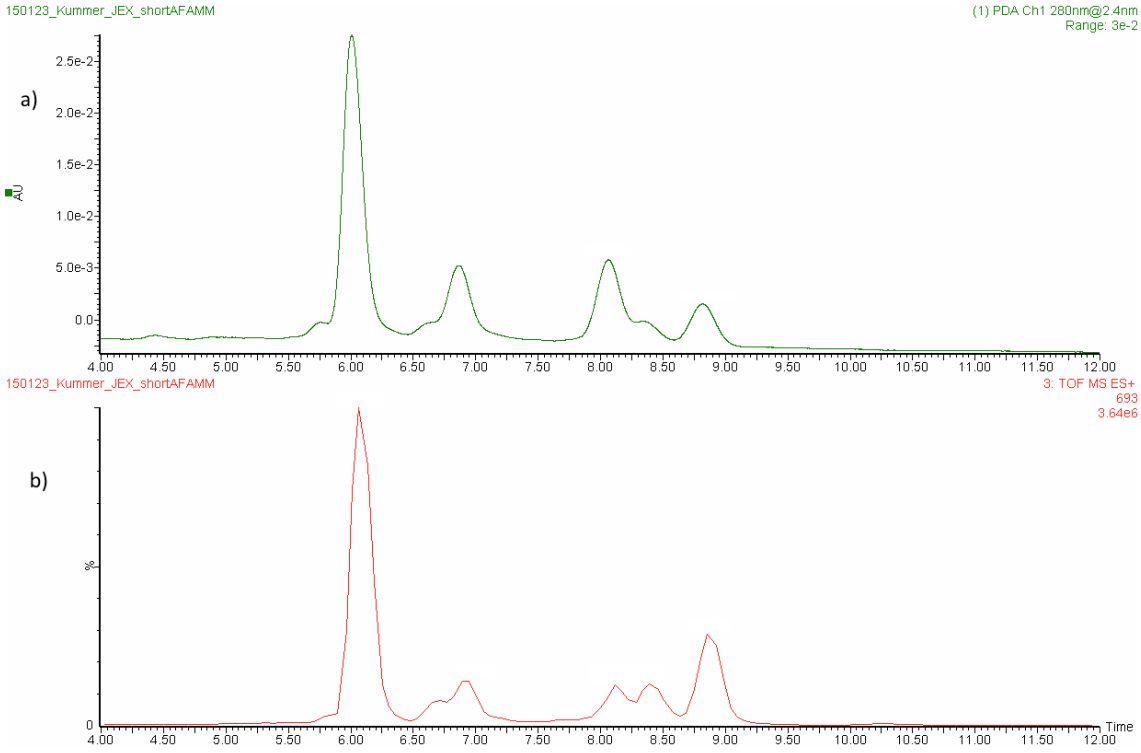


Abbildung 39: a) UV-Chromatogramm bei 280 nm und b) das Ionen-Chromatogramm im positiven MS bei $^{m}/_{z}$ 693 für die Jatrophafaktoren zeigen das deckungsgleiche Übereinanderliegen der Peaks. Damit sind alle Peaks in diesem Bereich als Phorbolester.

Abb. 39 zeigt die HPLC-MS-Analyse bei isokratischer Elution mit dem Ionenchromatogramm für $^{m}/_{z}$ 693 $[M+H]^+$und dem entsprechenden UV-Chromatogramm bei 280 nm. Daraus wird deutlich, dass alle im UV sichtbaren Peaks in dem Bereich den Jatrophafaktoren entsprechen und somit der Gesamtgehalt an Phorbolester über die Gesamtfläche in diesem Retentionsbereich erfolgen konnte.

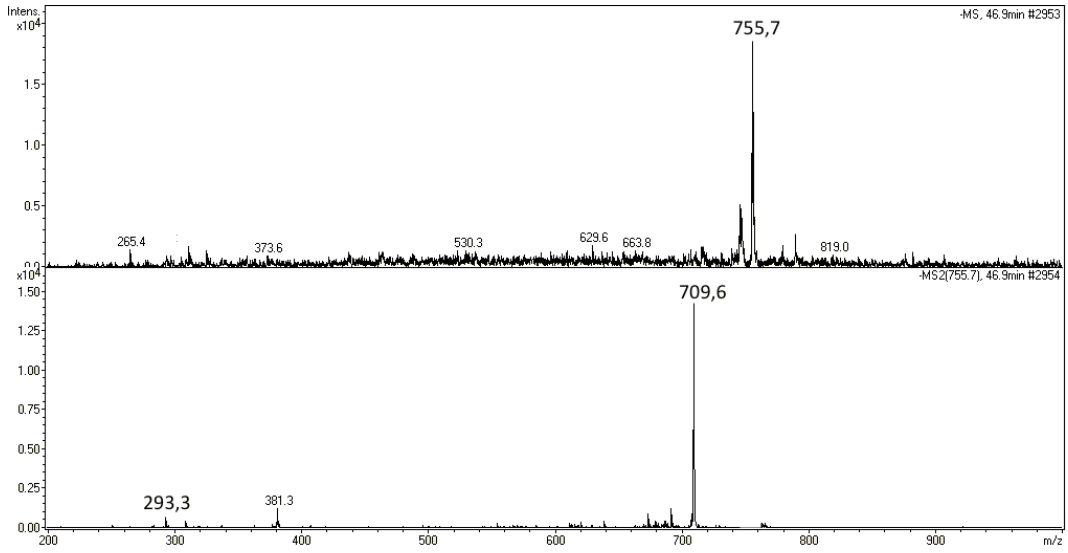


Abbildung 40: MS/MS-Spektrum im Negativmodus von dem Hauptpeak der Jatrophafaktoren als Formiataddukt mit einer Masse von $^{m}/_{z}$ 755 [M+CHOO]$^{-}$. Als charkteristische Ionen treten das dem Molekülpeak entsprechende Ion$^{m}/_{z}$ 709 [M-H]$^{-}$ und das dem Phorbol nach der Abspaltung der Ester zuzuordnende Ion bei $^{m}/_{z}$ 293 [M-H]$^{-}$. Es diente zur Identifikation der Verbindungen aus der Urtinktur, nach der in Anschnitt 3.6.2 beschriebenen Methode. Aufgrund der gleichen relativen Molekülmassen für alle Jatrophafaktoren, kann hier allein durch die MS-Daten keine weiter Zuordnung erfolgen. Für eine genaue Identifikation der einzelnen Verbindungen wäre eine NMR-Analyse notwendig.

Durch die Untersuchungen im Negativmodus konnten bereits auf der Iontrap-LCMS-Anlage der Hautpeak der Phorbolester den charakteristischen Ionen zugeordnet werden. Die erfolgte Elution in dem von Makkar *et al.* (1998) beschriebenen Gradientensystem und konnte daher nicht direkt mit der später genutzen isokratischen Elution verglichen werden. Wie in Abb. 40 dargestellt, kam es dabei im negativen Massenspektrum zu einem Addukt von Formiat mit einer Masse von $^{m}/_{z}$ 755 [M+CHOO]$^{-}$. Das entsprechende MS/MS-Spektrum wies den Molekülpeak von $^{m}/_{z}$ 709 [M-H]$^{-}$ als größtes Fragment auf.

Die isokratische Elution wurde später auf der Shimadzu HPLC-UV-Anlage ausgehend von der Methode von Wang *et al.* (2012) ausgearbeitet und dann auf die UHPLC-MS/MS-Anlage der MS Core Facility übertragen, was in Abb. 39 dargestellt ist. Die gleichen Ergebnisse, der wie oben beschrieben sowie in Abb. 40 und 38 dargestellten MS/MS-Analysen, wurden bei den Untersuchungen in der MS Core Facility für alle Peaks im erwarteten Retentionsbereich der isokratischen Elution erzielt.

Es konnte also für alle Peaks aus Abb. 29, die bei der isokratischen Methode mit 75 % Acetonitril in Wasser zwischen 6 und 12 Minuten in einem charakteristischen Muster eluieren, gezeigt werden, dass es sich dabei um die Jatrophafaktoren handelt. Damit konnten für die Quantifizierung die Peakflächen in dem Bereich aufsummiert und ein Gesamtgehalt als TPA-Äquivalente ermittelt werden.

Aufgrund des mittlerweile in den tropischen Regionen relativ weit verbreiteten Anbaus

von *Jatropha curcas* L. zur Gewinnung von Biotreibstoff aus dem fetten Öl der Jatrophasamen, wurde zu den darin enthaltenen Phorbolestern sowie deren Quantifizierung in der Literatur, im Vergleich zu Croton und Euphorbia, deutlich mehr publiziert. Besondes zwei Arbeitsgruppen haben sich mit der Thematik Jatropha und der quantitative Bestimmung von den enthaltenen Phorbolestern befasst (Makkar *et al.*, 2008; Devappa *et al.*, 2013a). Die Arbeiten zur Detoxifizierung wurde bereits in der Diskussion in Abschnit 4.6.3 besprochen.

Zu der Analyse der Phorbolester aus *Jatropha curcas* L. mithilfe von HPLC-MS/MS-Methoden gibt es auch einige aktuellen Veröffentlichungen (Liu *et al.*, 2013; Baldini *et al.*, 2014; Nishshanka *et al.*, 2016). Daher war die Datenlage zu diesen Verbindungen und deren qualitative Bestimmung viel umfangreicher als bei den anderen beiden Urtinkturen. Jedoch konnten einige der dort beschriebenen Analysenergebnisse nicht einfach nachvollzogen werden und es musste eine neue Methode auf den in dieser Arbeit genutzten Instrumenten entwickelt werden.

Es wurden außerdem in den vergangenen Jahren einige Übersichtsartikel von Devappa *et al.* (2010); Wakandigara *et al.* (2013) und Abdelgadir & Staden (2013) mit einer detaillierten Beschreibung der toxischen Inhaltsstoffe sowie der ethnomedizinischen Verwendung von *Jatropha curcas* L. veröffentlicht.

Um das pharmazeutische Potenzial der, bei der Detoxifizierung von Jatropha Samenmehl extrahierten, 12-Desoxy-16-hydroxyphorbolester zu nutzen, wurden von Devappa *et al.* (2013b) Untersuchungen durchgeführt, wobei eine Umsetzung zu Crotophorbolon und dann zu Prostatin (12-Desoxyphorbol-13-acetat) erfolgte, welches eine hohe biologische Aktivität besitzt und weitestgehend untoxisch ist.

4.8 Qualitativer Vergleich von Urtinkturen und Extrakten aus Crotonsamen mittels HPLC-UV

Es wurden die unterschiedlichen Urtinkturen und die aus den Samendrogen selbst hergestellten Extrakte zum relativen Vergleich ihrer Inhaltstoffe auf der analytischen HPLC untersucht. Dafür wurden sie über das HPLC-System 8 mit einem langen, flachen Gradienten aufgetrennt und im UV bei 254 nm detektiert. Ihr Chromatogramme wurden zum Vergleich ihrer Muster und der Intensität einzelner Peaks herangezogen.

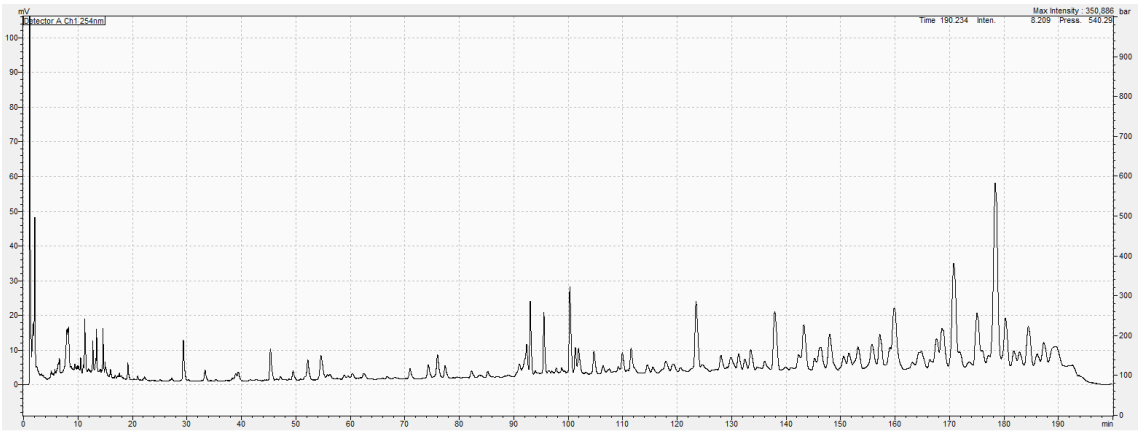
Die Extrakte können nicht direkt mit den Urtinkturen verglichen werden, da für die Herstellung Methanol als Lösungsmittel diente. Die Urtinkturen sind wässrig-ethanolische Auszüge und haben deshalb gerade im hydrophilen Bereich eine andere Zusammensetzung. Für den Vergleich im weniger polaren Bereich der Phorbolester spielt der Unterschied der beiden Lösungsmittel keine so entscheidende Rolle, so dass die Extrakte und Urtinkturen verglichen werden konnten.

Es ist deutlich ein Unterschied zwischen den Urtinkturen von den Firmen Dr. Reckeweg und DHU zu erkennen, denn bei den beiden Chargen von Dr. Reckeweg gibt es einen deutlich größeren Anteil an hydrophilen Verbindungen im Anfangsbereich des Chromatogramms. Die Peaks dort im Bereich zwischen einer Retentionszeit von 5 und 15 Minuten sind deutlich größer als bei den restlichen Chromatogrammen.

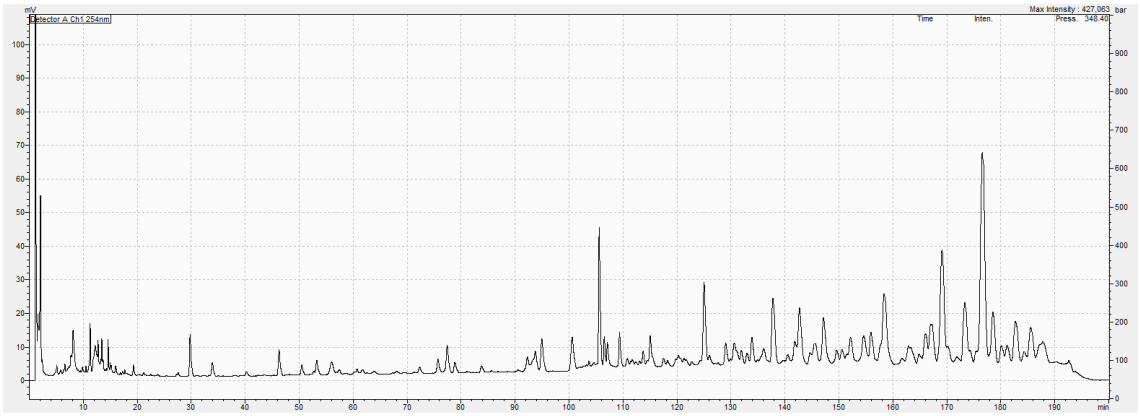
Die Extrakte aus den Samendrogen sind im lipophilen Bereich des Chromatogramms relativ gut vergleichbar, aber im mittelpolaren Bereich kommt es hier doch zu relativ unterschiedlichen Ausprägungen der Peaks. Dabei fällt besonders der Bereich zwischen den Retentionszeiten 90 und 130 Minuten auf. Hier findet man viele Diester und auch den TPA-Peak zwischen 100 und 110 Minuten. Es kam durch unzureichende Äquilibrierung und einem Wechsel der Säule zu einem leichten Unterschied der Retentionszeiten im mittelpolaren Bereich, so dass ein direkter Vergleich anhand der Zeit nicht möglich ist. Durch das gleiche Peakmuster kann man aber wieder die einzelnen Peaks zuordnen und untereinander vergleichen.

Die beiden Chargen der Urtinkturen von der Firma DHU zeigen schon sehr deutlich unterschiedliche Intensitäten der Peaks in ihren Chromatogrammen. Dies wurde auch aus den sehr unterschiedlichem Gesamtgehalt der Phorbolester bei der quantitativen Bestimmung deutlich. Bei so unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen wird deutlich, wie wichtig es ist, eine geeignete Gehaltsbestimmung in eine Arzneibuchmonographie einzubeziehen.

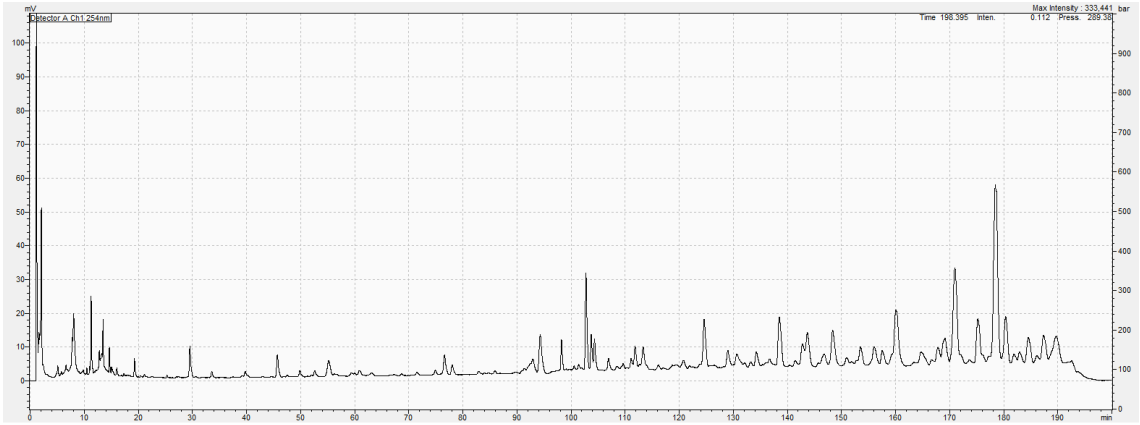
Extrakte



Croton Extrakt Dr. R. Charge: 22277

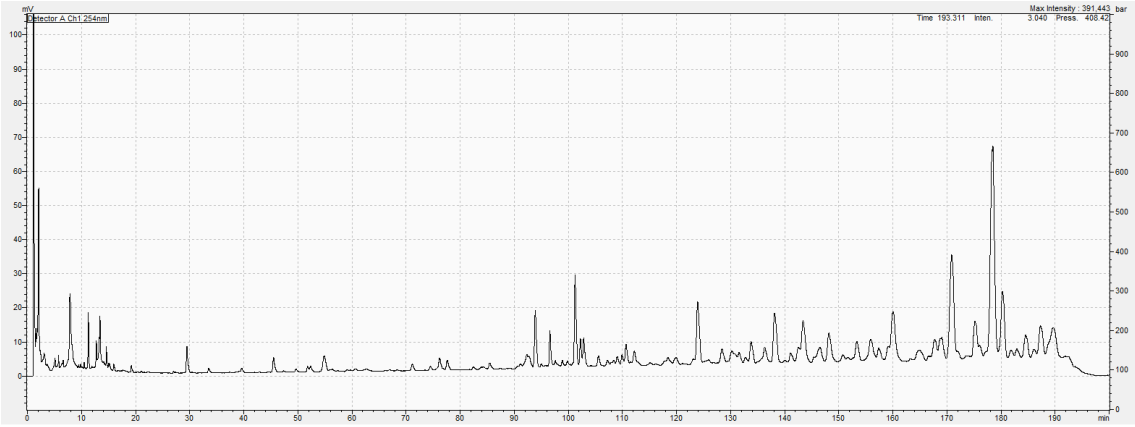


Croton Extrakt Dr. R. Charge: 22464

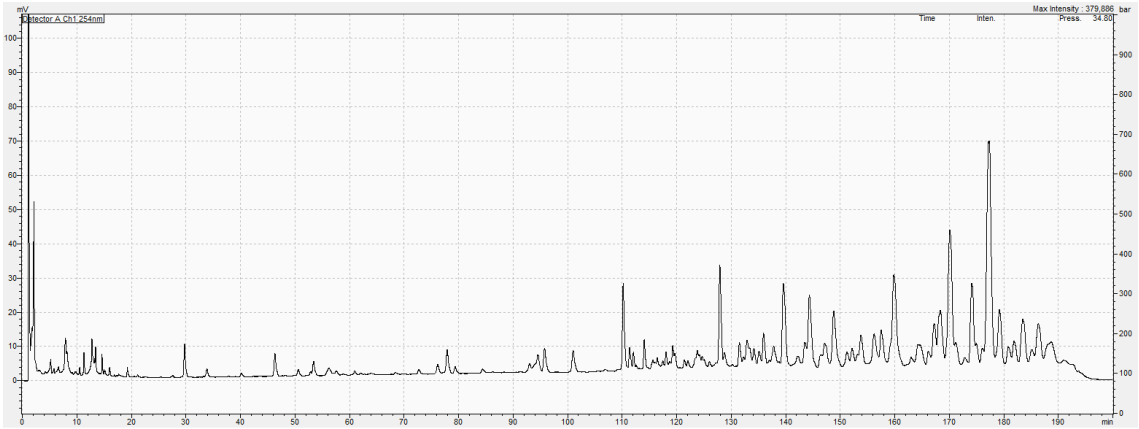


Croton Extrakt Dr. R. Charge: 22747

Abbildung 41: UV-Chromatogramme bei 254 nm von den Extrakten aus Crotonsamen der Chargen 22277, 22464 und 22747 von Dr. Reckeweg nach der in Abschnitt 3.8 beschriebenen Methode.



Croton Extrakt Dr. R. Charge: 22224



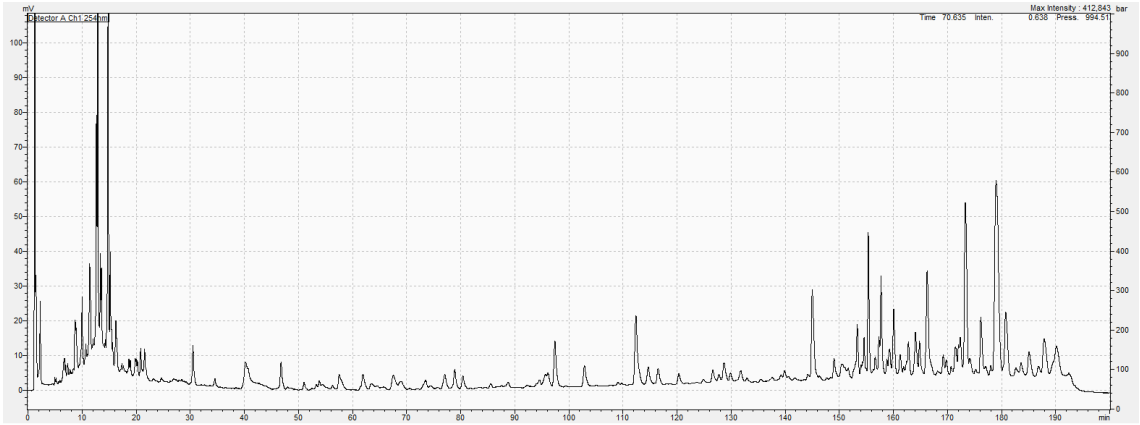
Croton Extrakt DHU Charge: D100078

Abbildung 42: UV-Chromatogramme bei 254 nm von den Extrakten aus Crotonsamen der Charge 22224 von Dr. Reckeweg und Charge D100078 von DHU nach der in Abschnitt 3.8 beschriebenen Methode.

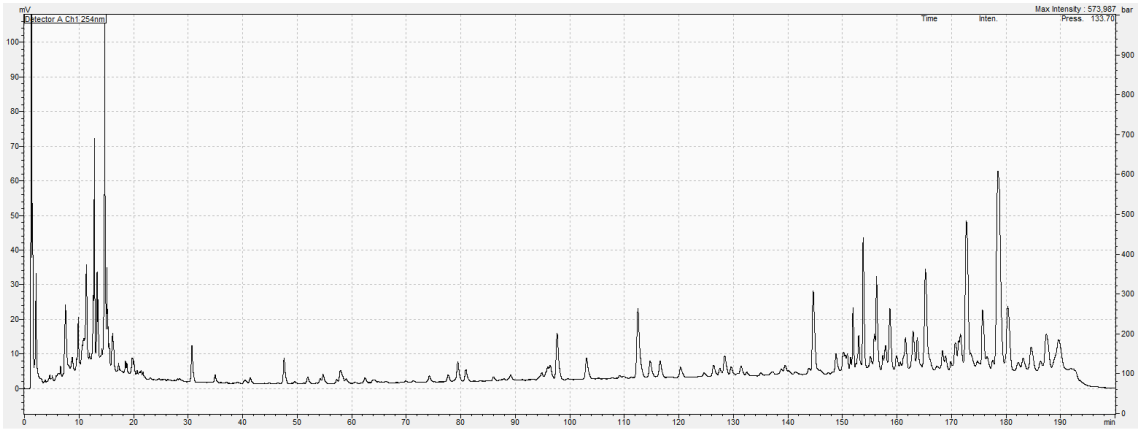
Die Extrakte aus den unterschiedlichen Samenproben weisen auf den ersten Blick nur geringfügige Unterschiede auf. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass bei den Samen von DHU gerade im hydrophilen Bereich des Chromatogramms die Signale etwas geringer ausgeprägt sind. Im hinteren, lipophilen Bereich des Chromatogramms dagegen sind die Peakintensitäten vergleichbar oder zum Teil sogar stärker ausgeprägt.

Generell kann man sagen, dass die Zusammensetzung der unterschiedlichen Samenproben vergleichbar ist, sich aber je nach Herkunft sich die quantitative Verteilung der Inhaltsstoffe unterscheidet. Da die Phorbolester in den Samen als relativ stabil anzusehen sind, ist davon auszugehen, dass es hierbei nicht durch die Lagerung der Samen zu Veränderungen kam.

Urtinkturen



Croton Urtinktur Dr. R. Charge: 1404T0001

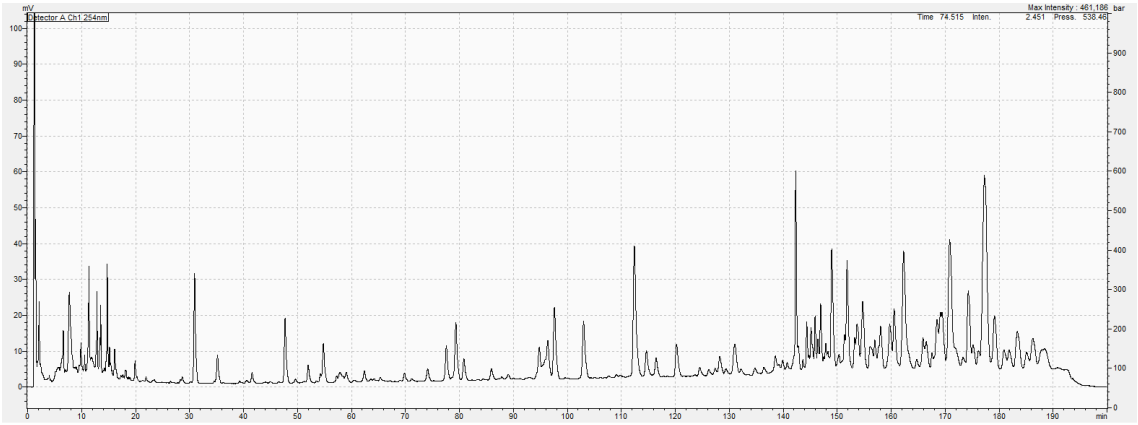


Croton Urtinktur Dr. R. Charge: 1404T0002

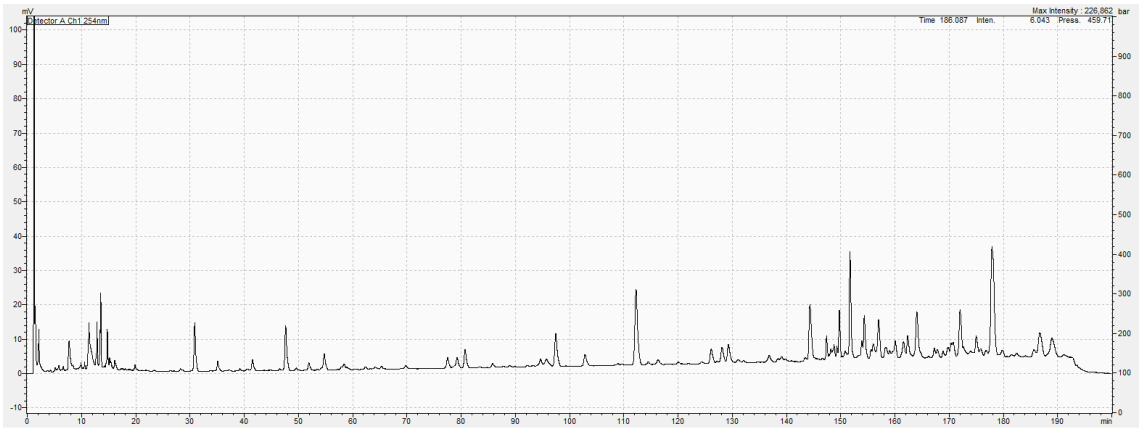
Abbildung 43: UV-Chromatogramme bei 254 nm von den Urtinkturen der Chargen 1404T0001 und 1404T0002 von Dr. Reckeweg nach der in Abschnitt 3.8 beschriebenen Methode.

Bei den beiden Urtinkturen von Dr. Reckeweg sind im hydrophilen Bereich der Chromatogramme im Vergleich zu den Urtinkturen von DHU deutlich stärkere Signale zu sehen. Da alle Urtinkturen laut HAB Vorschrift 4a mit 86 % Ethanol durch Mazeration hergestellt werden, ist davon auszugehen, dass es am Ausgangsmaterial liegen muss. Man kann auch schon bei den eigenen methanolischen Extrakten einen höheren Anteil an hydrophilen Bestandteilen beobachten, aber durch die geringere Hydrophilie des Lösungsmittels wird dies im methanolischen Extrakt nicht so deutlich wie bei den Urtinkturen.

Die Urtinkturen entsprechen laut Analysezertifikat von Dr. Reckeweg nicht den Spezifikationen des HAB in Hinblick auf Trockenrückstand und Gehalt. Sie wurden nur zum Forschungszweck bereitgestellt, da sie für die Herstellung von Verdünnungen nach HAB als nicht geeignet gelten. Man kann aber nach der Analyse dieser Urtinkturen aber sagen, dass diese Spezifikationen keine Aussage über den Gehalt der Phorbolester ermöglicht, denn dieser war mit den Urtinkturen von DHU vergleichbar.



Croton Urtinktur DHU Charge: 102



Croton Urtinktur DHU Charge: 103

Abbildung 44: UV-Chromatogramme bei 254 nm von den Urtinkturen der Chargen 102 und 103 von DHU nach der in Abschnitt 3.8 beschriebenen Methode.

Vergleicht man die beiden Chargen der von DHU bezogenen Urtinkturen, so weisen sie doch recht große Unterschiede in der Ausprägung der Signale auf. Das Peakmuster der Chromatogramme ist sehr ähnlich, doch ist bei gleichem Injektionsvolumen der Urtinkturen bei der neuen Charge 103 eine deutlich geringere Intensität zu beobachten. Da die Charge 102 schon über einen sehr langen Zeitraum von etwa 3 Jahren für die Untersuchung verwendet wurde, kann es im Laufe der Zeit zu einer Aufkonzentrierung durch das Abdampfen von Lösungsmittel gekommen sein. Das sollte aber nur in einem geringen Ausmaß stattgefunden haben, da die Urtinkturen gut verschlossen im Kühlschrank gelagert wurden.

Durch die lange Lagerung lässt sich hier auch eine Aussage über die Stabilität der Urtinktur treffen, denn es ist zu keinen ersichtlichen Veränderungen im Peakmuster gekommen und somit sind die enthaltenen Phorbolester unter den Lagerungsbedingungen über Jahre weg als stabil zu betrachten.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von homöopathischen Urtinkturen und Extrakten aus ausgewählten Euphorbiaceen, welche im besonderen Hinblick auf die enthaltenen hautreizenden und tumorpromovierenden Diterpenester von Interesse sind.

Die monographische Beschreibung dieser Urtinkturen im Europäischen Arzneibuch macht es notwendig, eine einfach durchzuführende Methode zur Quantifizierung dieser Inhaltsstoffe zu entwickeln, um das von ihnen ausgehende Gefährdungspotenzial einschätzen zu können.

Es wurden hierfür Urtinkturen und Extrakte aus den Samen von *Croton tiglium* L. und *Jatropha curcas* L. zunächst qualitativ untersucht, um eine genaue Beschreibung von den enthaltenen Phorbolestern vorzunehmen.

Mithilfe der UHPLC-MS/MS-Analysen konnten die enthaltenen Inhaltsstoffe identifiziert werden, wobei in der Urtinktur und den Extrakten aus Crotonsamen eine Vielzahl zuvor nicht beschriebener Phorbolesterderivate gefunden wurden. In der Urtinktur sowie den Extrakten aus *Jatropha curcas* L. konnten die bereits in der Literatur beschriebenen Jatrophafaktoren 1-6 identifiziert werden.

Wegen der hohen Anzahl unterschiedlicher Phorbolester in der Croton Urtinktur wurde eine Quantifizierung über die Diterpen-Grundalkohole nach einer Hydrolyse gewählt. Die zunächst durchgeführte enzymatische Spaltung der Ester führte nicht zu zufrieden stellenden Ergebnissen.

Die gewählte Methode zur Quantifizierung nach alkalischer Hydrolyse der Phorbolester wurde durch eine externe Kalibrierung als TPA-Äquivalente validiert. Die Standardsubstanz wird dabei dem gleichen Hydrolyseprozess unterzogen und es wird über ihre Spaltprodukte kalibriert.

Für die Jatropha Urtinktur wurde ebenfalls eine Quantifizierung der Phorbolester in der Summe als TPA-Äquivalente gewählt, wobei die gesamten Peakflächen der Jatrophafaktoren im Chromatogramm aufsummiert und zusammen gegen den externen Standard TPA berechnet wurden.

In der untersuchten Urtinktur aus *Euphorbia cyparissias* L. konnten die aus der Literatur bekannten Ingenolester identifiziert werden, aber aufgrund der heterogenen Zusammensetzung konnte hier keine zufriedenstellende Methode für die Quantifizierung gefunden werden.

Mit der entwickelten Methode konnte für vier unterschiedliche Chargen der Croton Urtinktur sowie für fünf selbst hergestellte Extrakte aus unterschiedlichen Samenproben ein Vergleich in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Phorbolester erreicht werden. Zwei Chargen der Jatropha Urtinktur wurden zusammen mit den eigenen Extrakten über die beschriebene Methode quantifiziert und verglichen.

Summary

The present work deals with the analysis of homeopathic mother tinctures and extracts from selected Euphorbiaceae, which are of particular interest in terms of the skin-irritating and tumor-promoting properties of the containing diterpene esters.

The monographic description of these mother tinctures in the European Pharmacopeia necessitates the development of an easy method for the quantification of these compounds estimating their risk potential.

For this purpose, we have qualitatively analysed mother tinctures and extracts from the seeds of *Croton tiglium* L. and *Jatropha curcas* L. to get a precise description of the phorbol esters contained therein.

By means of UHPLC-MS/MS analysis we were able to identify the contained compounds. In both the mother tincture and the extracts from croton seeds a lot of phorbol ester derivatives not yet described were found. In the mother tincture from *Jatropha curcas* L. we could identify the jatropha factors 1-6 already described in the literature.

Due to the high amount of different phorbol esters in the croton mother tincture quantification of the basic diterpene alcohols after hydrolysis was the chosen method. Initially, it was attempted to perform an enzymatic decomposition of the esters; this approach, however, did not work out satisfactorily.

The choosen method for quantification after alkaline hydrolysis of the phorbol esters was validated by means of external calibration as TPA-equivalents. The standard substance was treated with the same process of hydrolysis and the calibration over the decomposition products.

For the jatropha mother tincture, quantification of the phorbol esters as total ammount of TPA-equivalents was chosen. The sum of the peak areas of the jatropha factors was calculated by means of an external standard TPA.

In the examined mother tincture of *Euphorbia cyparissias* L. the ingenol esters already described in the literature could be identified. However, due to the heterogeneous composition, we were unable to find a satisfactory method for the quantification.

The developed method facilitated a comparision of the quantitative and qualitative phorbol ester compositions of the four different croton mother tinctures and the five extracts from croton seeds. The two jatropha mother tinctures were compared with an own extract by means of the described quantification method.

Literatur

Abdelgadir, H., & Staden, J. V.: Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of jatropha curcas l. (euphorbiaceae) - a review, *South African Journal of Botany*, 88, (2013), 204 – 218.

Baldini, M., Ferfuia, C., Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Pascali, J., Piasentier, E., & Franceschi, L.: Determination of phorbol esters in seeds and leaves of jatropha curcas and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Industrial Crops and Products*, 59, (2014), 268 – 276.

Bertolini, T. M., Giorgione, J., Harvey, D. F., & Newton, A. C.: Protein kinase c translocation by modified phorbol esters with functionalized lipophilic regions, *The Journal of Organic Chemistry*, 68(13), (2003), 5028 – 5036.

botanikus.de: *http://www.botanikus.de/Botanik3/Ordnung/Wolfsmilch/wolfsmilch.html*, Webseite, (2015), zuletzt aufgerufen 10.11.2015.

DAB: *Deutsches Arzneibuch*, 5. Ausgabe, Berlin: R.v. Deckers Verlag G. Schenk, 1910.

de Jussieu, A. L.: Euphorbiae classis xv, *Genera Plantarum*, Ordo I., (1789), 384–385.

Devappa, R. K., Bingham, J.-P., & Khanal, S. K.: High performance liquid chromatography method for rapidquantification of phorbol esters in jatropha curcas seed, *Industrial Crops and Products*, 49, (2013a), 211 – 219.

Devappa, R. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K.: Jatropha toxicity - a review, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 13(6), (2010), 476–507.

Devappa, R. K., Malakar, C. C., Makkar, H. P., & Becker, K.: Pharmaceutical potential of phorbol esters from jatropha curcas oil, *Natural Product Research*, 27(16), (2013b), 1459 – 1462.

Dixon, R. W., & Peterson, D. S.: Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging, *Analytical Chemistry*, 74(13), (2002), 2930–2937.

Dolan, J.: Chromatographic measurements, part 5: Determining lod and loq based on the calibration curve, *www.sepscience.com*, PDF, (2015), zuletzt aufgerufen 21.11.2015.

Duke, J. A.: Handbook of energy crops, *http://hort.purdue.edu/newcrop*, Webseite, (1983), zuletzt aufgerufen 06.11.2015.

EDQM: Guide for the elaboration of monographs on homoeopathic preparations, *European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare - http://www.edqm.eu*, PDF, (2013), zuletzt aufgerufen 07.03.2016.

EMA: Picato assessment report, *European Medicines Agency - Committee for Medicinal Products for Human Use - http://www.ema.europa.eu*, PDF, (2012), zuletzt aufgerufen 10.11.2015.

Gaudani, H., Gupta, M., Gupta, N., Trivedi, S., Patil, P., Gupta, G., K., V. K., P., R. M., D., S. B., & R., R. M.: Isolation and characterization of phorbol esters (toxin) from the jatropha curcas l, *International Journal of Microbiology Research*, 1(1), (2009), 1–7.

GIT-Labor.de: Systemoptimierung: Core-shell trennleistungen auf konventionellen hplc-systemen, *http://www.git-labor.de/applikationen/chromatographie/systemoptimierung-core-shell-trennleistungen-auf-konventionellen-hplc-*, Webseite, (2015), zuletzt aufgerufen 24.11.2015.

Gläser, S.: *Untersuchungen zu einem möglichen Gesundheits- und Krebsrisiko durch pflanzliche Arzneimittel sowie industriell genutzte Rohstoffe aus Euphorbiaceen - quantitative Bestimmung von irritierenden und tumorpromovierenden Diterpenestern und Evaluierung durch biochemische und biologische Tests*, Doktorarbeit, Universität Heidelberg, 1991.

Gläser, S., Sorg, B., & Hecker, E.: A method for quantitative determination of polyfunctional diterpene esters of the tigliane type in croton tiglium, *Planta Medica*, 54(6), (1988), 580.

Gogoi, R., Niyogi, U. K., & Tyagi, A. K.: Reduction of phorbol ester content in jatropha cake using high energy gamma radiation, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(3), (2014), 305 – 309.

Guedes, R. E., de Almeida Cruz, F., de Lima, M. C., Sant'Ana, L. D., Castro, R. N., & Mendes, M. F.: Detoxification of jatropha curcas seed cake using chemical treatment: Analysis with a central composite rotatable design, *Industrial Crops and Products*, 52, (2014), 537 – 543.

Haas, W., Sterk, H., & Mittelbach, M.: Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of jatropha curcas, *Journal of Natural Products*, 65(10), (2002), 1434–1440.

HAB: *Homöopathisches Arzneibuch*, Amtliche Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag, Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag, 2014.

Hager, H., Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., & Schulz, V.: *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2007.

Hänsel, R., & Sticher, O.: *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, 8. überarbeitete und aktualisierte Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007.

Hecker, E.: Cocarcinogenic principles from the seed oil of croton tiglium and from other euphorbiaceae, *Cancer Research*, 28, (1968), 2338 – 2348.

Hecker, E., & Schmidt, R.: Phorbolesters - the irritants and cocarcinogens of croton tiglium l., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 31, (1974), 377 – 467.

Heel: Sieben spezialisten bei erkältung, *http://www.heel.de/Heel-de-F-d-M-Broschuerendownload.html?ActiveID=10006922*, PDF, (2016), zuletzt aufgerufen 29.03.2016.

Hidayat, C., Hastuti, P., Wardhani, A. K., & Nadia, L. S.: Method of phorbol ester degradation in jatropha curcas l. seed cake using rice bran lipase, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(3), (2013), 372 – 374.

homoeopathiewelt.com: *http://www.homoeopathiewelt.com/einzelmittel/croton-tiglium/*, Webseite, (2015), zuletzt aufgerufen 09.11.2015.

ICH: Validation of analytical procedures: Text and methodology, *ICH Q2(R1)*, PDF, (2005), zuletzt aufgerufen 14.12.2015.

Idris, A., & Bukhari, A.: Immobilized candida antarctica lipase b: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis, *Biotechnology Advances*, 30(3), (2012), 550 – 563.

Jing, L., Fang, Y., Ying, X., Wenxing, H., Meng, X., Syed, M. N., & Fang, C.: Toxic impact of ingested jatropherol-i on selected enzymatic activities and the ultrastructure of midgut cells in silkworm, bombyx mori l., *Journal of Applied Entomology*, 129(2), (2005), 98–104.

Juhl, P., Doderer, K., Hollmann, F., Thum, O., & Pleiss, J.: Engineering of candida antarctica lipase b for hydrolysis of bulky carboxylic acid esters, *Journal of Biotechnology*, 150(4), (2010), 474 – 480.

Kaiser, P., Raina, C., Parshad, R., Johri, S., Verma, V., Andrabi, K. I., & Qazi, G. N.: A novel esterase from bacillus subtilis (rrl 1789): Purification and characterization of the enzyme, *Protein Expression and Purification*, 45(2), (2006), 262 – 268.

Kinghorn, A. D., & Erdelmeier, C. A. J.: Analysis of croton oil by reversed-phase overpressure layer chromatography, *Essential Oils and Waxes Essential Oils and Waxes - Modern Methods of Plant Analysis*, 12, (1991), 175 – 184.

Liu, X., Li, L., Li, W., Lu, D., Chen, F., & Li, J.: Quantitative determination of phorbol ester derivatives in chinese jatropha curcas seeds by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Industrial Crops and Products*, 47, (2013), 29 – 32.

Macherey-Nagel: Festphasenextraktion, *http://www.mn-net.com/*, PDF, (2013), zuletzt aufgerufen 07.11.2015.

Madaus, G.: *Lehrbuch der biologischen Heilmittel*, Leipzig: Georg Thieme Verlag, 1938.

Makkar, H., Aderibigbe, A., & Becker, K.: Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of jatropha curcas for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors, *Food Chemistry*, 62(2), (1998), 207 – 215.

Makkar, H. P., Martinez-Herrera, J., & Becker, K.: Variations in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol ester in toxic and non-toxic genotypes of jatropha curcas, *Journal of Plant Sciences*, 3, (2008), 260 – 265.

Meyer, V. R.: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 9. überarbeitete und aktualisierte Auflage, Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2008.

Nakada, M., Kobayashi, S., Ohno, M., Iwasaki, S., & Okuda, S.: Enantioselective hydrolysis of dialkyl 3-monosubstituted glutarates with pig liver esterase: Structure-optical purity relationships, *Tetrahedron Letters*, 29(32), (1988), 3951 – 3954.

Nakao, M., Hasegawa, G., Yasuhara, T., & Ishihara, Y.: Degradation of jatropha curcas phorbol esters derived from jatropha oil cake and their tumor-promoting activity, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, (2014), 357 – 364.

Nishshanka, U., Jayasuriya, H., Chattopadhaya, C., Kijak, P. J., Chu, P.-S., Reimschuessel, R., Tkachenko, A., Ceric, O., & Alwis, H. G. D.: Screening for toxic phorbol esters in jerky pet treat products using lc–ms, *Journal of Chromatography B*, 1020, (2016), 90 – 95.

Ott, H. H.: *Über die Isolierung und die chemische sowie biologische Charakterisierung von Diterpenestern aus Euphorbia Cyparissias L.*, Doktorarbeit, Universität Heidelberg, 1978.

Persson, M., & Bornscheuer, U. T.: Increased stability of an esterase from bacillus stearothermophilus in ionic liquids as compared to organic solvents, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(1–2), (2003), 21 – 27.

Schrot, J., Weng, A., & Melzig, M. F.: Ribosome-inactivating and related proteins, *Toxins*, 7(5), (2015), 1556–1615.

Spennemann, D. H.: A baunscheidt homeopathic medicine kit in the jindera pioneer museum. studies in german colonial heritage, *http://csusap.csu.edu.au/ dspennem/SGCH/SGCH004.pdf*, PDF, (2007), 1–88.

Strasburger, E., Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J., Neuhaus, G., & Sonnewald, U.: *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*, Spektrum Akademischer Verlag, 2008.

Teuscher, E., & Lindequist, U.: *Biogene Gifte*, 3. neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2010.

theplantlist.org: *http://www.theplantlist.org/browse/A/Euphorbiaceae/*, Webseite, (2015), zuletzt aufgerufen 06.11.2015.

Thews, G., Mutschler, E., Schaible, H.-G., & Vaupel, P.: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 6. Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2007.

van Duuren, B. L., & Orris, L.: The tumor-enhancing principles of croton tiglium l., *Cancer Research*, 25, (1965), 1871 – 1875.

Viegener, U.: Wolfsmilchsaft gegen präkanzerosen, *Pharmazeutische Zeitung*, 15, (2012), 30.

Vogg, G., Achatz, S., Kettrup, A., & Jr., H. S.: Fast, sensitive and selective liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of tumor-promoting diterpene esters, *Journal of Chromatography A*, 855(2), (1999), 563 – 573.

Wakandigara, A., Nhamo, L. R. M., & Kugara, J.: Chemistry of phorbol ester toxicity in jatropha curcas seed - a review, *International Journal of Biochemistry Research and Review*, 3(3), (2013), 146 – 161.

Wang, J.-F., Yang, S.-H., Liu, Y.-Q., Li, D.-X., He, W.-J., Zhang, X.-X., Liu, Y.-H., & Zhou, X.-J.: Five new phorbol esters with cytotoxic and selective anti-inflammatory activities from croton tiglium, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25, (2015), 1986 – 1989.

Wang, Z., Tang, L., Hu, H., Guo, Y., Peng, T., Yan, F., & Chen, F.: Metabolic profiling assisted quality control of phorbolesters in jatropha curcas seed by high-performance liquid chromatography using a fused-core column, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), (2012), 9567 – 9572.

waters.com: How to maintain the performance of your ms system, *http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local-seminar-presentations/SW-NMS2011-Product-intr-Vendors-sem-48-50-Stefan-Bergvall.pdf*, PDF, (2015), zuletzt aufgerufen 29.11.2015.

Watson, L., & Dallwitz, M.: The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval, *delta-intkey.com*, Webseite(- Version: 11th May 2015), (1992), zuletzt aufgerufen 06.11.2015.

Wei, Q., Liao, Y., Chen, Y., Wang, S.-H., Xu, Y., Tang, L., Chen, F., & Eloff, J.: Isolation, characterisation and antifungal activity of ß-1,3-glucanase from seeds of jatropha curcas, *South African Journal of Botany*, 71(1), (2005), 95 – 99.

Wiggers, M., Holt, J., Kourist, R., Bartsch, S., Arends, I. W., Minnaard, A. J., Bornscheuer, U. T., & Hanefeld, U.: Probing the enantioselectivity of bacillus subtilis esterase bs2

for tert. alcohols, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60(1–2), (2009), 82 – 86.

Zhang, D.-D., Zhou, B., Yu, J.-H., Xu, C.-H., Ding, J., Zhang, H., & Yue, J.-M.: Cytotoxic tigliane-type diterpenoids from croton tiglium, *Tetrahedron*, 71(52), (2015), 9638 – 9644.

Zhang, X.-L., Wang, L., Li, F., Yu, K., & Wang, M.-K.: Cytotoxic phorbol esters of croton tiglium, *Journal of Natural Products*, 76(5), (2013), 858 – 864.

Abbildungsverzeichnis

1 Diterpenester aus Euphorbiaceen 2
2 Die reifen getrockneten Früchte und die Samen von *Croton tiglium* L. . . 4
3 Strukturformel von TPA 6
4 Strukturformel von TPA 6
5 Bild von den Samen und der unterschiedlichen Reifestadien der Früchte . 7
6 Strukturformeln der Jatrophafaktoren 8
7 *Euphorbia cyparissias* L. Blütenstände und Kraut 10
8 Quercetin 3-O-glucuronid 10
9 Strukturformeln der Cyparissiasfaktoren 11
10 Herstellung von homöopathischen Zubereitungen 12
11 Aufbau des XB-C18 Säulenmaterials und eines Coreshell Partikels 23
12 Beispiel eines Dünnschichtchromatogramms 42
13 Croton Urtinktur nach Auftrennung über eine SPE-Normalphase 43
14 SPE-Auftrennung der Euphorbia Urtinktur 44
15 Schematische Darstellung der Reaktion von TPA zu Phorbol 46
16 Chromatogramme der enzymatische Hydrolyse von TPA 48
17 Chromatogramme der enzymatische Hydrolyse von TPA und Standards . 49
18 Croton Urtinktur vor und nach der enzymatischen Hydrolyse 50
19 Epimerisierung von Phorbol 52
20 Strukturformel von Phorbolmethylether 54
21 UV-Chromatogramm und TIC von Croton Urtinktur nach der Hydrolyse . 54
22 TPA und Croton Extrakt nach der alkalischen Hydrolyse 56
23 Temperatur- und Zeitkurve für die Hydrolyse von Croton Urtinktur 57
24 Kalibriergerade für Croton Urtinktur nach der alkalischen Hydrolyse . . . 58
25 Spiken von Croton Urtinktur mit TPA 59
26 TPA-Standard und Croton Urtinktur im HPLC-System 2 60
27 Residuenplot Croton Gehaltsbestimmung 61
28 HPLC-Chromatogramm von Gläser (1991) 64
29 Chromatogramme Jatrophafaktoren und TPA-Standard 65
30 Kalibriergerade für Jatropha Urtinktur 66
31 Residuenplot Jatropha Gehaltsbestimmung 68
32 CAD, UV und MS Chromatogramm von Croton Urtintur 73
33 Beispiel MS/MS-Spektrum für TPA 74
34 Chromatogramm von Croton Urtinktur mit Zuordnung der Peaks 77
35 MS/MS Spektren der Cyparissiasfaktoren 89
36 UV- und CAD-Cromatogramm von Euphorbia Urtinktur 90
37 Strukturformel des Jatrophafaktors 1 92

38 MS/MS-Spektrum eines Jatrophafaktors im Positivmodus 92
39 Ionen-Chromatogramm und UV-Chromatogramm der Jatrophafaktoren . . 93
40 MS/MS-Spektrum eines Jatrophafaktors im Negativmodus 94
41 Chromatogramme der Croton Extrakte von Dr. Reckeweg 97
42 Chromatogramme der Croton Extrakte von Dr. Reckeweg und DHU . . . 98
43 Chromatogramme der Croton Urtinkturen von Dr. Reckeweg 99
44 Chromatogramme der Croton Urtinkturen von DHU 100

Tabellenverzeichnis

1 Systematische Einordnung der Euphorbiaceen 3
2 Pharmazeutisch relevante Euphorbiaceen 4
3 Übersicht über die Hydrolyseprodukte aus Croton Urtinktur 55
4 Präzision der TPA-Hydrolyse 59
5 Quantitative Phorbolesterbestimmung aus Croton 62
6 Präzision der TPA-Kalibrierung 67
7 Quantitative Bestimmung der Phorbolester aus Jatropha 69
8 Säurekomponenten der Phorbolester 72
9 Neu identifizierte Mono- und Diester aus Croton Urtinktur 75
10 Identifizierte Phorbolester aus Croton Urtinktur 78

Publikationsverzeichnis

Poster

- **Kummer, J.**, Melzig, M. F. - Quantification of tumor-promoting and skin irritating diterpene esters in homeopathic mother tinctures - 13th International Congress of the Society for Ethnopharmacology (in collaboration with the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research and Eurasia Pacific Uninet), Graz, Austria, September 2-6, 2012 und DPhG Jahrestagung 2012. Greifswald, 11. - 13. Oktober 2012
- **Kummer, J.**, Melzig, M. F. - Qualitative and quantitative analysis of tumor-promoting and skin irritating diterpene esters in homeopathic mother tinctures by HPLC and MS - 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Münster, 01. - 04. September 2013
- **Kummer, J.**, Kiss, A. K., Granica, S., Melzig, M. F. - Identification of new phorbol ester derivatives in extracts from Croton tiglium L. seeds by UHPLC-MS/MS and the approach of a quantification method after alkaline hydrolysis - 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Guimarães, Portugal, 31. August - 04. September 2014

Vorträge

- Qualitative and quantitative analysis of tumor-promoting and skin irritating diterpene esters in homeopathic mother tinctures by HPLC and MS - 6st Dahlem Centre of Plant Sciences (DCPS) „OpenHouse“ day - Institut für Pharmazie, 29. Januar 2014
- Identification of phorbol ester derivatives in homeopathic mother tinctures from different Euphorbiaceae by UHPLC-MS/MS and the development of a quantification method - 1st Minisymposium “New developments in Pharmacognosy - Berlin and Warsaw” - Institut für Pharmazie 07. März 2015

Lebenslauf

-Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.-

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 31.03.2016

Joscha Kummer