

10. Experimenteller Teil

10.1. Pflanzenmaterial und Industriell gefertigte Extrakte

P. sidoides radix sicc.; Fa. Dr. Willmar Schwabe GmbH und Co. KG; Lot-Nr: E275/00;
26.01.01

P. reniforme radix sicc.; Fa. Dr. Willmar Schwabe GmbH und Co. KG; Lot-Nr: D343/00;
25.01.01

P. reniforme oberirdischer Teil, ohne verholzte Stängelanteile; einjähriges Kraut; Ernte
10/94; Trocken-T. :40 °C; Arzneipflanzengarten der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH
und Co. KG, Stafford

P. sidoides Kraut-Extrakt; PSC 1342/X17/X05-80; EL 03-248-B 23.11.01

Extrakt: Eps® 7630; Ident. Nr 501790080; Charge 001; 26.01.01 (es handelt sich um
einen fimenspezifischen Spezialextrakt)

10.2. Geräte–Chemikalien

10.2.1. Chemisches Labor

Zerkleinerung	Ultra Turrax Fa. IKA; Retsch-Mühle SK 25
Rotationsverdampfer	Fa. Büchi (Rotavapor EL und RE)
Vakuumpumpe für Rotationsverdampfer	Fa. Vacuubrand CVC 2
Vakuumtrockenschrank	WTB Binder VD/ 23/ 53
Pumpe für Vakuumtrockenschrank	AEG, Typ EAM 77/4
UV-Lampe	Fa. Camag (Universal UV-Lampe)
Analysenwaage	Fa. Satorius (2001 MP-2)
Feinwaage	Fa. Satorius (Typ 2204)
Fraktionssammler	Fa. Pharmacia LBK, SuperFrac Fa. LBK, Ultrorac®, Inst. Group 7000
Kofler-Heiztischmikroskop	Fa. Reichert (unkorrigierte Werte)
Ultraschallbad	Fa. Sonorex (Super RK 106)
Zentrifuge	Fa. Heraeus Christ GmbH (Piccolo, Typ 00702)

10.2.2. Mikrobiologisches Labor

Sterile Mikrotiterplatten	flat-bottom-96-well plate, Nunclon®, Nunc Brands Products
Multipipetten, Pipetten	Fa. Eppendorf
Ethambutol-Referenz	Fa. Sigma, Gillingham, UK
Thrombozytenaggregation	Fibrintimer®, Labor VertriebsGmbH, Ahrensburg

10.2.3. Geräte zur Chromatographischen Trennung

Dünnschichtchromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie

DC-Aluminium-Folie	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 0,2 mm (20x20), Fa. Merck
DC-Aluminium-Folie	Cellulose F, 0,1 mm (20x20), Fa. Merck
DC-Aluminium-Folie	Polyamid 11 F ₂₅₄ , 0,15 mm (20x20), Fa. Merck

Präparative Dünnschichtchromatographie

DC-Aluminium-Folie	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 0,2 mm (20x20), Fa. Merck
DC Glasplatte	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 0,25 mm (20x20), Fa. Merck

Säulenchromatographie

Säulen

Es wurden für die Trennungen Säulen verwendet, deren Dimensionen bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten im Detail wiedergegeben sind.

Säulenmaterialien

Kieselgel 60 (70-230 mesh ASTM, 0,063-0,2 µm), Fa. Merck
LiChroprep RP-18 (5-20 µm), Fa. Merck
Polyamid (50-160 µm), Fa. Carl Roth GmbH & Co.
Sephadex LH-20 (25-100 µm), Fa. Fluka Chemie AG bzw. Fa. Sigma Aldrich

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische HPLC

HPLC-Anlage	Fa. Shimadzu CTO-10A
Pumpe	Fa. Knauer (Modell T64)
Software für Pumpe	Fa. Knauer (Eurochrom 2000)
Gradientenformer	Fa. Knauer T2A
Mischkammer	Fa. Knauer A0258
Detektor	Fa. Shimadzu (Photodiodenarray-Detektor Class M10-A)
Software für Detektor	Fa. Shimadzu (Class M10-A)
Säulenofen	Fa. Shimadzu (CTO-10A (Betriebstemperatur 40°C))
Probenschleife	20 µl
Stationäre Phase	RP-18 Material, Ø der Säule 4 mm, Länge 25 mm

Halbpräparative HPLC

HPLC-Anlage	Fa. Shimadzu CTO-10A
Pumpe	Fa. Knauer (Modell T64)
Software für Pumpe	Fa. Knauer (Eurochrom 2000)
Gradientenformer	Fa. Knauer T2A
Mischkammer	Fa. Knauer A0258
Detektor	Fa. Knauer (Variable Wavelength Monitor UV/VIS)
Probenschleife	20 – 500 µl
Stationäre Phase	RP-18 Material, Ø der Säule 8 mm, Länge 25 mm

10.2.4. Spektroskopische Geräte

UV-Spektroskopie

Spektralphotometer	Fa. Shimadzu (Modell UV-160A)
Küvetten	Fa. Hellma (Präzisionsküvetten Suprasil Nr. 100-QS, 10mm Schichtdicke)

NMR-Spektroskopie

¹H-NMR 400 MHz: Bruker AC-400

¹³C-NMR 100,6 MHz: Bruker AC-400

δ-Werte in ppm bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als interner Standard; Multiplizität und Kopplungskonstanten in Hertz (Hz)

IR-Spektroskopie

Spektrometer Fa. Perkin-Elmer (1420 Ratio Recording Infrared Spectrophotometer)

Massenspektroskopie

EI-MS Finnigan MAT CA₇A Massenspektrometer 70 eV

FAB-MS Finnigan MAT CH₅DF 80; Matrix: Glycerol/Xenon

HR-EIMS Finnigan MAT 711, 80eV, Elektronenenergie: 0,8 mA;
Ionenbeschleunigung: 8kV; IonenquellenT: 150 °C

Optische Drehung

Polarimeter Fa. Perkin Elmer GmbH 241 MC

Spaltbreite/ Bündelungsdurchmesser 1,5 mm/ 0,6 mm

Lichtquelle Natrium-Spektrallampe Philips 20 W

Temperatur 20 und 22 °C

Zelle Küvette: QS 8867, 2002, Messstrecke: 2cm

Küvette: 6947 Messstrecke: 10 cm

10.2.5. Chemikalien

Alle Chemikalien, falls nicht besonders erwähnt, wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, Referenzsubstanzen von der Fa. Roth, Karlsruhe, und Lösemittel von der Fa. Laborat, Berlin bezogen. Wasser für die Säulenchromatographie ist demineralisiert, für die HPLC destilliert. Alle für die chromatographischen Trennungen verwendeten Lösemittel werden

vor Gebrauch frisch destilliert. Die deuterierten Lösemittel für die Spektroskopie wurden von der Fa. Isocom, Landshut, bezogen.

Fließmittel

Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser	18:1:1
Toluol-Aceton	4:1; 2:1
Petrolether-Ethylacetat	1:1
Ethylacetat-Methanol-Wasser	18:1:1
Ethylacetat-Methanol-Eisessig-Wasser	60:45:15:10
1-Butanol-Eisessig-Wasser	63:27:10

Sprühreagenzien für dünn-schichtchromatographische Untersuchungen

Aluminiumchlorid-Reagenz (abgewandelt aus Wagner und Blatt,1983)

1 g Aluminiumchlorid werden in 100 ml Methanol gelöst. Die Platte wird nach dem Besprühen 5 Minuten auf 90 °C erhitzt, die Auswertung erfolgt im UV bei 365 nm. Flavonoide mit einer freien OH-Gruppe in Position 3 oder 5 zeigen gelb bis grünliche Fluoreszenzen.

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Wagner und Blatt,1983)

0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konz. Schwefelsäure in angegebener Reihenfolge gemischt.

Die DC-Platte wird 5-10 Minuten auf 100 °C erhitzt und bei 365 nm oder bei 254 nm im UV ausgewertet.

Unspezifisches Reagenz für verschiedene Verbindungsklassen.

Eisen-III-chlorid-Reagenz (Wagner und Blatt,1983)

Eine 10%ige methanolische Lösung. Auswertung erfolgt im Tageslicht. Verbindungen mit ein, zwei oder drei vicinalen OH-Gruppen an einem aromatischen Ringsystem ergeben Farben von orange über grün zu tiefblau.

Gibbs-Reagenz (Wagner und Blatt,1983)

Eine 1%ige methanolische Lösung aus 2,6-Dichlorchinonchlorimid.

Die DC-Platte wird sofort nach dem Besprühen mit konz. Ammoniak bedampft. Liegt eine freie OH-Gruppe *para*-ständig zu einer unsubstituierten Position an einem Aromaten vor, erfolgt sofort eine tiefblaue Färbung der Substanzbande. Bei Reaktion in *ortho*-Position zur unsubstituierten OH-Gruppe erfolgt die tiefblaue Färbung erst etwas später.

Kalium-Hydroxid-Reagenz (Wagner und Blatt,1983)

5 g Kaliumhydroxid werden in 100 ml Methanol gelöst. Die Auswertung erfolgt im UV-365 nm. Cumarine zeigen eine Intensivierung der Fluoreszenz.

Liebermann-Burchardt-Reagenz (Wagner und Blatt,1983)

5 ml Essigsäureanhydrid und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure werden vorsichtig und unter Eiskühlung gemischt und zu 50 ml Methanol gegeben. Das Reagenz ist frisch zu bereiten. Die DC-Platte wird 5-10 Minuten im Trockenschrank auf 100 °C erwärmt und dann bei 365 nm im UV ausgewertet.

Steroide und Triterpene zeigen rötliche Fluoreszenzen.

Naturstoffreagenz A (Wagner und Blatt,1983)

Eine 1%ige methanolische Lösung von Diphenylboryloxyethylamin. Auswertung sofort oder nach 10 min im UV bei 365 nm. Unspezifisches Reagenz für Flavonoide, Cumarine und andere Naturstoffe mit zur Fluoreszenz anregbaren Ringsystemen.

Thymol-Schwefelsäure-Reagenz (Merck,1980)

0,5 g Thymol werden in 95 ml Methanol gelöst, vorsichtig werden 5 ml konzentrierte Schwefelsäure zugegeben. Nach dem Besprühen wird die Platte 5 bis 10 Minuten bis zur optimalen Farbentwicklung im Trockenschrank auf 120 °C erhitzt. Die Auswertung erfolgt bei Tageslicht oder unter UV 365 nm, wobei Zucker unterschiedliche Farben zeigen.

Vanillin-Salzsäure-Reagenz (Wagner und Blatt,1983)

Ca. 5 ml einer 1%igen ethanolischen Vanillinlösung und 3 ml konz. Salzsäure werden nacheinander auf die DC-Platte aufgesprüht. Es wird bei Tageslicht ausgewertet. Eine Farbverstärkung erreicht man durch 5 min Erhitzen auf 100 °C. Catechin-Gerbstoffe ergeben im Tageslicht eine tiefrote Färbung.

10.3. Extraktgewinnung für die antimykobakteriellen Testungen

Die pulverisierten Pflanzenteile des Krautes und der Wurzel von *Pelargonium reniforme*, sowie der Wurzel von *Pelargonium sidoides* wurden mit Aceton-Wasser (4:1; V/V)* für 24 h bei Raumtemperatur gerührt (6 x 500 ml) und anschließend abfiltriert. Die Filtrate wurden im Vakuum bei 40 °C eingengt. Ein Anteil der Gesamtextrakte wird jeweils in 100 ml Wasser gelöst bzw. suspendiert und mit Lösemitteln aufsteigender Hydrophilie ausgeschüttelt (1. Dichlormethan 20 x 50 ml; 2. Ethylacetat 30 x 50 ml; 3. wassergesättigtes 1-Butanol 12 x 50 ml; Rest: Wasser-Fraktion).

10.4. Extraktgewinnung für die phytochemischen Arbeiten

10.4.1. Extraktion des Wurzelmaterials

1 kg getrocknete Wurzeldroge von *Pelargonium sidoides* wurden mit einer Schlagmühle bis Siebgröße (3 mm) zerkleinert. Die gesamte gepulverte Drogenmenge wurden mit 2 l Aceton-Wasser (4:1, V/V) versetzt und über Nacht stehen gelassen. Das Lösemittel wird über eine Porzellannutsche (15 cm Innendurchmesser, Filter: MN 615, Fa. Machery-Nagel) abgesaugt. Der Vorgang wird 10 mal wiederholt. Die vereinigten Gesamtextrakte wurden im Vakuum bei 40 °C zur Trockne einrotiert und im Vakuumschrank bei 25 °C nachgetrocknet.

Tabelle 27: Ausbeuten der Extrakte der Wurzel von *P. sidoides*

Extrakt	Ausbeute (g)	Ausbeute (%)*
Gesamt Extrakt	133,5	13,35
Dichlormethan Extrakt	0,7	0,07
Ethylacetat Extrakt	5,9	0,59
1-Butanol Extrakt	12,6	1,26
Wasser	47,2	0,47

* bezogen auf das Trockengewicht (1 kg)

* alle Angaben zu Mischungsverhältnissen beziehen sich auf V/V, solange es an entsprechender Stelle nicht anders vermerkt ist

Es wurden 133,5 g des erhaltenen Gesamtextraktes (149 g) wieder in 500 ml Wasser unter Rühren gelöst und mit verschiedenen Lösemitteln steigender Hydrophilie sukzessive (Dichlormethan (19 x 200 ml), Ethylacetat (50 x 200 ml), wassergesättigtem 1-Butanol (30 x 200 ml)) ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden bei 40 °C zur Trockne einrotiert und bei 25 °C im Vakuum nachgetrocknet. Die sich daraus ergebenden Mengen sind in Tabelle 27 wiedergegeben.

10.4.2. Extraktion des Krautes

Der Extrakt aus dem oberirdischen Teil von *P. sidoides* wurde freundlicherweise von der Fa. Dr. Willmar Schwabe GmbH und Co. KG in Karlsruhe hergestellt. 2 kg Droge ohne verholzte Anteile wurden auf 4 mm vermahlen, anschliessend mit 14 kg Petrolether 4 h bei Raumtemperatur extrahiert, über Seitz Supra 1500 filtriert und eingedampft. Der dunkelgrüne, wachsartige Rückstand (22 g) wurde nicht weiter bearbeitet.

Anschließend wurde die Droge mit 14 kg Aceton-Wasser (4:1, Gew.-Anteile) 16 h bei Raumtemperatur extrahiert. Der Vorgang wurde 2 mal wiederholt, die vereinigten Filtrate wurden bei 50 °C im Vakuum einrotiert. Der Extrakt wurde anschließend im Vakuum (15 mbar und 60 °C) nachgetrocknet und durch ein feines Sieb gegeben. Die gesiebten Anteile ergeben 223,1 g, die groben, im Sieb zurückgebliebenen 73,5 g (Gesamtausbeute 296,6 g). 150 g des feinen Gesamtextraktanteils der Krautdroge wurden wieder in 300 ml Wasser unter Rühren gelöst und mit organischen Lösemitteln steigender Hydrophilie (Dichlormethan (16 x 150 ml), anschließend mit Ethylacetat (60 x 150 ml) und mit wassergesättigtem 1-Butanol (33 x 150 ml)) ausgeschüttelt. Alle so erhaltenen Extrakte wurden bei 40 °C im Vakuum zur Trockne einrotiert und im Trockenschrank bei 25 °C nachgetrocknet. Die sich ergebenden Mengen sind in Tabelle 28 wiedergegeben.

Tabelle 28: Ausbeuten der Extrakte des Krautes von *P. sidoides*

Extrakt	Ausbeute (g)	Ausbeute (%)*
Gesamt-Extrakt	150,0	7,50
Dichlormethan-Fraktion	13,5	0,68
Ethylacetat-Fraktion	19,4	0,97
1-Butanol-Fraktion	38,6	1,93
Wasser-Fraktion	71,3	3,57

* bezogen auf das Trockengewicht (2 kg)

10.5. Aufarbeitung der Wurzelextrakte von *P. sidoides*

10.5.1. Aufarbeitung der Ethylacetat-Fraktion

6 g der Ethylacetat Fraktion wurden in Methanol-Wasser (1:1) gelöst und über eine Sephadexsäule (60 g, 2,8 cm x 37 cm) in einem Fließmittelsystem von Wasser-Methanol (1:0)→(0:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 30 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm; UV 254 nm; Sprühreagenz Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz) weiter vereinigt (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Fließmittelgradient und Fraktionen bei der Auftrennung der Ethylacetat Fraktion des Wurzelextraktes

Wasser (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
100	0	4770	1-3	0-90	201,5	
90	10	1110	4-26	31-780	635,9	
80	20	990	27-129	781-3870	1113,4	
60	40	2550	130-164	3871-4920	173,8	1
50	50	3120	165-230	4921-6900	183,4	
40	60	3630	231-270	6901-8100	90,1	
20	80	1590	271-334	8101-10020	121,8	2
10	90	570	335-454	10021-13620	244,0	
0	100	1770	455-490	13621-14700	61,9	
Summe		20100	491-526	14701-15780	38,1	
			527-671	17781-20130		
Ausbeute:					2863,9	

Leider konnten bei der Auftrennung der Fraktionen keine neuen Naturstoffe isoliert werden.

10.5.2. Aufarbeitung der 1-Butanol-Fraktion

12 g der 1-Butanol-Fraktion wurden über eine Polyamidsäule (150 g, Durchmesser: 4,3 cm; Füllhöhe: 52 cm) in einem Fließmittelsystem von Wasser-Methanol (9:1)→(0:1) und

danach in einem System Wasser-Methanol (1:1) sowie (1:0) jeweils unter Zusatz von 0,1 % (Gew./V) Ammoniumcarbonat aufgetrennt (Lemmich und Shabana, 1984). Es wurden Fraktionen à 100 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm; UV 254 nm) weiter vereinigt (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Fließmittelgradient und Fraktionen bei der Auftrennung der 1-Butanol Fraktion des Wurzelextraktes

Ethylacetat (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge ml	Fraktionen	Elutions- volumen ml	Ausbeute mg	Nach- trennung
90	10	7300	1-12	0-120	hygros.~5 g	1
80	20	2200	13-20	121-2000	117,1	
70	30	600	21-26	2001-2600	39,9	
50	50	3900	27-39	2601-3900	104,7	2
0	100	1000	40-109	3901-10900	1302,5	
50	50	600	110-147	10901-14700	354,7	
	+ 0,1%		148-163	14701-16300	292,3	
Ammoniumcarbonat						
50	50	2800	164-166	16301-16600	262,0	3
100	0	4000	167-169	16601-16900	758,3	
Summe:		22400	170-172	16901-17200	77,7	
			173-176	17201-17600	44,2	
			177-224	17601-22400	179,7	
			Summe:	8033,1		

Nachtrennung der Fraktionen der 1-Butanol-Fraktion des Wurzelextraktes

10.5.2.1. Nachtrennung 1

4000 mg der Fraktionen 1-12 wurden über eine Sephadexsäule (40 g; 2,8 cm x 24 cm) in einem Fließmittelsystem von Methanol-Wasser (3:2) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 7 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm weiter vereinigt (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Nachtrennung der Fraktionen 1-12 der 1-Butanol-Fraktion

Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nachtrennung
1-3	0-21	300,4	
4-8	22-56	1168,7	
9-22	27-154	35,1	
Ausbeute		1504,2	

10.5.2.3. Nachtrennung 2

117 mg der Fraktionen 27-39 wurden über eine Kieselgelsäule (2 g; 0,7 cm x 10 cm) in einem Fließmittelsystem von Petrolether-Ethylacetat (4:1)→(7:3) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 5 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm weiter vereinigt (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Fließmittelgradient und Fraktionen bei der Auftrennung der Fraktionen 27-39 der 1-Butanol-Fraktion

Petrolether (%, V/V)	Ethylacetat (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Verbindung
80	20	260	1-5	0-25	1,1	
70	30	75	6-77	26-385	38,3	V6
50	50	45				
Summe:		380	Ausbeute:		39,4	

10.5.2.4. Nachtrennung 3

155 mg der Fraktionen 164-166 wurden durch HPLC über eine RP-18 Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min, einem Fließmittelgradientensystem von Wasser-Methanol (9:1)→(0:1) innerhalb von 20 Minuten aufgereinigt. Detektion erfolgt bei 275 nm. Die Peaks bei einer Retentionszeit von $R_t=5,18$ und $R_t=6,79$ Minuten wurden aufgefangen. Peak eins entspricht Scopoletin V2 (9,8 mg) während Peak zwei ein Gemisch (87,4 mg) aus Umckalin V1 und 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin V6 darstellt.

10.6. Aufarbeitung der Krautextrakte von *P. sidoides*

10.6.1. Aufarbeitung der Dichlormethan-Fraktion

2,5 g der Dichlormethan Fraktion wurden in Dichlormethan gelöst und über eine Kieselgelsäule (4 cm x 51 cm) in einem Fließmittelsystem von Dichlormethan-Methanol (1:0)→(97:3) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 50 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Aceton-Toluol (1:4); Sprühreagenz Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz) weiter vereinigt (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Fließmittelgradient und Fraktionen bei der Auftrennung der Dichlormethan Fraktion des Krautextraktes

Dichlormethan (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge ml	Fraktionen	Elutionsvolumen ml	Ausbeute mg	Nach- trennung
100	0	900	1-18	0-900	28,3	
99	1	1000	19-37	901-1850	7,2	
97	3	20000	38-57	1851-2850	4,7	
Summe: 21900			58-100	2851-5000	55,4	
			101-180	5001-9000	19,0	
			181 – 191	9001-9550	2,0	
			192 – 205	9551-10250	406,0	1
			206-403	10251-20150	6,4	
			Ausbeute:		529,0	

Nachtrennungen der Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes

10.6.1.1. Nachtrennung 1

406 mg der Fraktionen 192-205 wurden über eine Kieselgelsäule (2,5 cm x 19 cm) nach dünnstichtchromatographischen Vortestungen in einem Fließmittelsystem von Petrolether-Ethylacetat (4:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 15 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Aceton-Toluol (1:4); UV 365 nm, sowie Sprühreagenz Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz) weiter vereinigt.

Leider konnte auf diesem Weg keine Abtrennung vom Chlorophyll erreicht werden. Die Ausbeuten der relevanten Fraktionen waren so gering, dass auf eine weitere Nachtrennung verzichtet wurde.

Zur Isolierung der Substanzen wurde daher eine Cumarin-Abtrennung aus dem Gesamtextrakt durchgeführt (siehe Abbildung 5, Seite 15).

10.6.2. Cumarin-Abtrennung aus dem Gesamtextrakt

1 g des Gesamtextraktes wurden in 100 ml wassergesättigtem 1-Butanol gelöst und drei mal mit 100 ml 5%iger wässriger Kaliumhydroxidlösung ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 6%iger Salzsäure auf einen pH von 1 gebracht und mit drei mal 100 ml wassergesättigtem 1-Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten Butanol-Phasen ergeben nach dem Einrotieren im Vakuum bei 40 °C einen Rückstand von 537,1 mg.

Durch präparative Trennung des Rückstandes mit dem Fließmittelsystem Petrolether-Ethylacetat (1:1) auf Kieselgel (Laufstrecke 20 cm; Substanz 1: R_f : 0,7; 25 mg; Substanz 2: R_f : 0,5; 24 mg), sowie einer zweiten präparativen Trennung im System Toluol-Aceton (4:2) auf Kieselgel (Laufstrecke 20 cm; Substanz 1: R_f : 0,4; 9 mg; Substanz 2: R_f : 0,2; 13 mg) wurden die Substanzen 1 und 2 rein gewonnen und als Umckalin und Scopoletin identifiziert.

10.6.3. Aufarbeitung der Ethylacetat-Fraktion

15 g der Ethylacetat-Fraktion wurden in Methanol gelöst und über eine Sephadexsäule LH-20 (190 g, 3,5 cm x 75 cm) im Fließmittelsystem von Wasser-Methanol (1:0)→(0:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 50 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm; UV 254 nm; Sprühreagenz Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz) weiter vereinigt (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34: Fließmittelgradient und Fraktionen bei der Auftrennung der Ethylacetat Fraktion des Krautextraktes

Wasser (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutonsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
100	0	2450	1-4	0-200	hygrosk.	
90	10	1950	5-13	201-650	352,0	1
80	20	10200	14-24	651-1200	hygrosk.	
70	30	2850	25-43	1201-2150	180,6	
60	40	3100	44-58	2151-2900	123,3	2
50	50	3150	59-83	2901-4150	249,5	3
40	60	14200	84-129	4151-6450	1280	4
30	70	6300	130-150	6451-7500		
20	80	5000	151-179	7501-8950	518,2	
10	90	700	180-202	8951-10100	301,2	5
0	100	750	203-260	10101-13000	499,0	
Summe		50650	261-299	13001-14950	96,0	
			300-349	14951-17450	185,9	
			350-451	17451-22550	129,2	
			452-497	22551-24850	207,8	6
			498-580	24851-29000	143,8	7
			581-660	29001-33000	1324	
			661-715	33001-35750	622,5	8
			716-756	35751-37800	254,2	
			757-800	37801-40000	428,6	
			801-950	40001-47500	824,7	
			951-1000	47501-50000	254,8	
			Ausbeute:	7974,3		

Nachtrennung der Fraktionen der Ethylacetat-Fraktion des Krautextraktes

10.6.3.1. Nachtrennung 1

352 mg der Fraktionen 5-13 wurden über eine Sephadexsäule (20 g; 4 cm x 7 cm) in einem Fließmittelsystem von Methanol-Wasser (1:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 5 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-

Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm, sowie Sprühreagenz Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz) weiter vereinigt (siehe Tabelle 35).

Tabelle 35: Nachtrennung der Fraktionen 5-13 der Ethylacetat-Fraktion

Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nachtrennung
1-10	0-50	234,0	1
11-14	51-70	-	
15-46	71-230	111,6	
Ausbeute: 345,6			

Nachtrennung 1

234,0 mg der Fraktionen 1-10 wurden durch HPLC über eine RP-18 Säule mit einer Flussrate von 4 ml/min, einer Temperatur von 40 °C und einem Fließmittelgradientensystem von Wasser-Methanol (9:1)→(0:1) innerhalb von 43 Minuten aufgereinigt. Detektion erfolgt bei 275 und 360 nm. Der Peak bei einer Retentionszeit von 27,838 Minuten ergibt 90 mg der Verbindung 8 und kann als 4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1-β-D-glucopyranosid identifiziert wurden.

10.6.3.2. Nachtrennung 2

123,3 mg der Fraktionen 44-58 wurden über eine Sephadexsäule (20 g; 4 cm x 7 cm) in einem Fließmittelsystem von Methanol-Wasser (1:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 5 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm, sowie Sprühreagenz Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz) weiter vereinigt (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36: Nachtrennung der Fraktionen 44-58 der Ethylacetat-Fraktion

Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nachtrennung
1-10	0-50	46,6	
11-22	51-110	42,8	
Ausbeute: 89,4			

10.6.3.3. Nachtrennung 3

249,5 mg der Fraktionen 59-83 wurden über eine Kieselgelsäule (20 g; 1,3 cm x 43 cm) in einem Fließmittelsystem von Petrolether-Ethylacetat (9:1)→(0:1) und danach im System Ethylacetat-Methanol (1:0)→(1:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 20 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm) weiter vereinigt (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37: Nachtrennung der Fraktionen 59-83 der Ethylacetat-Fraktion

Petrolether (%, V/V)	Ethylacetat (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
90	10	5000	1-10	0-200	ölig	WM
80	20	3200	11-40	201-800	ölig	
70	30	1400	41-250	801-5000	37,9	V1
60	40	3200	251-330	5001-6600	27,3	
50	50	820	331-650	6601-13000	28,6	
0	100	2380	651-800	13001-16000	71,1	1
Summe		16000	Summe:	144,9		
Ethylacetat (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge in ml				
50	50	200				
Summe		200				

Nachtrennung 1

Es liegen 71,1 mg eines Gemisches aus einer unbekanntem Verbindung und Verbindung 7 vor, die über eine Sephadexsäule (20 g; 4 cm x 7 cm) in einem Fließmittelsystem von Methanol-Wasser (1:0)→(0:1) aufgetrennt wurden. Es wurden Fraktionen à 10 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm) weiter vereinigt (siehe Tabelle 38).

Tabelle 38: Nachtrennung 1 der Fraktionen 651-800 der Ethylacetat-Fractionen 59-83

Methanol (%, V/V)	Wasser (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
100	0	180	1-2	0-20	-	
50	50	220	3-10	21-100	48,5	1
0	100	1100	11-23	101-230	-	
Summe		1500	24-45	231-450	1,3	
			46-60	451-600	-	
			61-150	601-1500	1,0	
			Summe:		50,8	

Nachtrennung 1

16,1 mg der Fraktionen 3-10 wurden durch HPLC über eine RP-18 Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min, einer Temperatur von 40 °C und einem Fließmittelgradientensystem von Wasser-Methanol (1:0)→(0:1) innerhalb von 30 Minuten aufgereinigt. Detektion erfolgt bei 275 nm. Der Peak bei einer Retentionszeit von 7,62 Minuten ergibt 2 mg der Verbindung 7 und kann als 7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin identifiziert werden.

10.6.3.4. Nachtrennung 4

207,0 mg der Fraktionen 84-129 wurden durch HPLC über eine RP-18 Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min, einer Temperatur von 40 °C und einem Fließmittelgradientensystem von Wasser-Methanol (3:2)→(0:1) innerhalb von 15 Minuten aufgetrennt. Detektion erfolgt bei 275 nm. Es wurden vier Peaks der Verbindungen 9, 10, 11 und 12 aufgefangen und können als Gallussäure (Rt: 4,789 min, 12 mg), Protocatechusäure (Rt: 6,016 min, 5 mg), Taxifolin-3-β-glucopyranosid (Rt: 7,669 min, 6,5 mg) und Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid (Rt: 8,812 min, 20,4 mg) identifiziert werden.

10.6.3.5. Nachtrennung 5

301,2 mg der Fraktionen 180-202 wurden über eine Kieselgelsäule (20 g; 1,3 cm x 43 cm) in einem Fließmittelsystem von Ethylacetat-Methanol (1:0)→(0:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 15 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm] weiter vereinigt (siehe Tabelle 39)

Tabelle 39: Nachtrennung der Fraktionen 180-202 der Ethylacetat-Fraktion

Ethylacetat (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
100	0	2160	1-5	0-75	-	
60	40	1605	6-10	76-150	9,4	
20	80	1050	11-28	151-420	49,8	1
0	100	810	29-250	421-3750	120,9	2
Summe		5625	251-320	3751-4800	25,6	
			321-375	4801-5625	21,3	
			Summe:	227,0		

Nachtrennung 1

49,8 mg der Fraktionen 11-28 wurden durch HPLC über eine RP-18 Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min, einer Temperatur von 40 °C und einem Fließmittelgradientensystem von Wasser-Methanol (1:0)→(0:1) innerhalb von 30 Minuten aufgetrennt. Detektion erfolgt bei 275 nm. Es wird ein Peak aufgefangen (Rt: 12,01 min, 10,6 mg) und kann als Orientin, V15 identifiziert werden.

Nachtrennung 2

120 mg der Fraktionen 29-250 wurden über eine Kieselgelsäule (4 g; 0,7 cm x 17 cm) in einem Fließmittelsystem von Ethylacetat-Methanol (1:0)→(9:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 5 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm) weiter vereinigt (siehe Tabelle 40)

Tabelle 40: Nachtrennung der Fraktionen 29-250 aus der Fraktion 180-202 der Ethylacetat-Phase

Ethylacetat (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
100	0	285	1-15	0-75	10,0	V 15
90	10	50	16-80	76-400	13,4	1
80	20	35				
50	50	30				
Summe		400	Summe:		23,4	

Nachtrennung 1

13,4 mg der Fraktionen 16-80 wurden durch HPLC über eine RP-18 Säule mit einer Flussrate von 2 ml/min, einer Temperatur von 40 °C und einem Fließmittelgradientensystem von Wasser-Methanol (1:0)→(0:1) innerhalb von 35 Minuten aufgetrennt. Detektion erfolgt bei 360 nm. Es wurden zwei Peaks aufgefangen (Rt: 11,35 min, 3,6 mg) und kann als Orientin, V15, (Rt: 12,01 min, 5,8 mg) und kann als Isoorientin, V16 identifiziert wurden.

10.6.3.6. Nachtrennung 6

202 mg der Fraktionen 452-497 wurden über eine Kieselgelsäule (20 g; 1,3 cm x 43 cm) in einem Fließmittelsystem von Ethylacetat-Petrolether (4:1)→(1:0), anschließend mit Ethylacetat-Methanol (4:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 15 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm) weiter vereinigt (siehe Tabelle 41)

Tabelle 41: Nachtrennung der Fraktionen 452-497 der Ethylacetat-Fraktion

Ethylacetat (%, V/V)	Petrolether (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
80	20	2675	1-40	0-600	ölig	
100	0	1500	41-320	601-4800	37,1	1
Ethylacetat (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge in ml				
80	20	600				
Summe		4785	Summe:		37,1	

Nachtrennung 1

37,1 mg der Fraktionen 41-320 wurden über eine Sephadexsäule (20 g; 4 cm x 7 cm) in einem Fließmittelsystem von Methanol aufgetrennt wurden. Es wurden Fraktionen à 10 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm) weiter vereinigt (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Nachtrennung 1 der Fraktionen 41-320 der Ethylacetat-Fraktionen 452-497

Methanol (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Verbindung
100	200	1-7	0-70	ölig	WM
		8-20	71-200	30,1	V13
Summe	200	Summe:		50,8	

10.6.3.7. Nachtrennung 7

143 mg der Fraktionen 498-580 wurden über eine Kieselgelsäule (20 g; 1,3 cm x 43 cm) in einem Fließmittelsystem von Ethylacetat-Petrolether (1:4)→(1:0), anschließend in Ethylacetat-Methanol (9:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 15 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm) weiter vereinigt (siehe Tabelle 43)

Tabelle 43: Nachtrennung der Fraktionen 498-580 der Ethylacetat-Fraktion

Ethylacetat (%, V/V)	Petrolether (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
20	80	1815	1-269	4035	ölig	
40	60	1095	270-430	2400	71,1	1
60	40	765				
100	0	1965				
Ethylacetat (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge in ml				
90	10	795				
Summe		6435	Summe:		71,1	

Nachtrennung 1

71,1 mg der Fraktionen 270-430 wurden über eine Sephadexsäule (20 g; 4 cm x 7 cm) in einem Fließmittelsystem von Methanol aufgetrennt wurden. Es wurden Fraktionen à 10 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm] weiter vereinigt (siehe Tabelle 44).

Tabelle 44: Nachtrennung 1 der Fraktionen 41-320 der Ethylacetat-Fraktionen 452-497

Methanol (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Verbindung
100	200	1-4	0-40	ölig	WM
		5-20	41-200	20,4	V14
Summer	200	Summe:		20,4	

10.6.3.8. Nachtrennung 8

661 mg der Fraktionen 661-710 wurden über eine Kieselgelsäule (15 g; 1,3 cm x 25 cm) in einem Fließmittelsystem von Ethylacetat-Petrolether (1:4)→(6:5) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 15 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm] weiter vereinigt (siehe Tabelle 45)

Tabelle 45: Nachtrennung der Fraktionen 661-710 der Ethylacetat-Fraktion

Ethylacetat (%, V/V)	Petrolether (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
20	80	1365	1-119	0-1785	-	
25	75	510	120-130	1786-1950	2,8	
30	70	2385	131-432	1951-6480	84,1	1
40	60	710				
50	50	710				
60	40	810				
Summe		6480	Summe:		86,9	

Nachtrennung 1

84,1 mg der Fraktionen 131-432 wurden über eine Sephadexsäule (40 g; 2,8 cm x 24 cm) in einem Fließmittelsystem von Methanol-Wasser (1:0)→(1:1) aufgetrennt wurden. Es wurden Fraktionen à 7 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm] weiter vereinigt (siehe Tabelle 46).

Tabelle 46: Nachtrennung 1 der Fraktionen 131-432 der Ethylacetat-Fraktionen 661-710

Methanol (%, V/V)	Wasser (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Verbindung
100	0	161	1-13	0-91	-	
50	50	42	14-29	92-203	27,8	V17
Summer		203	Summe:		27,8	

10.6.4. Aufarbeitung der 1-Butanol-Fraktion/ Wasser-Fraktion

Da von der Wasser-Fraktion größere Mengen da sind und die DC Untersuchungen [Fließmittelsystem: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1)] ähnliche Substanzspektren aufweisen, sind 10g der Wasser-Fraktion aufgearbeitet worden, dabei zunächst zur Vortrennung in 70 ml Methanol suspendiert, filtriert und mit zweimal 15 ml Methanol nachgewaschen worden (Tsutomu *et al.*, 1985), das Lösemittel im Vakuum bei 40 °C reduziert und die Lösung über eine Polyamidsäule (300 g, Durchmesser: 6,2 cm; Füllhöhe: 22 cm) in einem Fließmittelsystem von Wasser-Methanol (1:0)→(2:3) und danach in einem System Wasser-Methanol (2:3)→(0:1) jeweils unter Zusatz von 0,1 % (Gew./V) Ammoniumcarbonat aufgetrennt worden. (Lemmich und Shabana, 1984) Es wurden Fraktionen à 500 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm; UV 254 nm] weiter vereinigt (siehe Tabelle 47).

Tabelle 47: Fließmittelgradient und Fraktionen bei der Auftrennung der Butanol Fraktion des Krautextraktes

Ethylacetat (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
100	0	25000	1-5	0-2500	hygros.	
99	1	9500	6-29	2501-14500	60,5	1
95	5	7000	30-149	14501-74500	912,9	
90	10	5500	150-180	74501-90000	248,8	
80	20	27000	181-196	90001-98000	101	
70	30	20000	197-315	98001-157500	227,5	
60	40	64500	316-319	157501-159500	180,7	
	+		320-330	159501-165000	48,7	
0,1%Ammoniumcarbonat						
60	40	28000	331-350	165001-175000	62,6	2
0	100	4500	351-372	175001-186000	117,5	
		Summe:	373-382	186001-191000	-	
		Summe:	1960,2			

Aus den Fraktionen 222-294 sind in Methanol unlösliche Niederschläge (88,8 mg) abfiltriert worden. Löslichkeit besteht nur in heißem Methanol-Wasser (1:1) (50-60 °C).

¹H-NMR Spektren in Methanol, DMSO und Pyridin liegen vor, liefern aber kein Ergebnis.

Nachtrennung der Fraktionen der 1-Butanol-Fraktion des Krautextraktes

10.6.4.1. Nachtrennung 1

60,5 mg der Fraktionen 6-29 wurden über eine Sephadexsäule (12 g; 1,5 cm x 14 cm) in einem Fließmittelsystem von Methanol-Wasser (1:1) aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 1 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen (Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm) weiter vereinigt (siehe Tabelle 48)

Tabelle 48: Nachtrennung der Fraktionen 6-29 der Wasser-Fraktion

Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nachtrennung
1-20	0-20	27,1	1
21-160	21-161	-	
Ausbeute:		27,1	

Nachtrennung 1

13,4 mg wurden durch präparative DC auf Kieselgel im Fließmittelsystem Ethylacetat-Methanol (9:1) durch doppelte Entwicklung (1. Laufstrecke: 10 cm; 2. Laufstrecke: 20 cm) getrennt. Die Bande bei einem R_f von 0,05 ergibt nach Lösen in Methanol und filtrieren 3,9 mg der Verbindung 3 (verunreinigt mit Verbindung 4).

13,7 mg wurden in einem anderen Fließmittelsystem (Ethylacetat-Wasser-Methanol (18:1:1)) ebenfalls der präparativen DC auf Kieselgel unterworfen (doppelte Entwicklung; 1. Laufstrecke: 10 cm; 2. Laufstrecke: 20 cm) und ergeben bei einem R_f -Wert von 0,1 1 mg der Verbindung 3.

10.6.4.4. Nachtrennung 2

62,6 mg Fraktionen 331-350 wurden über eine Polyamidsäule (15 g, 4 cm x 28 cm) im Fließmittelsystem Wasser-Methanol (9:1) + 0,1% Ammoniumcarbonat nachgetrennt. Es wurden Fraktionen von 200 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen

[Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm]
weiter vereinigt (siehe Tabelle 49)

Tabelle 49: Nachtrennung der Fraktionen 331-350 der Wasser-Fraktion

Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nachtrennung
1	0-200	22,8	
2-5	201-1000	27,1	1
6-10	1001-2000	-	
Ausbeute:		49,9	

Nachtrennung 1

27,1 mg der Fraktionen 2-5 wurden über eine Sephadexsäule (20 g; 4 cm x 7 cm) im Fließmittelsystem Wasser-Methanol (9:1) + 0,1% Ammoniumcarbonat nachgetrennt. Es wurden Fraktionen von 10 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm, UV 254 nm] weiter vereinigt (siehe Tabelle 50)

Tabelle 50: Nachtrennung der Fraktionen 2-5 der Nachtrennung 4 der Wasser-Fraktion

Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nachtrennung
1-3	0-30	5,5	V5
4-9	31-90	8,2	
10-20	91-200	4,0	
21	201-210	-	
Ausbeute:		17,7	

10.6.5. Nachisolierung der Verbindungen 3,4 und 5

10 g der Wasser Fraktion wurden in Methanol suspendiert und über eine Polyamidsäule (150 g, 5 cm x 38 cm) in einem Fließmittelsystem von Wasser, nach Elution der Verbindungen 3 und 4 durch spülen der Säule mit Wasser-Methanol (9:1) und anschließend im System 0,1% Ammoniumcarbonat in Wasser zur Elution von Verbindung 5 aufgetrennt. Es wurden Fraktionen à 250 ml aufgefangen und aufgrund von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 365 nm; UV 254 nm] weiter vereinigt (siehe Tabelle 51).

Tabelle 51: Nachisolierung der Verbindungen 3, 4 und 5

Wasser (%, V/V)	Methanol (%, V/V)	Menge in ml	Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nach- trennung
100	0	7000	1	0-250	-	
90	10	2500	2-13	251-3250	123,5	1
+ 0,1% Ammoniumcarbonat			14-45	3251-11250		
100	0	4000	46-50	11251-12500	254,1	2
Summe		13500	51-54	12501-13500	-	
			Summe:	377,6		

10.6.5.1. Nachtrennung 1

123,5 mg der Fraktionen 2-13 wurden durch präparative DC auf Kieselgelplatten im Fließmittelsystem Ethylacetat-Methanol-Wasser (18:1:1) durch doppelte Entwicklung über 1. 10 cm und 2. 15 cm Laufstrecke aufgereinigt.

Die Bande bei einem R_f -Werten von 0,23 ergaben 10,9 mg der Verbindungen 3 und 4.

10.6.5.2. Nachtrennung 2

254,1 mg der Fraktionen 46-50 wurden über eine Sephadexsäule (20 g; 4 cm x 7 cm) im Fließmittelsystem Methanol-Wasser (1:4) aufgereinigt. Es wurden Fraktionen von 5 ml aufgefangen und anhand von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem: Ethylacetat-

Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 254 nm; UV 365 nm] weiter zu Fraktionen vereinigt (siehe Tabelle 52).

Tabelle 52: Nachtrennung der Fraktionen 46-50 der Nachisolierung der Verbindungen 3,4 und 5

Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nachtrennung
1-2	0-10	-	
3-5	11-25	141,9	1
6-8	26-40	22,8	
Ausbeute:		164,7	

Nachtrennung 1

141,9 mg der Fraktionen 3-5 wurden über eine Kieselgelsäule (210 g; 1,5 cm x 13 cm) im Fließmittelsystem Methanol-Wasser (1:9) + 0,1% Ammoniumcarbonat aufgereinigt. Es wurden Fraktionen von 2 ml aufgefangen und anhand von DC Untersuchungen [Fließmittelsystem: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1); UV 254 nm; UV 365 nm] weiter zu Fraktionen vereinigt (siehe Tabelle 53).

Tabelle 53: Nachtrennung der Fraktionen 3-5 aus der Nachtrennung der Fraktionen 46-50

Fraktionen	Elutionsvolumen in ml	Ausbeute in mg	Nachtrennung
1-6	0-12	170,9	1
7-12	13-24	8,4	NMR:-
13-19	25-38	-	
20-40	39-80	10,5	NMR:-
Ausbeute:		189,8	

Nachtrennung 1

170,9 mg der Fraktionen 1-6 wurden durch HPLC Trennung an einer RP-18 Säule (Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1) in 25 Minute aufgereinigt (Flussrate: 3 ml/Minute). Der Peak mit einer Retentionszeit von 4,533 min ergibt nach Kristallisation aus Methanol 30,8mg der reinen Verbindung 5 am oberen Rand des Gefäßes.

1 0.7. Strukturaufklärung von Einzelverbindungen

10.7.1. 7-Hydroxy-5,6-dimethoxycumarin (= Umckalin (V 1))

Isolierung

Aus dem Gesamtextrakt der Krautdroge (1 g) wurden die Cumarine nach lösen in 1-Butanol durch Ausschütteln mit Kaliumhydroxid, ansäuern der wässrigen Phase mit Salzsäure und Ausschütteln mit 1-Butanol abgetrennt. Präparative DC in Petrolether-Ethylacetat (1:1) (R_f : 0,7) und Aceton-Toluol (1:2) (R_f : 0,4) liefern die Substanz.

Außerdem konnte Umckalin aus der Ethylacetat-Fraktion 59-83 des Krautextraktes durch säulenchromatographische Nachtrennung an Kieselgel im Fließmittelsystem Petrolether-Ethylacetat (9:1)→(0:1) in den Fraktionen 41-250 rein erhalten wurden.

Eigenschaften: gelb, amorph

Ausbeute: 9 mg (4,5 ppm)* bzw. 37,9 mg (18,95 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase Kieselgel

Mobile Phase: Präparative DC: Ethylacetat-Petrolether (1:1) R_f : 0,7; Toluol-Aceton (4:2) R_f : 0,4

Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f : 0,78

Detektion: UV 254 nm; UV 365 nm (rötlich graue Fluoreszenz)

Strukturaufklärung

Summenformel $C_{11}H_{10}O_5$

Relative Molekülmasse 222

UV λ_{max} (nm) (log ϵ) in Methanol 330 (4,72); 207 (5,15)

EI-MS 70 eV; 100 °C; m/z (rel. Int. %) $[M]^+$ 222 (89); 207 (100); 192 (20); 179 (45)

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

^1H -NMR Daten	Tabelle 2; Seite 23
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 3; Seite 25

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von ^1H , ^1H -COSY Daten.

10.7.2. 7-Hydroxy-6-methoxycumarin (= Scopoletin (V 2))

Isolierung

Aus dem Gesamtextrakt der Krautdroge (1 g) wurden die Cumarine nach lösen in 1-Butanol durch Ausschütteln mit Kaliumhydroxid, ansäuern mit Salzsäure und Ausschütteln mit 1-Butanol abgetrennt. Präparative DC in Petrolether-Ethylacetat (1:1) (R_f : 0,5) und Aceton-Toluol (1:2) (R_f : 0,2) liefern die Substanzzone.

Die Verbindung konnte außerdem aus den 1-Butanol Fraktionen 164-166 durch HPLC Trennung der Wurzel Droge isoliert werden.

Eigenschaften:	weiß, amorph
Ausbeute:	13 mg (6,5 ppm)*; 9,8 mg (9,8 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase:	Kieselgel
Mobile Phase:	Präparative Trennung: Ethylacetat-Petrolether (1:1) R_f : 0,5; Toluol-Aceton (2:1) R_f : 0,2 Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f : 0,71
Detektion	UV 254 nm; UV 365 nm (tiefblaue Fluoreszenz)

Strukturaufklärung

Summenformel	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$
Relative Molekülmasse	192

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

UV λ_{\max} (nm) (log ϵ) in Methanol	346 (3,83); 229 (3,91); 206 (4,14)
EI-MS 70 eV; 80 °C; m/z (rel. Int.%)	$[M]^+$ 192 (100); 177 (73); 164 (39); 149 (67); 121 (34)
$^1\text{H-NMR}$ Daten	Tabelle 2; Seite 23

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von ^1H , $^1\text{H-COSY}$ Daten.

10.7.3. 8-Hydroxy-6-methoxycumarin-7- β -glucopyranosid (= Fraxetin-7- β -glucopyranosid (V 3))

Isolierung

Aus der 1-Butanol-Phase des Krautextraktes (10 g) wurden nach Chromatographie über Polyamid mit dem Eluens Wasser die Fraktionen 2-13 an Sephadex-LH 20 rechromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:1)]. Die Fraktionen 2-7 ergeben nach präparativer Trennung auf Kieselgel Platten (Fließmittel: Ethylacetat-Methanol-Wasser (18:1:1)) die Substanz V 3 bei einem R_f -Wert von 0,23.

Eigenschaften: gelbes amorphes Pulver

Ausbeute: 10,9 mg (5,45 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase: Präparative DC: Ethylacetat-Methanol-Wasser (18:1:1) R_f : 0,23

Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1)

(R_f : 0,24)

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Detektion UV 254 nm; UV 365 nm (hellblaue Fluoreszenz);
Gibbs-Reagenz: positive Reaktion (blau)

Strukturaufklärung

Summenformel	$C_{16}H_{18}O_{10}$
Relative Molekülmasse	370
EI-MS 100 °C; 80 eV , m/z (rel. Int. %)	$[M]^+$ 208 (46); 193 (19); 165 (9)
(-)-FAB MS, 80 eV, m/z	$[M-H]^-$ 369 ; $[M-H+Na]^-$ 391; $[M-Glucose-H]^-$ 207
(+)-FAB MS, 80 eV, m/z	$[M+H]^+$ 371 ; $[M+Na]^+$ 393; $[C_{10}H_9O_5]^+$ 209
HREI-MS, 80 eV, m/z , 220°C	208,03701 $[C_{10}H_8O_5]^+$ ber. als 208,03718
1H -NMR Daten	Tabelle 2; Seite 23
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 3; Seite 25

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von $^1H, ^1H$ -COSY, sowie HETCORR Daten.

10.7.4. 7-Methoxycumarin-6- β -glucopyranosid (= Magnoliosid), (V4)

Isolierung

Aus der 1-Butanol-Phase des Krautextraktes (10 g) wurden nach Chromatographie über Polyamid mit dem Eluens Wasser die Fraktionen 2-13 an Sephadex-LH 20 rechromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:1)]. Die Fraktionen 2-7 ergeben nach präparativer Trennung auf Kieselgel Platten [Fließmittel: Ethylacetat-Methanol-Wasser (18:1:1)] die Substanz bei einem R_f -Wert von 0,23.

Eigenschaften: gelbes, amorphes Pulver
Ausbeute: 10,9 mg (5,45 ppm)*

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Präparative DC: Ethylacetat-Methanol-Wasser (18:1:1) R _f : 0,23; Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R _f : 0,26
Detektion:	UV 254 nm; UV 365 nm (dunkelblaue Fluoreszenz); Gibbs-Reagenz: negative Reaktion

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
Relative Molekülmasse	354
EI-MS 80 eV; 220 °C; <i>m/z</i> (rel. Int. %)	[C ₁₀ H ₈ O ₄] ⁺ ·192 (100); [C ₁₀ H ₈ O ₄ -CH ₃] ⁺ ·177 (40); [C ₁₀ H ₈ O ₄ -CO] ⁺ ·164 (17); [C ₁₀ H ₈ O ₄ -CH ₃ -CO] ⁺ ·149 (46)
(-)-FAB-MS, 80 eV, <i>m/z</i>	[M-Glucose-H] ⁻ 191
(+)-FAB-MS, 80 eV, <i>m/z</i>	[M+Na] ⁺ 377; [M+H] ⁺ 355; [M-Glucose+H] ⁺ 193
HREI-MS, <i>m/z</i> , 80 eV, 220 °C	192,04218 [C ₁₀ H ₈ O ₄] ⁺ ber. als 192,04226
¹ H-NMR Daten	Tabelle 2; Seite 23
¹³ C-NMR Daten	Tabelle 3; Seite 25

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von ¹H,¹H-COSY, sowie HETCOR Daten.

Substanz 3 und 4 liegen als Gemisch vor. Die eindeutige Zuordnung der Signale ist über eine HMBC-Messung erfolgte

10.7.5. 6,7-Dihydroxycumarin-8-sulfat (V5)

Isolierung

Aus der 1-Butanol-Phase des Krautextraktes (10 g) wurden nach Chromatographie über Polyamid mit dem Eluens Wasser und dann 0,1 % Ammoniumcarbonat in Wasser die Fraktionen 46-50 an Sephadex-LH 20 rechromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (4:1)]. Die Fraktionen 3-5 ergeben nach HPLC Trennung an einer RP-18 Säule (Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1) in 25 Minute; Flussrate: 3 ml/minute; Retentionszeit: 4,533 min) und Kristallisation aus Methanol die reine Substanz am oberen Rand des Gefäßes.

Eigenschaften: durchsichtige Kristalle

Ausbeute: 30,8 mg (15,4 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R _f : 0; Ethylacetat-Methanol-Eisessig-Wasser (60:45:15:10) R _f : 0,57 ; 1-Butanol-Eisessig-Wasser (63:27:10) R _f : 0,16
Detektion	UV 254 nm; UV 365 nm (hellblaue Fluoreszenz) Gibbs-Reagenz: negativ (als Referenzen auf der gleichen Platte: Capsaicin: pos; Fraxin: neg.; Fraxetin-7-β-glucopyranosid: pos.)

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₉ H ₆ O ₈ S
Relative Molekülmasse	274
UV λ _{max} (nm) (log ε) in Methanol	330 (3,00); 207 (3,53)

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

EI-MS 80 eV; 190 °C; <i>m/z</i> (rel. Int. %)	194 (43); 166 (52); 138 (24); 137 (20); 133 (71)
(-)-FAB-MS, 80 eV, <i>m/z</i>	[M-H] ⁻ 273 ; [C ₈ H ₅ O ₇ S] ⁻ 245; [HSO ₃] ⁻ 97; [SO ₃] ⁻ 80; [M-SO ₃ +Matrix] ⁻ 347; [M-CO] ⁻ 245
HREI-MS, 80 eV, <i>m/z</i> , 190 °C	194,02132 [C ₉ H ₆ O ₅] ⁺ ber. als 194,02153; 166,02652 [C ₈ H ₆ O ₄] ⁺ ber. als 166,02661; 138,03166 [C ₇ H ₆ O ₃] ⁺ ber. als 138,03170; 137,02381 [C ₇ H ₅ O ₃] ⁺ ber. als 137,02387
(+)-FAB-MS, 80 eV, <i>m/z</i>	-
¹ H-NMR Daten	Tabelle 4; Seite 30
¹³ C-NMR Daten	Abbildung 15; Seite 31

Zur Strukturaufklärung wurden HETCOR- und NOE-Messungen zur Hilfe genommen.

10.7.6. 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin (V6)

Isolierung

Die 1-Butanol-Phase des Wurzelextraktes (12 g) wird an Polyamid chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 27-39 (117 mg) über eine Kieselgelsäule rechromatographiert [Eluens: Petrolether-Ethylacetat (4:1)→(1:1)]. Nach DC Prüfung wurden die Fraktionen 6-77 vereinigt und ergeben die Verbindung 6.

Eigenschaften: gelbe Kristalle
Ausbeute: 38 mg (38 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase Kieselgel
Mobile Phase Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f: 0,79

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Detektion UV 254 nm; gelbgraue Fluoreszenz im UV bei 365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	$C_{12}H_{12}O_6$
Relative Molekülmasse	252
UV λ_{max} (nm) (log ϵ) in Methanol	328 (4,80); 262 (4,58); 208 (5,22)
EI-MS 70 eV; 130 °C m/z (rel. Int. %)	$[M]^+$ 252 (100); $[M-CH_3]^+$ 237 (85); $[M-2CH_3]^+$ 222 (35); $[M-3CH_3]^+$ 209 (22); $[M-3CH_3-CO]^+$ 181 (24)
1H -NMR Daten	Tabelle 5; Seite 32
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 6; Seite 33

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von HETCOR und Hmhc Daten.

10.7.7. 7,8-Dihydroxy-6-methoxycumarin (= Fraxetin) (V7)

Isolierung

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 59-83 (249,5 mg) wurden über eine Kieselgelsäule [Eluens: Petrolether-Ethylacetat (9:1)-(0:1) dann Ethylacetat-Methanol (1:0)-(1:1)] nachgetrennt und anschließend die Fraktionen 651-800 über HPLC an RP-18 [Flussrate: 3 ml/Minute; Fließmittel: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1) in 30 Minute] rechromatographiert. Substanz 13 eluiert bei einer Retentionszeit von 7,62 Minuten.

Eigenschaften: grün-gelbes, amorphes Pulver

Ausbeute: 2 mg (1 ppm)*

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f : 0,71
Detektion	UV 254 nm; $FeCl_3$ -Reagenz: graugrün; gelbe Fluoreszenz mit KOH bei 365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	$C_{10}H_8O_5$
Relative Molekülmasse	208
UV λ_{max} (nm) (log ϵ) in Methanol	333,5 (3,22); 210 (3,79)
EI-MS 70 eV; 200 °C m/z (rel. Int. %)	$[M]^+$ 208 (51,9); $[M-CH_3]^+$ 193 (22,3); $[M-CO]^+$ 180 (12,0); $[M-CO-CH_3]^+$ 165 (14,5)
(+)-FAB-MS, 80 eV, m/z	$[M+H]^+$ 209; $[M+Na]^+$ 231
(-)-FAB-MS, 80 eV, m/z	$[M-H]^-$ 207; $[C_9H_4O_5]^-$ 192
HREI-MS, 250 °C, 80 eV, m/z	208,03701 $[C_{10}H_8O_5]^+$ ber. als 208,03718; 193,01353 $[C_9H_5O_5]^+$ ber. als 193,01370; 180,04222 $[C_9H_8O_4]^+$ ber. als 180,04226; 165,01861 $[C_8H_5O_4]^+$ ber. als 165,01879; 137,02381 $[C_7H_5O_3]^+$ ber. als 137,02387
1H -NMR Daten	Tabelle 7 ; Seite 35
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 6; Seite 33

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von HETCOR Daten.

10.7.8. 4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1-β-D-glucopyranosid (V8)**Isolierung**

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol Gradient von (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 5-13 wurden an Sephadex-LH 20 rechromatographiert [Eluens Methanol-Wasser (1:1)] Aus der HPLC Trennung an RP-18 [Wasser-Methanol (9:1)→(0:1) in 43 Minute; Flussrate: 4 ml/min; Retentionszeit: 27,838 Minuten] der Fraktionen 1-14 wird die Substanz erhalten.

Eigenschaften: weiße Nadeln
Ausbeute: 90 mg (45 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase Kieselgel
Mobile Phase Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1), R_f: 0,36
Detektion UV 254 nm; Vanillin-H₂SO₄-Reagenz

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₁₇ H ₂₄ O ₈
Relative Molekülmasse	356
UV λ _{max} (nm) (log ε) in Methanol	288 (3,68); 205 (4,35)
Spez. Drehung	[α] _D ²⁰ = -32°; c= 0,5 in MeOH
Spez. Drehung der Glucose	[α] _D ²² = +14,3°; c=0,56 in Wasser
EI-MS 80 eV; 125 °C; m/z (rel. Int. %)	[M] ⁺ 194(100); 179 (22,2)
(+)-FAB-MS, 80 eV, m/z	[M] ⁺ 356; [M+Na] ⁺ 379; [M-Hexose] ⁺ 194
(-)-FAB-MS, 80 eV, m/z	[M-H] ⁺ 355; [C ₁₁ H ₁₃ O] ⁺ 193
HREI-MS, 80 eV, m/z, 120 °C	194,09427 [C ₁₁ H ₁₄ O ₃] ⁺ ber. als 194,09430; 179,07070 [C ₁₀ H ₁₁ O ₃] ⁺ ber. als 179,07082

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f : 0,7
Detektion	UV 254 nm; $FeCl_3$ -Reagenz (dunkelblau)

Strukturaufklärung

Summenformel	$C_7H_6O_5$
Relative Molekülmasse	170
UV λ_{max} (nm) (log ϵ) in Methanol	272 (4,43); 217 (4,91)
EI-MS 80 eV; 170 °C; m/z (rel. Int. %)	$[M]^+$ 170 (100); 153 (74); 125 (14)
1H -NMR Daten	Tabelle 11, Seite 41
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 12, Seite 42

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von HETCOR Daten.

10.7.10. Protocatechusäure (V10)

Isolierung

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 84-129 (207 mg) über HPLC an RP-18 [Flussrate: 3 ml/Minute; Fließmittel: Wasser-Methanol (3:2)→(0:1) in 15 Minute] rechromatographiert, ergeben die Substanz bei einer Retentionszeit von 6,0 Minuten.

Eigenschaften:	gelbe Nadeln
Ausbeute:	5 mg (2,5 ppm)*

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R _F : 0,75
Detektion	UV 254 nm; FeCl ₃ -Reagenz (graublau)

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₇ H ₆ O ₄
Relative Molekülmasse	154
UV λ _{max} (nm) (log ε) in Methanol	292 (4,30); 208 (4,78)
EI-MS 70 eV; 80 °C; m/z (rel. Int. %)	[M] ⁺ : 154 (100); 137 (89); 109 (25)
¹ H-NMR Daten	Tabelle 11, Seite 41
¹³ C-NMR Daten	Tabelle 12, Seite 42

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von HETCOR Daten.

10.7.11. (+)-(2R,3R)-Taxifolin-3-β-glucopyranosid (V11)

Isolierung

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 84-129 (207 mg) über HPLC an RP-18 [Flussrate: 3 ml/Minute; Fließmittel: Wasser-Methanol (3:2)→(0:1) in 15 Minute] rechromatographiert, ergeben die Substanz bei einer Retentionszeit von 7,6 Minuten.

Eigenschaften:	gelbes, amorphes Pulver
Ausbeute:	6 mg (3 ppm)*

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R _f : 0,22
Detektion	UV 254 nm; AlCl ₃ -Reagenz (gelb im VIS und im UV 365 nm)

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂
Relative Molekülmasse	466
UV λ _{max} (nm) (log ε) in Methanol	291 (3,42), 206 (3,71)
CD Messung	λ(nm)(Δε): 329 (17,58); 292 (-40,69); 253 (7,63); c=7,5 10 ⁻³ in Methanol
spez. Drehung	[α] ²² _D = +41,7° bei c=0,64 in Methanol
EI-MS 70 eV; 220 °C m/z (rel. Int. %)	[C ₁₅ H ₁₂ O ₇] ⁺ 304 (5); [C ₁₅ H ₁₀ O ₆] ⁺ 286 (10)
(+)-FAB-MS, 80 eV, m/z	[M+H] ⁺ 467; [M+Na] ⁺ 489
(-)-FAB-MS, 80 eV, m/z	[M-H] ⁻ 465
HREI-MS, 80 eV, m/z, 220 °C	304,05898 [C ₁₅ H ₁₂ O ₇] ⁺ ber. als 304,05831; 286,04716 [C ₁₅ H ₁₀ O ₆] ⁺ ber. als 286,04774
¹ H-NMR Daten	Tabelle 13; Seite 44
¹³ C-NMR Daten	Tabelle 14; Seite 45

Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von HETCOR Daten.

10.7.12. (+)-(2R,3R)-Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid (V12)**Isolierung**

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 84-129 (207 mg) über HPLC an RP-18 [Flussrate: 3 ml/Minute; Fließmittel: Wasser-Methanol (3:2)→(0:1) in 15 Minuten] rechromatographiert, ergeben die Substanz bei einer Retentionszeit von 8,8 Minuten.

Eigenschaften: gelbe Nadeln
 Ausbeute: 20,4 mg (10,2 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase Kieselgel
 Mobile Phase Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f: 0,28
 Detektion UV 254 nm; AlCl₃-Reagenz (gelb im VIS und im UV 365 nm)

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
Relative Molekülmasse	450
UV λ _{max} (nm) (log ε) in Methanol	295 (4,27), 217 (4,44)
CD-Spektrum	λ(nm)(Δε):327 (6,73); 296 (-11,43); 252 (2,55); c=10 10 ⁻³ in Methanol
Spez. Drehung	[α] ²⁰ _D =+35,7° bei c=0,68 in MeOH
EI-MS 80 eV; 210 °C; m/z (rel. Int. %)	[M] ⁺ 450 (1); [C ₁₅ H ₁₂ O ₆] ⁺ 288 (22); [C ₁₅ H ₁₁ O ₆] ⁺ 270 (69)
(+)-FAB-MS, 80 eV, m/z	[M+H] ⁺ 451; [M+Na] ⁺ 473; [C ₁₅ H ₁₃ O ₆] ⁺ 289
(-)-FAB-MS, 80 eV, m/z	[M-H] ⁻ 449; [C ₁₅ H ₁₁ O ₆] ⁻ 287
HREI-MS, 80 eV, m/z, 210 °C	450,11582 [C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁] ⁺ ber. als 450,11622;

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

	288,06321 [C ₁₅ H ₁₂ O ₆] ⁺ ber. als 288,06339;
	270,05273 [C ₁₅ H ₁₀ O ₅] ⁺ ber. als 270,05283
¹ H-NMR Daten	Tabelle 13; Seite 44
¹³ C-NMR Daten	Tabelle 14; Seite 45

10.7.13. Orientin-2''-gallat (V13)

Isolierung

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 452-497 (202 mg) wurden über Kieselgel im Fließmittel: Ethylacetat-Petrolether (4:1)→(1:0) anschließend Ethylacetat-Methanol (4:1) rechromatographiert, die resultierenden Fraktionen 41-320 über Sephadex-LH 20 mit Methanol gereinigt.

Eigenschaften: gelbes amorphes Pulver
 Ausbeute: 37,1 mg (18,55 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase Kieselgel
 Mobile Phase Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f: 0,39
 Detektion UV 254 nm; gelb im VIS; AlCl₃-Reagenz: orange Fluoreszenz im UV 365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅
Relative Molekülmasse	600
UV λ _{max} (nm) (log ε) in Methanol	346 (4,18), 270 (4,31), 213 (4,67)

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Spez. Drehung	$[\alpha]_{D}^{22} = -128,3^{\circ}$ bei $c=1,59$ in MeOH
EI-MS 80 eV; 200 °C; m/z (rel. Int. %)	$[M-C_6H_{10}O_4-C_7H_5O_5+H]^+286$ (0,11); $[C_7H_6O_5]^+170$ (1,43); $[C_7H_6O_5-OH]^+153$ (1,89); $[C_7H_6O_5-OH-CO+H]^+126$ (14,8)
(+)-FAB-MS, 80 eV, m/z	$[M+H]^+601$; $[C_{15}H_{11}O_6+2H]^+287$
(-)-FAB-MS, 80 eV, m/z	$[M-H]^-599$; $[C_{15}H_9O_6]^-285$; $[C_7H_5O_5]^-169$
1H -NMR Daten	Tabelle 15; Seite 49
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 16; Seite 52

10.7.14. Isoorientin-2''-gallat (V14)

Isolierung

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 498-580 (143,8 mg) wurden über Kieselgel im Fließmittel Ethylacetat-Petrolether (1:4)→(1:0) anschließend mit Ethylacetat-Methanol (9:1) rechromatographiert. Die resultierenden Fraktionen 270-430 wurden noch mal über Sephadex-LH 20 mit Methanol nachgereinigt.

Eigenschaften:	gelbes amorphes Pulver
Ausbeute:	20,4 mg (10,2 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f : 0,26
Detektion	UV 254 nm; gelb im VIS; $AlCl_3$ -Reagenz: orange Fluoreszenz im UV 365 nm

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Strukturaufklärung

Summenformel	$C_{28}H_{25}O_{15}$
Relative Molekülmasse	600
UV λ_{\max} (nm) (log ϵ) in Methanol	346 (4,16), 270 (4,34), 213 (4,73)
Spez. Drehung	$[\alpha]^{22}_D = -113,1^\circ$ bei $c=0,61$ in MeOH
EI-MS 80 eV; 200 °C; m/z (rel. Int. %)	$[C_7H_6O_5]^+$ 170 (1,11); $[C_7H_6O_5-OH]^+$ 153 (2,36)
(+)-FAB-MS, 80 eV, m/z	$[M+H]^+$ 601; $[M+Na]^+$ 623
(-)-FAB-MS, 80 eV, m/z	$[M-H]^-$ 599; $[M-C_7H_5O_5]^-$ 431; $[M-C_7H_5O_5-C_6H_{10}O_4]^-$ 285; $[C_7H_5O_5]^-$ 169
1H -NMR Daten	Tabelle 15; Seite 49
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 16; Seite 52

10.7.15. Orientin (V15)

Isolierung

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 180-202 (301,2 mg) wurden über Kieselgel im Fließmittel Ethylacetat-Petrolether (1:4)→(1:0) anschließend mit Ethylacetat-Methanol (9:1) rechromatographiert. Die resultierenden Fraktionen 29-250 wurden erneut über eine Kieselgelsäule mit Ethylacetat-Methanol (1:0)→(1:1) nachgereinigt.

Eigenschaften: gelbes amorphes Pulver

Ausbeute: 18,2 mg (9,1 ppm)*

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f : 0,34
Detektion	UV 254 nm; gelb im VIS; $AlCl_3$ -Reagenz: gelbe Fluoreszenz UV 365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Relative Molekülmasse	448
UV λ_{max} (nm) (log ϵ) in Methanol	344 (3,51), 257 (3,48), 210 (3,84)
Spez. Drehung	$[\alpha]_D^{24} = +5,9$ bei $c = 0,24$ in MeOH
EI-MS 80 eV; 300°C; m/z (rel. Int. %)	$[M-C_6H_{11}O_5+H]^+ 286$ (11,8)
(+)-FAB-MS, Methanol/Glycerol, 80 eV, m/z	$[M+H]^+ 449$
(-)-FAB-MS; Methanol/Glycerol, 80 eV, m/z	$[M-H]^- 447$; $[M-C_6H_{11}O_5]^- 285$
1H -NMR Daten	Tabelle 17; Seite 56
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 18; Seite 58

10.7.16. Isoorientin (V16)

Isolierung

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 180-202 (301,2 mg) wurden über Kieselgel im Fließmittel Ethylacetat-Petrolether (1:4)→(1:0) anschließend mit Ethylacetat-Methanol (9:1) rechromatographiert. Die resultierenden Fraktionen 29-250 wurden noch mal über eine Kieselgelsäule mit Ethylacetat-Methanol (1:0)→(1:1) nachgereinigt.

Eigenschaften: gelbes amorphes Pulver

Ausbeute: 8 mg (4 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase Kieselgel
 Mobile Phase Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R_f: 0,23
 Detektion UV 254 nm; AlCl₃-Reagenz: gelbe Fluoreszenz bei 365 nm

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Relative Molekülmasse	448
UV λ _{max} (nm) (log ε) in Methanol	346 (4,82), 213 (4,97)
Spez. Drehung	[α] _D ²⁰ =+19,4 bei c= 0,39 in MeOH
EI-MS 80 eV; 220 °C; m/z (rel. Int. %)	[C ₂₁ H ₁₄ O ₈] ⁺ 394 (1,7); [C ₁₅ H ₁₀ O ₆] ⁺ 286 (7,8); [C ₇ H ₅ O ₂] ⁺ 137 (14,5); [C ₆ H ₅ O ₂] ⁺ 109 (22,3)
(+)-FAB-MS; Methanol/Glycerol	[M+H] ⁺ 449; [M+H-C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺ 287
(-)-FAB-MS; Methanol/Glycerol	[M-H] ⁻ 447; [M-H-C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁻ 285
HREI-MS, 80 eV, m/z; 250 °C	394,06854 [C ₂₁ H ₁₄ O ₈] ⁺ (ber.:394,06888); 286,04772 [C ₁₅ H ₁₀ O ₆] ⁺ (ber.:286,04773); 137,02381 [C ₇ H ₅ O ₃] ⁺ (ber.:137,02386); 109,02884 [C ₆ H ₅ O ₂] ⁺ (ber.:109,02895)
¹ H-NMR Daten	Tabelle 17; Seite 56
¹³ C-NMR Daten	Tabelle 18; Seite 58

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

10.7.17. (-)-(2R,3R)-Epigallocatechin-3-gallat (V17)**Isolierung**

Die Ethylacetat-Phase des Krautextraktes (15 g) wird an Sephadex-LH 20 chromatographiert [Eluens: Wasser-Methanol (1:0)→(0:1)]. Die Fraktionen 661-710 (622 mg) wurden über Kieselgel im Fließmittel Ethylacetat-Petrolether (1:4)→(6:5). Die resultierenden Fraktionen 131-432 wurden über eine Sephadexsäule mit Methanol-Wasser (1:0)→(1:1) nachgereinigt.

Eigenschaften: rotbraunes amorphes Pulver

Ausbeute: 27,8 mg (13,9 ppm)*

Chromatographische Parameter

Stationäre Phase	Kieselgel
Mobile Phase	Analytische DC: Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (18:1:1) R _f : 0,66
Detektion	UV 254 nm; rotbraun im VIS; rot mit Vanillin/HCl; blau mit FeCl ₃

Strukturaufklärung

Summenformel	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁
Relative Molekülmasse	458
UV λ _{max} (nm) (log ε) in Methanol	275 (3,98), 213 (3,65)
CD-Messung	λ(nm)(Δε):281 (-15,90); 238 (+0,4); c=10 10 ⁻³ in Methanol
Spez. Drehung	[α] _D ²² = -180,0° bei c=0,53 in MeOH
EI-MS 80 eV; 240 °C; m/z (rel. Int. %)	[C ₇ H ₆ O ₅] ⁺ 170 (1,4); [C ₇ H ₅ O ₄] ⁺ 153 (1,0); [C ₆ H ₆ O ₃] ⁺ 126 (20,6); [C ₆ H ₄ O ₂] ⁺ 108 (7,5)
(+)-FAB-MS, Methanol/Glycerol, 80 eV, m/z	[C ₁₅ H ₁₃ O ₆] ⁺ 289; [C ₁₅ H ₁₁ O ₆ -2H] ⁺ 287; [C ₇ H ₅ O ₄] ⁺ 153

* ppm Angaben beziehen sich auf die extrahierte Menge Droge (Kraut 2 kg; Wurzel 1 kg)

(-)-FAB-MS, Methanol/Glycerol, 80 eV, $[M-H]^-$ 457; $[M-C_7H_5O_4]^-$ 305; $[C_7H_5O_5]^-$ <i>m/z</i>	169; $[C_7H_5O_4]^-$ 153; $[C_6H_5O_3]^-$ 125
HREI-MS, 80 eV, 240 °C, <i>m/z</i>	170,02135 $[C_7H_6O_5]^+$ (ber.:170,02153); 153,01871 $[C_7H_5O_4]^+$ (ber.:153,01879); 126,03159 $[C_6H_6O_3]^+$ (ber.:126,03170); 108,02111 $[C_6H_4O_2]^+$ (ber.:108,02113)
1H -NMR Daten	Tabelle 19, Seite 61
^{13}C -NMR Daten	Tabelle 20, Seite 63

10.8. Mikrobiologische Arbeitstechnik

10.8.1. Untersuchungen zur antimykobakteriellen Wirkung von Extrakten

Testkeime

Mykobakterium aurum A4 Pasteur Institut, Paris, France 104 482

Mykobakterium smegmatis ATCC 14 468

Beide Testkeime wurden an der School of Pharmacy, London verwendet (Seidel und Taylor, 2004; Stavri *et al.*, 2003). Die Bakterien wurden auf Columbia Blut Agar (Oxoid) mit einem Zusatz von 5% defibriniertem Pferdeblut bei 37 °C in Kultur (Oxoid) gehalten. Als Kulturmedium für die Mikrodilutionstests wird Sensititre®, Cation adjusted Mueller Hinton Broth with TES, Westlake, OH, verwendet.

Herstellung des Inokulums

Nach einer Inkubation von drei Tagen bei 37 °C auf Agar wird die Bakterienkultur in wenigen Millilitern physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Davon wird 1 ml entnommen und in ein steriles Gefäß mit ca. 7 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben. Zur Einstellung der Bakterienzahl wird die Bakteriensuspension mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, bis deren optische Dichte gleich der einer Standard-Bariumchlorid Lösung (0.5 McFarland Bariumchlorid Standard, optische Dichte von 0,125 bei 550 nm) ist (Chung *et al.* , 1995). Zum Schluss wurden 2µl 10% wässrige Tween 80 Lösung je 1000µl fertigen Inokulums zugesetzt.

Testaufbau

Die Testung der Extrakte und Fraktionen erfolgte auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen. Die Arbeiten erfolgen in einer Laminar-Air Flow Bank unter sterilen Bedingungen. Zu 100µl Nährmedium wurden je 100 µl der Ausgangslösungen (s. unten) gegeben und seriell 1:1 über 4 bzw. 5 Vertiefungen verdünnt. Ebenso wird mit der Ethambutollösung (Herstellung s. unten) verfahren. Die Lösemittelkontrollen (Herstellung s. unten) werden unverdünnt belassen. Zum Schluss wird jeder Vertiefung 100 µl des

Inokulums zugesetzt. Die befüllten Mikrotiterplatten werden bei 37 °C für 72 Stunden (*M. smegmatis*) bzw. 120 Stunden (*M. aurum*) inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des MTT–Assays zur Bestimmung der MHK-Werte. Dazu werden jeder Vertiefung 20µl 0,5 % methanolische MTT-Lösung zugesetzt und noch mal bei 37 °C für 20 Minuten (*M. smegmatis*) bzw. 60 Minuten (*M. aurum*) inkubiert. Der MHK-Wert eines Extraktes entspricht der Konzentration der Probenverdünnung, bei der kein Bakterienwachstum erkennbar ist.

Herstellung der Testlösungen

Ausgangskonzentrationen :	Gesamtextrakte:	4096 µg/ml
	Fraktionen:	2048 µg/ml
	Ethambutol:	64 µg/ml

Herstellen der Ausgangslösungen mit der korrekten Konzentration

Es wurden Ausgangslösungen hergestellt, so dass in der ersten Vertiefung der Mikrotiterplatte jeweils die korrekte Ausgangskonzentration von 4096 µg/ml, 2048 µg/ml bzw. 64 µg/ml (s.o.) resultierten. Dazu wurden zu 1880 µl Sensititre® Nährmedium jeweils 120 µl einer Extrakt- bzw. Ethambutollösung entsprechender Konzentration gegeben (Tabelle 54; Seite 137).

Herstellen der Lösemittel-Proben als Wachstums-Kontrolle

Hier wurden zu 1880 µl Sensititre® Nährmedium jeweils 120 µl des verwendeten Lösemittels gegeben.

Herstellung der MTT-Lösung

Es wurden für eine 0,5 % methanolische Lösung 100 mg 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in 20 ml Methanol gelöst. Die Lösung ist unter Schutz vor Licht einige Tage haltbar.

Tabelle 54: Verwendete Lösemittel der Extrakte und Fraktionen

	Methanol	Methanol- Wasser (1:1)	DMSO	DMSO- Wasser (1:1)
Eps® 7630				+
Dichlormethan-Fraktion			+	
Ethylacetat-Fraktion	+			
1-Butanol-Fraktion		+		
Wasser-Fraktion				+
<i>P. reniforme</i> Wurzel	+			
Dichlormethan-Fraktion			+	
Ethylacetat-Fraktion	+			
1-Butanol-Fraktion		+		
Wasser-Fraktion		+		
<i>P. reniforme</i> Kraut				+
Dichlormethan-Fraktion	+			
Ethylacetat-Fraktion	+			
1-Butanol-Fraktion		+		
Wasser-Fraktion		+		
<i>P. sidoides</i> Wurzel				+
Dichlormethan-Fraktion			+	
Ethylacetat-Fraktion	+			
1-Butanol-Fraktion		+		
Wasser-Fraktion				+
<i>P. sidoides</i> Kraut (industriell)	+			
Dichlormethan-Fraktion	+			
Ethylacetat-Fraktion	+			
1-Butanol-Fraktion		+		
Wasser-Fraktion		+		

10.8.2. Untersuchungen zur Modulation des Komplement-Systems

Herstellung der Testlösung

UNIVERSITÄT ANTWERPEN (Klerx *et al.*, 1983)

Die Proben wurden zu 200-1000µg/ml in Methanol (Einzelsubstanzen) bzw. in geeignetem Lösemittel (Tabelle 54, Seite 137) gelöst und mit einer Pufferlösung [enthält 0,83 mM Mg²⁺ und 0,25 mM Ca²⁺ (Huang *et al.*, 1997)] über 7 Stufen in der Mikrotiterplatte seriell 1:1 verdünnt, so dass 50 µl pro Vertiefung resultieren.

KOREA RESEARCH INSTITUTES, DEAJEON (Kabat und Mayer, 1967)

Die Testsubstanzen wurden zu ca. 10 mg/ml in DMSO gelöst und anschließend mit 0,1%igem Gelatine-Veronal-Puffer (GVB⁺⁺)(enthält 0,5 mM Mg²⁺ und 0,15 mM Ca²⁺) auf eine 2,5%ige Lösung verdünnt. Die Lösungen wurden auf Mikrotiterplatten über vier Stufen 1:1 mit GVB⁺⁺-Puffer verdünnt (Buyung *et al.*, 2001).

Herstellung des Komplementserums

UNIVERSITÄT ANTWERPEN

Es wurde humanes Blutserum so mit Puffer verdünnt, dass es ca. 50%ige Hämolyse der Ansätze hervorrief.

KOREA RESEARCH INSTITUTES, DEAJEON

Das humane Blutserum wurde mit GVB⁺⁺ 1:120 verdünnt, was eine Hämolyse von ca. 50% (Buyung *et al.*, 2001) hervorrief.

Herstellung der sensitiven Schaferythrozyten (ShE)

Das Schafblut wird mit citratgepufferter Glucoselösung verdünnt, zentrifugiert (1000g, 10 min, 20 °C) und vom Überstand getrennt. Die Erythrozyten werden 3x mit 0,9% NaCl-Lösung und einmal mit Veronal-Puffer gewaschen, anschließend mit Veronal-Puffer auf die gewünschte Zellzahl eingestellt (Alban *et al.*, 2002).

UNIVERSITÄT ANTWERPEN

Einer Lösung ShE mit der Zellzahl $4 \cdot 10^8$ /ml wird die gleiche Menge eines 1:400 verdünnten Anti-Schaf Serums vom Kaninchen zugesetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

KOREA RESEARCH INSTITUTE, DEAJEON

Die ShE wurden mit Puffer auf eine Lösung mit der Zellzahl von $5 \cdot 10^8$ /ml eingestellt. Dieser Lösung wird das gleiche Volumen einer Hämolytin Lösung zugesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wird vor Gebrauch bei 4 °C gelagert.

***In vitro* Assay für die Bestimmung der Antikomplement Aktivität**

UNIVERSITÄT ANTWERPEN

Es wurden je 50 µl des Komplementserums mit 50µl der Testlösungen gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 50 µl der Lösung der sensibilisierten ShE zugesetzt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde nachfolgend zentrifugiert (800 g, 6 min) und 80 µl des Überstandes mit Wasser auf 200 µl verdünnt und die Absorption bei 414 nm vermessen (Huang *et al.*, 1997). Der Test wurde pro Ansatz zwei mal wiederholt.

KOREA RESEARCH INSTITUTE, DEAJEON

Je 80 µl des Komplementserums wurden mit 80µl der Testlösungen gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 40 µl der Lösung der sensitiven ShE zugefügt und noch mal für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde danach bei 4 °C zentrifugiert (1500 U/Minute). Von 100 µl des Überstandes wurde sofort die optische Dichte bei 405 nm bestimmt (Buyung *et al.*, 2001). Der Test wurde pro Ansatz drei mal wiederholt.

Messwerte

 Tabelle 55: IC₅₀-Werte der Proben bei der Hemmung der komplementinduzierten Hämolyse

Proben (ANTWERPEN)	Ergebnisse		Mittelwert	SD*
	IC ₅₀ (µg/ml)		IC ₅₀ (µg/ml)	(µg/ml)
<i>P. sidoides</i> Extrakt	9,99	8,79	9,39	0,85
DCM-Fraktion	4,46	3,71	4,09	0,53
Etylacetat-Fraktion	19,82	18,49	19,16	0,94
1-Butanol-Fraktion	19,76	18,78	19,27	0,69
Wasser-Fraktion	9,59	7,39	8,49	1,56
6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin	72,13	80,41	76,27	5,85
Epigallocatechin-3-gallat	32,97	32,39	32,68	0,41
Gallussäure	>113	>113	>113	

* Standardabweichung

Tabelle 56: Messwerte Komplementmodulation durch die Testsubstanzen

Testsubstanz (KOREA)	Konzentration (µM)	OD ¹⁾		Lyse (%) Mittelwert	% SD ²⁾
		(405nm)	SD ²⁾		
4-Allyl-2,5-dimethoxyphenol-1-β-D-glucopyranosid V8	200	0,548	0,018	42,0	3,2
	100	0,575	0,010	44,1	1,7
	50	0,579	0,019	44,4	3,4
	25	0,584	0,024	44,8	4,3
Isoorientin-2''-gallat V14	200	0,029	0,009	1,33	1,6
	100	0,266	0,028	20,0	5,0
	50	0,466	0,015	35,6	2,7
	25	0,541	0,013	41,5	2,3
Dihydrokämpferol-3-β-glucopyranosid V12	200	0,688	0,016	53,0	2,8
	100	0,600	0,038	46,1	6,8
	50	0,518	0,026	39,7	4,7
	25	0,508	0,054	38,9	9,6
Kontrolle II		0,562	0,010	43,1	0,8
Kontrolle IV		0,012	0,004		
Kontrolle III		1,288	0,040		

1) Optische Dichte

2) Standardabweichung

10.8.3. Untersuchung zur Hemmung der Thrombozytenaggregation

Blutgewinnung erfolgte von gesunden Spendern, die keine Medikamente eingenommen haben. Das Blut wird sofort mit 3,13%iger Natriumcitratlösung vermischt (9:1).

Formel 2 zur Umrechnung von Umdrehungen pro Minute in g bei Zentrifugen

$$g = 11,18 * r(\text{cm}) * (\text{UpM}/1000)^2$$

g: Erdbeschleunigung

UpM: Umdrehungen pro Minute

r: Radius

Herstellung des plättchenreichen Plasmas (PRP)

Das Citratblut wird 15 Minuten mit 100g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand ist das PRP, mit dem die Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation durchgeführt werden.

Herstellung des plättchenarmen Plasmas (PAP)

Das Citratblut wird 15 Minuten mit 2000g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der so gewonnen Überstand (PAP) wird jeweils zur Bestimmung des maximalen Lichtdurchgangs des Photometers benutzt.

Herstellung des HEPES Puffers

Es wird eine 1 µM wässrige Lösung von 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazon)-ethansulfonsäure (HEPES) (M=238,31 g/mol) hergestellt.

Herstellung der Acetylsalicylsäure (ASS) Referenz Lösung

ASS dient hier zur Bestimmung der 100%igen Hemmung der Thrombozytenaggregation und damit zur Bestimmung der Basislinie des Photometers. Es wird Aspisol® verwendet, ein ASS Präparat zur Injektion, das in 1 g Trockensubstanz 0,9 g Lysinmonoacetylsalicylsäure enthält. Es wird eine Lösung von 6,48 mg/ml der Aspisol® Trockensubstanz werden in HEPES-Puffer hergestellt.

Herstellung der Kollagenlösung

Es soll eine Kollagenlösung mit 0,008 mg/ml resultieren ($2,1 \cdot 10^{-4}$ M). Das jeweiligen Trockenprodukt wird in der entsprechenden Menge HEPES-Puffer gelöst.

Herstellung der Lösung der Testsubstanzen

Es sollen ca. 4 ml $5 \cdot 10^{-3}$ M Lösungen der Testsubstanzen in HEPES-Puffer entstehen. Da die eingesetzten Substanzen nicht in wässrigen Milieus löslich sind, wird die 5 mM Lösung hier mit ca. 4 ml HEPES-Methanol (1:1) gelöst. Die $5 \cdot 10^{-3}$ M Ausgangslösung wird anschließend mit HEPES-Puffer auf $2,5 \cdot 10^{-3}$ M verdünnt. Zeigen die Proben in der Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-3}$ M eine Hemmung, werden diese noch mal 1:1 mit HEPES-Puffer verdünnt und erneut vermessen. Daraus resultieren Endkonzentrationen im Testansatz von $2,1 \cdot 10^{-4}$ M für die Ausgangslösungen, $1,05 \cdot 10^{-4}$ M für die erste Verdünnung.

Herstellung der Lösemittelkontrolle

2 ml Methanol werden mit 2 ml HEPES Puffer gemischt, und noch mal mit Pufferlösung 1:1 verdünnt.

Versuchsansatz

20 µl der Ausgangslösungen der Proben, der ASS-Lösung bzw. der Lösemittelkontrolle werden zu 200 µl PRP gegeben und für 4 Minuten bei 37,4 °C inkubiert. Anschließend werden 20 µl Kollagenlösung zugesetzt und die Absorption des Ansatzes bei 650 nm über die folgenden 4-10 Minuten beobachtet. Die Ansätze werden dabei ständig gerührt.

Tritt eine Hemmung der Thrombozytenaggregation auf (ASS), wird alles Licht absorbiert. Tritt normale Aggregation ein (Lösemittelkontrolle), beginnt die Absorption des Lichtes ab 120 Sekunden kontinuierlich zu fallen, bis der Lichtdurchgang 100% ist.

Es werden Transmissionskurven über die Zeit aufgezeichnet. Die prozentuale Hemmung der Thrombozytenaggregation für die jeweilige Testsubstanz ergibt sich aus der Differenz der Transmission nach mindestens 4 Minuten gegenüber der Transmission der Lösemittelkontrolle. Substanzen bei denen die 210 µM Lösung eine Hemmung der Aggregation hervorruft, können zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes weiter verdünnt, und die Messung wiederholt werden.