



# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Chemotaxonomische Untersuchungen an  
österreichischen Farnen“

A.Wendelin Rauch

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. Pharm.)

Wien, 20.12.2008	
Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	A.o. Univ. Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn



An dieser Stelle möchte ich mich bei  
Fr. Univ.-Prof.Dr. Verena Dirsch  
für den Arbeitsplatz und bei  
Fr. ao.Univ.-Prof.Mag.Dr. Liselotte Krenn  
für die Betreuung der Diplomarbeit bedanken.



1. Einleitung und Problemstellung – Seite 7
  
2. Material und Methoden – Seite 8
  - 2.1. Pflanzenmaterial – Seite 8
  
  - 2.2. Dünnschichtchromatographie – Seite 9
  
  - 2.3. Festphasenextraktion – Seite 10
  
  - 2.4. Säulenchromatographie – Seite 10
  
  - 2.5. UV-VIS Spektroskopie – Seite 11
  
  - 2.6. Massenspektrometrie – Seite 11
  
  - 2.7. NMR – Spektroskopie – Seite 11
  
3. Untersuchung der polaren phenolischen Inhaltsstoffe von *Dryopteris dilatata* – Seite 12
  - 3.1. Extraktion – Seite 12
  
  - 3.2. Anreicherung der polaren phenolischen Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion – Seite 12
  
  - 3.3. Auftrennung Fraktion III mittels Säulenchromatographie – Seite 20
  
  - 3.4. Isolierung und Identifizierung von Substanz WR1 (=Kämpferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid) – Seite 36

3.5. Flavonoid Gehaltsbestimmung von *Dryopteris dilatata* und *Dryopteris filix mas* – Seite 46

4. Chemotaxonomische Untersuchungen – Seite 46

4.1. Herstellung der Extrakte und Anreicherung der polaren phenolischen Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion – Seite 47

4.2. Chemotaxonomische Untersuchungen an *Athyrium filix femina* mittels Dünnschichtchromatographie – Seite 48

4.3. Chemotaxonomische Untersuchungen an *Athyrium distentifolium* mittels Dünnschichtchromatographie – Seite 56

4.4. Chemotaxonomische Untersuchungen an *Dryopteris dilatata* mittels Dünnschichtchromatographie – Seite 64

4.5. Chemotaxonomische Untersuchungen an *Dryopteris filix mas* mittels Dünnschichtchromatographie – Seite 70

5. Zusammenfassung – Seite 76

6. Abbildungsverzeichnis – Seite 78

7. Tabellen – Seite 79

8. Literaturverzeichnis – Seite 79

9. Lebenslauf – Seite 81

## 1. Einleitung und Problemstellung

In der Volksmedizin Österreichs werden Farne als Mittel gegen rheumatische Beschwerden, Gelenkschmerzen und ähnliche Beschwerden eingesetzt. Dabei werden die Farne als Tinkturen für Einreibungen, als Badezusatz, als Polsterfüllungen oder direkt als Auflage verwendet [Lit. 1].

In einer vorangegangenen Diplomarbeit [Lit. 1] wurde eine Identifizierung der polaren Phenolcarbonsäuren und Flavonoide in *Dryopteris dilatata* (Hoffm.) A. Gray vorgenommen. Es konnten Caffeoyl-tatrat, Chlorogensäure und die Flavonoide Astragalin und Isoquercitrin identifiziert werden. Ausserdem wurde eine weitere Hauptkomponente detektiert, die aber nicht identifiziert werden konnte. Ein Teil dieser Diplomarbeit widmet sich der Identifizierung dieser Hauptkomponente.

Der andere Teil der Diplomarbeit beschäftigt sich mit chemotaxonomischen Untersuchungen an *Athyrium filix femina* (L.) Roth, *Athyrium distentifolium* Tausch ex Opiz, *Dryopteris dilatata* und *Dryopteris filix mas* (L.) Schott. Im Rahmen der chemotaxonomischen Untersuchungen wurden Einzelpflanzenvergleiche, Standortvergleiche sowie Jahresvergleiche durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendetes Pflanzenmaterial

Tabelle 1: Probenliste

Art	Standort	Jahr	Probennummer
Athyrium filix femina	Ebenwaldhöhe	2006	E06
Athyrium filix femina	Irenental	2006	I-23
Athyrium filix femina	Schneeberg	2006	S19
Athyrium filix femina	Schneeberg	2007	S07-22
Athyrium filix femina	Schneeberg	2007	S07-23
Athyrium filix femina	Schneeberg	2007	S07-25
Athyrium filix femina	Schneeberg	2007	S07-26
Athyrium filix femina	Schneeberg	2007	S07-28
Athyrium filix femina	Nördlicher Grafensteg	2007	NG07
Athyrium filix femina	Lauschützsee	2007	L07-2ff
Athyrium filix femina	Schneidgraben	2007	SN07
Athyrium filix femina	Ebenwaldhöhe	2007	E07-16
Athyrium distentifolium	Ebenwaldhöhe	2007	E07-3
Athyrium distentifolium	Ebenwaldhöhe	2007	E07-5
Athyrium distentifolium	Ebenwaldhöhe	2007	E07-8
Athyrium distentifolium	Ebenwaldhöhe	2007	E07-11
Athyrium distentifolium	Ebenwaldhöhe	2007	E07-14
Athyrium distentifolium	Lauschützsee	2007	L07-1
Athyrium distentifolium	Ebenwaldhöhe	2008	E01
Dryopteris dilatata	Ebenwaldhöhe	2006	EWH-A
Dryopteris dilatata	Ebenwaldhöhe	2006	EWH-C
Dryopteris dilatata	Ebenwaldhöhe	2006	EWH-D
Dryopteris dilatata	Ebenwaldhöhe	2006	EWH-E2
Dryopteris dilatata	Ebenwaldhöhe	2006	EWH-F
Dryopteris dilatata	Schneeberg	2007	S07-1
Dryopteris dilatata	Schneeberg	2007	S07-4
Dryopteris dilatata	Schneeberg	2007	S07-7
Dryopteris dilatata	Schneeberg	2007	S07-10
Dryopteris dilatata	Schneeberg	2007	S07-14
Dryopteris dilatata	Lauschützsee	2007	L07-1Dd
Dryopteris filix mas	Ebenwaldhöhe	2007	Dfm-1
Dryopteris filix mas	Ebenwaldhöhe	2007	Dfm-2
Dryopteris filix mas	Ebenwaldhöhe	2007	Dfm-3
Dryopteris filix mas	Ebenwaldhöhe	2007	Dfm-4
Dryopteris filix mas	Ebenwaldhöhe	2007	Dfm-5
Dryopteris filix mas	Turrachbach	2007	T07-1
Dryopteris filix mas	Lauschützsee	2007	L07-1fm



Für die Extraktion der polaren phenolischen Inhaltsstoffe wurden die getrockneten oberirdischen Anteile von *Athyrium filix femina*, *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris dilatata* und *Dryopteris filix mas* mit einer Schere zerkleinert und in einer Reibschale pulverisiert. Die pulverisierte Droge wurde mit 40% Methanol am Wasserbad bei 80 Grad Celsius 60 Minuten extrahiert.

## 2.2. Dünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurde 1mg Extrakt in 100 µl Lösungsmittel gelöst und 5 – 15 µl dieser Lösung strichförmig aufgetragen. Die Vergleichssubstanzen wurden in Methanol gelöst.

### Stationäre Phasen:

- a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- b) DC Fertigplatte Cellulose, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- c) DC Fertigplatte Polyamid 11 F254, Merck (Darmstadt, Deutschland)

### Mobile Phasen:

- 1) Ethylacetat + konzentrierte Ameisensäure + konzentrierte Essigsäure + Wasser (100:11:11:26)
- 2) 30% Essigsäure bei Verwendung von stationärer Phase b)
- 3) Chloroform + Ethylacetat (60:40)
- 4) Cyclohexan + Dichlormethan + konzentrierte Ameisensäure + Ethylformiat (35:30:5:30)
- 5) Toluol + Petrolether + Ethylmethylketon + Methanol (18:4,5:9:8)

### Detektionsmethode:

Nach Trocknung der Platte wurde mit 1%iger methanolischer Naturstoffreagens A Lösung (Diphenylborsäure – 2- aminoethylester) und mit 5%iger ethanolischen Polyethylenglykol 400 Lösung besprüht. Die Detektion erfolgte unter UV – Licht bei 365 nm.

### **2.3. Festphasenextraktion**

Die Kartusche (Bond Elut C18 10g/60ml beziehungsweise Bond Elut C18 50mg/1ml) wurde mit 2 Reservoirvolumen Methanol und 3 Reservoirvolumen Wasser konditioniert. Anschliessend wurde das gelöste Extrakt auf die Kartusche aufgebracht und 10 Minuten lang trockengesaugt. Danach wurde mit 2 Reservoirvolumen Wasser, 6 Reservoirvolumen 20% Methanol und 4 Reservoirvolumen 80% Methanol eluiert.

Die gewonnenen Fraktionen wurden am Rotovapor beziehungsweise mittels Lyophilisation zur Trockene gebracht.

### **2.4. Säulenchromatographie**

Die bei der Säulenchromatographie verwendete stationäre Phase war Lipophilic Sephadex LH 20 Sigma Aldrich. Die stationäre Phase wurde über Nacht mit der mobilen Phase vorgequollen. Als mobile Phase wurden Wasser – Methanol – Gemische unterschiedlicher Polarität verwendet.

Die Durchführung der unterschiedlichen Säulenchromatographien, Größe und Durchmesser der verwendeten Säule sowie die Zusammensetzung der mobilen Phasen wird in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

## 2.5. UV – VIS Spektroskopie

Für die UV – VIS Untersuchungen wurde ein Beckman DU – 640 Spectrophotometer verwendet. Als Shiftreagenzien kamen eine 5%ige Aluminiumchloridlösung sowie konzentrierte Salzsäure zum Einsatz.

## 2.6. Massenspektrometrie

Gerät: Perkin Elmer Sciex API 150, Turbo Ion Spray, negative ionisation

Gase: Nebulizer: 8

Curtain Gas: 8

Ion Spray Voltage: -4200 V

Temperatur: 400°C

Linsenspannungen im Ionenpfad:

DP -5

FP -200

EP -10

Scans: 180 – 800 amu/2 sec; step size 0,5 amu

## 2.7. NMR – Spektroskopie

Alle NMR-Messungen wurden auf einem BRUKER Avance DRX 600 NMR-Spektrometer mit folgender Ausrüstung durchgeführt:

5 mm TBI Probenkopf ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , BB) mit xyz-Gradientenspule;

oder 5 mm QNP Probenkopf ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) mit z-Gradientenspule, mit automatischer Tuning und Matching Einheit.

Messfrequenz für  $^1\text{H}$  600.13 MHz, für  $^{13}\text{C}$  150.92 MHz

Temperaturstabilisierung mit BCU05, Messtemperatur 300 K

Software Topspin 1.3

### **3. Untersuchung der polaren phenolischen Inhaltsstoffe von *Dryopteris dilatata***

*Dryopteris dilatata* gehört zu der Familie der *Dryopteridaceen*. Der deutsche Name ist Dunkler -, Großer - oder Breitblättriger Dornfarn.

Die überhängenden Wedel des sommergrünen Farns sind in Rosetten angeordnet. Sie erreichen eine Länge von etwa einem Meter. Der Blattstiel ist ziemlich kurz. Das Blatt ist drei- bis vierfach gefiedert, von dreieckigem bis ovalem Umriss und läuft spitz zu. Die eckigen Fiederblättchen sind am Rand sehr fein gesägt. Die Sporenbehälter sitzen zweireihig auf der Unter-seite der sporentragenden Wedel. Die Wuchshöhe beträgt 25 bis 120 cm.

Der Breitblättrige Dornfarn kommt in feuchten, schattigen Wäldern in gemäßigten Breiten Europas, Gebirgslagen in Südeuropa und dem Kaukasus vor und erstreckt sich über Sibirien bis Kamtschatka, Sachalin, Nordamerika [Lit. 2].

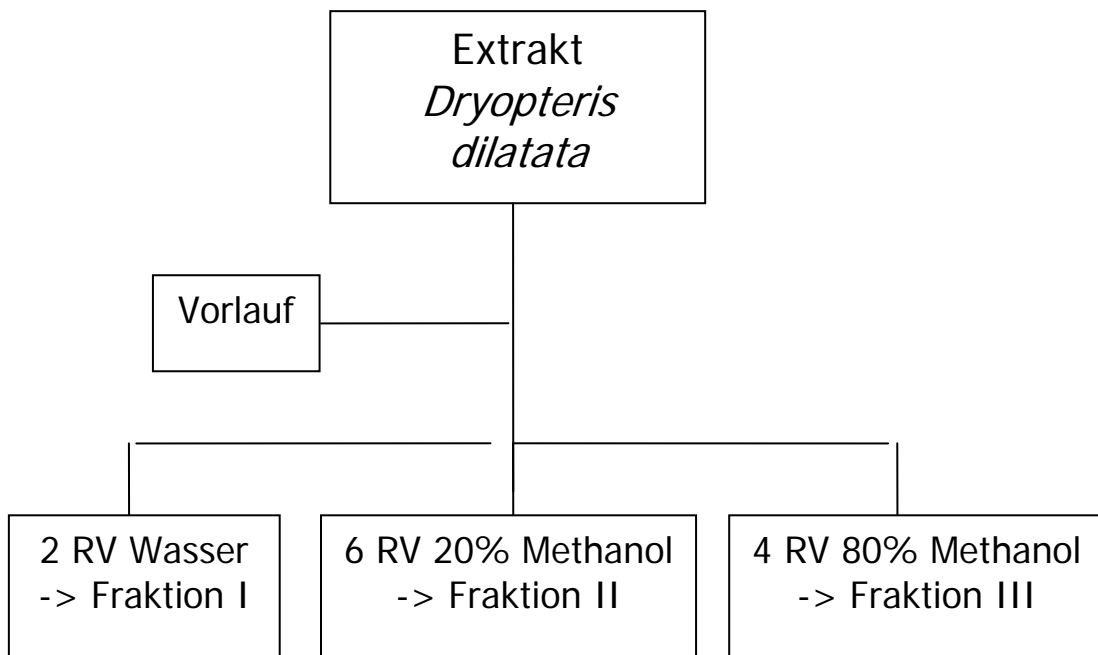
#### **3.1. Extraktion**

Für die Untersuchung standen 8,14 g eines Extrakts von einer vorhergehenden Diplomarbeit [Lit. 1] zur Verfügung.

#### **3.2. Anreicherung der polaren phenolischen Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion**

Um die polaren phenolischen Inhaltsstoffe des 40%igen Methanol Extrakts aufzukonzentrieren, wurde eine Anreicherung dieser Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion durchgeführt.

Die Elution fand nach folgenden Schema statt:



Nach der Konditionierung der Kartusche mit zwei Reservoirvolumina Methanol (ein Reservoirvolumen = 60 ml) und drei Reservoirvolumina Wasser wurde 1 g des 40%igen Methanol – Extrakts von *Dryopteris dilatata*, in 20 ml 20%igen Methanol gelöst, mit einer Pasteurpipette auf die stationäre Phase aufgebracht.

Anschliessend wurde 10 Minuten lang trockengesaugt und diese Lösung in einem Rundkolben gesammelt (Vorlauf).

Danach wurde das Extrakt mit zwei Reservoirvolumina Wasser (Fraktion I), sechs Reservoirvolumina 20%igen Methanol (Fraktion II) und vier Reservoirvolumina 80%igen Methanol (Fraktion III) eluiert.

Die gesammelten Fraktionen und der Vorlauf wurden am Rotavapor zur Trockenen gebracht. Diese Aufreinigung wurde achtmal durchgeführt.

Tabelle 2: Ausbeuten der Fraktionen in g

Lauf	Einwaage	Vorlauf	Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III
Lauf 1	1,002	0,572	0,165	0,121	0,105
Lauf 2	1,007	0,557	0,171	0,131	0,105
Lauf 3	1,003	0,547	0,173	0,136	0,088
Lauf 4	1,005	0,554	0,190	0,140	0,082
Lauf 5	1,005	0,570	0,186	0,132	0,100
Lauf 6	1,002	0,598	0,163	0,122	0,082
Lauf 7	1,001	0,588	0,179	0,119	0,098
Lauf 8	1,007	0,584	0,194	0,118	0,078

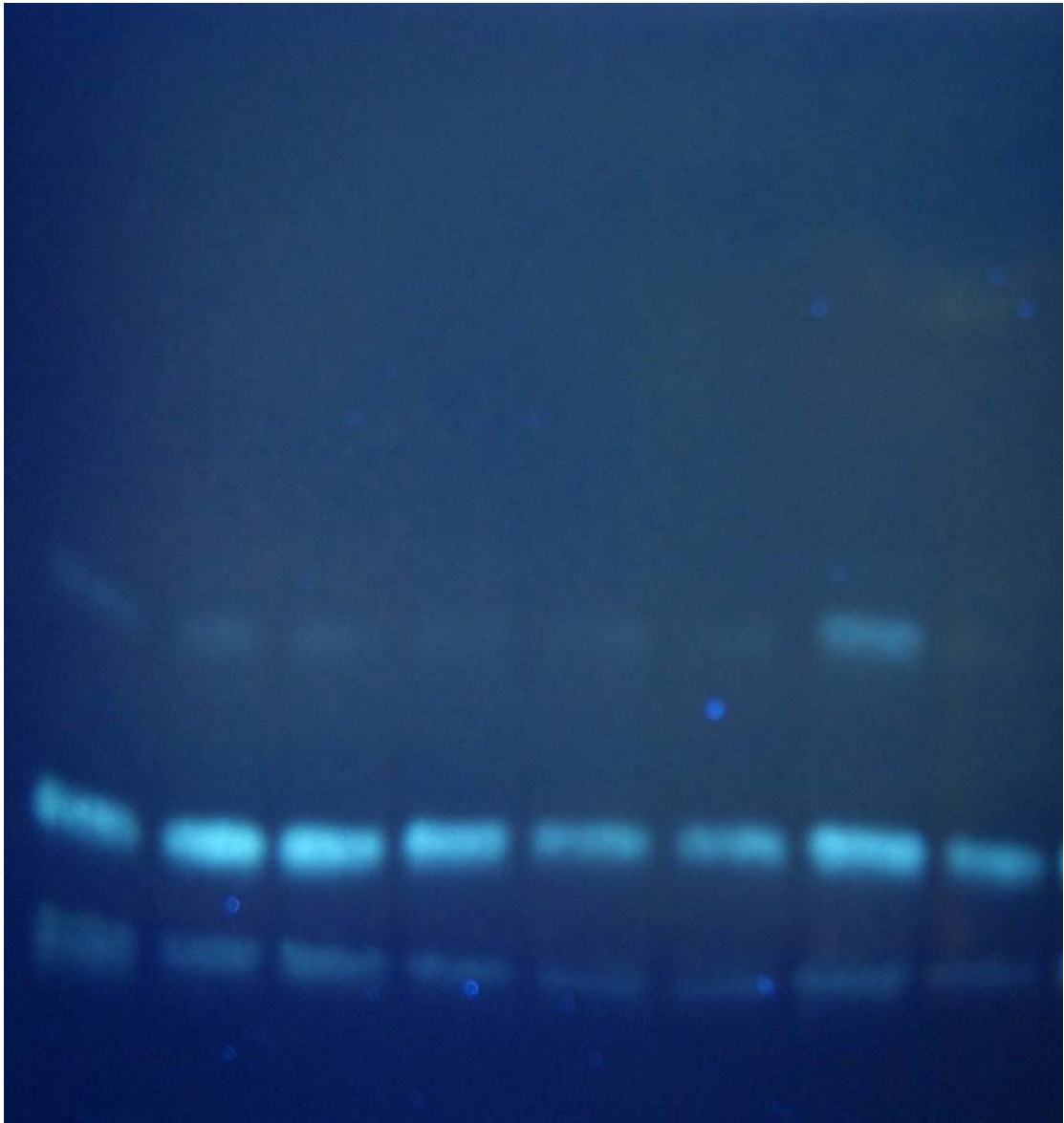
Alle Vorläufe wurden in 20%igen Methanol gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 1: DC – Kontrolle der Vorläufe

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4	Lauf 5	Lauf 6	Lauf 7	Lauf 8
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Die Vorläufe der Läufe 1,2,3 und 7 enthielten neben Caffeoyltartrat ( $R_f = 0,3$ ) auch Chlorogensäure ( $R_f = 0,53$ ) und wurden zu Vorlauf I zusammengefasst (Ausbeute = 2,26 g). Die Vorläufe der Läufe 4,5,6 und 8 enthielten nur Caffeonyltartrat und wurden zu Vorlauf II zusammengefasst (Ausbeute = 2,36 g).

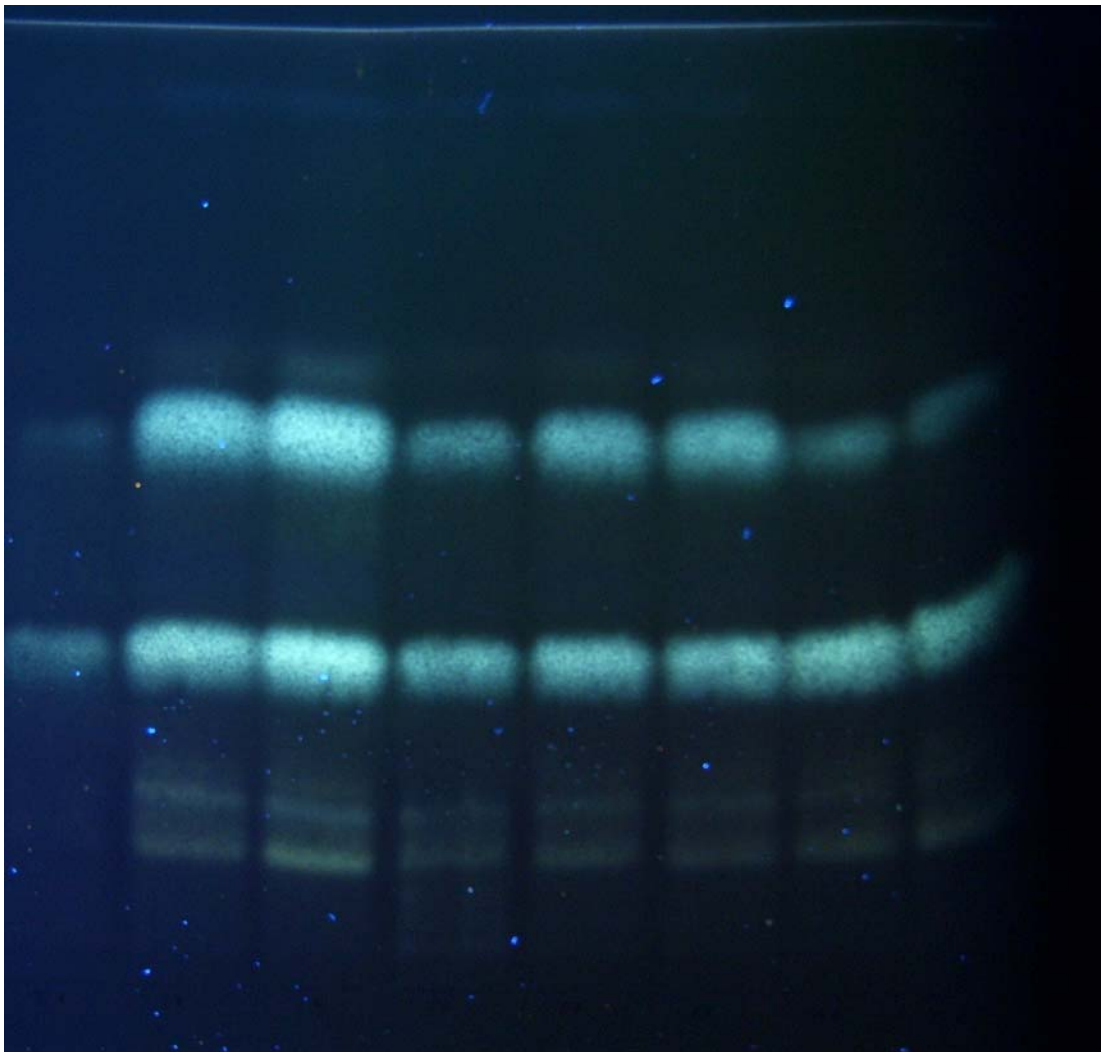
Die Fraktionen I wurden in Wasser gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 2: DC – Kontrolle der Fraktionen I

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4	Lauf 5	Lauf 6	Lauf 7	Lauf 8
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------



Aufgrund des qualitativ übereinstimmenden Musters mit Chlorogensäure ( $R_f = 0,57$ ) und Caffeoyltatrat ( $R_f = 0,34$ ) wurden die Fraktionen aller acht Läufe vereinigt. Die Ausbeute betrug 1,21 g.

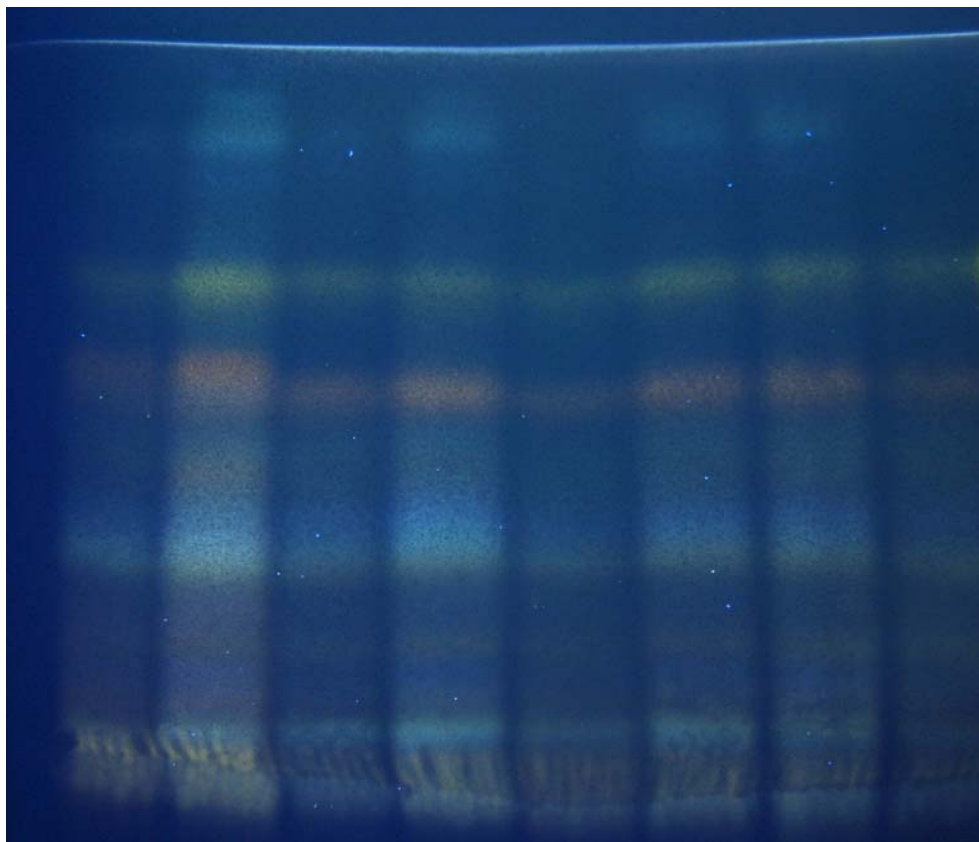
Die Fraktionen II der acht verschiedenen Läufe wurden in 20%igen Methanol gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 3: DC – Kontrolle der Fraktionen II

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4	Lauf 5	Lauf 6	Lauf 7	Lauf 8
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

In den Fraktionen II waren Flavonoide angereichert. Aufgrund des übereinstimmenden chromatographischen Fingerprints wurden die Fraktionen vereinigt. Die Ausbeute betrug 0,87 g.

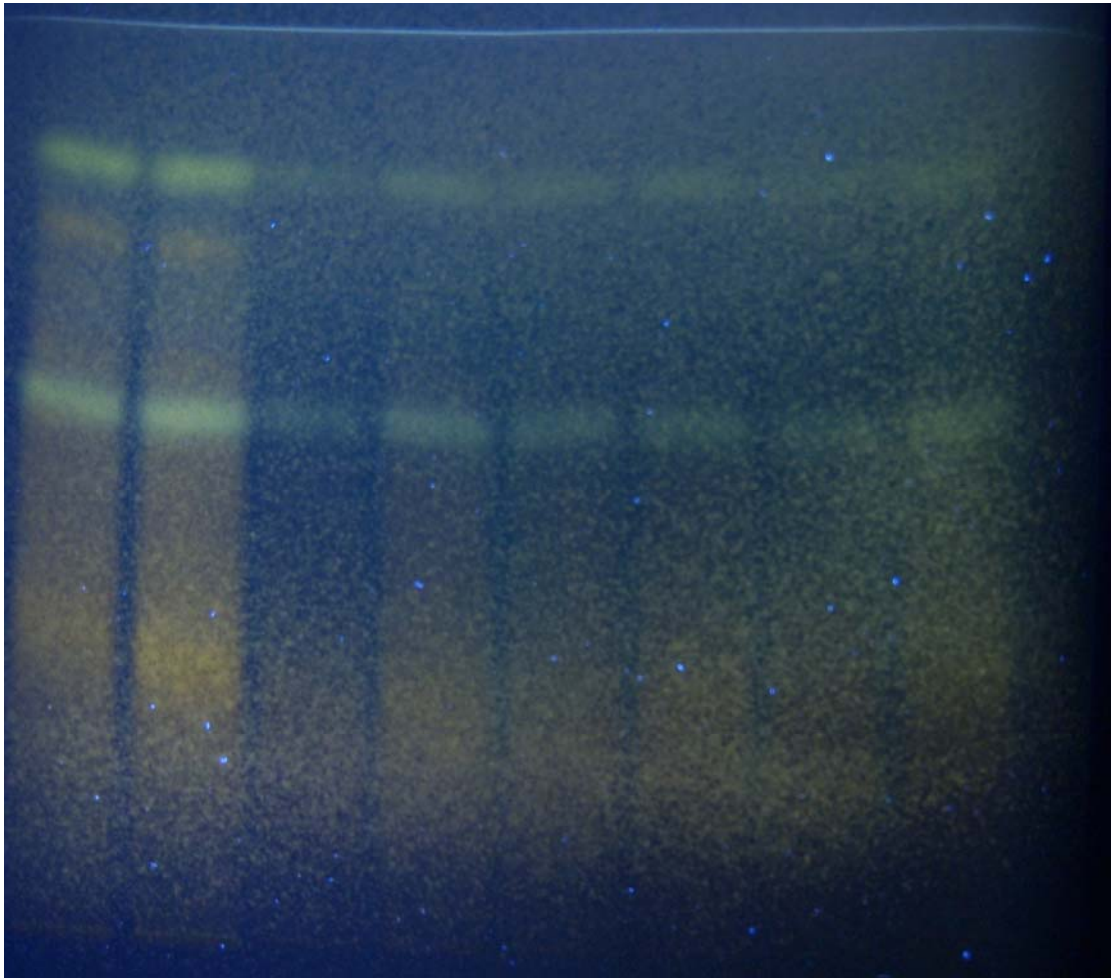
Die Fraktionen III der acht verschiedenen Läufe wurden in 80%igen Methanol gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 4: DC – Kontrolle der Fraktionen III

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4	Lauf 5	Lauf 6	Lauf 7	Lauf 8
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Auch die Fraktionen III aller acht Läufe zeigten ein übereinstimmendes Muster mit mindestens drei Flavonoiden ( $R_f = 0,87$ ,  $R_f = 0,75$  und  $R_f = 0,56$ ) und wurden vereinigt. Die Ausbeute betrug 0,69 g.

Mittels Festphasenextraktion des 40%igen methanolischen Extraktes von *Dryopteris dilatata* war eine Anreicherung von Chlorogensäure und Caffeoylatronat in Fraktion I, und eine Anreicherung von Flavonoiden in den Fraktionen II und III erfolgt.

Da Fraktion III das bisher noch nicht identifizierte Flavonoid ( $R_f = 0,56$ ) in der höchsten Konzentration enthielt, wurde diese zur weiteren Untersuchung herangezogen und mittels Säulenchromatographie aufgetrennt.

### 3.3. Auftrennung Fraktion III mittels Säulenchromatographie

Fraktion III der Festphasenextraktion wurde aufgrund der Anreicherung der Flavonoide mittels Säulenchromatographie aufgetrennt.

Als stationäre Phase für die Säulenchromatographie SC1 wurden 28ml Sephadex LH 20 verwendet, das in 100ml 20%igen Methanol zwei Stunden vorgequollen wurde. Anschliessend wurde die Säule befüllt, 699,3 mg Fraktion III wurde in 3,5ml 20%igen Methanol gelöst und mit einer Pasteurpipette auf den Säulenkopf aufgetragen. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 6ml pro Stunde.

SC 1:

Stationäre Phase: Lipophilic Sephadex LH 20 Sigma Aldrich

Mobile Phase: Wasser – Methanol – Gemische unterschiedlicher Polarität

Säulenlänge: 43 cm

Säulendurchmesser: 2cm

Aufgetragene Substanz:

699,3 mg Fraktion III in 3,5 ml 20%igen Methanol.

Die Säule wurde mit 20%igem Methanol eluiert, nach 82 Fraktionen wurde mit 30%igem Methanol weitereluiert. Ab Fraktion 180 wurde 40%iges Methanol verwendet, ab Fraktion 257 50% Methanol und ab Fraktion 330 wurde 60%iges Methanol als Elutionsmittel verwendet. Ab Fraktion 375 wurde die Sammelzeit des Fraktionierers auf 1,5 Stunden verlängert und 80%iges Methanol als Elutionsmittel verwendet. Abschliessend wurde mit reinem Methanol eluiert.

Die gesammelten Fraktionen wurden am Rotavapor zur Trockenen gebracht.

Es wurde jede zehnte Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht und Fraktionen mit gleichem Inhaltsspektrum zu 33 Sammelfractionen vereinigt.

Tabelle 3: Sammelfractionen von SC 1

SF	Einzelfractionen	Ausbeute (mg)
1	1 bis 5	8,87
2	6 bis 8	10,92
3	9 bis 13	21,57
4	14 bis 17	18,47
5	18 bis 25	19,81
6	26 bis 35	10,72
7	36 bis 45	8,17
8	46 bis 64	19,70
9	65 bis 85	6,08
10	86 bis 95	1,04
11	96 bis 105	0,88
12	106 bis 115	1,13
13	116 bis 125	0,52
14	126 bis 155	1,24
15	156 bis 175	1,95
16	176 bis 185	1,33
17	186 bis 195	16,12
18	196 bis 215	9,14
19	216 bis 225	2,53
20	226 bis 235	4,10
21	236 bis 245	1,91
22	246 bis 275	12,41
23	276 bis 285	2,14
24	286 bis 295	3,12
25	296 bis 305	7,26
26	306 bis 315	3,09
27	316 bis 325	2,02
28	326 bis 365	67,53
29	366 bis 375	12,16
30	376 bis 385	34,70
31	386 bis 395	57,60
32	396 bis 405	29,90
33	406 bis 455	33,49
<b>Gesamt</b>		<b>431,62</b>

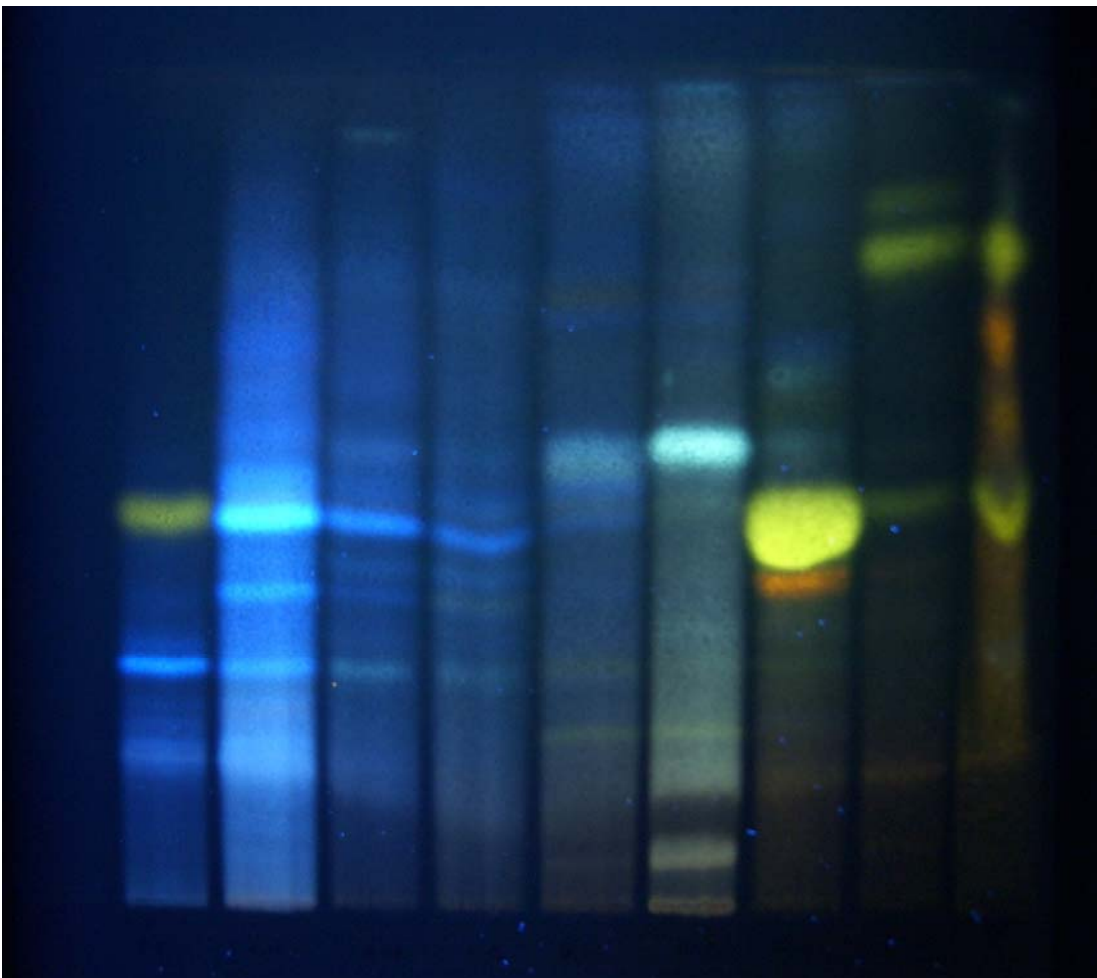
Die Sammelfractionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Vergleich wurde Fraktion III aufgetragen.

Abbildung 5: DC der Sammelfractionen 1 bis 9 von SC 1

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



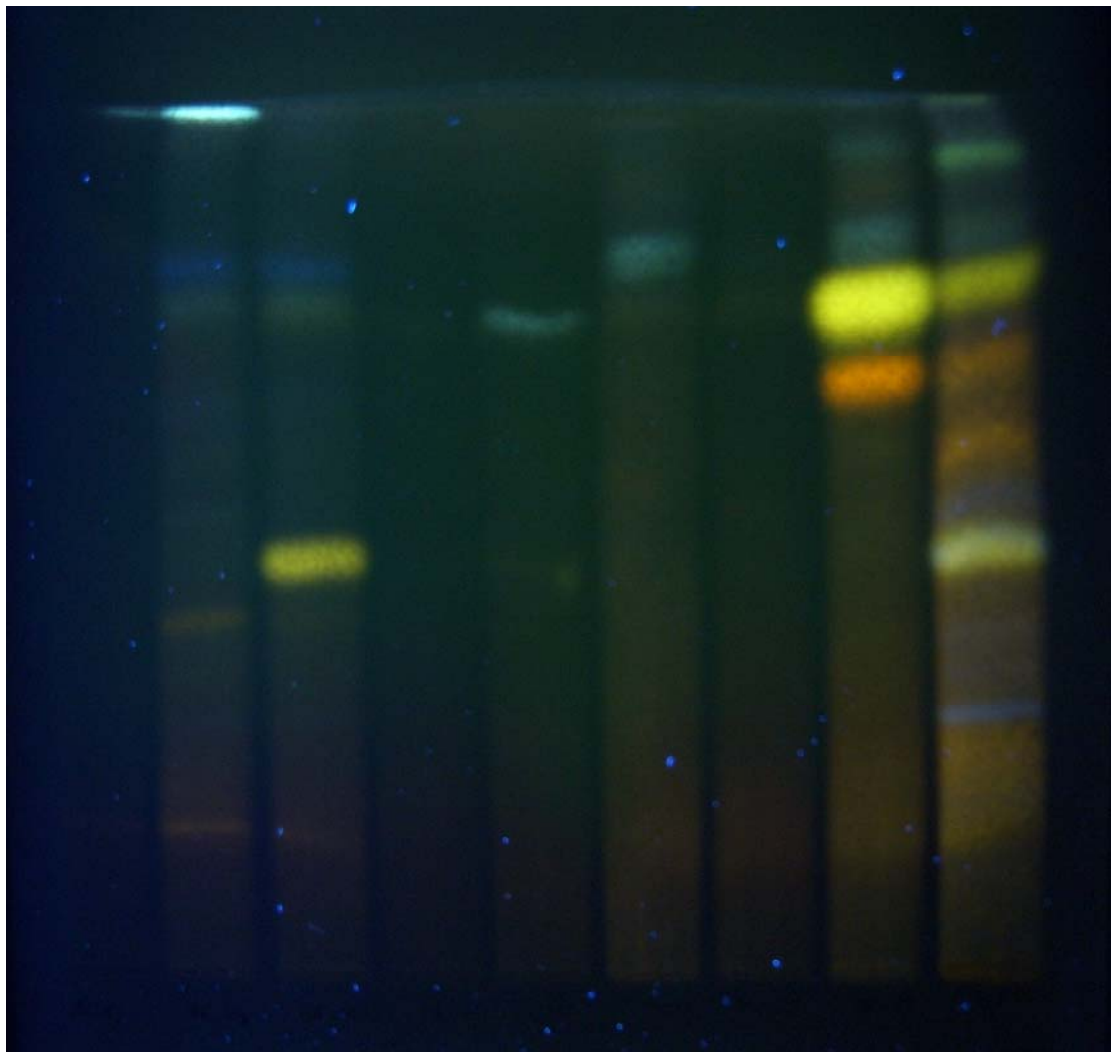
SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7	SF8	SF9	Vgl.
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

Abbildung 6: DC der Sammelfractionen 10 bis 17 von SC 1

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



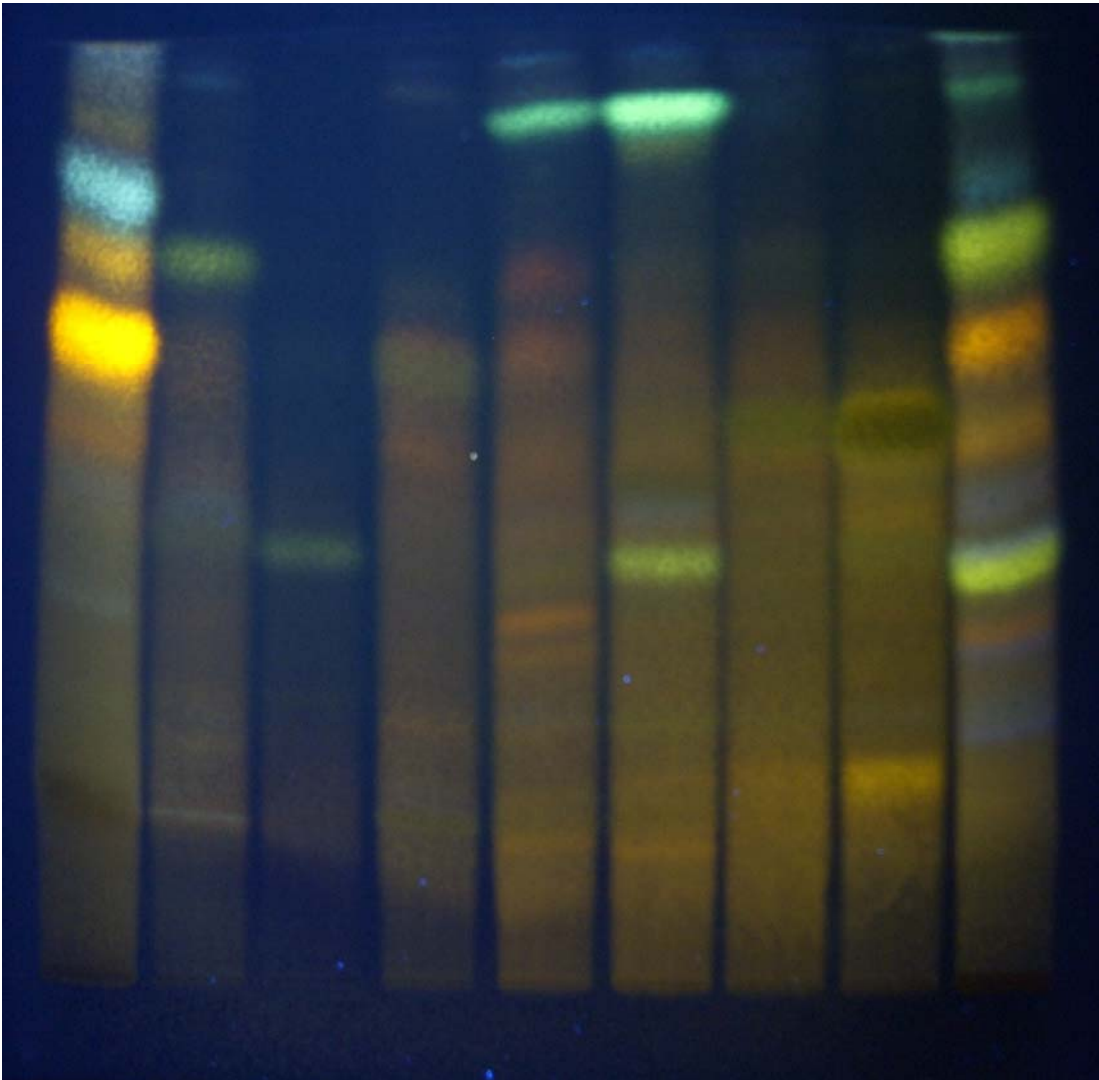
SF10	SF11	SF12	SF13	SF14	SF15	SF16	SF17	Vgl
------	------	------	------	------	------	------	------	-----

Abbildung 7: DC der Sammelfractionen 18 bis 25 von SC 1

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



SF18	SF19	SF20	SF21	SF22	SF23	SF24	SF25	Vgl.
------	------	------	------	------	------	------	------	------

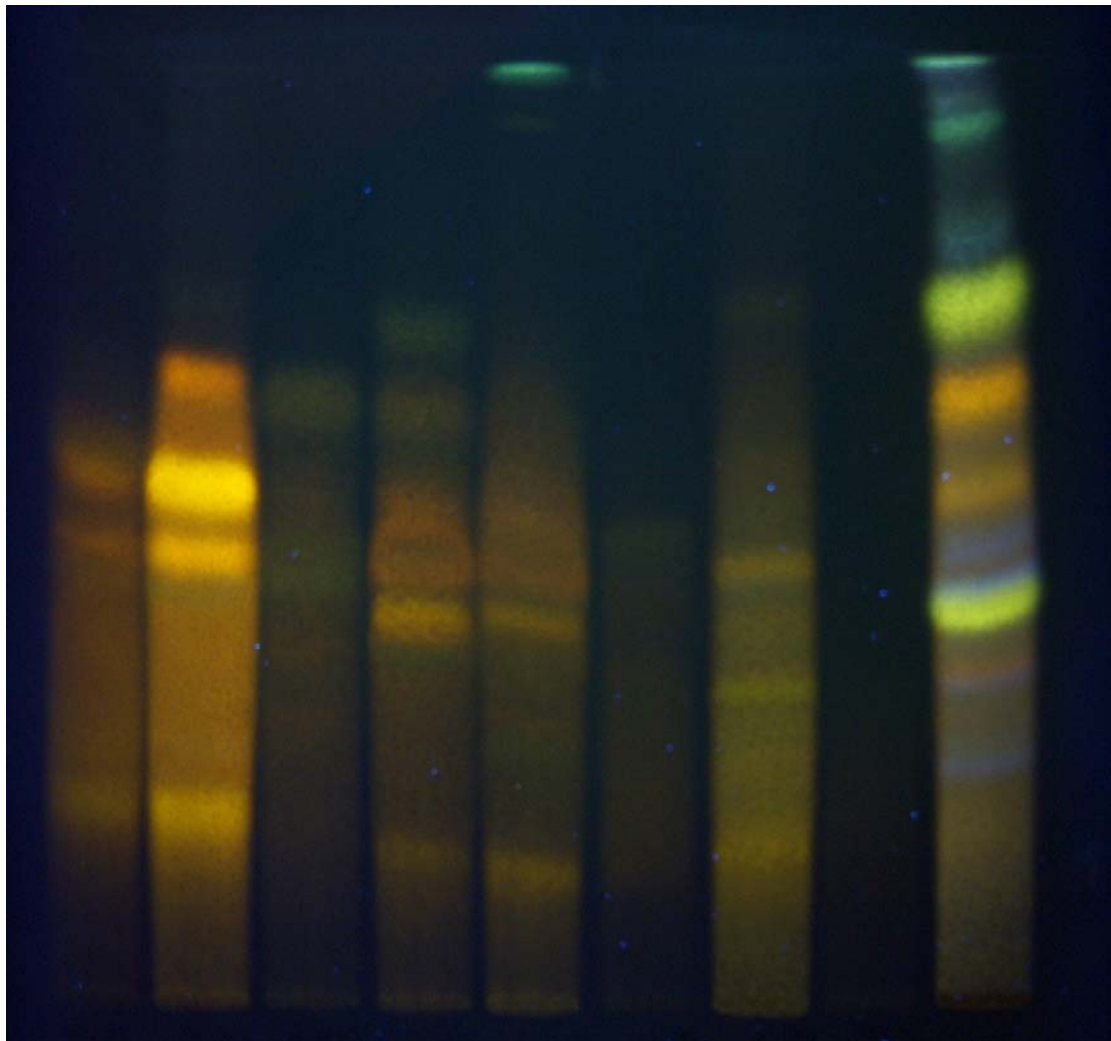


Abbildung 8: DC der Sammelfractionen 26 bis 33 von SC 1

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



SF26	SF27	SF28	SF29	SF30	SF31	SF32	SF33	Vgl
------	------	------	------	------	------	------	------	-----

In den Sammelfractionen SF 3 bis SF 7 sind blau fluoreszierende Banden von Phenolcarbonsäuren sichtbar. In den Sammelfractionen SF 8, SF 17 und SF 18 sind die Hauptkomponenten des Flavonoidkomplexes erkennbar. Kleine Anteile an gelb fluoreszierenden Flavonoidzonen sind auch in SF 2, SF 12, SF 19 und SF 20 sichtbar. Die orange fluoreszierenden Zonen in den weiteren Fractionen zeigen deutlich Tannine.

Der nächste Schritt war der Versuch der Identifizierung der polaren phenolischen Inhaltsstoffe in den Sammelfractionen.

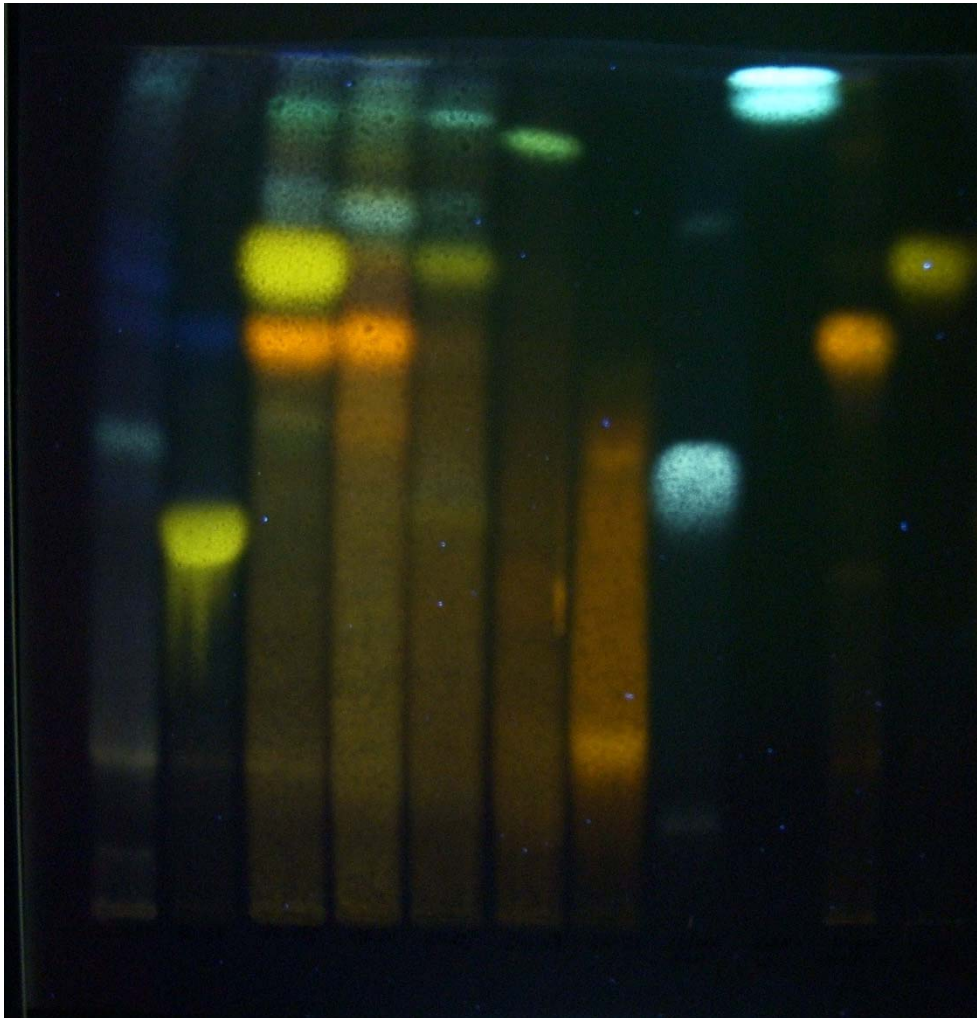
Für die erste Identifizierung wurden die Sammelfractionen 7, 8, 17, 18, 19, 22 und 27 mit den authentischen Vergleichssubstanzen Chlorogensäure (C), Kaffeesäure (K), Isoquercitrin (I) und Astragalin (A) auf eine Kieselgelplatte aufgetragen.

Abbildung 9: DC einzelner Sammelfractionen von SC 1 mit Vergleichssubstanzen

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



SF7	SF8	SF17	SF18	SF19	SF22	SF27	C	K	I	A
-----	-----	------	------	------	------	------	---	---	---	---

Die in Sammelfraktion 17 und 18 bei  $R_f$  0,65 sichtbare orange Bande entspricht Isoquercitrin, die gelbe Bande bei  $R_f$  0,75 entspricht Astragalin. Kaffeesäure war in diesen Fraktionen nicht nachweisbar, SF 7 zeigt eine Bande auf gleicher Höhe mit Chlorogensäure.

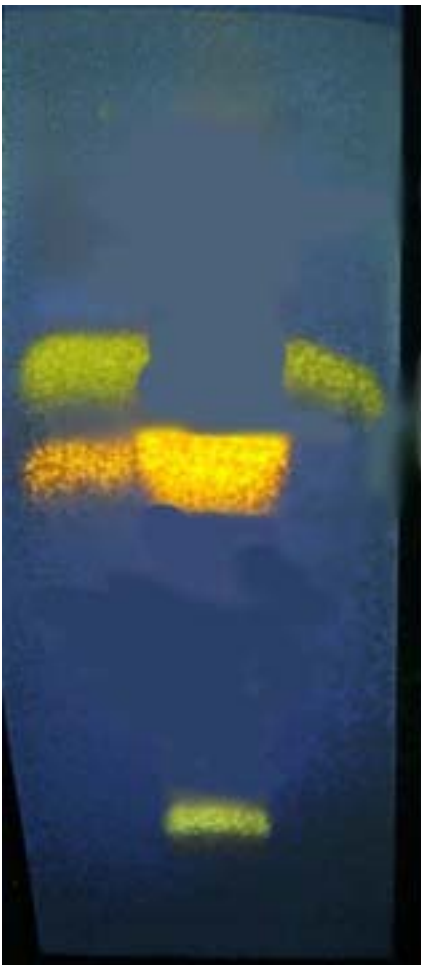
Um die Flavonoide zu bestätigen wurde Sammelfraktion 17 erneut mit Astragalin und Isoquercitrin dünnschichtchromatographisch verglichen, es wurde dazu Cellulose als stationäre Phase verwendet.

Abbildung 10: DC – Vergleich von SF 17 mit Astragalin und Isoquercitrin

Stationäre Phase: (b) DC Fertigplatte Cellulose

Mobile Phase: (2) 30% Essigsäure

Detektion: Naturstoffreagens A



SF17	I	A
------	---	---

Mit der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von Sammelfraktion 17 in zwei verschiedenen Systemen konnten Isoquercitrin und Astragalin als Hauptkomponenten im Flavonoidkomplex von *Dryopteris dilatata* bestätigt werden [Lit. 1].

Für die Identifizierung der weiteren Inhaltsstoffe wurden weitere dünnschichtchromatographische Untersuchungen durchgeführt. Sammelfraktion 12 wurde mit Rhoifolin in zwei verschiedenen Systemen verglichen.

Abbildung 11: DC Vergleich von SF 12 mit Rhoifolin

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

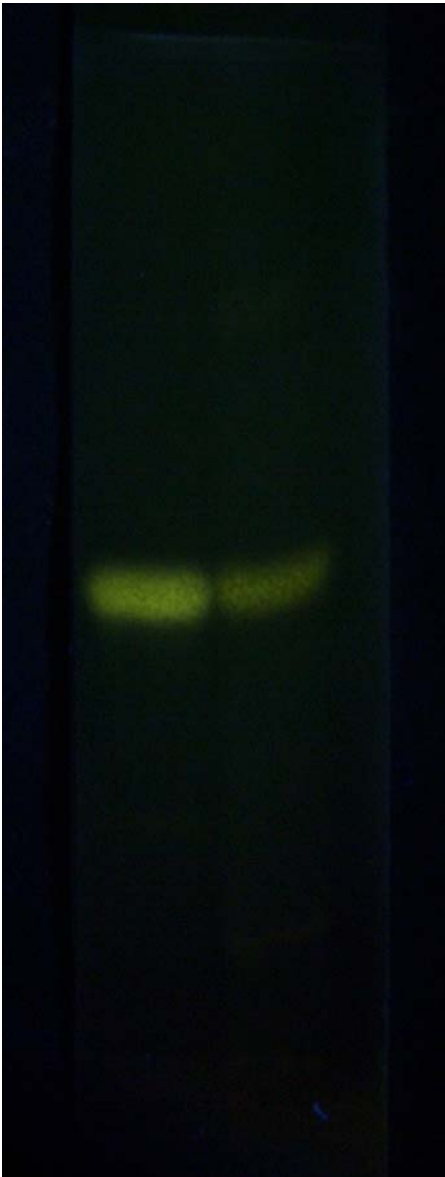
Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400

Abbildung 12: DC Vergleich von SF 12 mit Rhoifolin

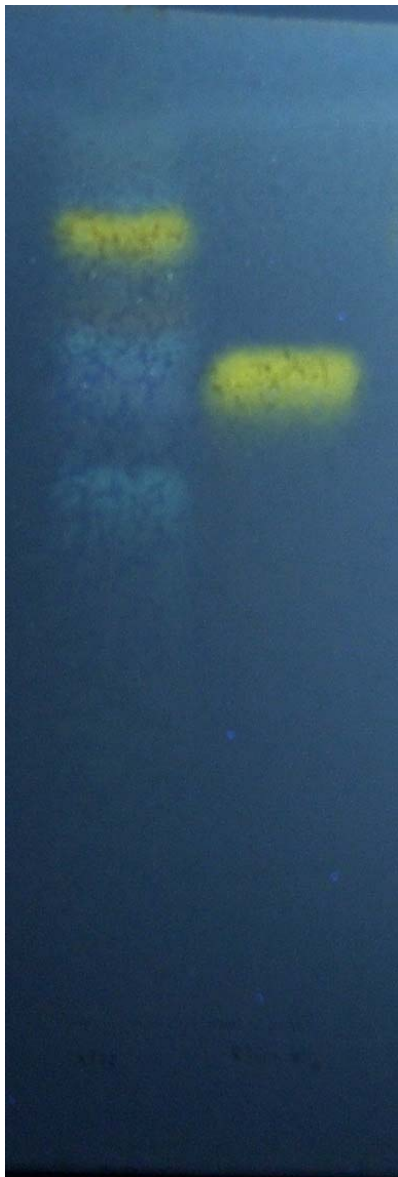
Stationäre Phase: (b) DC Fertigplatte Cellulose

Mobile Phase: (2) 30% Essigsäure

Detektion: Naturstoffreagens A



Rhoifolin	SF12
System 1	



SF12	Rhoifolin
System 2	

In System 1 zeigten Rhoifolin und die Hauptkomponente von Sammelfraktion 12 die gleiche Laufhöhe, dies konnte aber durch dünnschichtchromatographische Überprüfung in System 2 nicht bestätigt werden.

Anschliessend wurden SF 2, SF 8, SF 9, SF 12, SF 18, SF 19, SF 20, SF 23 und SF 27 dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Vergleichssubstanzen wurden nach Vergleich mit einer mit einer Flavonoidbibliothek [Lit. 3] Avicularin (Av), Myricitrin (M), Quercitrin (Q), Apigenin – 7 – O – glucosid (A7g), Quercitin

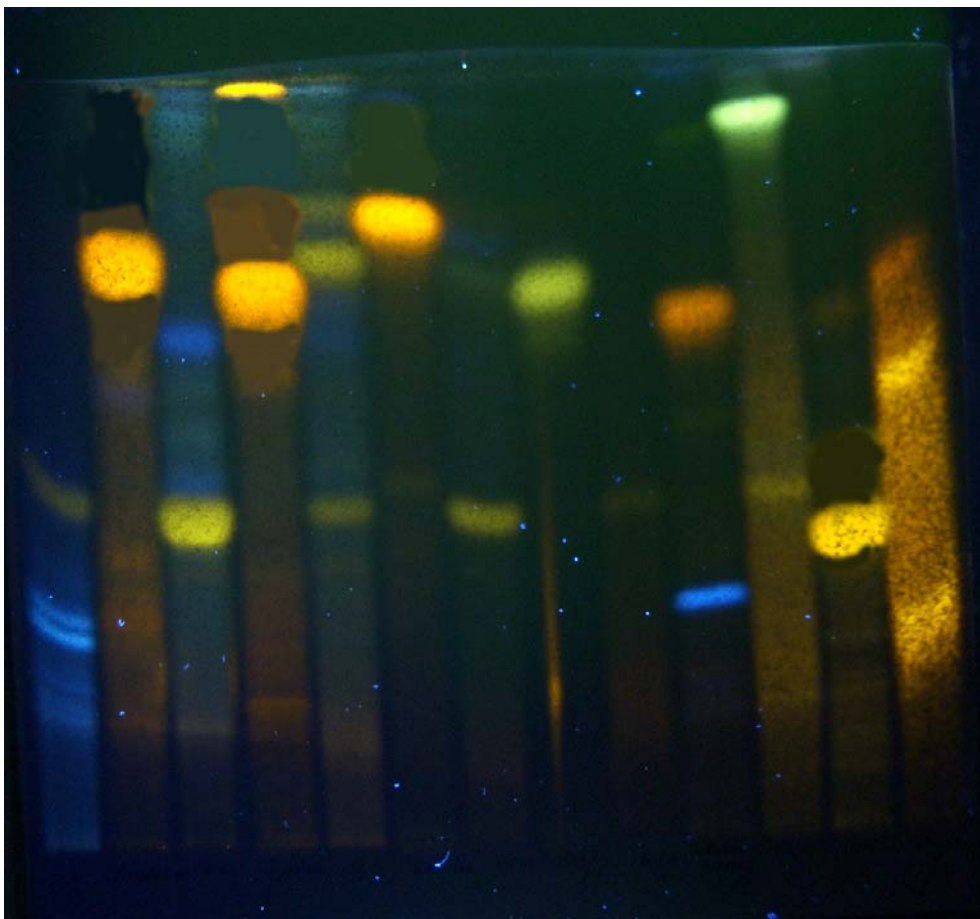
-3 – O – methylester – 7 – O – glucosid (Q3m7g) und Rutin (R) verwendet. Weiters kamen Vitexin (V), Isovitexin (IV), Apigenin – 7 – O – rutinosid (A7r) und Isoorientin (IO) zum Einsatz.

Abbildung 13a: DC Vergleich von Sammelfractionen mit Vergleichssubstanzen

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



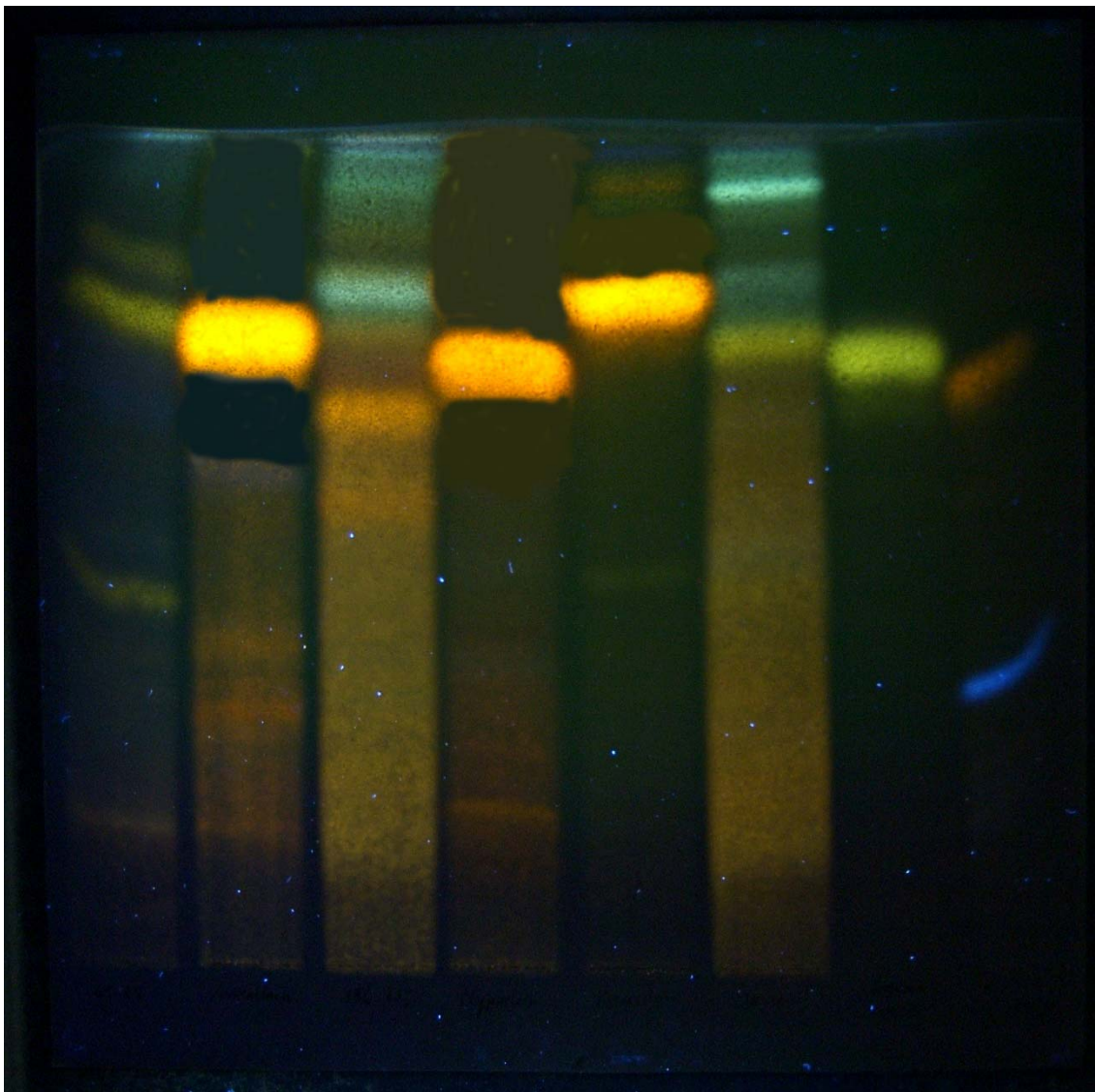
SF2	Av	SF8	M	SF9	Q	SF12	A7g	SF20	Q3m7g	SF23	R	SF27
-----	----	-----	---	-----	---	------	-----	------	-------	------	---	------

Abbildung 13b: DC Vergleich von Sammelfractionen mit Vergleichssubstanzen

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



SF9	A v	SF18	M	Q	SF19	A7g	Q3m7g
-----	-----	------	---	---	------	-----	-------

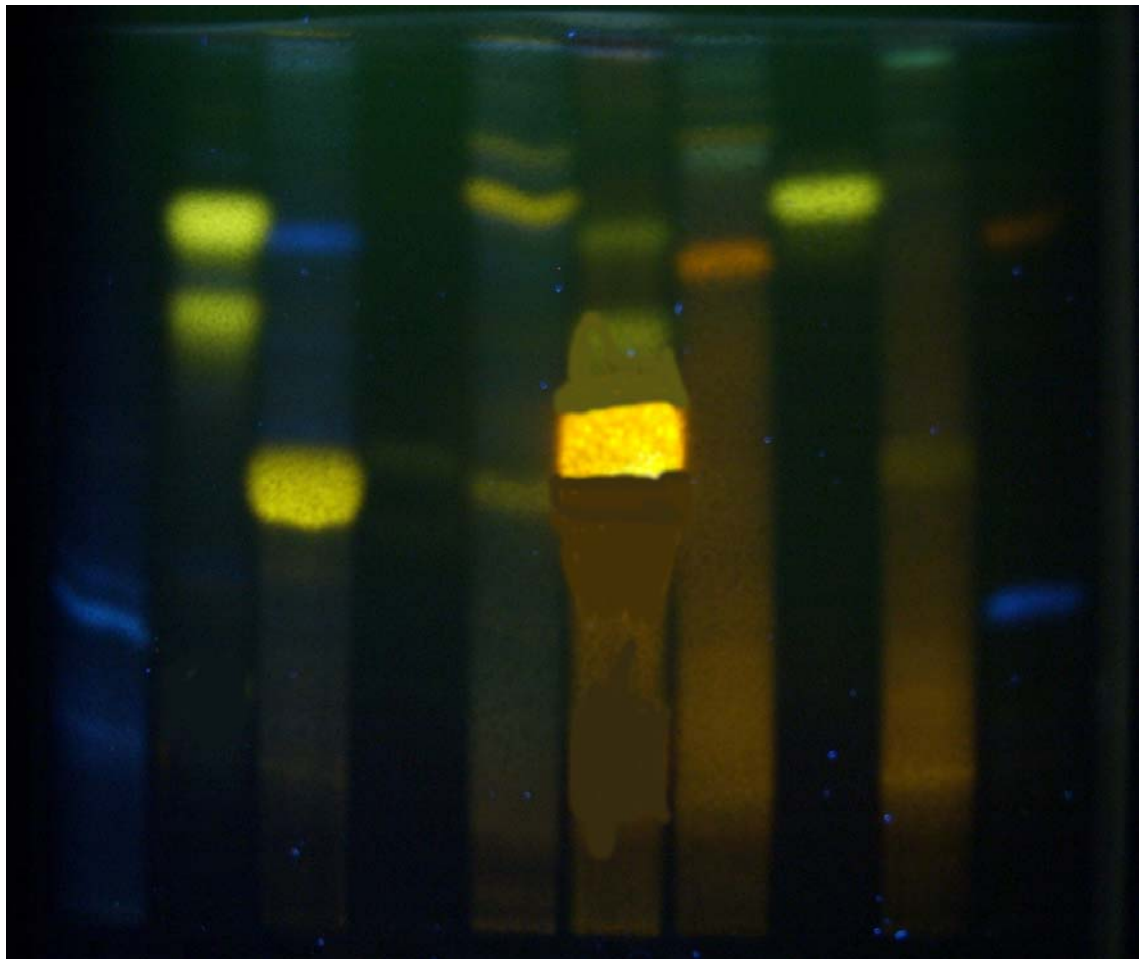


Abbildung 13c: DC Vergleich von Sammelfractionen mit Vergleichssubstanzen

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



SF2	V/IV	SF8	A7r	SF9	IO	SF18	A7g	SF19	Q3m7g
-----	------	-----	-----	-----	----	------	-----	------	-------

In SF 2, SF 8, SF 9 und SF 12 waren gelb fluoreszierende Zonen bei einem  $R_f = 0,43$  erkennbar die keine Übereinstimmungen mit den Vergleichssubstanzen zeigten. Die Zone bei  $R_f = 0,78$  in SF 9 zeigte einen übereinstimmenden  $R_f$  – Wert mit Avicularin, wies aber eine unterschiedliche Fluoreszenzfarbe auf. Somit war keine weitere Komponente des Flavonoidkomplexes durch dünnschichtchromatographische Vergleiche mit authentischen Substanzen vergleichbar.

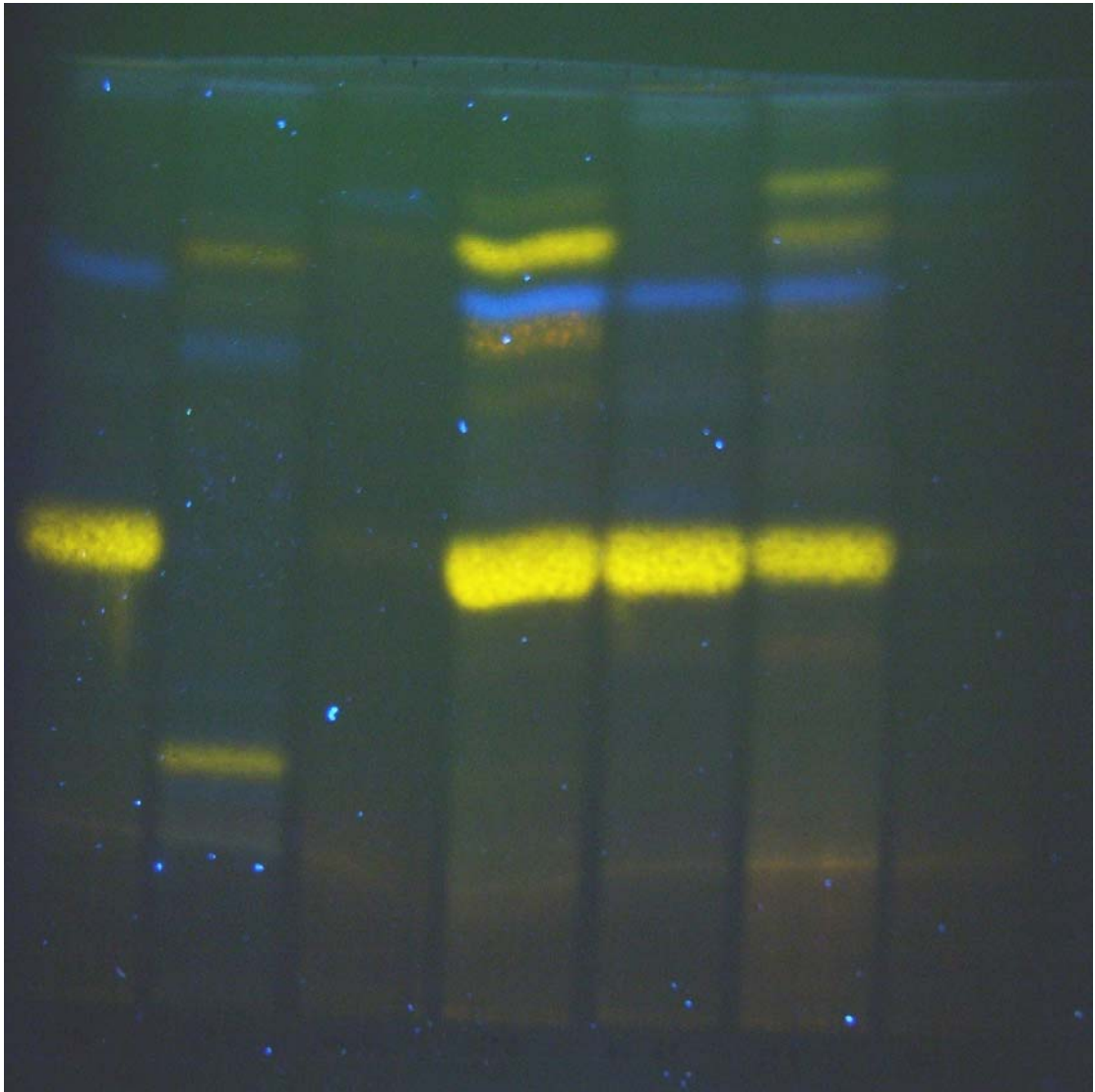
Um die dritte Hauptkomponente des Flavonoidkomplexes von *Dryopteris dilatata*, die gelb fluoreszierende Zone bei  $R_f = 0,46$  in SF 8 und SF 9, zu charakterisieren, war eine Isolierung notwendig. Um von einer größeren Substanzmenge ausgehen zu können, wurden SF 8 und SF 9 mit zwei Fraktionen aus der Diplomarbeit Vogler verglichen [Lit. 1].

Abbildung 14: DC Vergleich von SF 8 und SF 12 mit vorhandenen Fraktionen

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



SF8	SF5(GV)	SF12	SF8(GV)	SF8	SF9(GV)	SF12
-----	---------	------	---------	-----	---------	------

Diese Untersuchung zeigte, dass die in Sammelfraktion 8 vorkommende Bande ident mit den gelben Banden in den Sammelfraktionen SF8(GV) und SF9(GV) ist. Daher wurden diese drei Fraktionen sowie Sammelfraktion 9, in der die Bande ebenfalls schwach nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 13a, Seite 31) vereinigt und erneut mittels Säulenchromatographie aufgetrennt.

### **3.4. Isolierung und Identifizierung von Substanz WR1 (=Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosid-7-O-α-L-rhamnopyranosid)**

Um die gelbe Band mit  $R_f = 0,46$  in den Sammelfractionen 8 und 9 rein darzustellen, wurden diese Fractionen erneut einer Säulenchromatographie unterzogen.

Als stationäre Phase wurden 15ml Sephadex verwendet, als mobile Phase kam 20% Methanol zum Einsatz. Es wurde 29,8mg Substanzgemisch in 1,0ml 20%igen Methanol gelöst und mittels Pasteurpipette auf den Säulenkopf aufgetragen. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 3ml in einer halben Stunde.

SC II:

Stationäre Phase: Lipophilic Sephadex LH 20 Sigma Aldrich

Mobile Phase: 20% Methanol

Säulenlänge: 26 cm

Säulendurchmesser: 1 cm

Aufgetragene Substanz: 29,8 mg in 1,0 ml 20%igen Methanol.

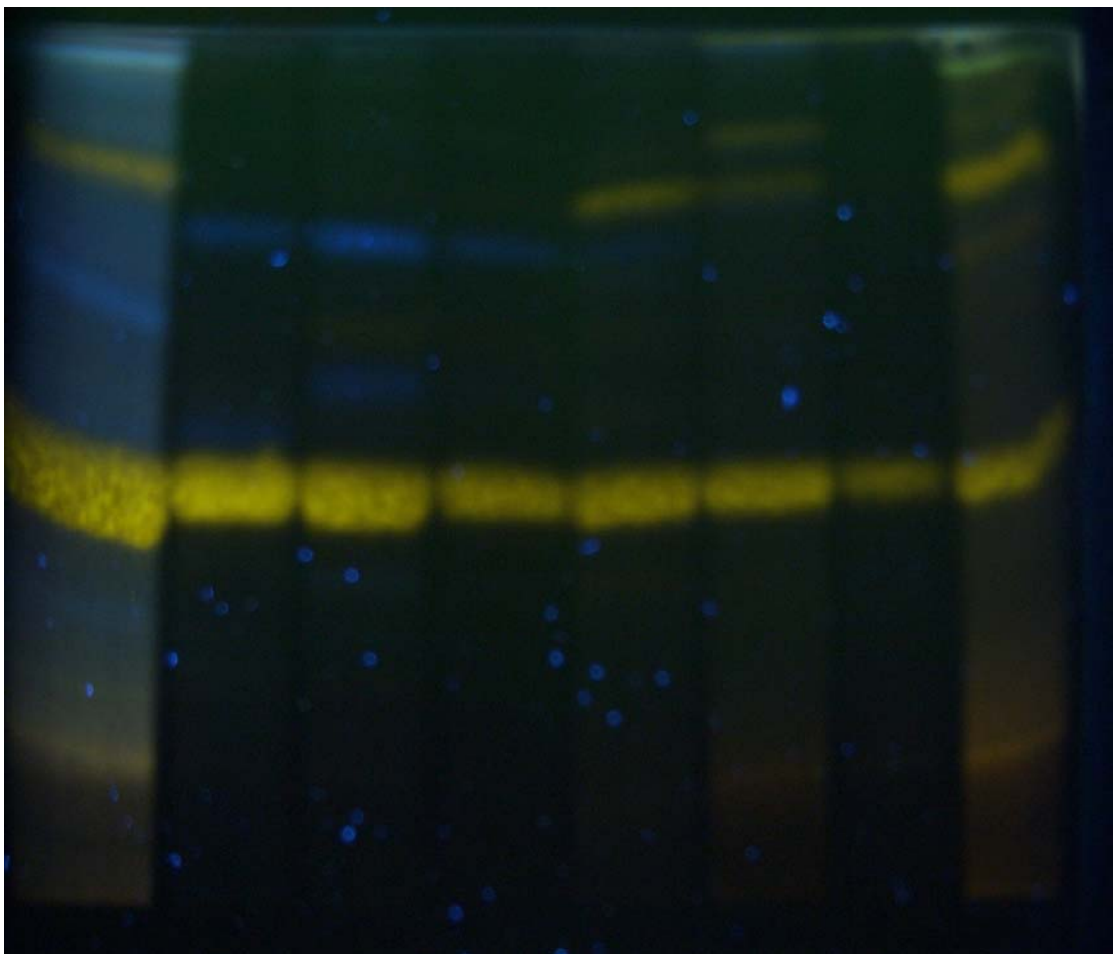
Es wurden 71 Fractionen gesammelt, Fractionen mit ähnlichem Inhaltsspektrum wurden zu acht Sammelfractionen (ab jetzt als SF\_SCII beschrieben) vereinigt und am Rotavapor zur Trockenen gebracht (siehe Tabelle 4, Seite 38).

Abbildung 15: DC der Sammelfractionen von SC II

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



SF\_SCH1 SF\_SCH2 SF\_SCH3 SF\_SCH4 SF\_SCH5 SF\_SCH6 SF\_SCH7 NL

Tabelle 4: Sammelfractionen von SC II

SF_SCII	Einzelfractionen	Ausbeute (mg)
1	1 bis 17	11,40
2	18 bis 23	4,70
3	24 bis 33	1,90
4	34 bis 46	0,30
5	47 bis 57	0,50
6	58 bis 63	0,30
7	64 bis 71	1,06
Nachlauf		4,70
<b>Gesamt</b>		<b>24,86</b>

Mittels Säulenchromatographie II konnte die gelbe Bande stark angereichert werden. In den Sammelfractionen SF\_SCII 2 bis SF\_SCII 5 wies die Substanz nur geringe Anteile an Begleitsubstanzen auf.

Die Substanz zeigte in der DC an Kieselgel 60 mit der mobilen Phase Ethylacetat + konzentrierte Ameisensäure + konzentrierte Essigsäure + Wasser (100:11:11:26) einen  $R_f$  – Wert von 0,5. Die intensiv gelb bis türkise Fluoreszenz nach dem Besprühen mit Naturstoff-reagens deutete auf das Vorliegen von einens Kämpferolglykosids hin, wobei der  $R_f$  – Wert auf ein Diglykosid schließen ließ.

Für die Identifizierung des Genins wurde SF\_SCII 5 herangezogen und einer Hydrolyse mit Kiliani – Reagens (5,5 ml Wasser, 1 ml konzentrierter Salzsäure, 3,5 ml Eisessig) unterzogen.

Für die Hydrolyse wurde SF\_SCII 5 (0,5 g) mit 0,3 ml Kiliani – Reagens in einer Epruvette versetzt und zwei Stunden lang im Trockenschrank bei 100° C erhitzt. Der Rückstand wurde in wenig Ethylacetat aufgenommen und in zwei Systemen dünnschichtchromatographisch untersucht.

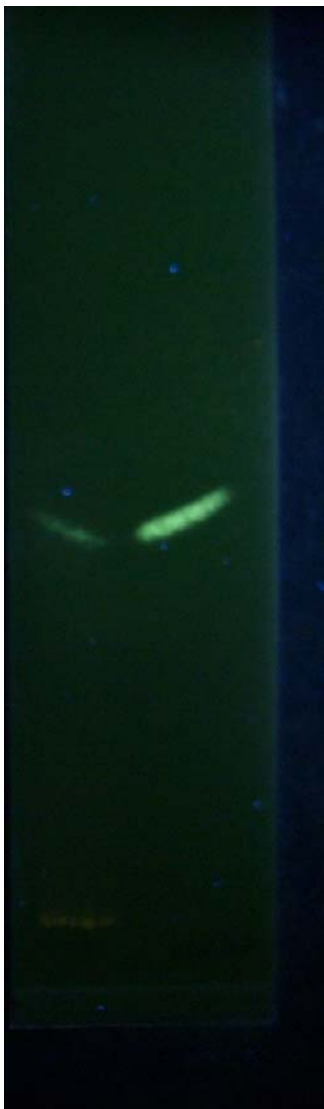
Da aufgrund der Fluoreszenzfarbe auf das Vorliegen eines Kämpferoldiglykosides geschlossen wurde, wurde als Vergleichssubstanz Kämpferol eingesetzt.

Abbildung 16: DC Vergleich des Genins von Substanz WR – 1 mit Kämpferol an Kieselgel

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (4) Cyclohexan + Dichlormethan + konzentrierte Ameisensäure + Ethylformiat (35:30:5:30)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



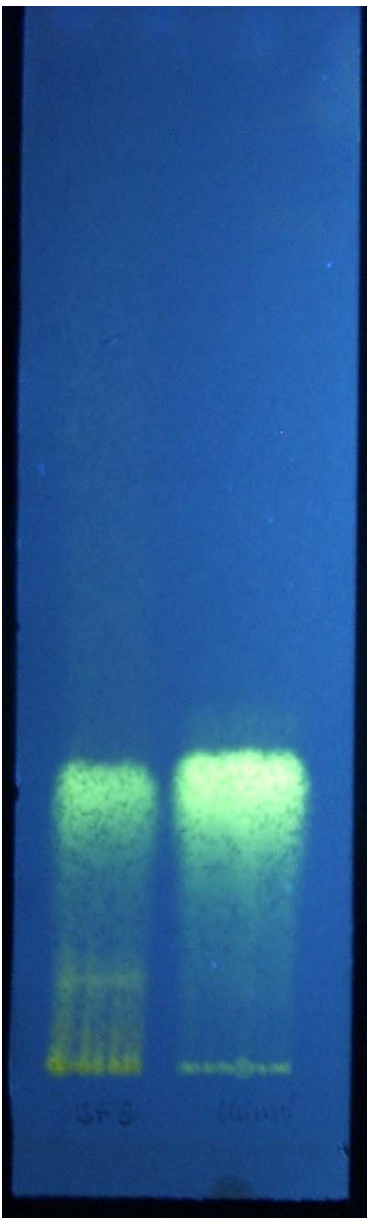
SF\_SCII 5 Kämpferol

Abbildung 17: DC Vergleich des Genins von Substanz WR – 1 mit Kämpferol an Polyamid

Stationäre Phase: (c) DC Fertigplatte Polyamid 11 F254

Mobile Phase: (5) Toluol + Petrolether + Ethylmethylketon + Methanol  
(18:4,5:9:8)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



SF_SCI15	Kämpferol
----------	-----------



Aufgrund dieser dünnschichtchromatographischen Untersuchung in zwei verschiedenen Systemen konnte Kämpferol als Aglykon bestätigt werden.

Das UV-VIS Spektrum von Substanz WR – 1 in Methanol wurde mit jenen von Astragalin und Kämpferol – 7 – O – neohesperosid verglichen um Informationen über die Verknüpfungsstellen der Zucker zu bekommen. Weiters wurde mit den Shiftreagenzien konzentrierter Salzsäure und 5%iger Aluminiumchloridlösung gearbeitet.

Es wurde von SF\_SCII 4, Astragalin und Kämpferol – 7 – O – neohesperosid ein Spektrum aufgenommen, anschliessend alle drei Substanzen mit sechs Tropfen Aluminiumchloridlösung versetzt, erneut ein Spektrum aufgenommen und nach weiterem Zusatz von drei Tropfen Salzsäure wiederum ein Spektrum aufgenommen.

Astragalin und Kämpferol – 7 – O – neohesperosid wurden gewählt, da beide Substanzen Kämpferolglykoside sind, aber ihre Zucker an unterschiedlichen Stellen tragen, an Stelle O - 3 beziehungsweise an O - 7.

Abbildung 18a: UV/VIS Spektrum von SF\_SCII 4 in MeOH

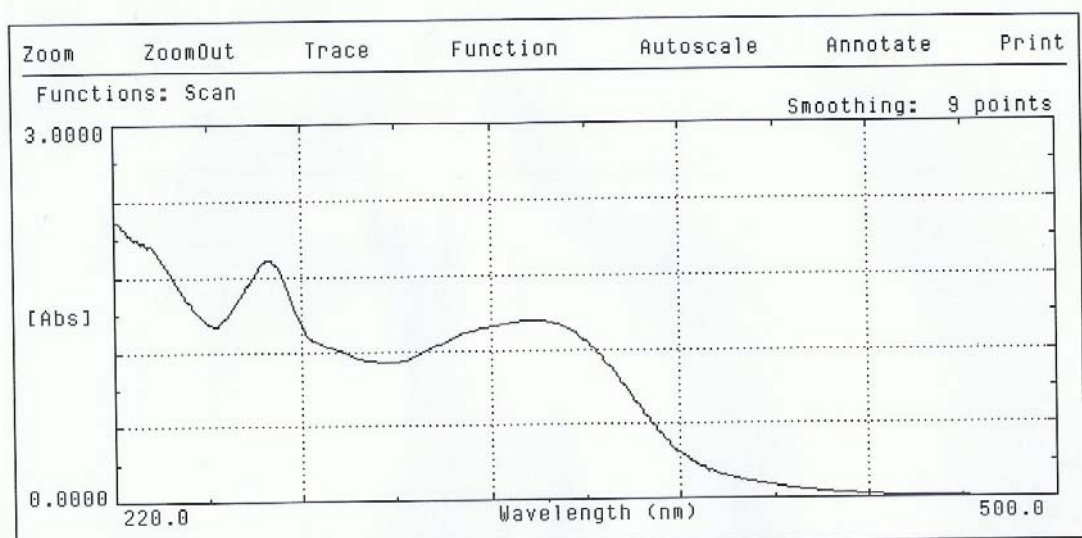


Abbildung 18b: UV/VIS Spektrum von SF\_SCII 4 in MeOH nach Zusatz von Aluminiumchlorid und konzentrierter Salzsäure

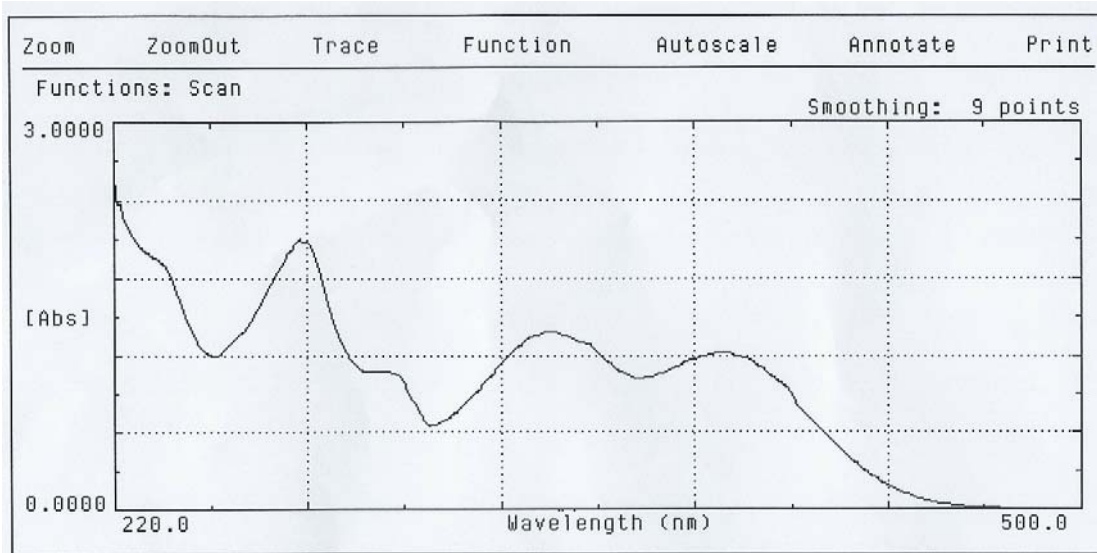
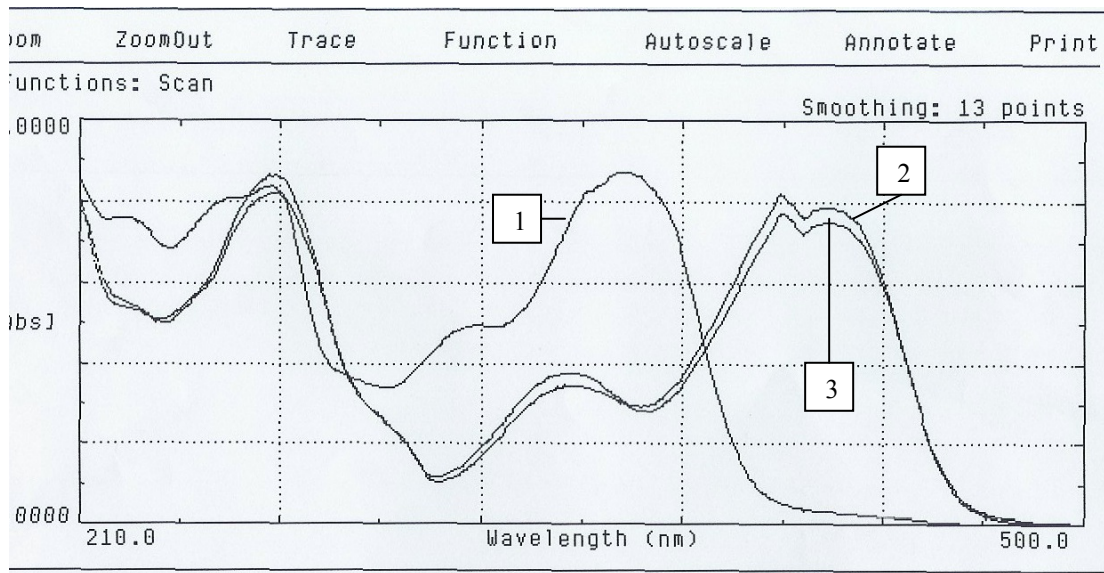
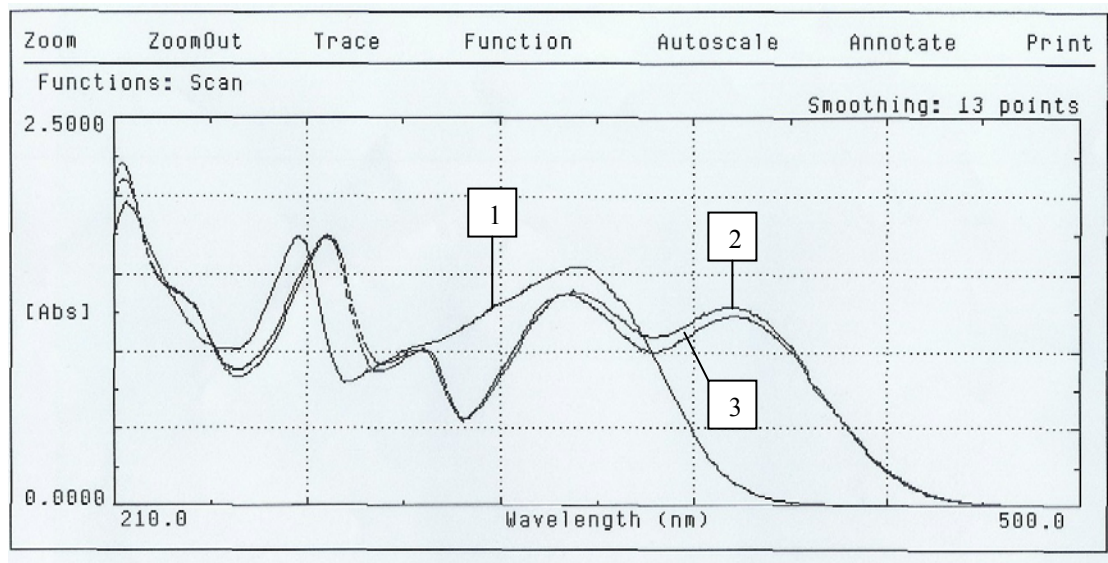


Abbildung 19: UV/VIS Spektrum von Kämpferol – 7 – O – neohesperosid



- 1... Spektrum von Kämpferol – 7 – O – neohesperosid
- 2... Spektrum von Kämpferol – 7 – O – neohesperosid mit  $\text{AlCl}_3$
- 3... Spektrum von Kämpferol – 7 – O – neohesperosid mit  $\text{AlCl}_3$  und  $\text{HCl}$

Abbildung 20: UV/VIS Spektrum von Astragalin



- 1... Spektrum von Astragalin
- 2... Spektrum von Astragalin mit AlCl<sub>3</sub>
- 3... Spektrum von Astragalin mit AlCl<sub>3</sub> und HCl

Im Vergleich der Spektren nach Zugabe von sechs Tropfen 5%iger Aluminiumchloridlösung konnte man sehen, dass SF\_SCII 4 und Astragalin ein übereinstimmendes Spektrum zeigten und nach Zugabe von Salzsäure dieses auch beibehielten. Das Spektrum von Kämpferol – 7 – O – neohesperosid unterschied sich deutlich.

Dies deutete darauf hin, dass die Zucker in WR 1 an O 3 verknüpft sind.

Mittels Massenspektrometrie wurde das Molekulargewicht der Substanz mit 594 ermittelt und deutete auf eine Summenformel von C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>. Die Abspaltung von zwei Fragmenten mit m/z = 146 und m/z = 162 vom Molekülionenpeak wiesen auf die Verknüpfung einer Hexose und einer Desoxyhexose am Genin.

Im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum stimmten die 2 Dubletts bei δ = 6,47 und 6,77 (J = 2,2 Hz, jeweils 1H) sowie bei 6,90 und 8,09 (J = 9 Hz; jeweils 2H) sehr gut mit

jenen von Kämpferol-3,7-diglykosiden überein [Lit. 4]. Die Signale der Zuckerprotonen korrelierten mit jenen von Kämpferol-3-O- $\beta$ -D-glucoopyranosid-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR Shifts bestätigten aufgrund der exzellenten Übereinstimmung diese Struktur [Lit. 5].

Dieses Flavonoid war bisher nur in einzelnen Farnen, den Asplenium-Arten *Asplenium kauffussii* Schlecht, *Asplenium scolopendrium* L. und *Camptosorus sibiricus* Rupr. (=syn. *Asplenium ruprechtii* Kurata) sowie aus *Selliguea feei* Bory (Polypodiaceae), nachgewiesen worden [Lit. 6, 7, 8, 9]. Mit der Isolierung aus *Dryopteris dilatata* ist dieses Flavonoids erstmals in der Familie der Dryopteridaceae identifiziert worden.

Abbildung 21: Struktur von Substanz WR - 1

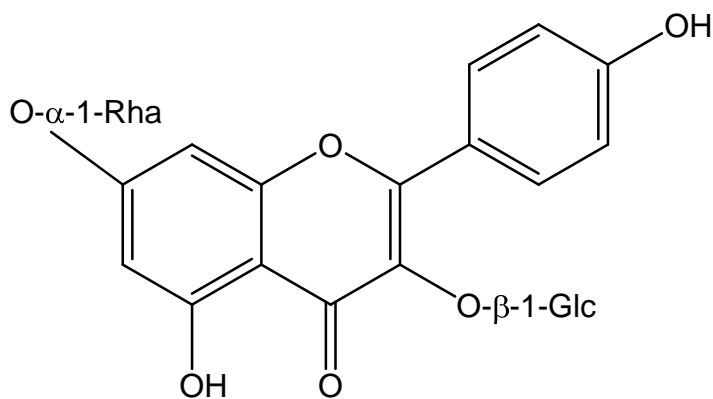


Tabelle 5: <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Daten von Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosid-7-O-α-L-rhamnopyranosid (in ppm; Lösungsmittel CD<sub>3</sub>OD)

C-Atom	<sup>1</sup> H-NMR	J in Hz	<sup>13</sup> C-NMR
Kaempferol			
2	-		159,59
3	-		135,62
4	-		179,72
5	-		162,92
6	6,474	2,2	100,58
7	-		163,57
8	6,770	2,2	95,53
9	-		158,09
10	-		107,46
1'	-		122,66
2'/6'	8,089	9,0	132,39
3'/5'	6,899	9,0	116,14
4'	-		161,77
α -Rhamnose			
1	5,571	1,7	99,85
2	4,020	1,7 / 3,5	71,70
3	3,830	3,5 / 9,4	72,07
4	3,579	9,4 / 9,5	73,59
5	3,588	9,5 / 6,2	71,28
6	1,251	6,2	18,06

β -Glucose			
1	5,339	7,6	103,62
2	3,446	7,6 / 9,3	75,76
3	3,418	9,3 / 9,2	71,42
4	3,299	9,2 / 9,8	71,42
5	3,212	9,8 / 2,3 / 5,7	78,52
6	3,705	2,3 / 11,9	62,63
	3,522		

### 3.5. Flavonoid Gehaltsbestimmung von *Dryopteris dilatata* und *Dryopteris filix mas*

Da aus den Mengen der Fraktionen nach der Festphasenextraktion deutlich war, dass die Flavonoide in *Dryopteris dilatata* und *Dryopteris filix mas* nur in geringer Konzentration vorlagen, wurde eine Bestimmung des Flavonoidgesamtgehalts beider Arten durchgeführt. Hierzu wurden Proben von *Dryopteris dilatata* und *Dryopteris filix mas* vom Standort Ebenwaldhöhe 2007 nach der spektrophotometrischen Gehaltsbestimmungsmethode für *Betulae folium* laut europäischem Arzneibuch analysiert.

Dabei wurde ein Gesamtflavonoidgehalt von 0,055% für *Dryopteris dilatata* und 0,066% für *Dryopteris filix mas* ermittelt.

## 4. Chemotaxonomische Untersuchungen

Da in der Volksmedizin Farne allgemein ohne genaue botanische Zuordnung verwendet werden, stellte sich die Frage wie weit sich die polaren phenolischen Inhaltsstoffe verschiedener Arten sowie, innerhalb einer Art in Abhängigkeit von Standort und Erntejahr unterscheiden.

Der zweite Teil der Diplomarbeit beschäftigte sich mit chemotaxonomischen Untersuchungen an vier Farnarten, die in Österreich heimisch sind. Die

untersuchten Arten waren *Athyrium filix femina*, *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris dilatata* und *Dryopters filix mas*.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Einzelpflanzenvergleiche, Standortvergleiche und Jahresvergleiche durchgeführt.

Ziel der Untersuchungen war herauszufinden, inwiefern sich das Phenolmuster der untersuchten Arten innerhalb eines Standortes und innerhalb verschiedener Jahre unterscheidet.

#### **4.1. Herstellung der Extrakte und Anreicherung mittels Festphasenextraktion**

Für die Untersuchungen wurden zunächst 40%ige Methanolextrakte hergestellt. Dafür wurden 200mg Droge in einer Reibschale pulverisiert und eine Stunde lang mit 50ml 40%igen Methanol am Wasserbad bei 80° C extrahiert. Die Filtrate wurden jeweils am Rotavapor zur Trockene gebracht.

Anschliessend wurden die polaren phenolischen Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion angereichert. Dafür wurde eine Bond Elut C18 50mg/1ml Kartusche mit zwei Reservoirvolumina Methanol und drei Reservoirvolumina Wasser konditioniert. Ein Reservoirvolumen entsprach 1 ml.

30mg des 40%igen Methanol - Extrakts wurde in 0,3 ml 20%igen Methanol am Ultraschallbad gelöst und mit einer Pasteurpipette auf die stationäre Phase aufgebracht. Anschliessend wurde 10 Minuten lang trockengesaugt und die abgesaugt Lösung in einem Rundkolben gesammelt (Vorlauf).

Dannach wurde das Extrakt mit zwei Reservoirvolumina Wasser (Fraktion I), sechs Reservoirvolumina 20%igen Methanol (Fraktion II) und vier Reservoirvolumina 80%igen Methanol (Fraktion III) eluiert.

Die gesammelten Fraktionen und der Vorlauf wurden am Rotavapor zur Trockene gebracht.

Die Fraktionen wurden dann anschliessend dünnschichtchromatographisch untersucht.

#### **4.2. Chemotaxonomische Untersuchungen an *Athyrium filix femina* mittels Dünnschichtchromatographie**

*Athyrium filix femina* gehört zur Familie der *Athyriaceen*. Der deutsche Name ist Frauenfarn, Waldfarn oder gewöhnlicher Farn.

Die Wedel erreichen Längen zwischen 30cm und 1m und sind zwei- bis dreimal gefiedert. Ihre Hauptachse ist meist grün, manchmal strohfarben bis rosa. Die fiederschnittigen Fiederblättchen sind 2,5- bis 3-mal so lang wie breit. Achse und Blättchen sind auf der Unterseite, besonders in der Jugend, mit kleinen, keulenförmigen Haaren besetzt.

Die Sori, die sich in Reihen zwischen der Mittelrippe der Fiederblättchen und deren Rand, und zwar etwas näher an der Rippe befinden, sind am Blättchengrund deutlich hakenförmig, weiter oben dann länglich gerade. Sie werden bis zur Sporenreife vom gleich geformten Indusium verdeckt [Lit. 10, 11, 12].

Von *Athyrium filix femina* wurde ein Einzelpflanzenvergleich von fünf verschiedenen Pflanzen vom Standort Schneeberg aus dem Jahr 2007 durchgeführt. Ebenso erfolgte ein Vergleich zwischen Proben aus den Jahren 2006 und 2007 von den Standorten Schneeberg und Ebenwaldhöhe. Ausserdem wurden Pflanzen der Standorte Ebenwaldhöhe, Irenental und Schneeberg aus dem Jahr 2006 sowie aus dem Jahr 2007 der Standorte Ebenwaldhöhe, Schneidgraben, Nördlicher Grafensteig und Lauschützsee verglichen.

Es wurden Extrakte wie in Kapitel 4.1 (siehe Seite 47) beschrieben hergestellt und die polaren phenolischen Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion angereichert.



Tabelle 6: Ausbeuten der Fraktionen in mg von *Athyrium filix femina*

Standort/ Jahr	Probe	Einwaage	Ausbeute	Einwaage SPE	VL	FI	FII	FIII
Ebenwaldhöhe 2006	E06	*	*	30,1	19,5	4,0	1,0	2,2
Irenental 2006	I-23	205,2	57,7	30,3	15,0	4,6	1,6	3,0
Schneeberg 2006	S19	205,0	74,3	30,4	19,4	4,3	1,6	3,0
Ebenwaldhöhe 2007	E07-16	204,0	69,5	30,1	21,1	3,6	1,1	2,0
Schneidgraben 2007	SN07	*	*	25,0	15,1	1,0	1,5	1,9
Nördl. Grafensteig 2007	NG07	*	*	30,9	23,3	1,1	1,2	0,7
Lauschützsee 2007	L07-2ff	202,7	80,3	30,4	19,7	3,9	1,1	1,6
Schneeberg 2007	S07-22	203,7	52,6	22,2	9,4	2,4	1,1	1,2
Schneeberg 2007	S07-23	176,5	42,5	30,1	13,2	8,2	0,8	0,9
Schneeberg 2007	S07-25	203,4	54,8	30,2	21,0	5,3	1,4	1,6
Schneeberg 2007	S07-26	201,9	50,7	29,7	19,4	2,7	0,7	0,8
Schneeberg 2007	S07-28	201,8	57,7	30,3	21,7	3,2	1,6	1,0

\* Extrakt aus vorhergehender Diplomarbeit [Lit. 1]

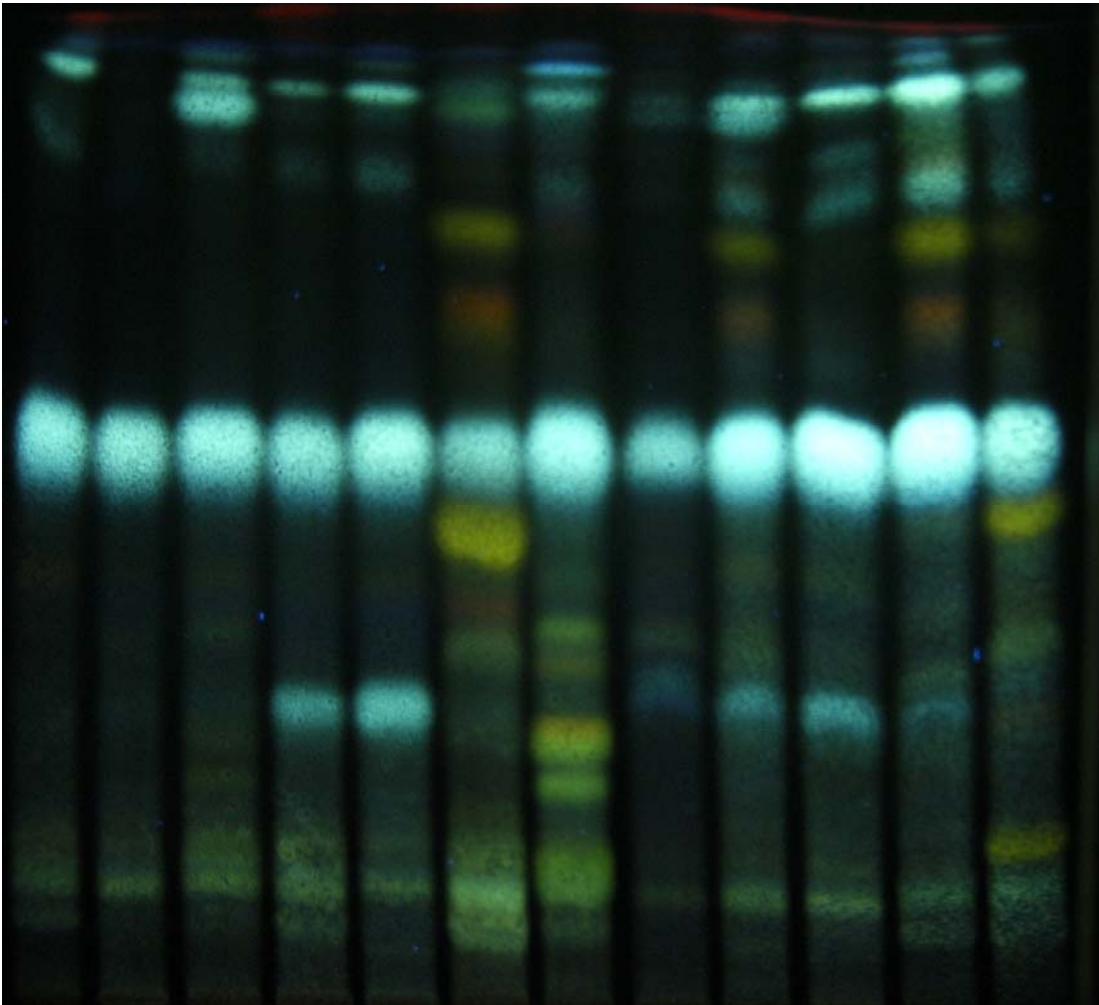
Die erhaltenen Fraktionen wurden im Verhältnis von 1mg/100µl gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 22: DC – Kontrolle der Vorläufe von *Athyrium filix femina*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



S0722	S0723	S0725	S0726	S0728	S19	I23	E06	E07-16	SN07	NG07	L07-2ff
-------	-------	-------	-------	-------	-----	-----	-----	--------	------	------	---------

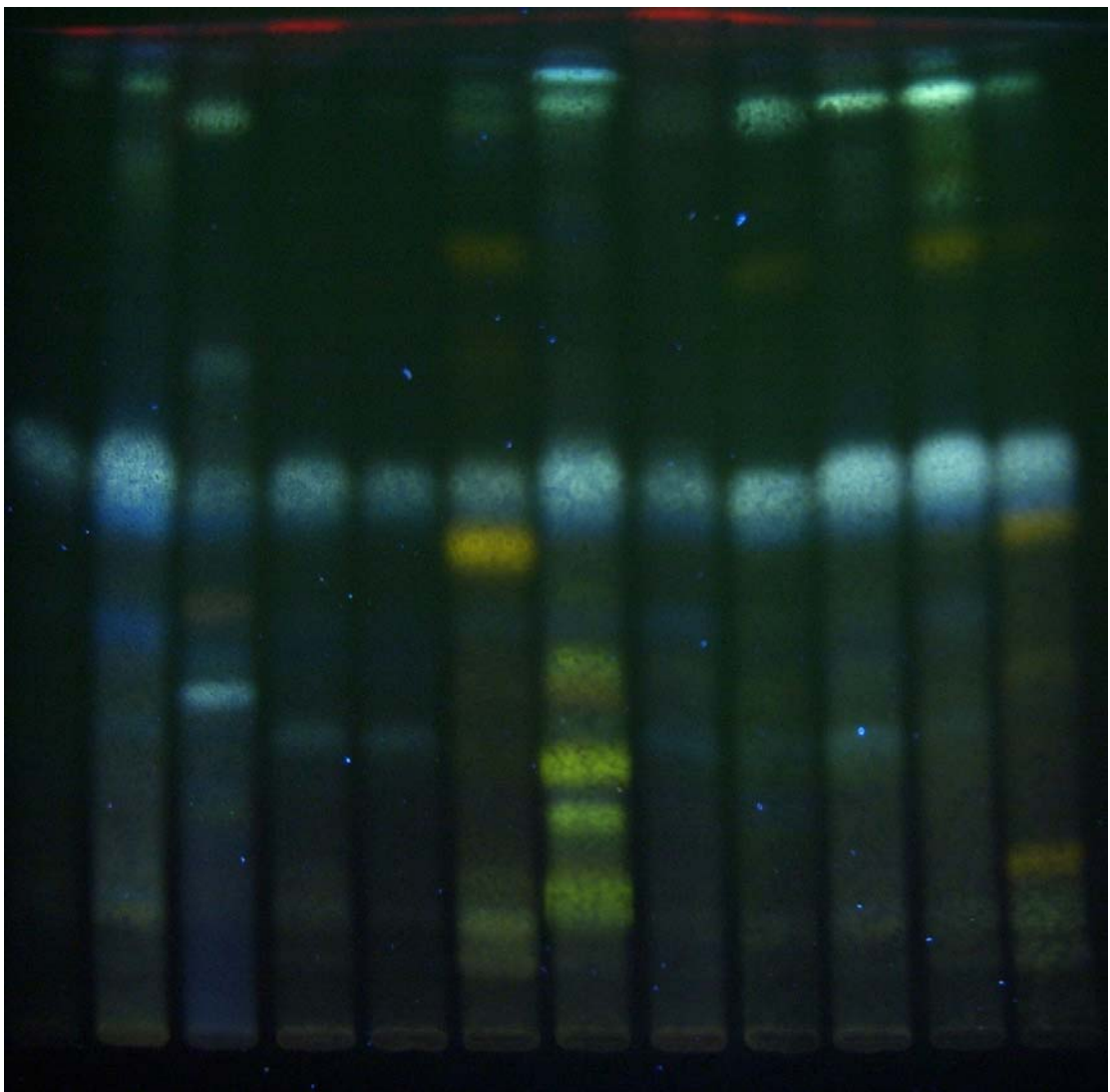
Im Vorlauf ist deutlich Chlorogensäure bei  $R_f = 0,58$  in allen Proben zu erkennen, daneben wurden bei einzelnen Mustern (S19, I-23, E07-16, NG07, L07-2ff) Anteile an Flavonoiden nicht ausreichend an Kartuschen retentiert. In I-23 und L07-2ff wurden vorwiegend polare Flavonoide eluiert, im Vorlauf von S19, E07-16 und NG07 waren auch Astragalin bei  $R_f = 0,77$  und Isoquercitrin bei  $R_f = 0,68$  erkennbar. Spuren von sehr polaren Flavonoiden bei  $R_f$  – Werten von 0,07 bis 0,26 waren in allen Mustern erkennbar. In den Proben S07-26, S07-28, E07-16 und SN07 war die blau fluoreszierende Bande von Caffeoyltatrat bei  $R_f = 0,29$  erkennbar.

Abbildung 23: DC – Kontrolle der Fraktion I von *Athyrium filix femina*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



S0722	S0723	S0725	S0726	S0728	S19	I23	E06	E07-16	SN07	NG07	L07-2ff
-------	-------	-------	-------	-------	-----	-----	-----	--------	------	------	---------

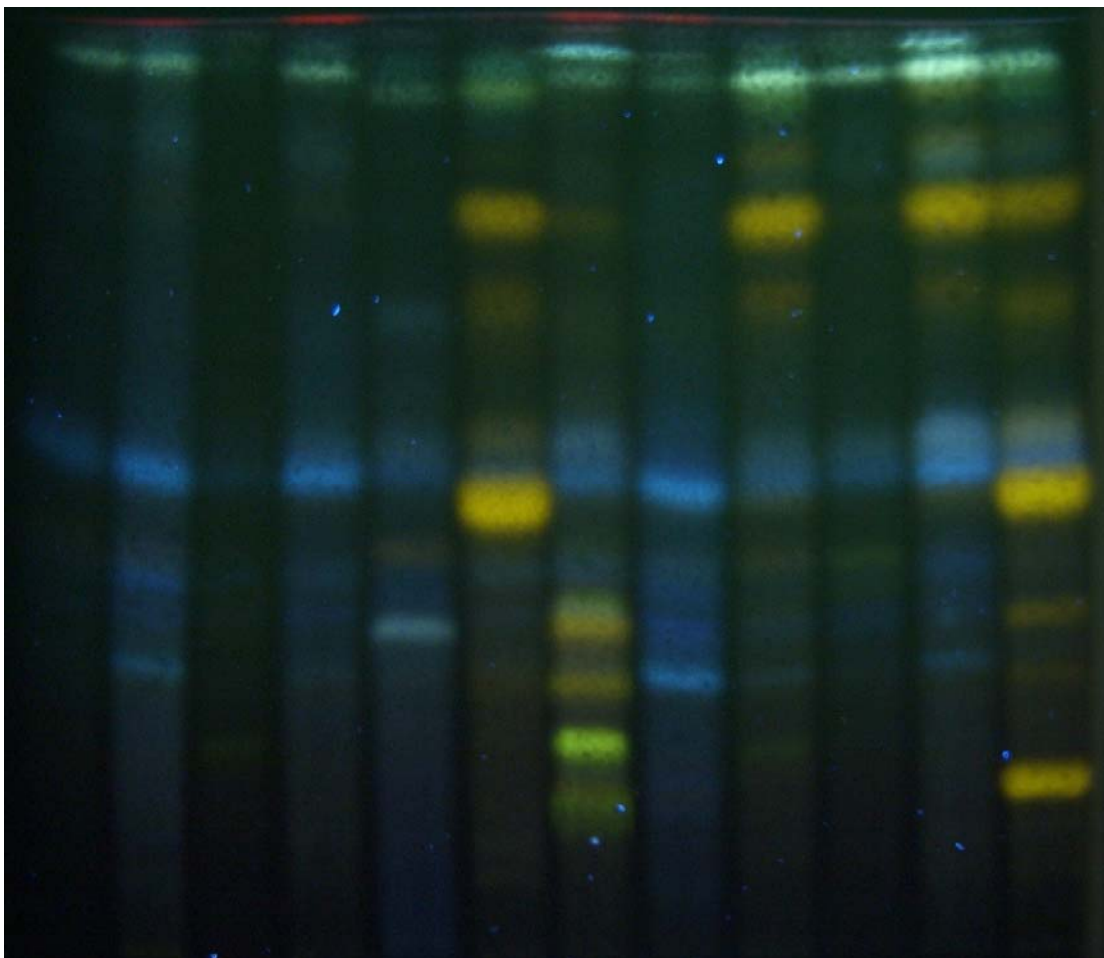
In Fraktion I wurde Chlorogensäure und eine etwas dunkler blau fluoreszierende Bande mit geringfügig niedrigeren Rf – Wert eluiert. Daneben waren in den Proben S19, E07-16, NG07, I-23 und L07-2ff weitere Anteile der bereits im Vorlauf detektierten Flavonoide sichtbar.

Abbildung 24: DC – Kontrolle der Fraktion II von *Athyrium filix femina*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



S0722	S0723	S0725	S0726	S0728	S19	I23	E06	E07-16	SN07	NG07	L07-2ff
-------	-------	-------	-------	-------	-----	-----	-----	--------	------	------	---------

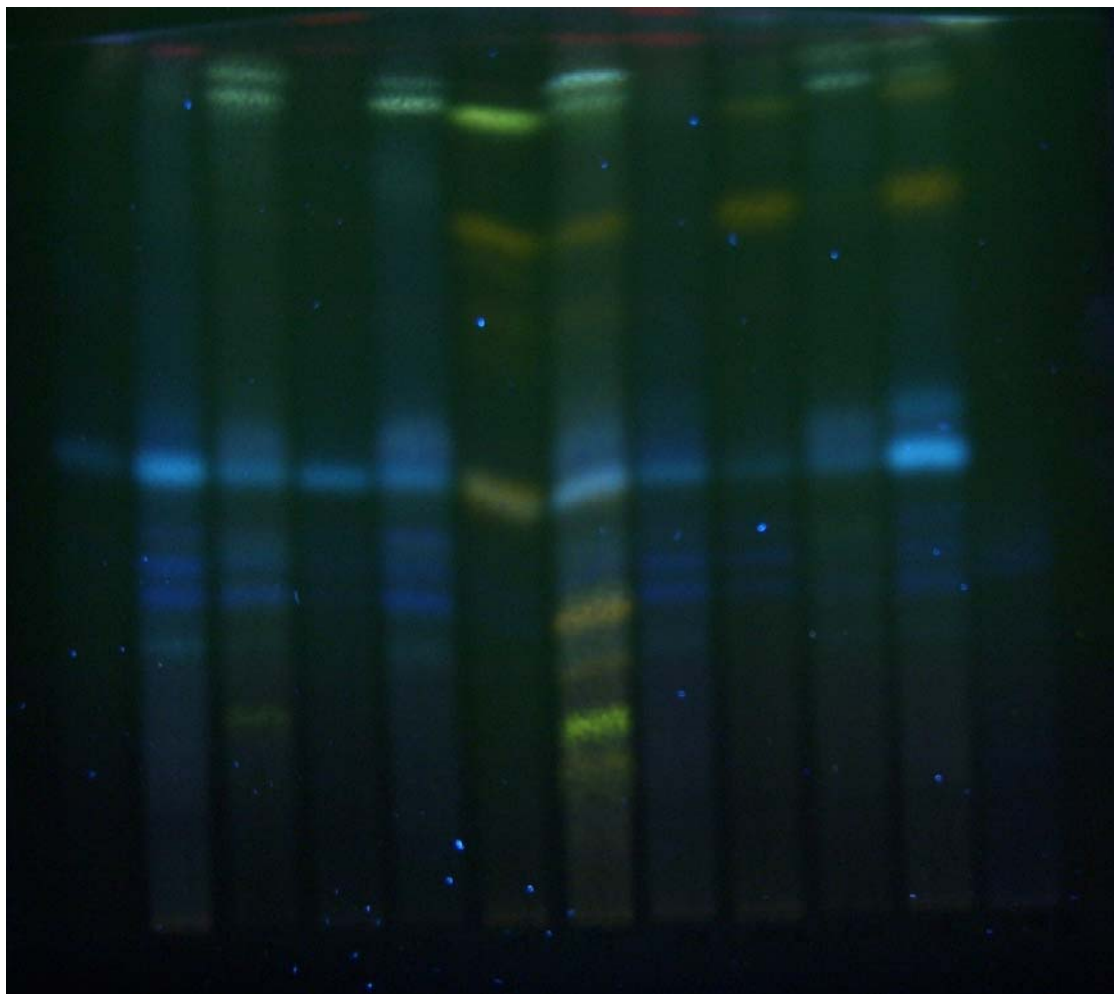
In den Fraktionen II waren in den Mustern S19, I-23, E07-16 und L07-2ff die Flavonoide deutlich angereichert. Die Proben S07-22, S07-23, S07-25, S07-26, S07-28, E06 und SN07 zeigten keine gelb-orange fluoreszierende Flavonoidbanden bei  $R_f = 0,8$  beziehungsweise  $R_f = 0,48$ .

Abbildung 25: DC – Kontrolle der Fraktion III von *Athyrium filix femina*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



S0722	S0723	S0725	S0726	S0728	S19	I23	E06	E07-16	SN07	NG07	L07-2ff
-------	-------	-------	-------	-------	-----	-----	-----	--------	------	------	---------

Die DC der Fraktionen III zeigte eine mit jener der Fraktionen II eine weitgehend übereinstimmende Zusammensetzung der Auszüge. Damitlich wurde deutlich, dass das Retentionsvermögen der Bond Elut C18 50mg/1ml Kartuschen trotz Berücksichtigung des maximalen Fassungsvermögen bei der Probenaufgabe nicht so optimal war wie bei den größeren Bond Elut C18 10g/60ml Kartuschen.

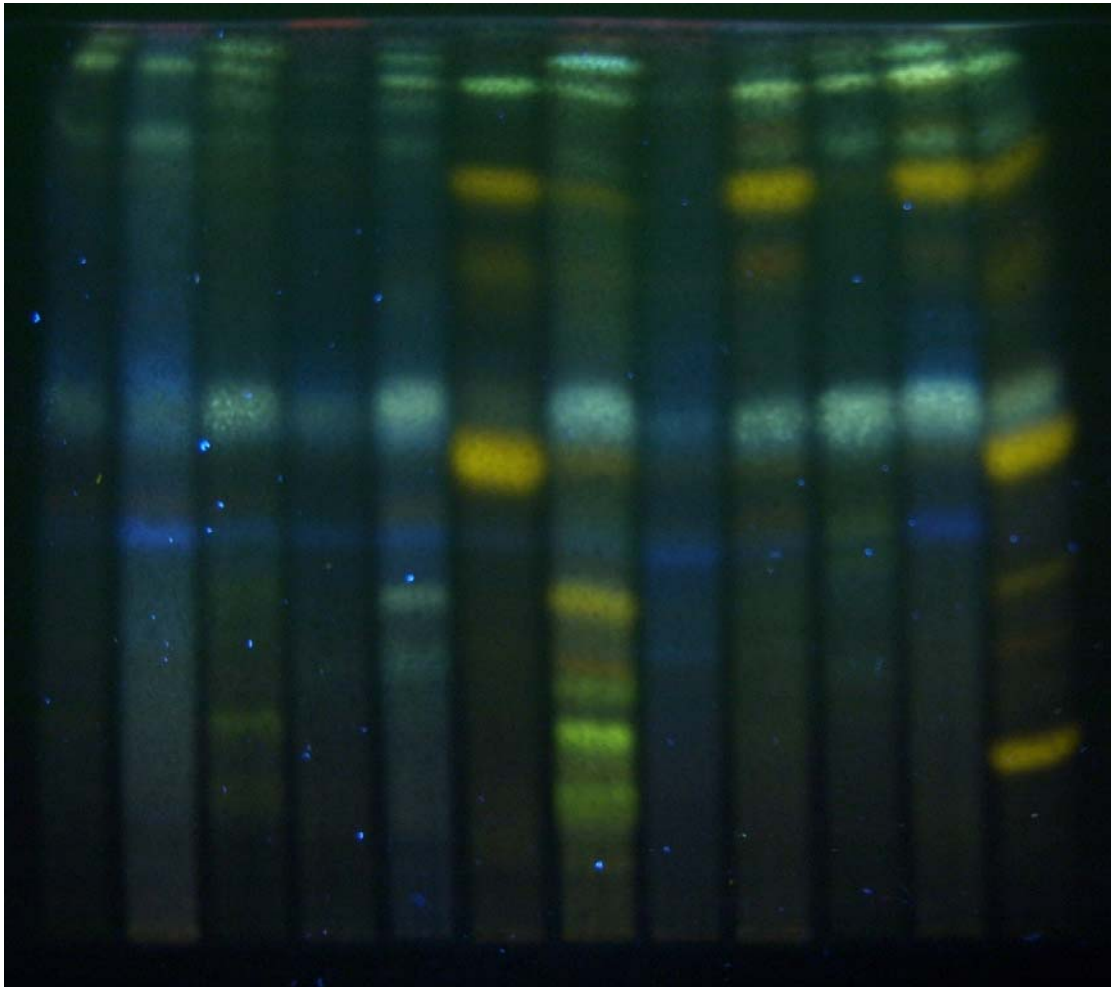
Aus diesem Grund wurden die korrespondierenden Fraktionen II und Fraktionen III vereinigt und erneut dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 26: DC – Kontrolle der Fraktionen II und III von *Athyrium filix femina*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



S0722	S0723	S0725	S0726	S0728	S19	I23	E06	E07-16	SN07	NG07	L07-2ff
-------	-------	-------	-------	-------	-----	-----	-----	--------	------	------	---------

In den Mustern des Einzelpflanzenvergleichs (Schneeberg 2007) erkannte man hauptsächlich die Zonen von Chlorogensäure in allen Fraktionen und von Caffeoyltatratronat im Vorlauf. Flavonoide waren bei diesen Proben allerdings kaum erkennbar. Hingegen sind im Jahresvergleich vom Standort Schneeberg in Probe S19 aus dem Jahr 2006 die Flavonoide Astragalin ( $R_f = 0,84$ ), Isoquercitrin ( $R_f = 0,76$ ) und eine Komponente bei einem  $R_f$  – Wert von 0,48 sichtbar. Hier zeigten sich unterschiedliche Muster abhängig vom Erntejahr. Ein ähnliches Ergebnis ergab der Jahresvergleich vom Standort Ebenwaldhöhe. In der Probe E06 waren keine Flavonoide sichtbar, hingegen wies die Probe E07-16 wiederum Astragalin und Isoquercitrin auf.

Im Standortvergleich aus dem Jahr 2006 sind in den Proben S19 und I-23 Astragalin, Isoquercitrin und die unbekannte Komponente X erkennbar, in Probe E06 allerdings nicht.

Der Standortvergleich 2007 zeigte ein ähnliches Ergebnis. In den Proben E07-16, NG07 und L07-2ff waren die Flavonoide Astragalin und Isoquercitrin deutlich sichtbar, in SN07 sehr schwach und in den Proben vom Standort Schneeberg überhaupt nicht.

Es zeigte sich ein starker Unterschied im Flavonoidmuster von *Athyrium filix femina* abhängig von Standort und Erntejahr.

#### **4.3. Chemotaxonomische Untersuchungen an *Athyrium distentifolium* mittels Dünnschichtchromatographie**

*Athyrium distentifolium* ist ein weiterer Vertreter der Familie der *Athyriaceen*. Der deutsche Name ist Gebirgsfrauenfarn.

*Athyrium distentifolium* ist *Athyrium filix femina* sehr ähnlich, allerdings sind die letzten Abschnitte breiter und stumpfer als bei *Athyrium filix femina*. Die Wuchshöhe ist 50 bis 150 cm [Lit. 13].

Von *Athyrium distentifolium* wurde ein Einzelpflanzenvergleich vom Standort Ebenwaldhöhe im Jahr 2007, ein Vergleich von Mustern vom Standort Ebenwaldhöhe aus den Jahren 2007 und 2008 sowie ein Vergleich von Proben der Standorte Ebenwaldhöhe und Lauschützsee aus dem Jahr 2007 durchgeführt.

Es wurden Extrakte wie in Kapitel 4.1 (siehe Seite 47) beschrieben hergestellt und die polaren phenolischen Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion angereichert.



Tabelle 7: Ausbeuten der Fraktionen in mg von *Athyrium distentifolium*

Standort/ Jahr	Probe	Einwaage	Ausbeute	Einwaage SPE	VL	FI	FII	FIII
Ebenwaldhöhe 2007	E07-3	203,6	54,3	30,0	17,3	3,1	0,6	1,5
Ebenwaldhöhe 2007	E07-5	203,4	45,9	30,2	16,6	3,0	0,4	0,5
Ebenwaldhöhe 2007	E07-8	202,1	44,9	30,1	16,5	3,5	0,8	1,0
Ebenwaldhöhe 2007	E07-11	202,2	38,0	30,3	17,5	2,9	0,2	0,6
Ebenwaldhöhe 2007	E07-14	203,3	43,1	30,1	11,2	3,3	1,5	1,0
Lauschützsee 2007	L07-1	203,2	52,3	29,9	18,4	4,6	0,7	0,7
Ebenwaldhöhe 2008	E01	203,9	62,4	30,0	18,2	4,5	1,7	1,6

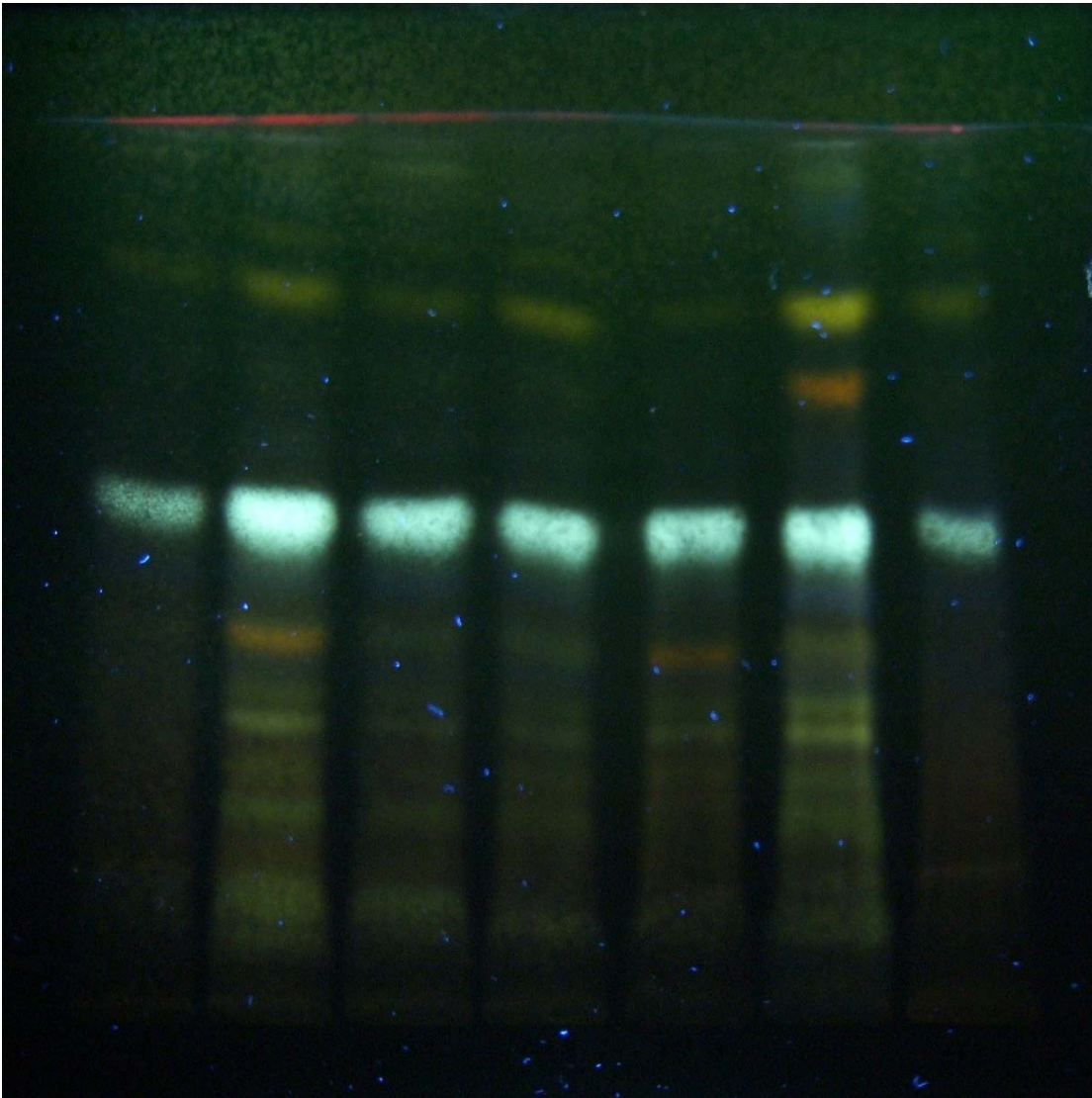
Die erhaltenen Fraktionen wurden im Verhältnis von 1mg/100µl gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 27: DC – Kontrolle der Vorläufe von *Athyrium distentifolium*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



E07-3	E07-5	E07-8	E07-11	E07-14	E01	L07-1
-------	-------	-------	--------	--------	-----	-------

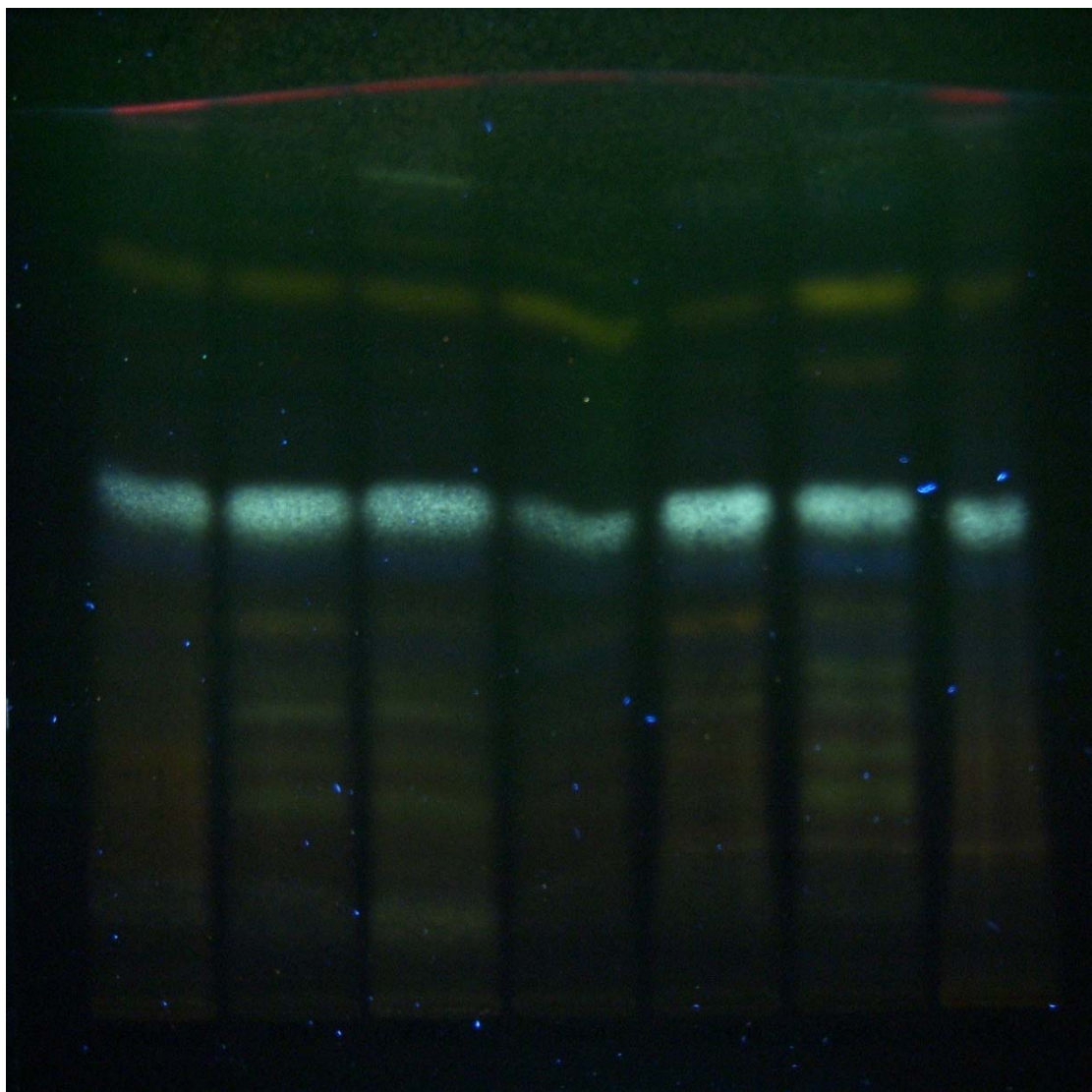
Im Vorlauf aller Proben war Chlorogensäure ( $R_f = 0,52$ ) die Hauptkomponente. Daneben wurden polare Flavonoide in allen Mustern im  $R_f$  – Bereich von 0,12 bis 0,4 und Astragalin ( $R_f = 0,76$ ) detektiert, wobei die Konzentrationen in den Proben E07-3 und L07-1 relativ gering waren. In Probe E01 war auch Isoquercitrin ( $R_f = 0,68$ ) deutlich nachweisbar.

Abbildung 28: DC – Kontrolle der Fraktionen I von *Athyrium distentifolium*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



E07-3

E07-5

E07-8

E07-11

E07-14

E01

L07-1

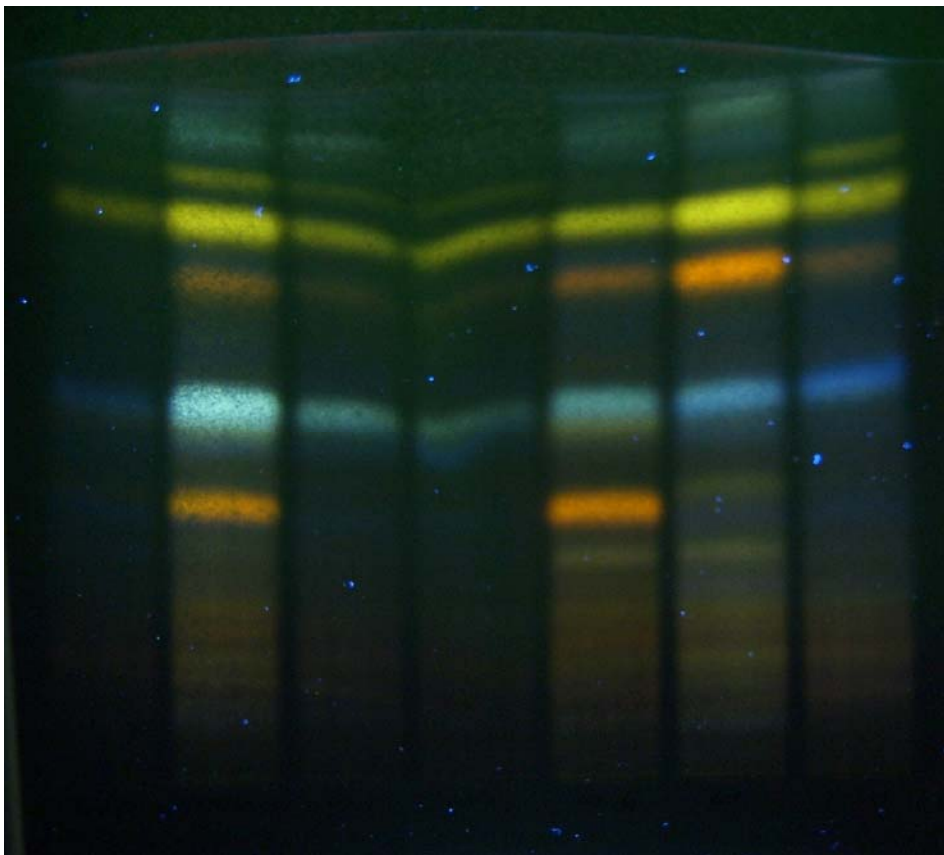
In Fraktion I aller Proben ist wiederum die hellblaue Bande von Chlorogensäure (Rf = 0,56) erkennbar, sowie eine dunkelblaue Bande (Rf = 0,48) direkt darunter. Das chromatographische Bild entsprach weitgehend jenem der korrelierenden Vorläufe.

Abbildung 29: DC – Kontrolle der Fraktionen II von *Athyrium distentifolium*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



E07-3	E07-5	E07-8	E07-11	E07-14	E01	L07-1
-------	-------	-------	--------	--------	-----	-------

In den Fraktionen II war Chlorogensäure ( $R_f = 0,54$ ), mit Ausnahme von Probe E07-5, schwach erkennbar, die Flavonoide waren stark angereichert.

Die gelbe Bande von Astragalin ( $R_f = 0,72$ ) stellte in allen Mustern die Hauptkomponente dar, in Probe E01 war Isoquercitrin ( $R_f = 0,68$ ) in ähnlicher Konzentration erkennbar, während es in den anderen Proben als Nebenkomponente auftrat.

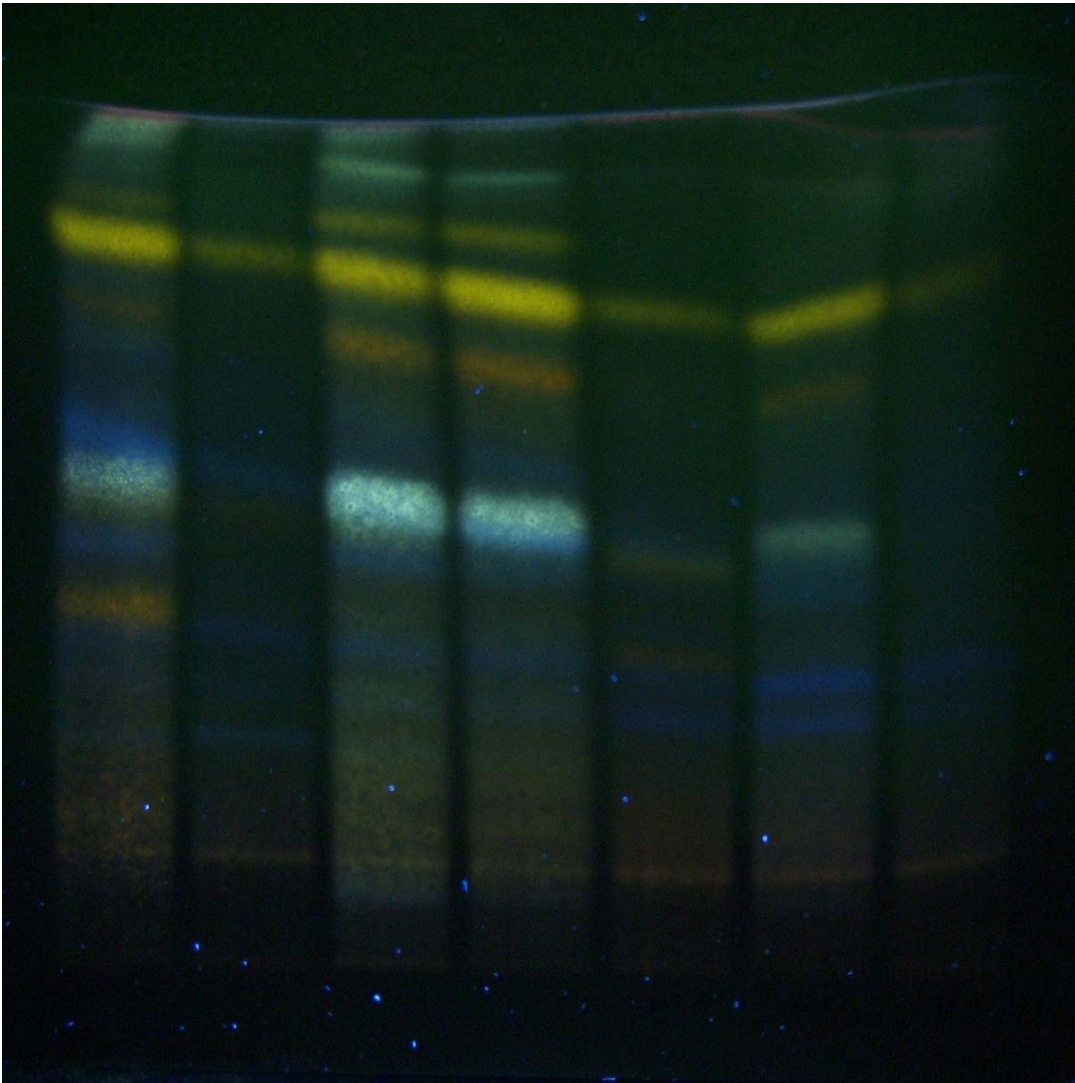
Im Unterschied zu allen anderen Mustern wurde in E07-5 und E01 eine deutlich orange fluoreszierende Zone bei  $R_f = 0,38$  detektiert.

Abbildung 30: DC – Kontrolle der Fraktionen III von *Athyrium distentifolium*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



E07-3	E07-5	E07-8	E07-11	E07-14	E01	L07-1
-------	-------	-------	--------	--------	-----	-------

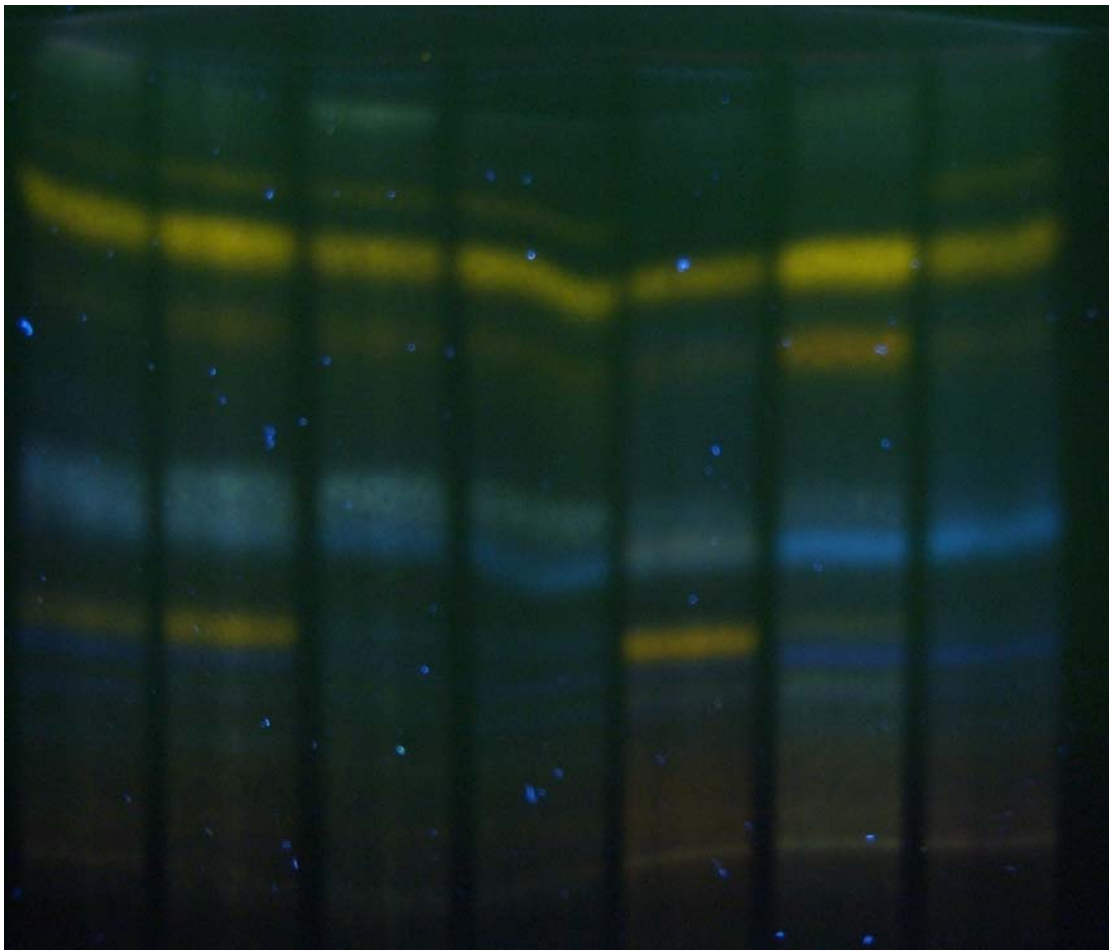
Die DC der Fraktionen III zeigte qualitativ gute Übereinstimmung mit den Fraktionen II, allerdings unterschieden sich die Intensitäten. Die Fraktionen III von Muster E07-3, E07-8 und E07-11 wiesen deutlich höhere Phenolanteile auf als jene der anderen Muster. Bei den Fraktionen II dieser Muster war ein genau umgekehrter Trend zu beobachten. Aus diesem Grund wurden die korrespondierenden Fraktionen II und Fraktionen III vereinigt und erneut dünn-schichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 31: DC – Kontrolle der Fraktionen II und III von *Athyrium distentifolium*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



E07-3	E07-5	E07-8	E07-11	E07-14	E01	L07-1
-------	-------	-------	--------	--------	-----	-------

In den vereinigten Fraktionen II und III von *Athyrium distentifolium* sieht man in allen 7 Proben die gelbe Bande von Astragalin ( $R_f = 0,7$ ) als Hauptkomponente, erkennbar in allen Proben ist auch die hellblaue Bande von Chlorogensäure bei  $R_f = 0,44$  und eine dunkelblaue Bande knapp darunter. In den Proben E07-3, E07-5 und E07-14 ist die orange Bande von Rutin bei  $R_f = 0,3$  detektierbar. Isoquercitrin mit einem  $R_f$  – Wert von  $0,61$  ist als weitere Hauptkomponente in Probe E01 und in allen anderen Proben schwächer sichtbar.

Die chemotaxonomischen Untersuchungen bei *Athyrium distentifolium* zeigten mit Chlorogensäure, Astragalin und Isoquercitrin unabhängig von Standort und Jahr ein weitgehend übereinstimmendes Spektrum der polaren Phenole, allerdings in unterschiedlichen Intensitäten. Lediglich das Auftreten der orange fluoreszierenden Bande von Rutin bei einem  $R_f$  – Wert von  $0,3$  in einzelnen Pflanzen stellte einen Unterschied dar.

#### **4.4. Chemotaxonomische Untersuchungen an *Dryopteris dilatata* mittels Dünnschichtchromatographie**

*Dryopteris dilatata* gehört zu der Familie der *Dryopteridaceen*, die Pflanze wurde in Kapitel 3 (Seite 12) beschrieben.

Von *Dryopteris dilatata* wurden zwei Einzelpflanzenvergleiche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden jeweils fünf Proben vom Standort Ebenwaldhöhe aus dem Jahr 2006 beziehungsweise Schneeberg 2007 gezogen und untersucht. Ebenso wurde ein Standortvergleich mit Mustern der Standorte Schneeberg und Lauschützsee aus dem Jahr 2007 gemacht.

Es wurden Extrakte wie in Kapitel 4.1 (siehe Seite 47) beschrieben hergestellt und die polaren phenolischen Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion angereichert.



Tabelle 8: Ausbeuten der Fraktionen in mg von *Dryopteris dilatata*

Standort/ Jahr	Probe	Einwaage	Ausbeute	Einwaage SPE	VL	FI	FII	FIII
Ebenwaldhöhe 2006	EWH-A	202,0	62,8	31,5	18,6	3,5	1,1	1,7
Ebenwaldhöhe 2006	EWH-C	203,8	62,7	31,4	15,8	3,6	0,9	1,5
Ebenwaldhöhe 2006	EWH-D	200,2	62,1	31,9	18,3	3,3	1,0	2,0
Ebenwaldhöhe 2006	EWH-E2	203,1	60,9	31,2	16,4	2,6	1,1	1,4
Ebenwaldhöhe 2006	EWH-F	204,0	71,1	31,3	16,7	2,4	1,0	1,9
Schneeberg 2007	S07-1	204,8	66,4	30,1	19,3	3,3	1,0	1,3
Schneeberg 2007	S07-4	201,0	64,4	30,7	14,9	2,8	1,3	1,5
Schneeberg 2007	S07-7	205,1	74,6	30,4	16,5	2,3	1,5	1,7
Schneeberg 2007	S07-10	202,4	85,2	30,0	16,2	2,8	0,8	1,2
Schneeberg 2007	S07-14	200,8	76,8	30,0	15,6	1,7	1,0	1,2
Lauschützsee 2007	L07-1Dd	201,6	58,5	32,2	18,9	2,7	1,2	1,5

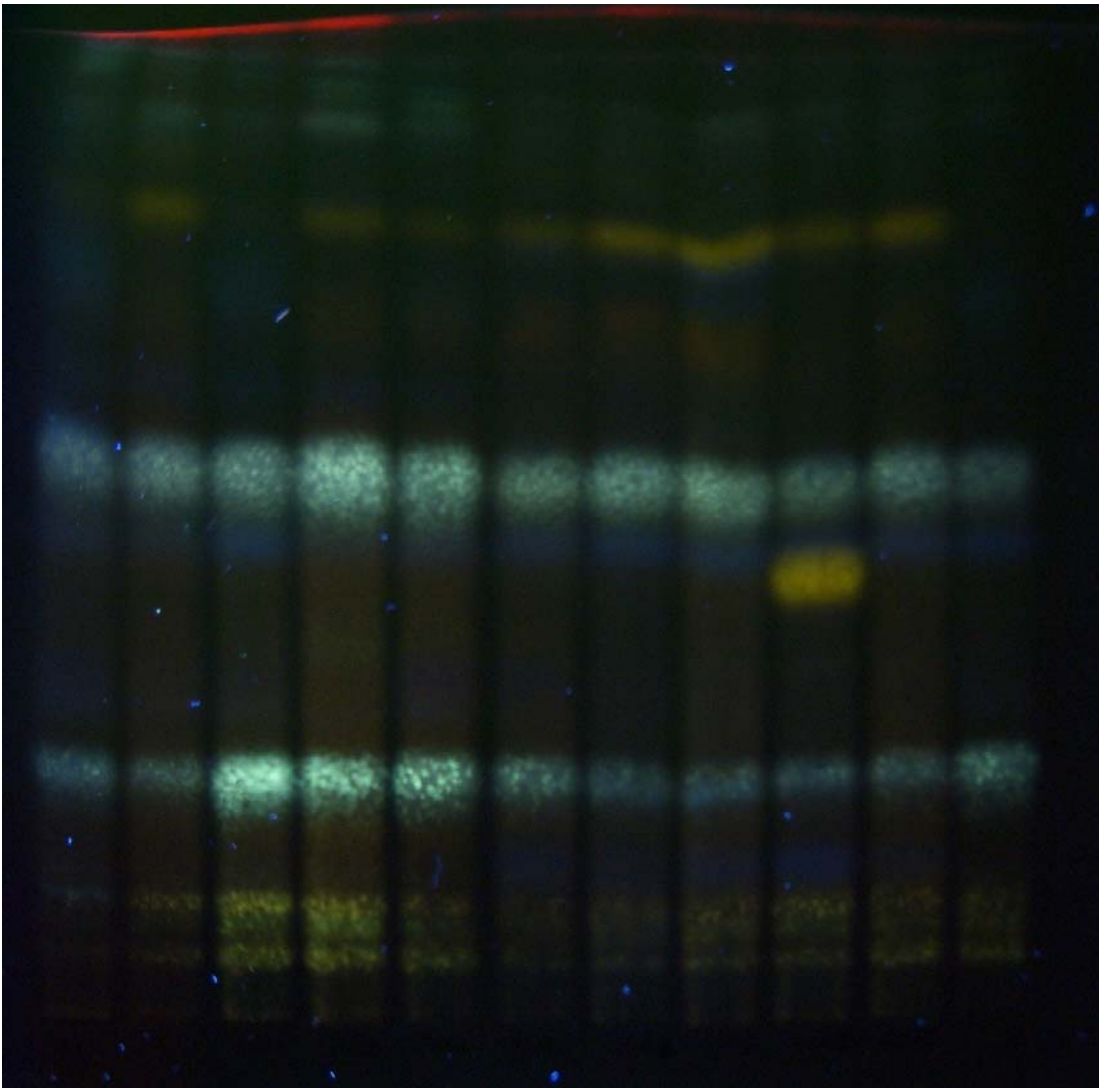
Die erhaltenen Fraktionen wurden im Verhältnis von 1mg/100µl gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 32: DC – Kontrolle der Vorläufe von *Dryopteris dilatata*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



S07-1 S07-4 S07-7 S07-10 S07-14 EWH-A EWH-C EWH-D EWH-E2 EWH-F L07-1Dd

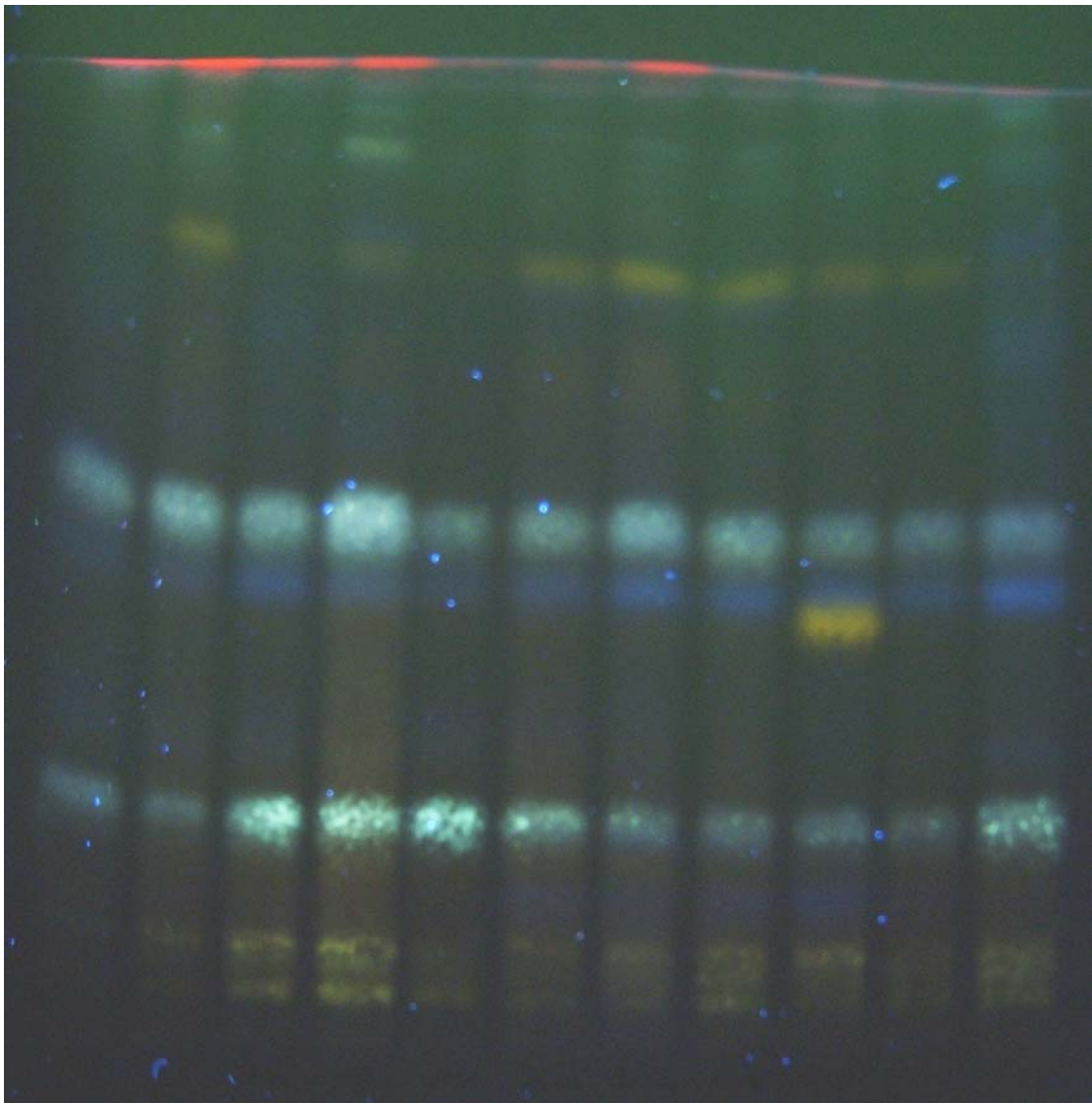
In der DC der Vorläufe sieht man in allen Mustern Chlorogensäure mit dem  $R_f$  Wert von 0,57 und eine blaue Bande mit  $R_f = 0,26$ , die Caffeoyl – tatronat entspricht. Daneben sind kleine Anteile polarer Flavonoide im  $R_f$  – Bereich von 0,07 bis 0,15 sichtbar, sowie Astragalin bei  $R_f = 0,81$ . Auffallend ist die intensiv gelb fluoreszierende Zone bei  $R_f = 0,44$  in Muster EWH-E2.

Abbildung 33: DC – Kontrolle der Fraktionen I von *Dryopteris dilatata*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



S07-1	S07-4	S07-7	S07-10	S07-14	EWH-A	EWH-C	EWH-D	EWH-E2	EWH-F	L07-1Dd
-------	-------	-------	--------	--------	-------	-------	-------	--------	-------	---------

In den Fraktionen I traten ebenso wie im Vorlauf Chlorogensäure, Caffeoyl –  
tatronat, Astragalin und die gelb fluoreszierende Zone in Probe EWH-E2, sowie  
eine dunkelblaue Bande direkt unterhalb der Chlorogensäure in allen Proben  
auf.

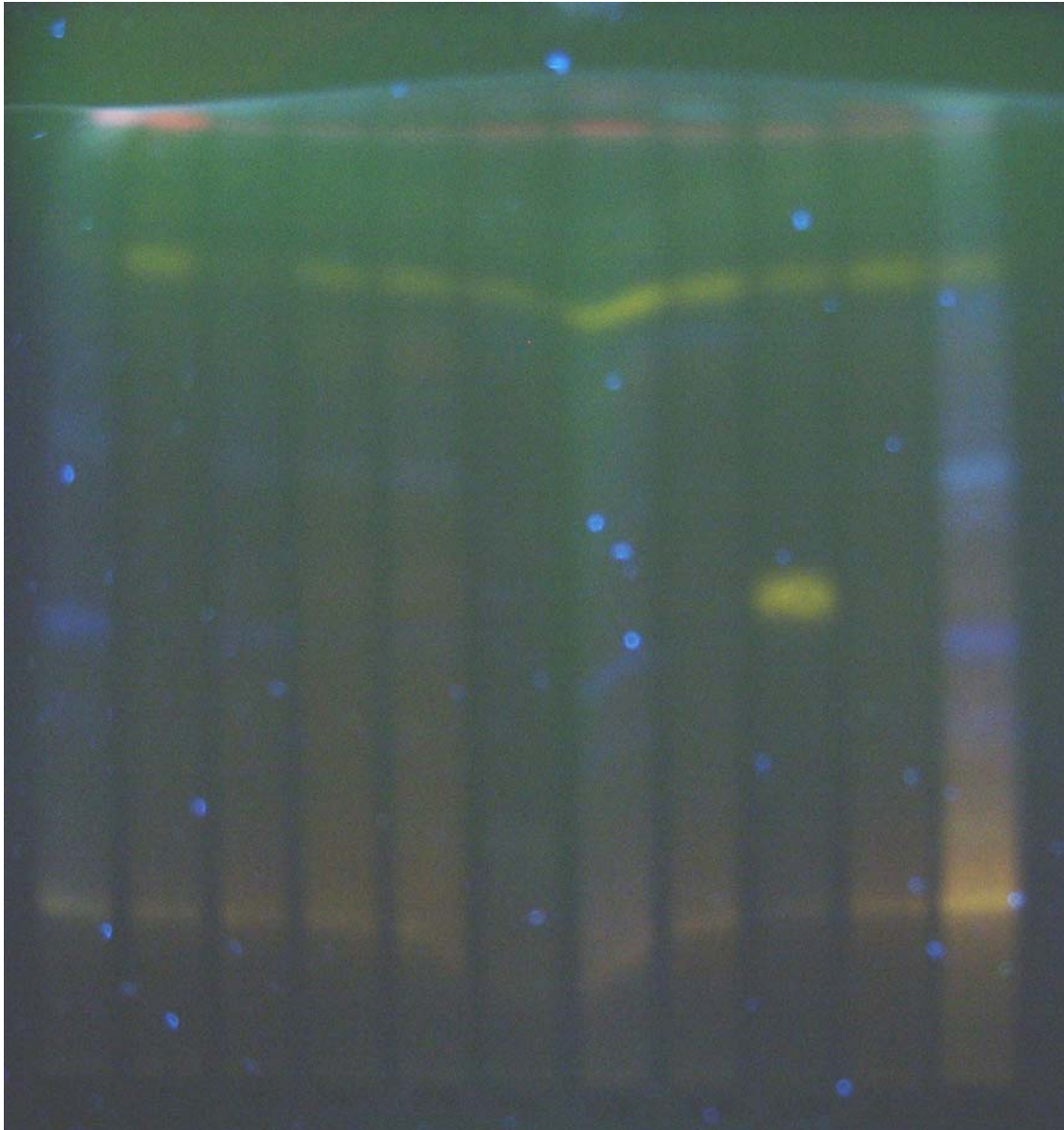
Da, wie bei den anderen Anreicherungen mittels Festphasenextraktion auch, die  
Fraktionen II und Fraktionen III ein qualitativ übereinstimmendes Muster  
zeigten, wurden die beiden Fraktionen vereinigt und gemeinsam untersucht.

Abbildung 34: DC – Kontrolle der Fraktionen II und III von *Dryopteris dilatata*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte  
Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



S07-1 S07-4 S07-7 S07-10 S07-14 EWH-A EWH-C EWH-D EWH-E2 EWH-F L07-1Dd

In den vereinigten Fraktionen II und III war die gelbe Bande von Astragalin in allen Proben die Hauptkomponente.

Auch im Einzelpflanzenvergleich von *Dryopteris dilatata* sind quantitative Unterschiede der vorkommenden Komponenten zu beobachten. Isoquercitrin war in diesen Mustern von *Dryopteris dilatata* nur in sehr geringen Mengen detektierbar.

Im Vorlauf und Fraktion I konnte Chlorogensäure und Caffeoyl – tatronat nachgewiesen werden.

#### **4.5. Chemotaxonomische Untersuchungen an *Dryopteris filix mas* mittels Dünnschichtchromatographie**

*Dryopteris filix mas* gehört zu der Familie der *Dryopteridaceen*. Der deutsche Name ist Echter Wurmfarne, Männerfarne oder Gewöhnlicher Wurmfarne.

Die Wedel des sommergrünen Farne sind in Rosetten angeordnet. Sie erreichen eine Länge von etwa einem Meter, können jedoch auch bis 1,2 m lang werden. Der kurze Blattstiel ist locker mit gelbraunen Spreuschuppen besetzt. Das Blatt ist zweifach gefiedert, oval geformt und läuft spitz zu. Die Fiederblättchen sind am Rand sehr fein gesägt. Die Sporenbehälter sitzen zweireihig auf der Unterseite der sporentragenden Wedel. Die Sporen werden von Juli bis September verbreitet und sind 33-46 µm groß [Lit. 14,15].

Von *Dryopteris filix mas* wurde ein Einzelpflanzenvergleich vom Standort Ebenwaldhöhe aus dem Jahr 2007 durchgeführt sowie ein Vergleich von Proben aus dem Jahr 2007 der Standorte Ebenwaldhöhe, Turrachbach und Lauschützsee.

Es wurden Extrakte wie in Kapitel 4.1 (siehe Seite 47) beschrieben hergestellt und die polaren phenolischen Inhaltsstoffe mittels Festphasenextraktion angereichert.

Tabelle 9: Ausbeuten der Fraktionen in mg von *Dryopteris filix mas*

Standort/ Jahr	Probe	Einwaage	Ausbeute	Einwaage SPE	VL	FI	FII	FIII
Ebenwaldhöhe 2007	Dfm1	201,0	63,9	29,7	20,6	2,1	0,4	2,4
Ebenwaldhöhe 2007	Dfm2	200,6	61,4	30,0	21,0	2,6	0,5	1,8
Ebenwaldhöhe 2007	Dfm3	202,5	62,7	30,4	17,0	4,4	0,8	0,8
Ebenwaldhöhe 2007	Dfm4	200,3	62,8	30,3	20,8	3,9	1,0	1,2
Ebenwaldhöhe 2007	Dfm5	200,9	58,1	30,9	18,0	3,3	0,9	1,1
Turrachbach 2007	T07-1	201,1	64,7	30,3	15,1	4,3	1,0	1,1
Lauschützsee 2007	L07-1fm	201,3	69,2	30,4	21,2	3,1	2,2	1,7

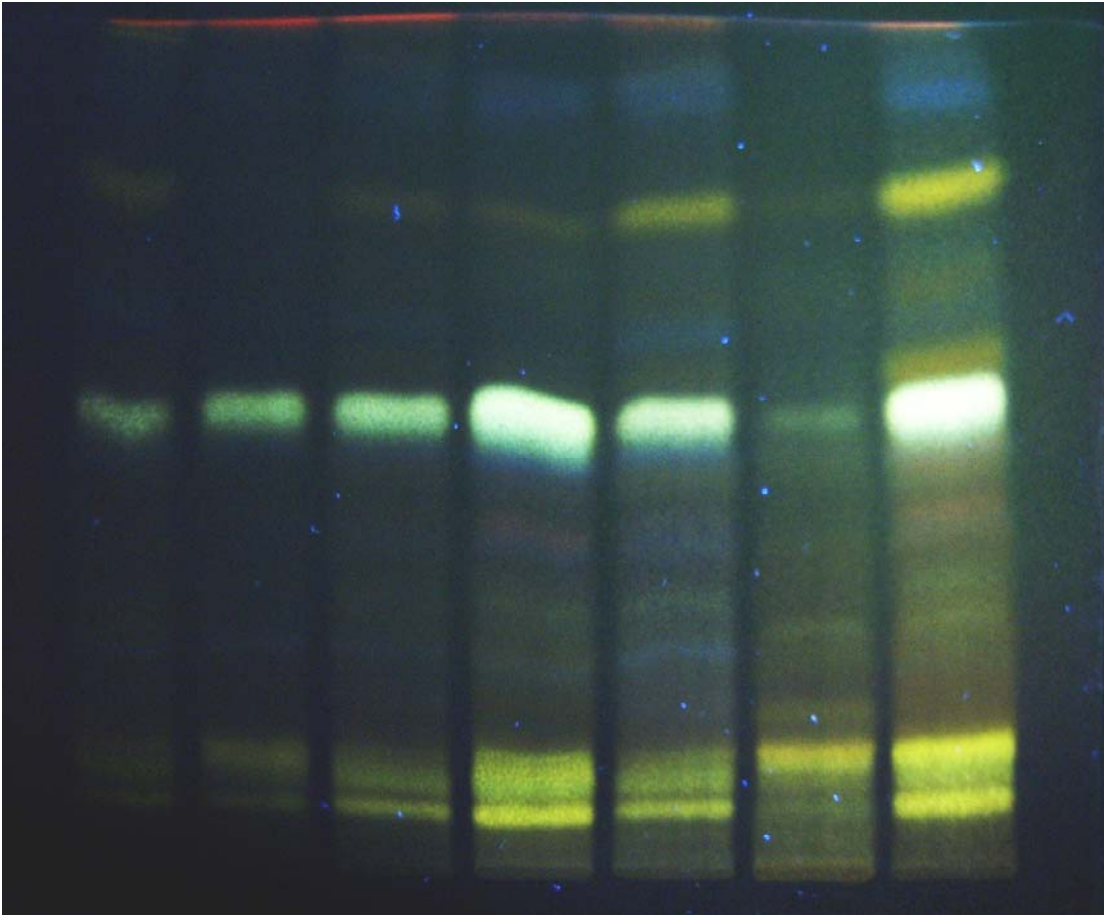
Die erhaltenen Fraktionen wurden im Verhältnis von 1mg/100µl gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Abbildung 35: DC – Kontrolle der Vorläufe von *Dryopteris filix mas*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



Dfm 1	Dfm 2	Dfm 3	Dfm 4	Dfm 5	T07-1	L07-1fm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	---------

Im Vorlauf waren in allen Proben Chlorogensäure ( $R_f = 0,47$ ) und Astragalin ( $R_f = 0,78$ ) sichtbar. Ausserdem wurden polare Flavonoide in allen Mustern im  $R_f$  – Bereich von 0,09 bis 0,17 detektiert

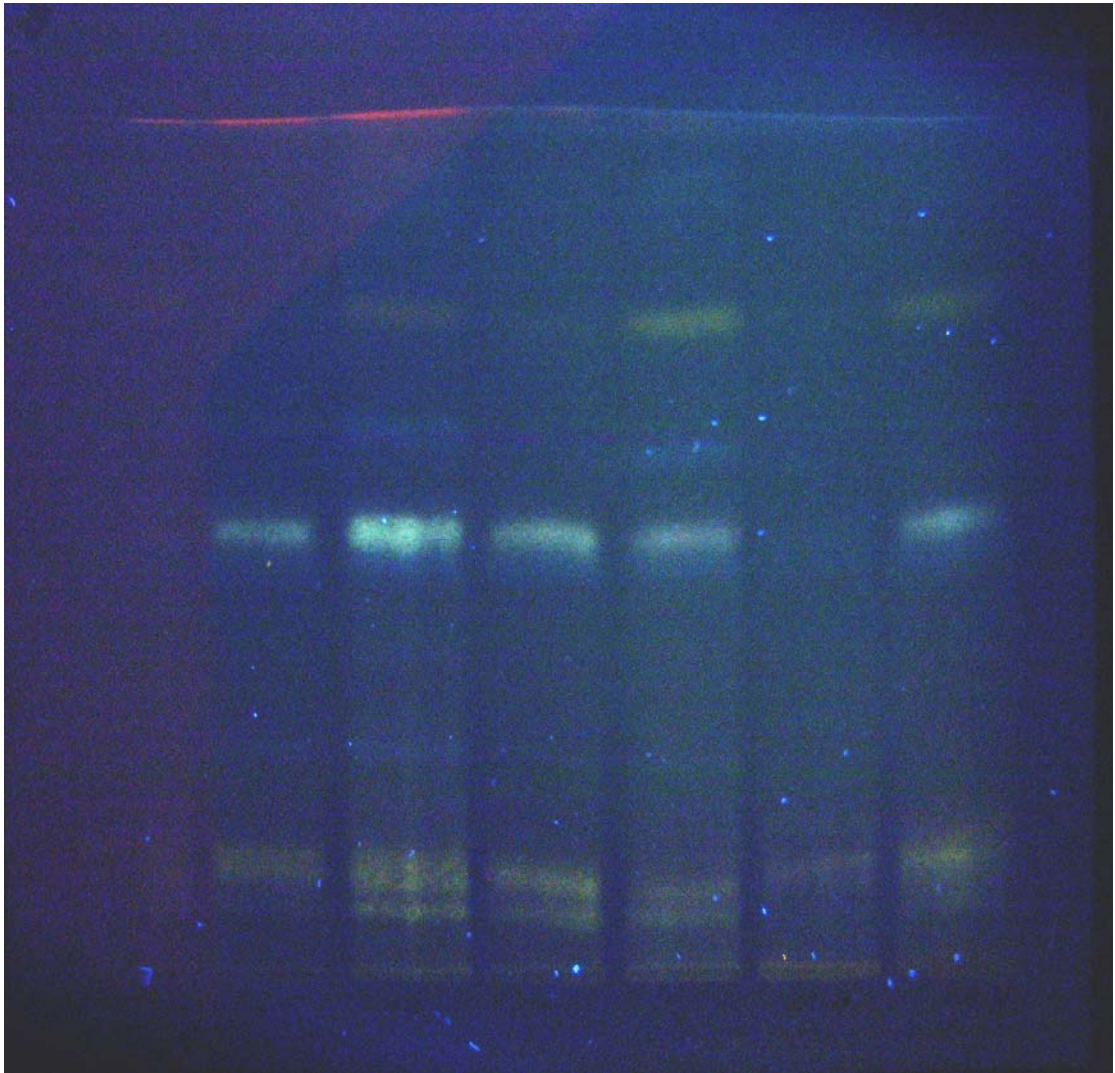
Abbildung 36: DC – Kontrolle der Fraktionen I von *Dryopteris filix mas*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400





Dfm 1	Dfm 2	Dfm 3	Dfm 4	Dfm 5	T07-1	L07-1fm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	---------

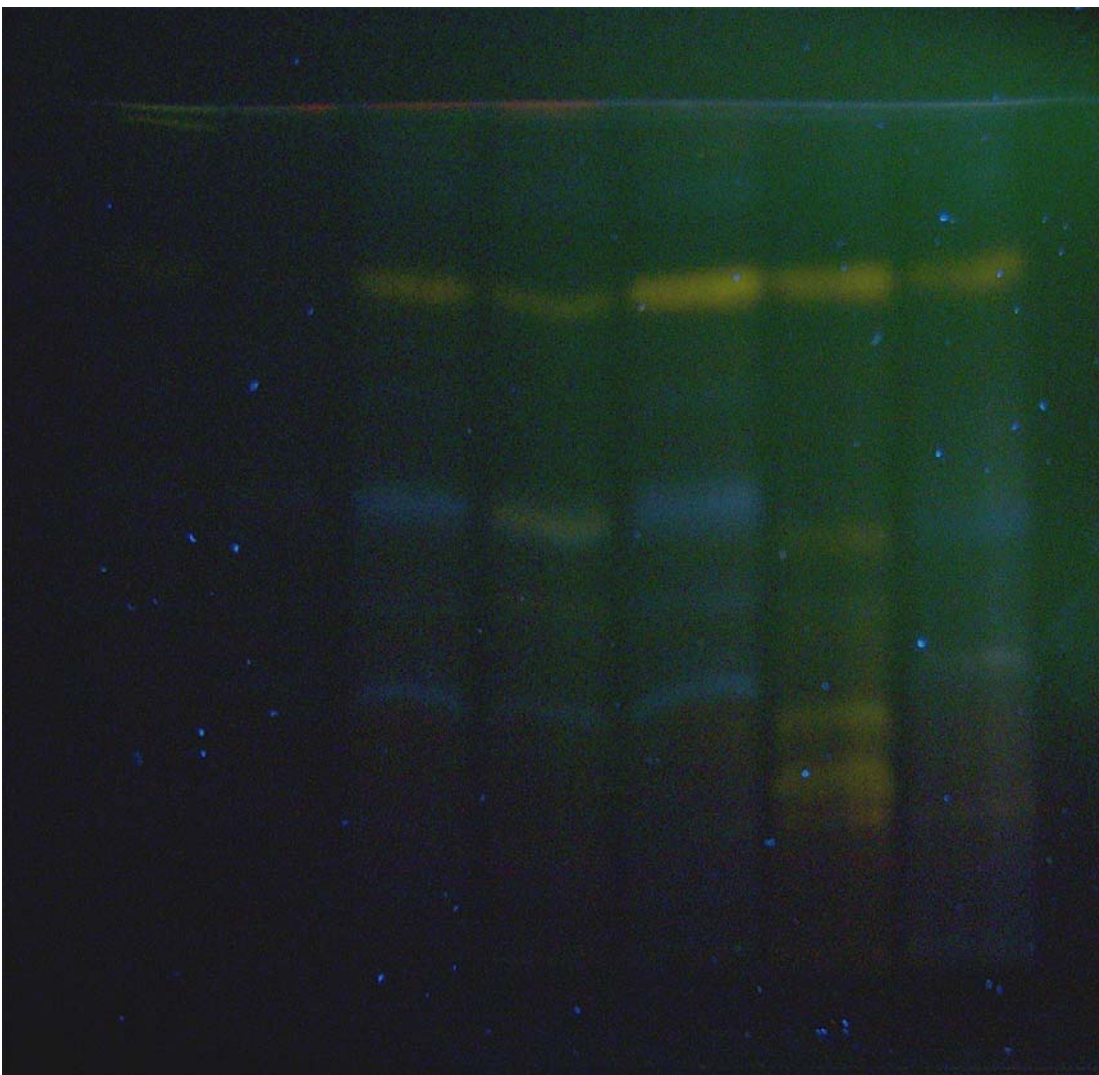
In Fraktion I wurden Chlorogensäure ( $R_f = 0,48$ ), eine dunkelblau fluoreszierende Bande direkt darunter, sowie Astragalin bei  $R_f = 0,76$  und polare Flavonoide im  $R_f$  – Bereich von 0,08 bis 0,16 detektiert.

Abbildung 37: DC – Kontrolle der Fraktionen II von *Dryopteris filix mas*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



Dfm 1	Dfm 2	Dfm 3	Dfm 4	Dfm 5	T07-1	L07-1fm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	---------

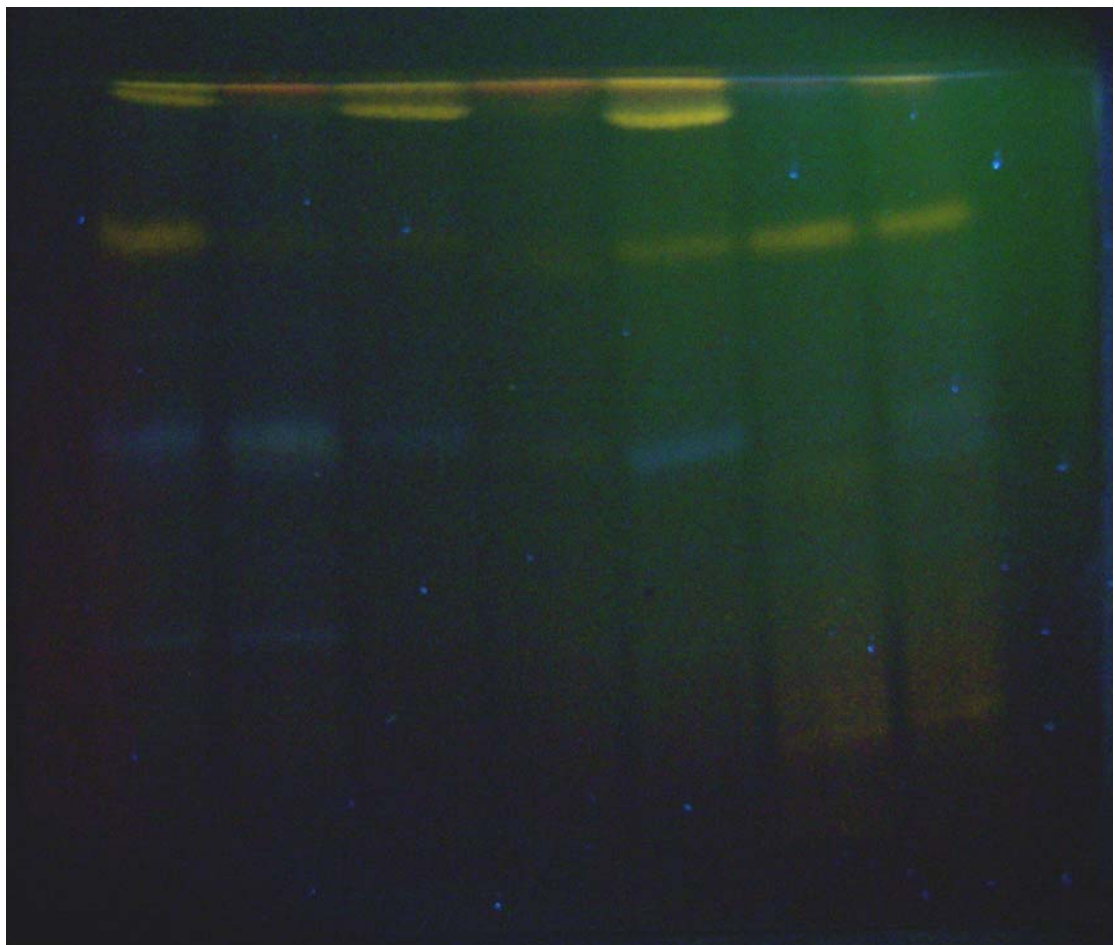
In den Fraktionen II war Chlorogensäure nur schwach zu sehen. Hauptkomponente war die gelbe Bande von Astragalin bei einem Rf – Wert von 0,78. In Probe T07-1 wurden außerdem gelb fluoreszierende Banden bei Rf- Werten von 0,16 bis 0,33 detektiert.

Abbildung 38: DC – Kontrolle der Fraktionen III von *Dryopteris filix mas*

Stationäre Phase: (a) DC Fertigplatte Kieselgel 60 F254

Mobile Phase: (1) Ethylacetat + konzentrierte Essigsäure + konzentrierte Ameisensäure + Wasser (100:11:11:26)

Detektion: Naturstoffreagens A/ PEG 400



Dfm 1	Dfm 2	Dfm 3	Dfm 4	Dfm 5	T07-1	L07-1fm
-------	-------	-------	-------	-------	-------	---------

Das Chromatogramm der Fraktionen III zeigte große qualitative Übereinstimmung mit jenem der Fraktionen II. Hauptkomponente in allen Proben war Astragalin ( $R_f = 0,8$ ). In den Proben Dfm1, Dfm3 und Dfm5 war eine gelb fluoreszierende Zone knapp unterhalb der Front erkennbar.

Die chemotaxonomischen Untersuchungen von *Dryopteris filix mas* zeigten sowohl im Einzelpflanzenvergleich als auch im Standortvergleich Astragalin und Chlorogensäure als Hauptkomponente sowie polare Flavonoide. In drei Proben des Einzelpflanzenvergleichs (Dfm1, Dfm3, Dfm5) wurde ausserdem eine gelb fluoreszierende Zone knapp unter der Front detektiert.

## 5. Zusammenfassung

Der erste Teil der Diplomarbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung der dritten Hauptkomponente des Flavonoidkomplexes von *Dryopteris dilatata*. Zu diesem Zweck wurden die polaren Inhaltstoffe eines Extrakt von *Dryopteris dilatata* mittels Festphasenextraktion aufkonzentriert und fraktioniert.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten eine Anreicherung der Flavonoide in der Fraktion, die mit 80%igem Methanol (Fraktion III) eluiert wurde. Die Flavonoide wurden mittels Gelpermeationschromatographie aufgetrennt und die Sammelfraktionen dünnschichtchromatographisch untersucht. In drei Sammelfraktionen konnte die unbekannte Komponente WR1 angereichert und durch nochmalige Säulenchromatographie annähernd rein dargestellt werden. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen nach einer Hydrolyse mit Kiliani – Reagens zeigten Kämpferol als Genin. Durch UV-VIS Spektroskopie unter Verwendung von Shiftreagenzien konnten die Stellen O3 und O7 als Bindungsstellen der Zucker bestimmt werden. Mittels NMR Spektroskopie und Massenspektrometrie konnte die unbekannte Komponente als Kämpferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid identifiziert werden.

Der zweite Teil der Diplomarbeit beschäftigte sich mit chemotaxonomischen Untersuchungen an vier Arten österreichischer Farne. Da diese Farne in der Volksmedizin ohne eine genaue botanische Zuordnung verwendet werden, stellte sich die Frage wie weit sich die polaren phenolischen Inhaltsstoffe verschiedener Arten innerhalb einer Art in Abhängigkeit von Standort und Erntejahr unterscheiden.

Im Flavonoidmuster von *Athyrium filix femina* zeigte sich abhängig von Standort und Erntejahr ein starker Unterschied. Der Einzelpflanzenvergleich des Standorts Schneeberg 2007 zeigte ein übereinstimmendes Muster mit Chlorogensäure als Hauptkomponenten. Die Flavonoide Astragalin und Isoquercitrin, die in einigen Proben der Standort- und Jahresvergleiche detektiert wurden, konnten in den Einzelpflanzen vom Schneeberg nicht nachgewiesen werden. Die Muster der Standort- und Jahresvergleiche zeigten ebenfalls Chlorogensäure in allen Proben, sowie Astragalin, Isoquercitrin und Caffeoyltatrat in einigen Mustern. Es konnte keine Korrelation zwischen Standort oder Erntejahr und Auftreten von Inhaltsstoffen hergestellt werden. Bei *Athyrium distentifolium* hingegen zeigte sich ein anderes Bild. Mit Astragalin, Isoquercitrin und Chlorogensäure zeigten die chemotaxonomischen Untersuchungen unabhängig von Standort und Erntejahr ein weitgehend übereinstimmendes Spektrum der polaren Phenole, allerdings in unterschiedlichen Intensitäten. Lediglich das Auftreten von Rutin in einzelnen Pflanzen stellte einen Unterschied dar.

In *Dryopteris dilatata* konnten Astragalin, Chlorogensäure und Caffeoyltatrat in allen Mustern, wenn auch in unterschiedlichen Intensitäten, detektiert werden. Isoquercitrin konnte nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden.

Bei *Dryopteris filix mas* wurden Astragalin und Chlorogensäure in allen Proben als Hauptkomponenten detektiert. Es zeigten sich jedoch Intensitätsunterschiede.

## 6. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: DC – Kontrolle der Vorläufe	15
Abbildung 2: DC – Kontrolle der Fraktionen I	16
Abbildung 3: DC – Kontrolle der Fraktionen II	17
Abbildung 4: DC – Kontrolle der Fraktionen III	19
Abbildung 5: DC der Sammelfraktionen 1 bis 9 von SC 1	22
Abbildung 6: DC der Sammelfraktionen 10 bis 17 von SC 1	23
Abbildung 7: DC der Sammelfraktionen 18 bis 25 von SC 1	24
Abbildung 8: DC der Sammelfraktionen 26 bis 33 von SC 1	25
Abbildung 9: DC einzelner Sammelfraktionen von SC 1 mit Vergleichssubstanzen	27
Abbildung 10: DC – Vergleich von SF 17 mit Astragalin und Isoquercitrin	28
Abbildung 11: DC Vergleich von SF 12 mit Rhoifolin	30
Abbildung 12: DC Vergleich von SF 12 mit Rhoifolin	30
Abbildung 13a: DC Vergleich von Sammelfraktionen mit Vergleichssubstanzen	31
Abbildung 13b: DC Vergleich von Sammelfraktionen mit Vergleichssubstanzen	32
Abbildung 13c: DC Vergleich von Sammelfraktionen mit Vergleichssubstanzen	33
Abbildung 14: DC Vergleich von SF 8 und SF 12 mit vorhandenen Fraktionen	35
Abbildung 15: DC der Sammelfraktionen von SC II	37
Abbildung 16: DC Vergleich des Genins von Substanz WR – 1 mit Kämpferol an Kieselgel	39
Abbildung 17: DC Vergleich des Genins von Substanz WR – 1 mit Kämpferol an Polyamid	40
Abbildung 18a: UV/VIS Spektrum von SF_SCII 4 in MeOH	41
Abbildung 18b: UV/VIS Spektrum von SF_SCII 4 in MeOH nach Zugabe von Aluminiumchlorid und konzentrierter Salzsäure	42
Abbildung 19: UV/VIS Spektrum von Kämpferol – 7 – O – neohesperosid	42
Abbildung 20: UV/VIS Spektrum von Astragalin	43
Abbildung 21: Struktur von Substanz WR - 1	44
Abbildung 22: DC – Kontrolle der Vorläufe von <i>Athyrium filix femina</i>	50
Abbildung 23: DC – Kontrolle der Fraktion I von <i>Athyrium filix femina</i>	51
Abbildung 24: DC – Kontrolle der Fraktion II von <i>Athyrium filix femina</i>	52
Abbildung 25: DC – Kontrolle der Fraktion III von <i>Athyrium filix femina</i>	53
Abbildung 26: DC – Kontrolle der Fraktionen II und III von <i>Athyrium filix femina</i>	55
Abbildung 27: DC – Kontrolle der Vorläufe von <i>Athyrium distentifolium</i>	58
Abbildung 28: DC – Kontrolle der Fraktionen I von <i>Athyrium distentifolium</i>	59
Abbildung 29: DC – Kontrolle der Fraktionen II von <i>Athyrium distentifolium</i>	60
Abbildung 30: DC – Kontrolle der Fraktionen III von <i>Athyrium distentifolium</i>	62
Abbildung 31: DC – Kontrolle der Fraktionen II und III von <i>Athyrium distentifolium</i>	63
Abbildung 32: DC – Kontrolle der Vorläufe von <i>Dryopteris dilatata</i>	66
Abbildung 33: DC – Kontrolle der Fraktionen I von <i>Dryopteris dilatata</i>	67
Abbildung 34: DC – Kontrolle der Fraktionen II und III von <i>Dryopteris dilatata</i>	69
Abbildung 35: DC – Kontrolle der Vorläufe von <i>Dryopteris filix mas</i>	72
Abbildung 36: DC – Kontrolle der Fraktionen I von <i>Dryopteris filix mas</i>	73
Abbildung 37: DC – Kontrolle der Fraktionen II von <i>Dryopteris filix mas</i>	74
Abbildung 38: DC – Kontrolle der Fraktionen III von <i>Dryopteris filix mas</i>	75

## 7. Tabellen

Tabelle	Seite
Tabelle 1: Probenliste	8
Tabelle 2: Ausbeuten der Fraktionen in g	14
Tabelle 3: Sammelfraktionen von SC 1	21
Tabelle 4: Sammelfraktionen von SC II	38
Tabelle 5: <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR Daten von Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosid-7-O-α-L-rhamnopyranosid	45
Tabelle 6: Ausbeuten der Fraktionen in mg von <i>Athyrium filix femina</i>	49
Tabelle 7: Ausbeuten der Fraktionen in mg von <i>Athyrium distentifolium</i>	57
Tabelle 8: Ausbeuten der Fraktionen in mg von <i>Dryopteris dilatata</i>	65
Tabelle 9: Ausbeuten der Fraktionen in mg von <i>Dryopteris filix mas</i>	71

## 8. Literaturverzeichnis

[1] G. Vogler, Polare phenolische Inhaltsstoffe in *Dryopteris filix mas* und *Dryopteris dilatata*, Universität Wien 2008

[2] A. Minkevičius. Lietuvos TSR Flora I. Vilnius 1959.

[3] E. Pemp, Analytik pharmazeutisch relevanter Flavonoide mittels HPLC/UV, HPLC/MS und HPLC/UV/MS, Universität Wien, 2005

[4] Veit M, Pauli GF. Major Flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Nat Prod* 1999;62:1301-3.

[5] Pauli GF. Higher Order and Substituent Chemical Shift Effects in the Proton NMR of Glycosides. *J Nat Prod* 2000;63:834-8.

[6] Imperato F. The first fern aurone and rare flavonoids from *Asplenium kauffussii*. *Chimica e l'Industria* (Milan, Italy) 1989; 71:86-7.

- [7] Mizuno M, Kyotani Y, Iinuma M, Tanaka T, Kojima H, Iwatsuki K. Kaempferol glycosides in *Asplenium scolopendrium* Newm. *Z Naturforschung C* 1990; 45:143-6.
- [8] Baek NI, Kennelly E J, Kardono LB S, Tsauri S, Padmawinata K, Soejarto DD, Kinghorn A D. Flavonoids and a proanthocyanidin from rhizomes of *Selliguea feei*. *Phytochemistry* 1994;36:513-8.
- [9] Li N, Li X, Zhang Y, Wang T, Xiao W. Free radical scavengers, antioxidants and aldose reductase inhibitors from *Camptosorus sibiricus* Rupr. *Z Naturforschung C* 2008;63:66-8.
- [10] Henning Haeupler, Thomas Muer: Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. Herausgegeben vom Bundesamt für Naturschutz Deutschland. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 2000, ISBN 3-8001-3364-4
- [11] Werner Rothmaler: Exkursionsflora für die Gebiete der DDR und der BRD. Band 2: Gefäßpflanzen, 14. Auflage. Volk und Wissen, Berlin 1988, ISBN 3-060-12539-2
- [12] Hans Martin Jahns: BLV Bestimmungsbuch Farne, Moose, Flechten. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München 1982, ISBN 3-405-11893-X
- [13] Watson, L., and Dallwitz, M.J. 2004 onwards. The ferns (Filicopsida) of the British Isles. Version: 3rd March 2008
- [14] Manfred A. Fischer: Exkursionsflora von Österreich, Stuttgart 1994, ISBN 3-8001-3461-6
- [15] Marbach / Kainz: BLV Naturführer Moose, Farne und Flechten, München 2002, ISBN 3-405-16323-4



## **9. Lebenslauf**

### **PERSÖNLICHE ANGABEN**

Name: Andreas Wendelin Rauch  
Geburtsdatum: 27.05.1979  
Adresse: Wedlgasse 3/10, 1030 Wien  
Telefon: 0664/3519938  
E-Mail: wendelin.rauch@gmail.com  
Staatsangehörigkeit: Österreich

### **SCHULAUSBILDUNG**

Seit 1997: UNIVERSITÄT WIEN  
PHARMAZIE  
Abschluss des ersten Studienabschnitts am 16. Jänner 2003  
Diplomarbeit März 2008 – Juli 2008

1989 – 1997: BRG 18 – SCHOPENHAUERSTRASSE 49  
Bundesrealgymnasium mit Darstellender Geometrie (ab der 7. Klasse)

1986 – 1990: VS COTTAGEGASSE